



**Rafael Machado Dornellas**

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de fungicidas da classe das estrobilurinas utilizando eletrodos de filme de bismuto e de diamante dopado com boro.**

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Rio de Janeiro  
Agosto de 2014



**Rafael Machado Dornellas**

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de fungicidas da classe das estrobilurinas utilizando eletrodos de filme de bismuto e de diamante dopado com boro.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof. Ricardo Queiroz Aucélio**

Orientador  
Departamento de Química - PUC-Rio

**Dra. Simone Carvalho Chiapetta**

INT – Rio

**Prof. Wagner Felipe Pacheco**

UFF

**Prof. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz**

UFU

**Prof. Renato Camargo Matos**

UFJF

**Prof. Pércio Augusto Mardini Farias**

Departamento de Química – PUC-Rio

**Prof. José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial do Centro  
Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2014

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

### **Rafael Machado Dornellas**

Graduou-se em Química (licenciatura e bacharelado) no ano de 2007 pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Tornou-se mestre em Química Analítica pela UFJF (2009), atuando em temas como cromatografia líquida, derivatização de amostras, carboidratos estruturais, forrageiras e metais em cachaça. Já atuou na área metalúrgica com supervisão de pessoal em linha de produção e divisão técnica de tratamento térmico do aço.

#### Ficha Catalográfica

Dornellas, Rafael Machado

Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de fungicidas da classe das estrobilurinas utilizando eletrodos de filme de bismuto e de diamante dopado com boro / Rafael Macahado Dornellas ; orientador: Ricardo Queiróz Aucélio. – 2014.

209 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2014.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Estrobilurinas. 3. Filme de bismuto. 4. Diamante dopado com boro. 5. Voltametria. 6. Amperometria. 7. Análise por injeção em batelada. I. Aucélio, Ricardo Queiróz. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Dedico a Deus acima de tudo, meus  
pais, familiares e amigos

## Agradecimentos

Ao professor Dr. Ricardo Queiroz Aucélio pela sua confiança no meu trabalho, ensinamentos, amizade, paciência e ajuda nos momentos que necessitei. Também agradeço pela sua exigência, que me propiciou aprofundar os meus conhecimentos, me tornando um profissional mais completo.

Ao professor Dr. Renato Camargo Matos por disponibilizar seu laboratório sempre que precisei, pelos conselhos, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz por ter me recebido tão bem em seu laboratório, por ter me transmitido novos conhecimentos, por ter me ajudado sempre que precisei e pela sua amizade.

A professora Dra. Aldaléa Lopes Brandes Marques por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por ter me transmitido novos conhecimentos.

A professora Dra. Andrea Rosana da Silva pela sua amizade, conselhos e ajuda sempre nos momentos que precisei.

Aos professores do Departamento de Química da PUC-Rio, que contribuíram com seus ensinamentos que levarei comigo na minha vida profissional.

Aos funcionários do Departamento de Química da PUC-Rio, Marlene, Carlos e principalmente a Fátima, pela ajuda durante todo esse tempo.

A equipe e amigos do LEEA, Ana Paula Lamounier, Cabrini Ferraz, Alessandra Licursi, Juliana Carvalho, Monica Vianna, Sarzamin Khan, Paulo Santos, Sônia Gomes, Leila Fialho, Adriana Doyle, Junior, Anastácia Silva, Ana Catalina,

Vanessa Franco, Luís, Helem, Alex e Juan pelas boas conversas e também por terem contribuído de alguma forma com o meu trabalho.

As minhas alunas de iniciação científica Ana Paula, Vanessa, Júlia e Daíza, pois sem o auxílio de vocês eu não teria conseguido realizar este trabalho.

Aos meus pais, Denise e Lúcio por me apoiarem, psicológica, afetiva e financeiramente na medida do possível, para que este sonho pudesse ser realizado.

Agradeço também pelo amor, paciência e por acreditarem sempre em mim e na minha capacidade.

Aos meus outros familiares por me apoiarem sempre, além do carinho recebido.

A minha namorada e futura esposa Francislene Juliana Martins pela paciência nos momentos difíceis do doutorado e da vida, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo e a ajuda na revisão do meu texto.

Ao CNPq que financiou a bolsa de pesquisa que propiciou meu doutoramento.

As agências FAPERJ, FINEP e PUC-Rio pela infraestrutura e financiamentos que possibilitaram a manutenção do laboratório.

## Resumo

Dornellas, Rafael Machado; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de fungicidas da classe das estrobilurinas utilizando eletrodos de filme de bismuto e de diamante dopado com boro.** Rio de Janeiro, 2014. 209p. Tese de doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O monitoramento de resíduos de pesticidas é extremamente importante e isso se dá pelo emprego de métodos analíticos adequados para avaliar a sua presença em compartimentos ambientais e a contaminação de alimentos com esses agentes. Os pesticidas da classe das estrobilurinas vêm se tornando os mais utilizados para o controle dos fungos e apesar da propagada baixa toxicidade e rápida degradação, estudos devem ser realizados para averiguar o nível de exposição dos humanos a tais substâncias. Estudos com as estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) utilizando o eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro (DDB) foram realizados por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada (SWV) e indicaram dois picos de oxidação (varredura anódica) em potenciais distintos. Dados experimentais e da literatura permitiram supor que para cresoxim-metílico e dimoxistrobina o primeiro pico de oxidação tem um mecanismo irreversível com 2 mols de elétrons por mol de analito e o segundo pico de oxidação com mecanismo quase-reversível. Para picoxistrobina, os dois picos de oxidação são irreversíveis com 2 mols de elétrons por mol de analito. Para piraclostrobina os dois picos de oxidação são quase-reversíveis. Métodos por SWV foram desenvolvidos utilizando DDB para determinação de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina. As varreduras anódicas foram feitas entre: +1000 a +1750 mV (medição do sinal em +1420 mV) para cresoxim-metílico; +1100 a +1800 mV (medição do sinal em +1450 mV) para picoxistrobina e +1050 a +2100 mV (medição do sinal em +1280 mV) para piraclostrobina. O eletrólito suporte foi tampão acetato (0,05 mol L<sup>-1</sup>; pH 4,0) para a determinação de cresoxim-metílico e piraclostrobina e tampão Britton-Robinson (0,04 mol L<sup>-1</sup>; pH 2,0) para a picoxistrobina. Resposta analítica linear

para cresoxim-metílico foi do limite de quantificação, LOQ, ( $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ ) até  $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com  $R^2 > 0,999$ . Para picoxistrobina a faixa linear foi do LOQ ( $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) a  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0,994$ ). Já para piraclostrobrina a faixa linear foi do LOQ ( $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $0,32 \text{ mg L}^{-1}$ ) a  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0,991$ ). Os métodos foram aplicados na análise de amostras de suco de uva (cresoxim-metílico e piraclostrobrina) e águas naturais (picoxistrobina e piraclostrobrina). As recuperações variaram de 91,6 a 105,3% dependendo da estrobilurina. Os métodos propostos foram comparados com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os resultados não indicaram diferença significativa entre eles. Amostras de suco de uva comercial foram fortificadas na concentração do limite máximo permitido pela legislação, sendo o analito pré-concentrado dez vezes por extração em fase sólida (SPE), com cartucho C18, obtendo-se recuperações entre 95,4 a 99,5% dependendo da estrobilurina. Dados experimentais indicaram que não houve degradação térmica significativa para as estrobilurinas em soluções aquecidas a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h. Não foi possível propor um perfil simples de cinética para degradação por exposição ao UV para o cresoxim-metílico. Para picoxistrobina e piraclostrobrina, um modelo de cinética de segunda ordem pode ser atribuído para a degradação por exposição ao UV. Métodos com a abordagem de análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica no eletrodo de DDB foram desenvolvidos para a determinação de dimoxistrobina e picoxistrobina em águas naturais. Os métodos apresentaram uma frequência de análise de 180 injeções  $\text{h}^{-1}$  (dimoxistrobina) e 108 injeções  $\text{h}^{-1}$  (picoxistrobina), e precisão satisfatória (abaixo de 5%). Resposta analítica linear para dimoxistrobina foi de  $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,41 \text{ mg L}^{-1}$ ) a  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com  $R^2 > 0,999$  e para picoxistrobina foi de  $5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $1,95 \text{ mg L}^{-1}$ ) e  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0,999$ ). Valores de recuperação obtidos nas amostras de águas naturais fortificadas com os analitos foram entre 80,2 e 105,6% dependendo do analito. Além disso, uma estratégia simples para detectar a presença de moléculas interferentes em amostras de água com base na amperometria de múltiplos pulsos foi apresentada com sucesso. Um método voltamétrico de redissolução anódica por pulso diferencial usando o eletrodo de filme de bismuto foi desenvolvido para a determinação de picoxistrobina em amostras de urina e águas naturais. O ciclo de medição começou com a aplicação de um potencial de deposição de  $-700 \text{ mV}$  durante 60 s para a formação *in situ* do



filme Bi e a acumulação do analito. A varredura de potencial foi no sentido anódico entre +790 e +1050 mV. Provou-se que, nas condições empregadas, uma quantidade significativa de filme de Bi ainda está presente na superfície do eletrodo de carbono vítreo após a varredura anódica, com uma velocidade de 40 mV s<sup>-1</sup>. A presença de Bi é fundamental para a acumulação e oxidação de picoxistrobina (pico máximo em +954 mV) durante redissolução. O eletrólito suporte foi HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Um procedimento de limpeza foi desenvolvido a fim de minimizar o efeito de memória. Resposta analítica linear para picoxistrobina foi observada de 2,8 µmol L<sup>-1</sup> (1,0 mg L<sup>-1</sup>) até 19,0 µmol L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> > 0,994). SPE permitiu a pré-concentração do analito e eliminou as interferências nas amostras de urina. Recuperações de 89,3 a 104,8% foram encontradas e a interferência das outras estrobilurinas ao método foram avaliadas. O método proposto foi comparado com HPLC e os resultados indicam que não houve diferença significativa entre eles.

## **Palavras-chave**

Estrobilurinas; filme de bismuto; diamante dopado com boro; voltametria; amperometria e análise por injeção em batelada.

## Abstract

Dornellas, Rafael Machado; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor). **Electroanalytical methods for the determination of fungicides of the strobilurin class using the bismuth film electrode and the boron-doped diamond.** Rio de Janeiro, 2014. 209p. DSc. Thesis – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The monitoring of pesticide residues is extremely important and this is accomplished by the use of methods to assess their presence in environmental compartments and in food stuff contaminated with these agents. The pesticides of the strobilurin class have become the most widely used for fungi control and despite the low toxicity and rapid degradation, studies should be conducted to ascertain the level of human exposure to such substances. Studies with the strobilurin pesticides (azoxystrobin, kresoxim-methyl, dimoxystrobin, fluoxastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin and trifloxystrobin) were performed by cyclic voltammetry and square wave voltammetry (SWV) using the boron-doped diamond (BDD). Results indicated two oxidation peaks (anodic scan) at different potentials. Based on experimental data and literature it is assumed that for kresoxim-methyl and dimoxystrobin the first oxidation peak comes from an irreversible mechanism involving 2 moles of electrons per mole of analyte while the second oxidation peak is from a quasi-reversible mechanism. For picoxystrobin, the two oxidation peaks are from irreversible processes involving 2 moles of electrons per mole of analyte. For pyraclostrobin, the two oxidation peaks are from quasi-reversible processes. SWV methods were developed for determination of kresoxim-methyl, pyraclostrobin and picoxystrobin using the BDD. The anodic scans were made between: +1000 to +1750 mV (measured signal at +1420 mV) for kresoxim-methyl; +1100 to +1800 mV (measured signal at +1450 mV) for picoxystrobin and +1050 to +2100 mV (measured signal at +1280 mV) for pyraclostrobin. The supporting electrolyte was acetate buffer (0.05 mol L<sup>-1</sup>, pH 4.0) for the determination of kresoxim-methyl and pyraclostrobin and Britton-Robinson buffer (0.04 mol L<sup>-1</sup>, pH 2.0) to picoxystrobin. Linear analytical response to kresoxim-methyl was the limit

of quantification, LOQ ( $0.9 \mu\text{mol L}^{-1}$  or  $0.27 \text{ mg L}^{-1}$ ) to  $34.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  with  $R^2 > 0.999$ . For picoxystrobin the linear range was from LOQ ( $0.7 \mu\text{mol L}^{-1}$  or  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ) to  $20.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0.994$ ). Pyraclostrobin presented linear range from LOQ ( $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0.32 \text{ mg L}^{-1}$ ) to  $20.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0.991$ ). The methods were applied in the analysis of grape juice samples (kresoxim-methyl and pyraclostrobin) and in natural waters (picoxystrobin and pyraclostrobin). The recoveries ranged from 91.6 to 105.3% depending on the strobilurin. The results obtained with the proposed methods were compared with the ones achieved by high performance liquid chromatography (HPLC) indicating no significant difference between them. Commercial grape juice samples were fortified at the maximum concentration allowed legislation and the analytes were pre-concentrated (tenfold) by solid phase extraction (SPE) in a C18 cartridge analyte Recoveries were between 95.4 to 99.5 % depending on the strobilurin. Experimental data indicate that no significant thermal degradation occurred for strobilurins in solutions heated at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 2 h. It was not possible to propose a simple kinetic profile for the UV degradation of kresoxim-methyl. However, for picoxystrobin and pyraclostrobin, a second-order kinetic model explains their degradation profile. Methods using batch injection analysis (BIA) with amperometric detection on a BDD electrode have also been developed for the determination of picoxystrobin and dimoxystrobin in natural waters. The methods showed an analytical frequency of  $180 \text{ injections h}^{-1}$  (dimoxystrobin) and  $108 \text{ injections h}^{-1}$  (picoxystrobin) and satisfactory precision (less than 5%). Linear analytical response for dimoxystrobin was from  $1.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0.41 \text{ mg L}^{-1}$ ) to  $60.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  with  $R^2 > 0.999$  while for picoxystrobin, the range was from  $5.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $1.95 \text{ mg L}^{-1}$ ) to  $100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0.999$ ). Recoveries achieved for analyte fortified water samples were between 80.2 and 105.6% depending on the analyte. In addition, a simple strategy to detect the presence of interfering molecules in water samples, based on multiple pulse amperometry, was successfully introduced. A stripping anodic differential pulse voltammetric method using the bismuth film electrode was developed for the determination picoxystrobin in urine samples and in natural waters. The measurement cycle started with the application of a deposition potential of  $-700 \text{ mV}$  for 60 s for the *in situ* formation of the Bi film and for the accumulation of analyte. The potential was scanned in the anodic direction between  $+790$  and  $+1050 \text{ mV}$ . It has been proven that, under the conditions employed, a significant amount of Bi film is still present on the surface

of the glassy carbon electrode after anodic sweep, with a speed of  $40 \text{ mV s}^{-1}$ . The presence of Bi is essential for the accumulation and oxidation of picoxystrobin (maximum peak at +954 mV) during stripping. The supporting electrolyte was HCl  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ . A cleaning procedure was developed to minimize the memory effect. Analytical linear response was observed for picoxystrobin from  $2.8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) to  $19.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 > 0.994$ ). SPE allowed the pre-concentration of the analyte and elimination of interferences from urine samples. Recoveries from 89.3 to 104.8% were found. Interference of other strobilurin the method were evaluated. The proposed method was compared with HPLC and the results indicate no significant difference between them.

## Keywords

Strobilurins; bismuth film; boron-doped diamond; voltammetry; amperometry and batch injection analysis.

## Sumário

1. Contextualização do trabalho.	34
1.1. Objetivos.	35
1.1.1. Objetivos gerais.	35
1.1.2. Objetivos específicos.	35
•Desenvolvimento de métodos voltamétricos com varredura de potencial do tipo onda quadrada (SWV) para a determinação cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina e estudo do comportamento eletroquímico das estrobilurinas em meio aquoso usando o DDB.	35
•Desenvolvimento de métodos baseados no uso da abordagem BIA para determinar dimoxistrobina e picoxistrobina.	36
•Desenvolvimento métodos voltamétricos, com varredura de potencial do tipo pulso diferencial, utilizando bife para determinar picoxistrobina e comprovar a viabilidade do uso do bife com potenciais acima do de oxidação do Bi.	37
1.2. Estrutura da tese.	38
2. Introdução.	40
2.1. Pesticidas.	40
2.1.1. Estrobilurinas.	42
2.1.1.1. Estrobilurinas naturais.	42
2.1.1.2. Estrobilurinas sintéticas.	43
2.1.1.3. Atividade e toxicidade das estrobilurinas sintéticas.	47
2.1.1.4. Utilização de estrobilurinas como fungicida em lavouras.	48
2.1.1.5. Métodos analíticos para a determinação de estrobilurinas.	53
2.2. Voltametria.	61
2.2.1. Voltametria de pulso diferencial (DPV).	66
2.2.2. Voltametria de onda quadrada (SWV).	68
2.2.3. Voltametria de redissolução e voltametria adsortiva de redissolução.	71

2.2.4. Voltametria cíclica (CV)	72
2.3. Amperometria	74
2.4. Análise por injeção em batelada (BIA).	75
2.5. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).	78
2.6. Eletrodos de filme metálico.	80
2.6.1. Eletrodo de filme de bismuto (BiFE).	80
3. Material e métodos.	83
3.1. Reagentes.	83
3.2. Soluções e amostras.	83
3.3. Materiais.	84
3.4. Instrumentação.	85
3.4.1. Analisadores voltamétricos.	85
3.4.2. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.	87
3.4.3. Reator fotoquímico.	87
3.4.4. Outros equipamentos.	88
3.5. Procedimentos nas determinações voltamétricas e por bia- amperometria das estrobilurinas com eletrodo de trabalho de DDB.	89
3.5.1. Preparo das soluções padrões de dimoxistrobina e picoxistrobina para as determinações por BIA-amperometria.	89
3.5.2. Preparo das amostras.	89
3.5.2.1. Preparo das amostras para a determinação de cresoxim- metílico por SWV.	89
3.5.2.2. Preparo das amostras para determinação de dimoxistrobina por BIA-amperometria.	90
3.5.2.3. Preparo das amostras para determinação de picoxistrobina por SWV e BIA-amperometria.	90
3.5.2.4. Preparo das amostras para determinação de piraclostrobina por SWV.	91
3.5.3. Caracterização da amostra de água da Lagoa Rodrigo de Freitas.	92
3.5.4. Procedimento para ativação do eletrodo de DDB.	92
3.5.5. Procedimento de limpeza do eletrodo de DDB.	92
3.5.6. Procedimento para as medições eletroquímicas de cresoxim- metílico, picoxistrobina e piraclostrobina por SWV.	93

3.5.7. Procedimentos para determinações de dimoxistrobina e picoxistrobina com a abordagem BIA-amperometria e eletrodo de DDB.	94
3.5.8. Procedimento para a determinação de cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina por HPLC.	95
3.5.9. Estudo do mecanismo redox e transferência de massa para as estrobilurinas no eletrodo de DDB.	96
3.5.10. Cálculo da área eletroativa do eletrodo de DDB.	96
3.5.11. Estudo da degradação por exposição ao UV de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.	97
3.5.12. Estudo da degradação térmica de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.	97
3.5.13. Estudo na eficiência do processo de pré-concentração com SPE no cartucho C18 para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.	98
3.6. Metodologia de trabalho para a determinação voltamétrica de picoxistrobina em filme de bismuto (BiFE).	99
3.6.1. Preparo das amostras.	99
3.6.2. Procedimento de limpeza dos eletrodos.	99
3.6.3. Procedimento para medição eletroquímica.	100
4. Desenvolvimento de métodos voltamétricos com varredura de potencial do tipo onda quadrada para a determinação cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina e estudo do comportamento eletroquímico das estrobilurinas em meio aquoso usando o DDB.	101
4.1. Testes preliminares.	101
4.2. Estudo do mecanismo redox e transferência de massa para as estrobilurinas no eletrodo de DDB.	105
4.3. Seleção das condições experimentais e instrumentais.	117
4.3.1. Estudo do eletrólito suporte.	117
4.3.2. Estudo da frequência, amplitude e incremento de varredura.	120
4.4. Desempenho analítico.	125
4.5. Aplicação dos métodos.	134

4.6. Estudo da degradação térmica e fotoquímica (por exposição ao UV) de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.	138
4.7. Estudo na eficiência do processo de pré-concentração para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.	143
5. Desenvolvimento de métodos baseados no uso da abordagem BIA para determinar dimoxistrobina e picoxistrobina.	146
5.1. Otimização dos parâmetros para determinação de dimoxistrobina e picoxistrobina na célula BIA.	146
5.1.1. Estudo do ph e potencial aplicado.	146
5.1.2. Estudo da agitação na solução do eletrólito suporte.	149
5.1.3. Estudo da velocidade e volume de injeção.	150
5.2. Desempenho analítico.	155
5.3. Aplicação dos métodos de BIA-amperometria.	159
6. Voltametria de pulso diferencial para determinar picoxistrobina mostrando a viabilidade do uso do eletrodo de filme de bismuto em potenciais acima do de oxidação do Bi.	166
6.1. Testes preliminares.	166
6.2. Avaliação da oxidação do filme de bismuto após a varredura anódica de potencial.	168
6.3. Estudo do mecanismo redox de picoxistrobina e sua próton-dependência no filme de bismuto.	172
6.4. Seleção das condições experimentais e instrumentais.	174
6.4.1. Estudo do eletrólito suporte.	175
6.4.2. Estudo do procedimento de limpeza eletroquímica no carbono vítreo.	177
6.4.3. Estudo da concentração de $\text{Bi}^{3+}$ na célula eletroquímica.	178
6.4.4. Estudo do tempo de deposição.	179
6.4.5. Estudo do potencial de deposição.	181
6.4.6. Otimização da velocidade de varredura e amplitude de pulso.	182
6.5. Desempenho analítico.	183
6.6. Aplicação do método.	188



7. Conclusão.	191
7.1. Perspectivas de trabalhos futuros.	194
Referências bibliográficas.	195

## Lista de figuras

- Figura 1 - Estrutura básica das estrobilurinas naturais. Fonte: Adaptado de BALBA, 2007. 43
- Figura 2 - Estrutura básica das estrobilurinas naturais:  
A - (E)- $\beta$ -metoxiacrilato; e seus análogos sintéticos: B - (E)-metoxiiminoacetato, C - (E)metoxiimino-N-metilacetamida, D - dihidro-dioxazina-metanona-O-metiloxima. 45
- Figura 3 - Representação esquemática da dupla camada elétrica segundo a síntese de Stern dos modelos propostos por Helmholtz, Gouy e Chapman, onde:  $\sigma^i$  é a camada interna e  $\sigma^d$  a camada de difusão. Fonte: Adaptado de TICIANELLI e GONZALEZ, 2005. 64
- Figura 4 - Estratégias de aplicação da taxa de variação de potencial:  
A) Voltametria com varredura linear; B) voltametria de varredura do tipo cíclico; C) voltametria com varredura do tipo pulso diferencial e D) voltametria com varredura do tipo onda quadrada. Fonte: Adaptado de SKOOG, *et. al*, 2002. 66
- Figura 5 - Aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial. A corrente é amostrada em  $S_1$  e  $S_2$  e a diferença entre elas é que é registrada:  $I = I_{S_2} - I_{S_1}$ , sendo  $t$  o tempo. Fonte: Adaptado de SKOOG, *et. al*, 2002. 67
- Figura 6 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Onde:  $a$  é a amplitude de pulso;  $\Delta E_s$  é o incremento de varredura e  $\tau$  é o tempo. Fonte: Adaptado de SOUZA, *et. al*, 2003. 68
- Figura 7 - a) Diagrama esquemático da primeira célula BIA: A - eletrodo de trabalho; B - eletrodo auxiliar; C - eletrodo de referência; D - ponteira da micropipeta; E - orifício para preenchimento da célula; F - barra de agitação; G - dreno. b) Etapas envolvidas em uma injeção no BIA. Fonte: Adaptado de WANG e TAHA, 1991 e QUINTINO e ANGNES, 2004. 77

Figura 8 - Célula eletroquímica de Teflon construída no laboratório:  
 (A) Eletrodo auxiliar de platina; (B) Eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ; (C) Eletrodo de trabalho de DDB. 85

Figura 9 – 1) Representação esquemática de uma célula para realização dos experimentos de BIA-amperometria: (A) Eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ; (B) eletrodo auxiliar; (C) ponteira plástica de micropipeta eletrônica do tipo Combitip®; (D) barra de Teflon utilizada como agitador; (E) placa de cobre para estabelecer contato elétrico com o potenciostato; (F) Anel de vedação de borracha; (G) eletrodo de DDB.  
 2) Foto da célula utilizada na abordagem BIA-amperometria. Fonte: Adaptado de TORMIN *et al.*, 2011. 86

Figura 10 - 1) Representação esquemática do reator fotoquímico utilizado no estudo da degradação UV das estrobilurinas, onde: (A) Sentido do fluxo de ar no reator; (B) tubos de quartzo; (C) extrator de ar (mesa com ventilador de notebook); (D) lâmpadas de vapor de mercúrio. 2) Foto do interior do fotoreator com duas lâmpadas ligadas. Fonte: Adaptado de ANTONIO, 2012. 88

Figura 11 – Voltamogramas com uma varredura anódica de potencial em uma faixa de 0 a +2200 mV para as estrobilurinas utilizando eletrodo de trabalho de DDB. (A) azoxistrobina ( $E_{p1} = +1390$  mV e  $E_{p2} = +1958$  mV); (B) cresoxim-metílico ( $E_{p1} = +1420$  mV e  $E_{p2} = +1700$  mV); (C) dimoxistrobina ( $E_{p1} = +1350$  mV e  $E_{p2} = +1750$  mV); (D) fluoxastrobina ( $E_p = +1884$  mV); (E) picoxistrobina ( $E_{p1} = +1450$  mV e  $E_{p2} = +1914$  mV); (F) piraclostrobin ( $E_{p1} = +1280$  mV e  $E_{p2} = +1650$  mV) e (G) trifloxistrobina ( $E_{p1} = +1734$  mV e  $E_{p2} = +2048$  mV). Parâmetros instrumentais: 25 mV de amplitude de pulso; 15 mV de incremento de varredura; 30 Hz de frequência e célula contendo tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). Traço pontilhado é o voltamograma da mistura de tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). 102

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos obtidos para as estrobilurinas utilizando como eletrodo de trabalho o DDB. (A) azoxistrobina; (B) cresoxim-metílico; (C) dimoxistrobina; (D) fluoxastrobina; (E)

picoxistrobina; (F) piraclostrobina e (G) trifloxistrobina. Parâmetros instrumentais: 100 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; 5 mV de incremento de varredura e célula contendo tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). Traço pontilhado é o voltamograma da mistura de tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). 103

Figura 13 – Voltamogramas obtidos com uma varredura anódica de potencial em uma faixa de +1400 a +2200 mV para as fluoxastrobina utilizando como eletrodo de trabalho o DDB. Parâmetros instrumentais: 25 mV de amplitude de pulso; 15 mV de incremento de varredura; 30 Hz de frequência e célula contendo tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). 104

Figura 14 - (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico de cresoxim-metílico ( $I_p$ ) de cresoxim-metílico. (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico. 107

Figura 15 - (A) Potencial de pico ( $E_p$ ) em função do logaritmo da frequência ( $\log f$ ) aplicada a uma amplitude de pulso ( $a$ ) de 30 mV. (B) Variação da corrente de pico ( $I_p$ ) em função de  $a$  para  $f$  de 30 Hz. Parâmetros instrumentais: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura e 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico. 108

Figura 16 - Mecanismos propostos para a oxidação de cresoxim-metílico. 110

Figura 17 - (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico de cresoxim-metílico ( $I_p$ ). (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento

de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico.

111

Figura 18 – (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico ( $I_p$ ) da dimoxistrobina. (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina.

112

Figura 19 – (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico ( $I_p$ ) de dimoxistrobina. (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina.

113

Figura 20 - (A) Corrente de pico em função de frequência ( $f$ ). (B) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura em função de  $I_p$  de picoxistrobina. (1) Pico de oxidação com máximo em +1450 mV e (2) pico de oxidação com máximo em +1950 mV. Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração

final de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de picoxistrobina. 114

Figura 21 - (A) Corrente de pico em função de frequência (*f*). (B) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura em função de *I<sub>p</sub>* de piraclostrobina. (1) Pico de oxidação com máximo em +1280 mV e (2) pico de oxidação com máximo em +1650 mV.

Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de piraclostrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de piraclostrobina. 116

Figura 22 – Influência do pH no eletrólito suporte para a área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 a 12,0 foi o eletrólito suporte; 40 Hz de frequência; 10 Mv de incremento de varredura; 20 mV de amplitude de pulso e 9,9 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de cada estrobilurina na célula. 118

Figura 23 – Influência na concentração da solução de tampão acetato na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão acetato pH 4,0 foi o eletrólito suporte; 40 Hz de frequência; 10 mV de incremento de varredura; 20 mV de amplitude de pulso e 9,9 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de cada estrobilurina na célula. 119

Figura 24 – Influência da amplitude de pulso (*a*) na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão acetato (0,05 mol L<sup>-1</sup>) pH 4,0, para cresoxim-metílico e piraclostrobina e tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 4,0 para picoxistrobina foram os eletrólitos suporte; 40 Hz de frequência;

10 mV de incremento de varredura e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula. 120

Figura 25 – Influência da frequência de pulso ( $f$ ) na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobrina.

Parâmetros instrumentais: tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0, para cresoxim-metílico e piraclostrobrina e tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0 para picoxistrobina foram os eletrólitos suporte; 50 mV de amplitude para cresoxim-metílico e picoxistrobina e 40 mV de amplitude para piraclostrobrina; 10 mV de incremento de varredura e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula. 121

Figura 26 – Influência do incremento de varredura na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobrina.

Parâmetros instrumentais: tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0, para cresoxim-metílico e piraclostrobrina e tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0 para picoxistrobina foram os eletrólitos suporte; 50 mV de amplitude para cresoxim-metílico e picoxistrobina e 40 mV de amplitude para piraclostrobrina; 30 Hz de frequência e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula. 122

Figura 27 – Voltamogramas característicos utilizando eletrodo de trabalho DDB nas condições experimentais escolhidas para: (A) cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobrina. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 8 para cresoxim-metílico; ver Tabela 9 para picoxistrobina; ver Tabela 10 para piraclostrobrina e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula. 124

Figura 28 - (A) Voltamogramas de concentrações crescentes de cresoxim-metílico: (A) branco; (B)  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (C)  $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (D)  $12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (E)  $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (F)  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (G)  $23,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (H)  $27,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (I)  $31,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (J)  $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

(B) Curva analítica com  $Y = (3,3 \times 10^{-2} \pm 2,5 \times 10^{-4} \mu\text{A L mol}^{-1}) X - (2,1 \times 10^{-3} \pm 5,3 \times 10^{-3})$  e  $R^2 = 0,9995$ . Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 8. 126

Figura 29 – Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) branco e (B) por uma concentração de cresoxim-

metílico equivalente ao LOQ ( $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 8. 127

Figura 30 - (A) Voltamogramas de concentrações crescentes de picoxistrobina: (A) branco; (B)  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (C)  $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (D)  $12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (E)  $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (F)  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica com  $Y = (2,0 \times 10^{-2} \pm 7,1 \times 10^{-4} \mu\text{AL mol}^{-1}) X + (1,1 \times 10^{-2} \pm 8,4 \times 10^{-3})$  e  $R^2=0,9941$ . Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 9. 128

Figura 31 – Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) branco e (B) por uma concentração de picoxistrobina equivalente ao LOQ ( $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 9. 129

Figura 32 - (a) Voltamogramas de concentrações crescentes de piraclostrobina: (A) branco; (B)  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (C)  $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (D)  $12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (E)  $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (F)  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (b) Curva analítica com  $Y = (5,5 \times 10^{-2} \pm 2,3 \times 10^{-3} \mu\text{AL mol}^{-1}) X + (4,5 \times 10^{-2} \pm 2,7 \times 10^{-3})$  e  $R^2= 0,9912$ . Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 10. 130

Figura 33 - Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) Branco e (B) por uma concentração de piraclostrobina equivalente ao LOQ ( $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o (A) branco. Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 10. 131

Figura 34 – (A) Degradação de cresoxim-metílico (%) em função do tempo de exposição à radiação UV. (B) Log da razão entre a concentração inicial ( $C_0$ ) e a concentração medida (C) de cresoxim-metílico em função do tempo. (C) Relação entre o inverso da concentração de cresoxim-metílico e o tempo. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 8. 139

Figura 35 - (A) Degradação de picoxistrobina (%) em função do tempo de exposição à radiação UV. (B) Cinética de segunda ordem para degradação de picoxistrobina com  $k= 1,06 \times 10^3$  e  $t_{1/2} = 1,6 \text{ min}$ . Parâmetros instrumentais: ver Tabela 9. 140



- Figura 36 - (A) Degradação de piraclostrobina (%) em função do tempo de exposição à radiação UV. (B) Cinética de segunda ordem para degradação de piraclostrobina com  $k= 1,02 \times 10^2$  e  $t_{1/2} = 9,8$  min. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 10. 142
- Figura 37 - Voltamogramas hidrodinâmicos de (A) dimoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) picoxistrobina ( $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em soluções de tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para diferentes valores: (A) 2,0; (B) 4,0; (C) 6,0; (D) 8,0; (E) 10,0; (F) 12,0; obtidos através da corrente de pico em função dos pulsos de potenciais aplicados (+1100 a +2000 mV). Velocidade de injeção:  $11,6 \text{ mL min}^{-1}$  para dimoxistrobina e  $9,6 \text{ mL min}^{-1}$  para picoxistrobina; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ . 147
- Figura 38 – Velocidade de agitação da solução na célula BIA em função da corrente de pico para dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Velocidade de injeção:  $11,6 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; eletrólito suporte: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH=10 e 0 a 560 rpm de agitação. 150
- Figura 39 - Efeito da variação na velocidade de injeção sobre a corrente de pico para as estrobilurinas: (A) dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) picoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 10,0 para dimoxistrobina e pH 2,0 para picoxistrobina; potencial de trabalho +1900 mV; volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$  e 280 rpm de agitação para dimoxistrobina. 152
- Figura 40 - Efeito do volume de injeção sobre a corrente de pico: (A) dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) picoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 10,0 para dimoxistrobina e pH 2,0 para picoxistrobina; potencial de trabalho +1900 mV; velocidade de injeção de  $20,7 \text{ mL min}^{-1}$  para dimoxistrobina e de  $13,3 \text{ mL min}^{-1}$  para picoxistrobina e 280 rpm de agitação para dimoxistrobina. 153
- Figura 41 – Biagrama mostrando injeções sequenciais de uma solução de: (A) dimoxistrobina nos níveis de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (a) e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (b); (B) picoxistrobina nos níveis de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (c) e  $20,0$

$\mu\text{mol L}^{-1}$  (d). Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18 para dimoxistrobina e Tabela 19 para picoxistrobina. 155

Figura 42 - (1) Respostas no sistema BIA-amperometria com eletrodo de DDB para injeções em triplicata de (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 20,0; (e) 40,0 e (f) 60,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  soluções padrão de dimoxistrobina. (2) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (8,21 \times 10^{-1} \pm 1,19 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1}) X + 3,11 \times 10^{-7} \pm 3,41 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99987$  para concentrações crescentes de dimoxistrobina. (3) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (8,44 \times 10^{-1} \pm 1,69 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1}) X + 2,34 \times 10^{-7} \pm 4,82 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99976$  para concentrações decrescentes de dimoxistrobina. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18. 157

Figura 43 - Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (6,78 \times 10^{-1} \pm 1,00 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1}) X + 6,49 \times 10^{-6} \pm 1,37 \times 10^{-6}$  e  $R^2 = 0,996$  para concentrações crescentes de dimoxistrobina (1,0 a 500,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18. 158

Figura 44 – (1) Respostas no sistema BIA-amperometria com eletrodo de DDB para injeções em triplicata de (a) 10,0; (b) 20,0; (c) 40,0; (d) 60,0; (e) 80,0 e (f) 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  soluções padrão de picoxistrobina. (2) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (2,65 \times 10^{-1} \pm 2,63 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1}) X + 1,80 \times 10^{-7} \pm 1,48 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99941$  para concentrações crescentes de picoxistrobina. (3) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (2,61 \times 10^{-1} \pm 3,44 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1}) X + 1,10 \times 10^{-7} \pm 1,93 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99986$  para concentrações decrescentes de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 19. 159

Figura 45 - Voltamogramas obtidos com varredura anódica de potencial em uma faixa de -300 a 1050 mV utilizando eletrodo de carbono vítreo: (A) HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  com a presença de picoxistrobina (9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); (B) HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  sem picoxistrobina; (C) HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  com a presença de picoxistrobina (9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e  $\text{Bi}^{3+}$  (47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; 50 mV de amplitude de pulso e 25 mV  $\text{s}^{-1}$  de velocidade de varredura. 168

Figura 46 - (1) Picos de redissolução do Bi (medidos pela varredura de -300 a +50 mV) a partir do eletrodo de carbono de vítreo revestido com o filme de Bi (formado pela aplicação de -900 mV por 60 s) após a realização (A) 0; (B) 1; e (C) 5 varreduras anódicas de potencial na faixa de +790 a +1050 mV. (2) Correntes de pico normalizada após a realização (A) 0; (B) 1; e (C) 5 varreduras anódicas de +790 a +1050 mV em uma célula na ausência (A1, B1 e C1) de picoxistrobina e em uma célula com 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de picoxistrobina (A2, B2 e C2). Parâmetros instrumentais: o eletrólito suporte foi o HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$ ; a concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula foi de 47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; a amplitude de pulso de 50 mV e a velocidade de varredura de 25  $\text{mV s}^{-1}$ . 170

Figura 47 - Picos de redissolução do Bi em um eletrodo de carbono de vítreo revestido com filme de Bi após a realização de varreduras anódicas (+790 a +1050 mV) com diferentes velocidades: (a) 5; (B) 10; (C) 15; (D) 20; (E) 25; (F) 30; (G) 35; 40 (H); (I) 45; e (J) 50  $\text{mV s}^{-1}$ . Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; faixa de potencial varrida de -300 a +50 mV; eletrólito suporte foi o HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  e a concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula de 47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . 171

Figura 48 – (A) Área integrada do pico de picoxistrobina em função da  $f$  (10 a 50 Hz). (B) Potencial de pico ( $E_p$ ) em função do logaritmo da frequência. Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; amplitude de pulso de 30 mV; incremento de varredura de potencial de 10 mV; HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  de eletrólito suporte; concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula de 47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de picoxistrobina de 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . 173

Figura 49 - Relação entre a área integrada do pico de redissolução da picoxistrobina e a concentração de HCl (0,0050 a 1,00 mol  $\text{L}^{-1}$ ). Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; amplitude de pulso de 30 mV, incremento de varredura de potencial de 10 mV; concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula de 47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de picoxistrobina de 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . 174

Figura 50 - Medidas voltamétricas sequenciais de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: -900 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (60,0 µmol L<sup>-1</sup>); 50 mV de amplitude de pulso; 25 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial anódica varrida de +790 a +1050 mV e a concentração de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>. 176

Figura 51 – Picos de redissolução sequenciais do Bi e picoxistrobina em um eletrodo de carbono vítreo revestido com um filme de Bi. (A) Sem Bi e analito; (B) com Bi e sem analito; (C) primeira corrida com ambos Bi e analito; (D) terceira corrida com ambos Bi e analito; (E) quinta corrida com ambos Bi e analito; (F) sexta corrida com ambos Bi e analito; (G) nona corrida com ambos Bi e analito; e (H) décima segunda corrida com ambos Bi e analito. Parâmetros instrumentais: -900 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (47,0 µmol L<sup>-1</sup>); 50 mV de amplitude de pulso; 25 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>. 177

Figura 52 – Área integrada do pico de redissolução da picoxistrobina em função da concentração de Bi<sup>3+</sup> na célula. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (0,0 a 2,7 × 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>); -900 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; 50 mV de amplitude de pulso; 35 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>. 179

Figura 53 - Efeito de diferentes tempos de deposição sobre área do pico de redissolução da picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (47,0 µmol L<sup>-1</sup>); -900 mV de potencial de deposição; 0 a 300 s de tempo de deposição; 50 mV de amplitude de pulso e 35 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>. 180

Figura 54 - Efeito de diferentes potenciais de deposição sobre área do pico de redissolução da picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: HCl

- 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (47,0 µmol L<sup>-1</sup>); de 0 a -1000 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; 50 mV de amplitude de pulso e 35 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>. 181
- Figura 55 – (A) Estudo da velocidade de varredura (0 a 50 mV s<sup>-1</sup>) em função da área integrada do pico de redissolução de picoxistrobina. (B) Estudo da amplitude de pulso (0 a 150 mV) em função da área integrada do pico de redissolução de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (47,0 µmol L<sup>-1</sup>); -700 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>. 182
- Figura 56 - (A) Voltamogramas de concentrações crescentes de picoxistrobina: (a) branco; (b) 3,9 µmol L<sup>-1</sup>; (c) 7,7 µmol L<sup>-1</sup>; (d) 12,0 µmol L<sup>-1</sup>; (e) 15,0 µmol L<sup>-1</sup>; (f) 19,0 µmol L<sup>-1</sup>. (B) curva analítica com o modelo de equação de  $Y = (4,29 \times 10^{-3} \pm 1,41 \times 10^{-4} \text{ L mol}^{-1}) X + 2,42 \times 10^{-9} \pm 1,64 \times 10^{-9}$  e  $R^2 = 0,9945$ . Parâmetros instrumentais: ver Tabela 23. 184
- Figura 57 - Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) Branco e (B) por uma concentração de picoxistrobina equivalente ao LOD (0,8 µmol L<sup>-1</sup>) e o (A) branco. Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 23. 185
- Figura 58 – Voltamogramas do pico de redissolução para (A) azoxistrobina e (B) dimoxistrobina na concentração de 3,9 µmol L<sup>-1</sup>, em filme de bismuto. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 23. Traço pontilhado é o voltamograma da solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. 188

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Estrobilurinas sintéticas utilizadas na agricultura como fungicidas.	44
Tabela 2 - Propriedades físicas das estrobilurinas sintéticas.	46
Tabela 3 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de azoxistrobina em diferentes culturas no Brasil.	49
Tabela 4 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de cresoxim-metílico em diferentes culturas no Brasil.	50
Tabela 5 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de picoxistrobina em diferentes culturas no Brasil.	50
Tabela 6 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de piraclostrobina em diferentes culturas no Brasil.	51
Tabela 7 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de trifloxistrobina em diferentes culturas no Brasil.	52
Tabela 8 - Condições experimentais selecionadas para a determinação voltamétrica de cresoxim-metílico usando o eletrodo de trabalho de DDB.	123
Tabela 9 - Condições experimentais selecionados para a determinação voltamétrica de picoxistrobina usando o eletrodo de trabalho DDB.	123
Tabela 10 - Condições experimentais selecionados para a determinação voltamétrica de piraclostrobina usando o eletrodo de trabalho DDB.	123
Tabela 11 - Avaliação da interferência de outros estrobilurinas no sinal de eletroanalítico de cresoxim-metílico ( $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).	132
Tabela 12 - Avaliação da interferência de outros estrobilurinas no sinal de eletroanalítico de picoxistrobina ( $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).	133
Tabela 13 - Avaliação da interferência de outros estrobilurinas no sinal de eletroanalítico de piraclostrobina ( $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).	134
Tabela 14 - Recuperação de cresoxim-metílico ( $n = 3$ ) em amostras de suco de uva fortificadas em dois níveis de concentração ( $6,0$ e $11,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).	135

Tabela 15 - Recuperação de picoxistrobina (n = 3) em amostras de águas naturais fortificadas em dois níveis de concentração (5,4 e 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).	136
Tabela 16 - Recuperação de piraclostrobina (n = 3) em amostras de águas naturais em dois níveis de concentração (5,4 e 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).	137
Tabela 17 – Recuperações de amostras de suco de uva (n = 3) pré-concentradas por SPE em cartucho C18 e fortificadas para picoxistrobina (1,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou com concentrações no limite máximo de resíduos (LMR) permitido pela legislação para cresoxim-metílico (1,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e piraclostrobina (5,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Cálculo do fator de enriquecimento (FE) pela razão entre a concentração do analito pré-concentrado ( $C_c$ ) dez vezes e a concentração do analito original ( $C_a$ ) sem passar pelo cartucho, em duas concentrações (7,9 e 11,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).	144
Tabela 18 - Condições experimentais escolhidas para o método BIA-amperométrico de determinação para dimoxistrobina.	154
Tabela 19 - Condições experimentais escolhidas para o método BIA-amperométrico de determinação para picoxistrobina.	154
Tabela 20 - Concentração dimoxistrobina em amostras naturais de água analisadas pelo método BIA proposto e os testes de recuperação (n=3).	161
Tabela 21 – Concentração de picoxistrobina em amostras naturais de água analisadas pelo método BIA proposto e os testes de recuperação (n=3).	162
Tabela 22 - Valores do fator ( $I_{E2}/I_{E1}$ ) calculado para dimoxistrobina na ausência e na presença de diferentes substâncias concomitantes em solução (n = 5), sob condição experimental escolhidas <sup>a</sup> .	164
Tabela 23 - Condições experimentais escolhidas para o método voltamétrico de determinação da picoxistrobina.	183
Tabela 24 – Avaliação da interferência de outras estrobilurinas no sinal eletroanalítico de picoxistrobina.	187
Tabela 25 - Recuperação de picoxistrobina em amostras de água e urina fortificadas em dois níveis de concentração (4,8 e 12,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).	190

## Lista de abreviaturas e siglas

<i>a</i>	Amplitude
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIA	Análise por injeção em batelada
BiFE	Eletrodo de filme de bismuto
CV	Voltametria cíclica
CVD	Deposição química a partir da fase de vapor
DDB	Diamante dopado com boro
DAD	Espectrofotometria em sistema de arranjo de diodos
DC	Polarografia Clássica
DP	Pulso Diferencial
E	Potencial
EC	Captura de elétrons
$E_p$	Potencial de pico
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico
$E_{p,c}$	Potencial de pico catódico
$E_{p/2}$	Largura máxima à meia altura do pico
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
<i>f</i>	Frequência
FE	Fator de enriquecimento
FIA	Análise por injeção em fluxo
GC	Cromatografia gasosa
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
GPC	Permeação cromatográfica em gel
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IUPAC	União Internacional de Química Pura Aplicada
$I_d$	Corrente de difusão
$I_p$	Corrente de pico
$I_{p,a}$	Corrente de pico anódica
$I_{p,c}$	Corrente de pico catódica
ILO	International Labor Organization



$k$	Constante de velocidade
LC	Cromatografia líquida
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia eletrocinética capilar micelar
MS	Espectrometria de massas
MS-MS	Espectrometria de massas em tandem
NP	Nitrogênio-fósforo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OIT	Organização Internacional do Trabalho
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SWV	Voltametria de onda quadrada
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
UPLC	Cromatografia líquida de ultraeficiência (ou de resolução rápida)
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
$v$	Velocidade de varredura
WHO	World Health Organization
$\sigma^i$	Camada interna
$\sigma^d$	Camada de difusão
$\Delta E_s$	Incremento de varredura

## 1. Contextualização do trabalho.

O uso de agrotóxicos é cada dia mais expressivo no mundo e o Brasil um dos principais consumidores. O monitoramento de resíduos de pesticidas é extremamente importante e isso se dá pelo emprego de métodos analíticos adequados para avaliar a sua presença em compartimentos ambientais e a contaminação de alimentos com esses agentes. Os pesticidas da classe das estrobilurinas vêm se tornando os mais utilizados para o controle dos fungos e apesar da propaganda baixa toxicidade e rápida degradação, estudos devem ser realizados para averiguar o nível de exposição dos humanos a tais substâncias. Neste contexto, as técnicas eletroquímicas se enquadram para o desenvolvimento de métodos de determinação de pesticidas permitindo averiguar o nível de contaminação causado por estes. As técnicas eletroquímicas possuem vantagens por envolverem instrumentação mais barata, um consumo baixo de reagentes e permitir o monitoramento em linha, em alguns casos. Em amostras complexas essas técnicas, em especial a amperometria, podem apresentar seletividade limitada, porém quando as condições experimentais são ajustadas corretamente e a estratégia de análise desenhada com etapas prévias de extração, tal limitação pode ser contornada.

A escolha de um eletrodo de trabalho que permita resposta analítica dos pesticidas com boa sensibilidade, picos resolvidos e sinais reproduzíveis é de suma importância para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos. Neste contexto, os eletrodos de filme de bismuto e diamante dopado com boro se enquadraram para o caso das estrobilurinas. O eletrodo de filme de bismuto se destaca pela possibilidade da pré-concentração do analito em sua superfície aumentando a capacidade de detecção. Já o eletrodo de diamante dopado com boro, por ter uma ampla faixa de trabalho de potencial e uma potencial capacidade de eletrocatalisar reações redox, permite obter respostas analíticas de moléculas aparentemente muito resistentes a processos de oxidação e/ou de redução.

Neste trabalho, as técnicas eletroquímicas de amperometria, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial foram utilizadas para o desenvolvimento de métodos analíticos com a determinação de cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina (substâncias da classe das

estrobilurinas). O eletrodo de diamante dopado com boro foi preferencialmente usado nesse projeto. Mais especificamente visou-se encontrar condições eletroquímicas e instrumentais que permitissem um sinal analítico que possibilitasse a determinação destas estrobilurinas. Com o uso do eletrodo de diamante dopado com boro visou-se, além de obter um melhor desempenho analítico, estudar o mecanismo redox e avaliar a degradação térmica e por exposição ao UV destas estrobilurinas.

Estudos com o eletrodo de filme de bismuto também foram realizados. Assim, no contexto geral, visou-se com o uso do eletrodo de filme de bismuto obter um melhor desempenho analítico e também comprovar a sua existência após varreduras anódicas na região positiva de potencial.

## **1.1. Objetivos.**

### **1.1.1. Objetivos gerais.**

A proposta do trabalho foi desenvolver métodos eletroanalíticos para a determinação de pesticidas da classe das estrobilurinas (cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina) em amostras de água, sucos industriais e urina. As abordagens escolhidas foram: (i) a voltametria de onda quadrada com eletrodo de trabalho de diamante dopado com boro (DDB), a voltametria de pulso diferencial com eletrodo de trabalho de filme de bismuto (BiFE) e (iii) a análise por injeção em batelada com detecção amperométrica no eletrodo de DDB. Além disso, estudou-se os mecanismos de oxirredução das estrobilurinas no eletrodo de DDB e no BiFE em uma faixa de potencial acima do potencial de oxidação do filme, provando que é possível trabalhar com esse eletrodo em tal condição.

### **1.1.2. Objetivos específicos.**

- **Desenvolvimento de métodos voltamétricos com varredura de potencial do tipo onda quadrada (SWV) para a determinação cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina e estudo do**

### **comportamento eletroquímico das estrobilurinas em meio aquoso usando o DDB.**

(i) Propor o mecanismo redox para as estrobilurinas no eletrodo de DDB;

(ii) Estudar diferentes eletrólitos suportes para a determinação de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobinas usando o DDB;

(iii) Ajustar parâmetros instrumentais de modo a se obter a melhor resposta analítica possível;

(iv) Obter os parâmetros analíticos de mérito;

(v) Estudar a eficiência do procedimento de pré-concentração das estrobilurinas.

(vi) Aplicar os métodos na determinação de cresoxim-metílico (em suco de uva fermentado, suco de uva não fermentado e em leite de soja); na determinação de picoxistrobina (em água mineral e em amostras de água da lagoa Rodrigo de Freitas); e na determinação de piraclostrobinas (em água mineral, em amostras de água da lagoa Rodrigo de Freitas e em suco de uva fermentado);

(vii) Comparar o desempenho dos métodos com um método baseado no uso do HPLC-UV;

(viii) Estudar a degradação térmica e fotoquímica (por exposição ao UV) de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobinas.

- **Desenvolvimento de métodos baseados no uso da abordagem BIA para determinar dimoxistrobina e picoxistrobina.**

(i) Estudar os potenciais de oxidação e a influência do pH para a determinação amperométrica de dimoxistrobina e picoxistrobina;

(ii) Ajustar os parâmetros do BIA de modo a se obter a melhor resposta analítica possível;

(iii) Obter os parâmetros analíticos de mérito;

(iv) Aplicar os métodos na determinação de dimoxistrobina (em água da torneira, água mineral e água do rio Uberabinha); e de picoxistrobina (em água mineral e em água da lagoa Rodrigo de Freitas);

(v) Comparar o desempenho dos métodos com um método baseado no uso do HPLC;

(vi) Estabelecer um fator para identificar interferências na determinação amperométrica das estrobilurinas no DDB.

- **Desenvolvimento de método voltamétrico, com varredura de potencial do tipo pulso diferencial, utilizando BiFE para determinar picoxistrobina e comprovar a viabilidade do uso do BiFE com potenciais acima do potencial de oxidação do Bi.**

(i) Estudar o comportamento redox da picoxistrobina no eletrodo de BiFE;

(ii) Estudar a viabilidade do uso do BiFE, comprovando a existência do filme, em potenciais acima do potencial de oxidação do Bi;

(iii) Estudar condições experimentais para a determinação de picoxistrobina;

(iv) Ajustar os parâmetros instrumentais para a formação do BIFE e para se obter o melhor sinal analítico possível usando a técnica de pulso diferencial;

(v) Obter os parâmetros analíticos de mérito;

(vi) Aplicar o método na determinação de picoxistrobina em água do riacho Rainha, em água da lagoa Rodrigo de Freitas e em urina;

(vii) Comparar o desempenho dos métodos com um método baseado no uso do HPLC.

## 1.2. Estrutura da tese.

A presente Tese se estrutura em sete capítulos. No Capítulo 2, as principais características dos analitos são apresentadas assim como uma breve explicação de sua atividade antifúngica, aplicações nas lavouras além de uma revisão bibliográfica dos métodos analíticos existentes na literatura para a determinação de azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina. Nesse capítulo são feitas considerações relevantes sobre os princípios físicos e químicos das técnicas analíticas e dos eletrodos de trabalho utilizados.

O Capítulo 3 contém as informações detalhadas sobre a instrumentação, os materiais utilizados e os procedimentos de preparação de soluções e de amostras. Neste, são também apresentados os procedimentos das análises envolvendo os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho.

No Capítulo 4 os resultados obtidos para a determinação de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina por SWV com eletrodo de DDB e o comportamento eletroquímico das estrobilurinas em meio aquoso com DDB. Neste são apresentados: (i) os estudos preliminares de azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina com eletrodo de DDB; (ii) o estudo do mecanismo redox para os picos de oxidação de cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina; (iii) a otimização das condições experimentais e instrumentais para a determinação por SWV de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina; (iii) os parâmetros analíticos de mérito e a interferência na presença de outras estrobilurinas no sinal analítico; (iv) a aplicabilidade dos métodos voltamétricos propostos na análise de amostras comerciais de suco de uva (cresoxim-metílico e piraclostrobina) e águas naturais (picoxistrobina e piraclostrobina); (v) o estudo das degradações térmica e fotoquímica por exposição ao UV e (vi) a utilização da extração em fase sólida (SPE) para pré-concentrar amostras de suco de uva fortificadas com estrobilurinas na concentração do limite máximo de resíduos permitido pela legislação em uva.

No Capítulo 5 os resultados obtidos para a determinação de dimoxistrobina e picoxistrobina utilizando a abordagem de análise por injeção em batelada (BIA)

com detecção amperométrica no eletrodo de DDB. Neste são apresentados: (i) a otimização das condições experimentais e instrumentais para a determinação por BIA de dimoxistrobina e picoxistrobina, (ii) os parâmetros analíticos de mérito, (iii) a aplicabilidade dos métodos BIA-amperométricos propostos na análise de amostras de águas naturais e (iv) uma estratégia simples para detectar a presença de moléculas interferentes em amostras de água com base na amperometria de múltiplos pulsos.

No Capítulo 6 os resultados obtidos para a determinação de picoxistrobina por voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial, com eletrodo de BiFE depositado sobre um substrato de carbono vítreo. Neste são apresentados: (i) os estudos preliminares de picoxistrobina com eletrodo de BiFE, (ii) a oxidação de BiFE após a varredura anódica de potencial positivo, (iii) o estudo do mecanismo redox para o pico de oxidação de picoxistrobina; (iv) a otimização das condições experimentais e instrumentais para determinação voltamétrica de pulso diferencial da picoxistrobina usando o eletrodo de BiFE, (v) os parâmetros analíticos de mérito e a interferência na presença de outras estrobilurinas no sinal analítico e (vi) a aplicabilidade do método voltamétrico proposto na análise de amostras de urina e águas naturais.

Finalizando, no Capítulo 7 se encontram descritas as conclusões e as recomendações deste trabalho de Tese de doutorado além das perspectivas de trabalhos futuros.

## **2. Introdução.**

### **2.1. Pesticidas.**

O aumento crescente da população mundial leva à necessidade de se desenvolverem tecnologias para o incremento da produção agropecuária. Dentro das alternativas, os agrotóxicos (usualmente chamados de pesticidas) têm papel fundamental na garantia da qualidade da produção e na ampliação da fronteira agrícola para áreas mais propensas ao ataque de pragas. O extensivo uso dos agrotóxicos requer um controle efetivo de seus resíduos que permanecem nos alimentos, a fim de evitar agravos à população (BRASIL, 2002). Além disso, a disseminação e o uso, muitas vezes fora das boas práticas, acarretam impactos à saúde e à segurança do trabalhador rural.

Os agrotóxicos são denominados comumente como pesticidas ou praguicidas e são classificados, de acordo com o Decreto Federal Brasileiro nº 4074, de 4 de janeiro de 2002, como os produtos e componentes dos processos físicos, químicos e biológicos que têm o objetivo de impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga nociva à plantação, aumentando assim a sua produtividade (BRASIL, 2002). Um pesticida pode ser uma substância química ou um agente biológico, tal como um vírus, bactéria ou animal, que é lançado sobre as pragas que estiverem destruindo uma plantação, disseminando doenças ou impedindo um melhor rendimento na produção de alimentos (FRANK *et al.*, 2004; WARE, 1991).

Apesar das vantagens inegáveis que os agrotóxicos têm trazido para a economia agrícola moderna no controle de pragas e no aumento da produtividade, eles podem gerar uma série de problemas para o meio ambiente em geral se não usados de forma adequada. Esses problemas ocorrem se as precauções necessárias não forem tomadas durante sua aplicação e armazenamento (FAO/WHO, 2006). Grandes frações dos agrotóxicos utilizados acabam movendo-se com escoamento superficial em córregos, rios, lagos e lixiviação para os sistemas de águas subterrâneas ou volatilizado para a atmosfera (BATTAGLIN e FAIRCHILD, 2002).



Na literatura existem alguns estudos que relacionam a contaminação humana a diversos tipos de agrotóxicos com o desenvolvimento de patologias, tais como a leucemia (MAELE-FABRY *et al.*, 2008), outros cânceres em geral e distúrbios neurocomportamentais, sendo as crianças as mais sensíveis (GARRY, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS ou WHO do inglês *World Health Organization*) e a Organização Internacional do Trabalho (OIT ou ILO do inglês *International Labor Organization*) classificam a atividade agrícola como uma das que acarretam maior perigo ao trabalhador. Os estudos realizados indicaram a ocorrência de mais de sete milhões de casos de intoxicação/ano por agrotóxicos no mundo, com taxa de letalidade de aproximadamente 1% (ILO/WHO, 2005; ILO, 2005).

O consumo anual de agrotóxicos no Brasil é acima de 150 mil toneladas (de principio ativo) com aumento de mais de 400% no uso nas últimas quatro décadas, enquanto a produção agrícola aumentou pouco menos de 80% no mesmo período (SPADOTTO, 2010). Esses números indicam uma disparidade na relação quantidade de agrotóxico/produzido que pode ser explicada pelo uso inadequado ou exagerado de pesticidas nas plantações brasileiras.

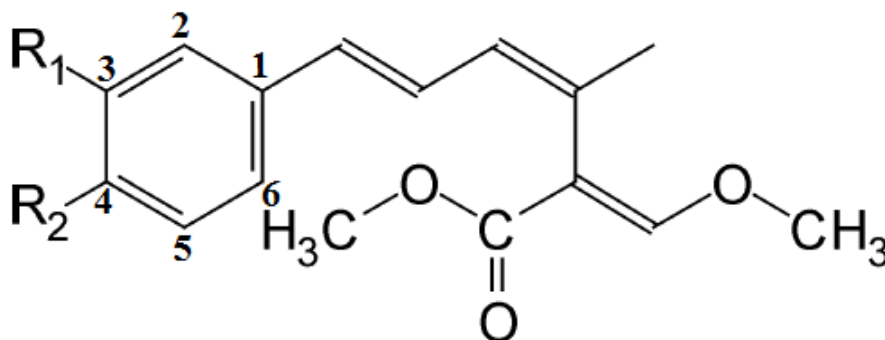
Dentro do grupo dos agrotóxicos, encontram-se os fungicidas, denominação dada a uma classe específica, capaz de destruir ou inibir a ação dos fungos fitopatogênicos. Os fungicidas podem ser inorgânicos e orgânicos, sendo comum a utilização de fungicidas sintéticos na agricultura convencional, o que representa risco ao homem e ao meio ambiente, devido a sua toxicidade (BALBA, 2007). Para diminuir a persistência no meio ambiente e facilitar a degradação, os fungicidas que vem sendo inseridos no mercado atualmente são sintetizados de forma a ter suas estruturas similares a de fungicidas naturais (KEITH *et al.*, 2000). Uma classe de fungicida muito utilizada atualmente é a das estrobilurinas, que possuem estrutura similar à das estrobilurinas naturais (JEWESS *et al.*, 1999; RAVELO-PÉREZ *et al.*, 2007).

### **2.1.1. Estrobilurinas.**

#### **2.1.1.1. Estrobilurinas naturais.**

As estrobilurinas são substâncias naturais cujo nome é derivado dos cogumelos *Strobilurus sp.* Esse cogumelo sintetiza as estrobilurinas naturais a partir do aminoácido fenilalanina. A primeira estrobilurina isolada a partir do cogumelo *Strobilurus tenacellus* foi denominada estrobilurina-A (ANKE et al. 1977). As outras estrobilurinas naturais foram denominadas: estrobilurina-B, estrobilurina-C e assim por diante, de acordo com a ordem de sua descoberta. As estrobilurinas A e B foram isoladas e utilizadas contra leveduras e fungos filamentosos, mas foram inativas contra bactérias. Estes compostos se degradam facilmente com a exposição à luz, e são fungicidas relativamente fracos. No entanto, elas se tornaram a molécula de partida para o desenvolvimento de fungicidas sintéticos, que são mais estáveis e mais poderosos quando usados comercialmente na prática agrícola do que as estrobilurinas naturais (ANKE et al., 1977).

Estruturalmente, a característica essencial e comum desta classe de substâncias é a presença da estrutura metil(E)-3-metoxi-2-(5-fenilpenta-2,4-dienil) acrilato, que é a base de todas as moléculas das estrobilurinas naturais, sendo que a diferença entre elas está na substituição do anel aromático nas posições 3 e 4 (ANKE et al., 1977; SCHRAMM et al., 1978). Na Figura 1 é apresentada a estrutura básica das estrobilurinas naturais e dois possíveis substituintes do anel que caracterizam a estrobilurina-A e a estrobilurina-B.



Estrobilurina A -  $R_1 = H$ ;  $R_2 = H$

Estrobilurina B -  $R_1 = OCH_3$ ;  $R_2 = Cl$

Figura 1 - Estrutura básica das estrobilurinas naturais. Fonte: Adaptado de BALBA, 2007.

### 2.1.1.2. Estrobilurinas sintéticas.

Os principais precursores das estrobilurinas sintéticas são as estrobilurinas naturais A e B. A síntese dessas estrobilurinas ocorre com a modificação no grupo (E)- $\beta$ -metoxiacrilato com substituições  $\alpha$ , ou pela substituição de parte desse grupo por metoxiiminoacetato. Já foram sintetizadas muitas estrobilurinas, porém as que são foto-estáveis e com boa atividade antifúngica, e que por isso apresentam maior eficiência para serem utilizadas como fungicidas comerciais, são: azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina (BALBA, 2007; BARTLETT *et al.*, 2002). Na Tabela 1 são apresentadas as fórmulas estruturais das estrobilurinas sintéticas com seus nomes de acordo com a União Internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC).

Tabela 1 - Estrobilurinas sintéticas utilizadas na agricultura como fungicidas.

Nome	Nome IUPAC	Fórmula estrutural
Azoxistrobina	metil-(E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato	
Cresoxim-metílico	metil-(E)-metoxiimino [a-(o-toliloxi)-o-tolil] acetato	
Dimoxistrobina	(E)-2-(metoxiimino)-N-metil-2-[a-(2,5-xililoxi)-o-tolil] acetamida	
Fluoxastrobina	(E)-{2-[6-(2-clorofenoxi)-5-fluoropirimidin-4-iloxi]fenil}(5,6-di-hidro-1,4,2-dioxazina-3-il)metanona-O-metiloxima	
Metominostrobin	(E)-2-metoxiimino-N-metil-2(2-fenoxifenil) acetamida	
Picoxistrobina	metil-(E)-3-metoxi-2-{2-[6-(trifluorometil)-2-piridiloximetil]fenil} acrilato	
Piraclostrobina	metil-N-2-[1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-3-yloximetil]fenil(N-metoxi)-carbamato	
Trifloxistrobina	metil-(E)-metoxiimino-{(E)-α-[1(α, α, α-trifluoro-m-tolil)-etilidenoaminoxil]-o-tolil} acetato	

Para serem considerados pertencentes à família das estrobilurinas, a molécula sintetizada deve conter um substituinte com as seguintes estruturas básicas apresentadas na Figura 2.

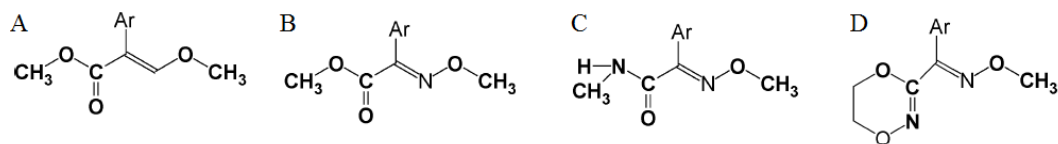


Figura 2 - Estrutura básica das estrobilurinas naturais: A - (E)-β-metoxiacrilato; e seus análogos sintéticos: B - (E)-metoxiiminoacetato, C - (E)-metoxiimino-N-metilacetamida, D - dihidro-dioxazina-metanona-O-metiloxima.

Azoxistrobina foi descoberta pela empresa Syngenta, sendo o primeiro produto da classe a ser anunciado na Conferência de Proteção de Cultivos Britânicos de 1992, como um fungicida comercial. A sua estrutura contém o grupo (E)-β-metoxiacrilato (BALBA, 2007). Cresoxim-metílico foi sintetizado pela empresa BASF, na mesma época da azoxistrobina, sendo também chancelada como fungicida de uso comercial na mesma conferência de 1992. Na sua estrutura, pela primeira vez apresenta a transformação do grupo (E)-β-metoxiacrilato em metoxiiminoacetato (YPEMA e GOLD, 1998). A trifloxistrobina foi descoberta pela empresa Novartis Crop Protection em 1998. Esse fungicida só foi comercializado a partir do ano 2000, quando a Bayer Crop Science adquiriu os direitos de exploração dessa substância. Na estrutura da trifloxistrobina também está presente o grupo metoxiiminoacetato (BALBA, 2007).

Metominostrobinina foi descoberta pela empresa Shienogi e foi registrada no Japão, em 1998. A diferença mais importante na estrutura deste produto foi a inclusão da N-metilacetamida na estrutura do (E)-β-metoxiacrilato. A fluoxastrobina foi obtida pela empresa Bayer e anunciada em 2002 na Conferência de Proteção de Cultivos Britânicos. Nesta estrutura, embora o grupo de substituição seja semelhante ao da azoxistrobina, o grupo (E)-β-metoxiacrilato foi modificado para um derivado de metoxiiminoacetato. A piraclostrobinina foi descoberta por cientistas da BASF em 2000. A estrutura deste produto é caracterizada como um derivado de carbamato. Já a obtenção da picoxistrobina foi anunciada pela empresa

Zeneca Agroquímicos na Conferência de Proteção de Cultivos Britânicos em 2000 e registrada comercialmente no ano seguinte. Dimoxistrobina foi desenvolvida em 2003 pela BASF, mas sua aplicação como fungicida demorou, sendo a sua entrada no mercado agrícola brasileiro acontecendo apenas em 2013 (HOWELL *et al.*, 2014; AENDA, 2013).

As estrobilurinas que apresentam as maiores solubilidades em água são a metominostrobin (128,0 mg L<sup>-1</sup>), azoxistrobina (6,0 mg L<sup>-1</sup>) e picoxistrobina (3,1 mg L<sup>-1</sup>). Metominostrobin e dimoxistrobina apresentam estruturas muito semelhantes, diferindo apenas na inclusão de dois radicais metila em um dos benzenos da dimoxistrobina. Esta modificação na estrutura de dimoxistrobina diminui sua solubilidade em água (0,6 mg L<sup>-1</sup>) pela inclusão de mais átomos de carbono e também pelo impedimento estérico que os grupos metila podem impor, não permitindo que as moléculas de água se aproximem para estabelecer a ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio próximo ao anel. A fluoxastrobina apresenta a menor solubilidade em água (0,2 mg L<sup>-1</sup>) entre todas as estrobilurinas e também o maior ponto de fusão (234,0 °C) (BARTLETT *et al.*, 2002, b CHEMSPIDER, 2014a c CHEMSPIDER, 2014b). As propriedades físicas das estrobilurinas sintéticas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades físicas das estrobilurinas sintéticas.

	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> em 20° C)	Pressão de vapor (mPa em 20° C)	Ponto de fusão (°C)	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> )
Azoxistrobina <sup>a</sup>	6,0	1,1 x 10 <sup>-7</sup>	115,0	403,4
Cresoxim-metílico <sup>a</sup>	2,0	2,3 x 10 <sup>-3</sup>	99,0	313,4
Dimoxistrobina <sup>b</sup>	0,6*	1,0 x 10 <sup>-10*</sup>	206,0*	326,4
Fluoxastrobina <sup>c</sup>	0,2*	1,6 x 10 <sup>-1*</sup>	234,0*	458,8
Metominostrobin <sup>a</sup>	128,0	1,8 x 10 <sup>-2</sup>	88,0	284,3
Picoxistrobina <sup>a</sup>	3,1	5,5 x 10 <sup>-3</sup>	75,0	367,3
Piraclostrobina <sup>a</sup>	1,9	2,6 x 10 <sup>-5</sup>	64,0	387,8
Trifloxistrobina <sup>a</sup>	0,6	3,4 x 10 <sup>-6</sup>	73,0	408,4

\* Valor estimado por cálculos teóricos.

Fonte: <sup>a</sup> Adaptado de BARTLETT *et al.*, 2002, <sup>b</sup> CHEMSPIDER, 2014a <sup>c</sup> CHEMSPIDER, 2014b.

### 2.1.1.3.

#### Atividade e toxicidade das estrobilurinas sintéticas.

A atividade antifúngica das estrobilurinas sintéticas baseia-se na inibição da respiração mitocondrial pela ligação ao centro  $Q_oI$ , chamado de citocromo B (inibidores quinonas oxidase  $Q_oI$ ), que tem como característica mais importante a ação rápida concentrada no primeiro período do ciclo de vida dos fungos (estágio dos esporos) (BALBA, 2007; BARTLETT *et al.*, 2002). Esta ação faz com que as estrobilurinas sejam utilizadas nas plantações para a proteção das plantas e erradicação de fungos. Algumas estrobilurinas são eficientes também contra fungos que crescem nas plantas após a germinação dos esporos, sendo utilizadas assim para curar as plantações afetadas pelas doenças causadas por estes fungos. Porém, os fungicidas triazóis são mais eficientes para esse processo (BALBA, 2007). As estrobilurinas, mesmo em concentrações baixas, são eficientes contra um grande número de tipos de fungos como, por exemplo, os Ascomycetes, Basidomycetes, Deuteromycetes, Omicetes (BALBA, 2007). A aplicação desses fungicidas na maioria das lavouras é foliar, sendo as moléculas absorvidas de forma gradual e constante pelas folhas, possibilitando assim uma proteção mais prolongada e uniforme. O intervalo entre as aplicações é maior (período residual na planta para atividade antifúngica é de até 45 dias dependendo do tipo de cultura, (BALBA, 2007)) e a concentração é mais baixa comparado com outros fungicidas. Isso diminui o risco de intoxicação pela presença de concentrações acima do permitido pela legislação nas frutas, verduras ou legumes (LUZ *et al.*, 1999).

Algumas estrobilurinas podem apresentar fitotoxicidade em certos tipos de culturas, como a azoxistrobina e o cresoxim-metílico em variedades de maçã e de cereja. Outros exemplos que podem ser citados são o da trifloxistrobina, que apresenta fitotoxicidade em banana e o da piraclostrobina em videiras (TOMLIN, 1997; RODRIGUES, 2005).

Uma vez que estes produtos são derivados de produtos naturais, as estrobilurinas são ambientalmente mais seguras, quando comparados aos outros tipos de fungicidas, devido à sua rápida degradação no meio ambiente. Porém, elas são tóxicas para peixes e invertebrados aquáticos e não devem ser aplicadas em regiões próximas a rios e lagoas conforme as recomendações indicadas nos rótulos

dos produtos (TOMLIN, 1997). As estrobilurinas são consideradas relativamente seguras, nos efeitos agudos, crônicos e de longo prazo em seres humanos (FISHEL, 2005). Os valores de ingestão diária aceitáveis, para que as estrobilurinas não causem intoxicação nos seres humanos, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são: 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para azoxistrobina (BRASIL, 2010); 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para cresoxim-metílico (BRASIL, 2009a); 43  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para picoxistrobina (BRASIL, 2011); 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para piraclostrobina (BRASIL, 2012); 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para trifloxistrobina (BRASIL, 2009b). Até o presente momento, a ANVISA ainda não possui uma legislação que regula o valor de ingestão diária máxima aceitável para fluoxastrobina e dimoxistrobina. De acordo com a agência reguladora do Reino Unido, o valor de ingestão diária aceitável de dimoxistrobina é de 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (PSD, 2013). O limite máximo permitido de estrobilurinas em águas naturais ainda não foi regulamentado no Brasil ou no mundo até o momento.

#### **2.1.1.4.**

#### **Utilização de estrobilurinas como fungicida em lavouras.**

Os fungicidas sintéticos da classe das estrobilurinas foram introduzidos na agricultura a partir do ano de 1996 (BARTLETT *et al.*, 2002). Esses fungicidas estão entre os mais vendidos em todo o mundo devido a sua maior estabilidade e eficácia no combate aos principais fitopatógenos fúngicos (RAVELO-PÉREZ *et al.*, 2007). As formulações comerciais não apresentam misturas de estrobilurinas, possuindo apenas um princípio ativo de fungicida em cada produto. Vale salientar também que não é comum que no combate às pragas nas plantações, os produtores rurais utilizem misturas de produtos que contenham diferentes estrobilurinas. A escolha do fungicida a ser utilizado é feita de acordo com a maior eficiência para aquela praga específica naquele tipo de plantação (BALBA, 2007; BARTLETT *et al.*, 2002).

No Brasil os fungicidas comerciais de estrobilurinas sintéticas são amplamente utilizados em diversos tipos de plantações como pode ser observado nas Tabelas 3 a 7, que trazem os tipos de culturas, modo de aplicação, limite máximo de resíduos (LMR) e intervalo de segurança antifúngico das estrobilurinas estabelecidos pela ANVISA.



Tabela 3 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de azoxistrobina em diferentes culturas no Brasil.

<b>Culturas</b>	<b>Modalidade de Emprego (Aplicação)</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intervalo de Segurança (dias)</b>
Alface	Foliar	1,00	7
Algodão	Sementes	0,10	Não disponível
Algodão	Foliar	0,10	30
Alho	Foliar	0,20	2
Amendoim	Foliar	0,20	7
Arroz	Foliar	0,70	30
Aveia	Foliar	0,80	20
Banana	Foliar	0,20	7
Batata	Foliar	0,10	7
Berinjela	Foliar	0,05	3
Beterraba	Foliar	0,20	2
Cana-de-açúcar	Foliar	0,03	30
Cana-de-açúcar	Mudas antes do plantio	0,03	Não disponível
Cana-de-açúcar	Sulco de plantio	0,03	Não disponível
Café	Foliar	0,05	21
Cebola	Foliar	0,20	2
Cenoura	Foliar	0,20	7
Cevada	Foliar	0,05	20
Citros	Foliar	0,50	7
Couve-flor	Foliar	0,50	2
Feijão	Foliar	0,10	7
Figo	Foliar	1,00	7
Girassol	Foliar	0,01	21
Goiaba	Foliar	0,20	2
Mamão	Foliar	0,30	3
Manga	Foliar	0,30	7
Melancia	Foliar	0,05	2
Melão	Foliar	0,05	2
Milho	Foliar	0,01	42
Morango	Foliar	0,30	1
Pepino	Foliar	0,50	2
Pêssego	Foliar	0,50	7
Pimentão	Foliar	0,50	2
Soja	Foliar	0,50	21
Tomate	Foliar	0,50	3
Trigo	Foliar	0,05	30
Uva	Foliar	0,50	7

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010.

Tabela 4 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de cresoxim-metílico em diferentes culturas no Brasil.

<b>Culturas</b>	<b>Modalidade de Emprego (Aplicação)</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intervalo de Segurança (dias)</b>
Algodão	Foliar	0,05	14
Arroz	Foliar	0,02	45
Batata	Foliar	0,10	7
Café	Foliar	0,05	45
Cevada	Foliar	0,05	30
Feijão	Foliar	0,05	14
Maçã	Foliar	0,20	35
Melão	Foliar	0,10	7
Pepino	Foliar	0,10	7
Soja	Foliar	0,05	14
Tomate	Foliar	0,10	3
Trigo	Foliar	0,05	30
Uva	Foliar	0,50	21

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2009a.

Tabela 5 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de picoxistrobina em diferentes culturas no Brasil.

<b>Culturas</b>	<b>Modalidade de Emprego (Aplicação)</b>	<b>LMR (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intervalo de Segurança (dias)</b>
Algodão	Foliar	0,01	30
Arroz	Foliar	0,07	42
Café	Foliar	0,01	40
Cana de açúcar	Foliar	0,01	30
Feijão	Foliar	0,01	7
Milho	Foliar	0,01	42
Soja	Foliar	0,02	21
Trigo	Foliar	0,01	30

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2011.

Tabela 6 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de piraclostrobina em diferentes culturas no Brasil.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	Intervalo de Segurança (dias)
Algodão	Foliar	0,20	7
Algodão	Sementes	0,20	Não disponível
Alho	Foliar	0,10	7
Amendoim	Foliar	0,10	14
Amendoim	Sementes	0,10	Não disponível
Aveia	Foliar	1,00	30
Banana	Foliar	0,50	3
Batata	Foliar	0,01	3
Batata	Sulco de plantio	0,01	Não disponível
Café	Foliar	0,05	45
Cana-de-açúcar	Foliar	0,10	30
Cana-de-açúcar	Sulco de plantio	0,10	Não disponível
Cebola	Foliar	0,50	7
Cenoura	Foliar	0,20	7
Cevada	Foliar	1,00	30
Cevada	Sementes	1,00	Não disponível
Citros	Foliar	0,50	14
Feijão	Foliar	0,10	14
Feijão	Sementes	0,10	Não disponível
Maçã	Foliar	2,00	14
Mamão	Foliar	0,10	7
Manga	Foliar	0,10	7
Melancia	Foliar	0,10	7
Melão	Foliar	0,10	7
Milho	Foliar	0,10	42
Milho	Sementes	0,10	Não disponível
Pepino	Foliar	0,05	7
Pimentão	Foliar	1,00	3
Soja	Foliar	0,10	14
Soja	Sementes	0,10	Não disponível
Sorgo	Sementes	0,02	Não disponível
Tomate	Foliar	0,20	1
Trigo	Foliar	0,50	30
Trigo	Sementes	0,50	Não disponível
Uva	Foliar	2,00	7

Obs: os LMRs referem-se à soma do piraclostrobina e seu metabólito N-[[1-(4-clorofenil)pirazol-3-il]oxil-o-tolil] carbamato.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2012.

Tabela 7 - Limite máximo de resíduo (LMR) e emprego de trifloxistrobina em diferentes culturas no Brasil.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	Intervalo de Segurança (dias)
Algodão	Foliar	0,05	21
Alho	Foliar	0,05	14
Amendoim	Foliar	0,05	15
Arroz	Foliar	0,02	15
Aveia	Foliar	0,05	30
Banana	Foliar	0,05	1
Batata	Foliar	0,02	30
Café	Foliar	0,05	30
Caqui	Foliar	0,20	20
Cebola	Foliar	0,02	14
Cenoura	Foliar	0,05	14
Cevada	Foliar	0,50	30
Citros	Foliar	0,20	14
Feijão	Foliar	0,20	15
Goiaba	Foliar	0,05	20
Maçã	Foliar	0,05	7
Mamão	Foliar	0,05	7
Manga	Foliar	0,05	20
Maracujá	Foliar	0,05	7
Melancia	Foliar	0,05	14
Melão	Foliar	0,50	14
Milho	Foliar	0,05	30
Soja	Foliar	0,02	30
Tomate	Foliar	0,50	7
Trigo	Foliar	0,05	30

Obs: Os LMRs referem-se à soma de trifloxistrobina e seu metabólito ácido (E, E)-metoxiimino-{2-[1-(3-trifluorometilfenil)-etilidenoamino-oximetil]-fenil}-acético

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2009b.

No mundo, de modo geral, as estrobilurinas sintéticas são utilizadas como fungicidas em lavouras de amendoim, aveia, arroz, batata, cevada, centeio, frutas cítricas, maçã, trigo, soja, uva entre outras (BALBA, 2007; LUZ *et al.*, 1999; BARTLETT *et al.*, 2002).

### 2.1.1.5.

#### Métodos analíticos para a determinação de estrobilurinas.

Na literatura científica se encontram diferentes métodos analíticos para determinação das estrobilurinas em diversos tipos de matrizes. A cromatografia a gás (GC) com os detectores de nitrogênio-fósforo (NP) e de espectrometria de massa (MS) foi utilizada para o desenvolvimento do primeiro método analítico reportado no ano de 1998, cujo objetivo era determinar azoxistrobina e cresoxim-metílico em uvas e vinhos. O pré-tratamento das amostras foi realizado através de uma microextração em linha utilizando acetona e hexano (50:50% v/v). As recuperações obtidas variaram de 80 a 111%, com o limite de detecção (LOD) de 0,05 e 0,10 mg kg<sup>-1</sup> para cresoxim-metílico e azoxistrobina, respectivamente (CABRAS *et al.*, 1998a). O método desenvolvido com GC foi utilizado pelo mesmo grupo de pesquisa para monitorar os resíduos de azoxistrobina e cresoxim-metílico provenientes da aplicação de fungicidas a videiras em uvas e vinhos. O decréscimo das quantidades dos fungicidas em uvas seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem ( $r$  entre 0,96 e 0,99) com tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) no intervalo de 4 a 15 dias (CABRAS *et al.*, 1998b).

No ano de 2001 foi publicado um método para determinar azoxistrobina, cresoxim-metílico e trifloxistrobina, em amostras de trigo, maçã e uva utilizando GC com três diferentes tipos de detecção: NP, MS e por captura de elétrons (EC). A extração dos analitos das amostras foi feita com acetato de etila/ciclo-hexano e a limpeza da matriz foi realizada com cromatografia de permeação em gel. A recuperação obtida variou de 70 a 110% e os valores de LOD foram de 0,004 a 0,013 mg kg<sup>-1</sup> para azoxistrobina; 0,005 a 0,012 mg kg<sup>-1</sup> para cresoxim-metílico; 0,004 a 0,014 mg kg<sup>-1</sup> para trifloxistrobina (CHRISTENSEN e GRANBY, 2001).

Um trabalho utilizando cromatografia líquida (LC) com detector de espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foi publicado em 2004 visando determinar 24 pesticidas, entres eles azoxistrobina, cresoxim-metílico e trifloxistrobina, em amostras de frutas, verduras e suco de frutas. Os pesticidas foram extraídos das amostras por extração líquido-líquido. As recuperações obtidas variaram de 87 ± 9 a 95 ± 9% para azoxistrobina, de 88 ± 9 a 96 ± 6% para cresoxim-metílico e de 83 ± 10 a 106 ± 2% para trifloxistrobina (SANNINO *et al.*, 2004).

Em 2005, um método foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção absorciométrica no UV com sistema de arranjo de diodos (DAD) para determinar azoxistrobina, cresoxim-metílico e trifloxistrobina em amostras de uvas e vinhos. O comprimento de onda de detecção utilizado foi de 207 nm, a eluição isocrática (metanol/água 80/20% v/v) e o tempo total de corrida cromatográfica foi de 13 min. A extração líquido-líquido dos analitos na amostra foi realizada com éter etílico. O material extraído foi redissolvido em n-hexano e as amostras foram submetidas a um processo de limpeza utilizando um cartucho de sílica. Os valores de LOD obtidos foram: 0,15; 0,36 e 0,30 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente para azoxistrobina, cresoxim-metílico e trifloxistrobina. As recuperações encontradas ficaram na faixa de 53 a 164% para azoxistrobina, de 71 a 88% para cresoxim-metílico e de 85 a 94% para trifloxistrobina (ABREU *et al.*, 2005).

Já no ano de 2006 foi publicado um trabalho onde se mostrou a determinação de 450 pesticidas, entre eles azoxistrobina e cresoxim-metílico, utilizando a técnica de GC com detecção por MS em amostras de vinho branco e tinto, mel de cinco tipos diferentes, sucos de maçã e pera. Os pesticidas foram extraídos das amostras em um cartucho de extração em fase sólida (SPE) e foram determinados obtendo recuperações que variaram de 79 a 116% (azoxistrobina) e de 50 a 101% (cresoxim-metílico). O limite de quantificação (LOQ) foi de 0,001 mg kg<sup>-1</sup> para azoxistrobina e de 0,012 mg kg<sup>-1</sup> para cresoxim-metílico (PANG *et al.*, 2006). No mesmo ano outro trabalho foi publicado utilizando GC-EC para determinar 16 pesticidas, entre eles o cresoxim-metílico em amostras de maçã. A extração da estrobilurina das amostras foi feita através de solventes orgânicos (acetona, diclorometano, e éter de petróleo). O valor do LOQ foi de 0,01 mg kg<sup>-1</sup> (BEMPELOU e LIAPIS, 2006). Nesse mesmo ano, outro trabalho foi publicado utilizando LC com detector absorciométrico do tipo DAD para a determinação de azoxistrobina, cresoxim-metílico, piraclostrobina e trifloxistrobina, além de dois outros fungicidas de outras classes, em vinhos e uvas. O comprimento de onda para a detecção foi de 207 nm e a eluição da fase móvel foi feita de modo isocrático (metanol/água 80/20% v/v) perfazendo um tempo de corrida cromatográfica de 13 minutos. O procedimento de microextração foi realizado adicionando às amostras 10 mL de uma solução de acetato de etila-hexano (50/50% v/v) seguido por agitação por 15 min, sendo a fase orgânica imiscível em água retirada para as análises. Os valores de LOD foram 0,2 mg kg<sup>-1</sup> para todas as estrobilurinas determinadas. As recuperações ficaram entre:

$97 \pm 6$  e  $104 \pm 6\%$  para a azoxistrobina,  $99 \pm 9$  e  $105 \pm 6\%$  para o cresoxim-metílico,  $97 \pm 12$  e  $102 \pm 12\%$  para a piraclostrobina e  $96 \pm 10$  e  $103 \pm 12\%$  para a trifloxistrobina (ABREU *et al.*, 2006).

Em 2008, mais um método foi publicado utilizando GC-MS, só que dessa vez ele focava na determinação de oito estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) simultaneamente em amostras de frutas, legumes, bebidas, cereais, nozes, carnes, ovos e leite. A extração das estrobilurinas foi realizada utilizando cromatografia de permeação em gel. Os valores de LOQ foram de  $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $0,015 \text{ mg kg}^{-1}$  e a recuperações variaram de 60 a 120% (BO *et al.*, 2008).

No ano de 2009 foram publicados mais dois métodos utilizando GC-MS. O primeiro determinava simultaneamente sete estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) em amostras de alimento para bebê. O pré-tratamento usado foi a microextração em fase sólida, com imersão direta da fase sólida (fibra adsorvente de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno) no injetor de dessorção térmica. As porcentagens recuperadas de analitos nas amostras fortificadas foram de 96 a 109%, com valores de LOQ variando de  $0,01 \mu\text{g kg}^{-1}$  (dimoxistrobina) a  $0,40 \mu\text{g kg}^{-1}$  (piraclostrobina) (VIÑAS *et al.*, 2009). O segundo método difere do primeiro por utilizar uma temperatura programada de vaporização para injeção da amostra no sistema, além de um tratamento da amostra usando extração líquido-líquido (acetato de etila:hexano (1:1, v/v)) e uma limpeza da matriz por SPE usando cartucho de fase estacionária de dupla camada com carbono grafitizado/etilenodiamina-N-propil. As estrobilurinas determinadas foram piraclostrobina e trifloxistrobina, além de outros nove pesticidas em amostras de uvas e vinhos. Os valores de LOQ variaram de  $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$  (trifloxistrobina) a  $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$  (piraclostrobina) em uvas e  $0,003 \text{ mg kg}^{-1}$  (trifloxistrobina) a  $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$  (piraclostrobina) em vinho. As recuperações ficaram em uma faixa de 129 a 147% para piraclostrobina e de 98 a 103 % para trifloxistrobina (GONZALES-RODRÍDEZ *et al.*, 2009). Também nesse ano, a cromatografia eletrocínica capilar micelar (MEKC) foi utilizada para determinar picoxistrobina e piraclostrobina em amostras fortificadas de urina, usando azoxistrobina como padrão interno. A limpeza da amostra e a extração dos fungicidas foram feitas por

SPE (cartucho C18). O valor de LOQ instrumental para a picoxistrobina foi 32  $\mu\text{g L}^{-1}$  enquanto o da piraclostrobina foi 21  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O teste de recuperação foi feito em amostra de urina fortificada com os pesticidas e as médias das recuperações para picoxistrobina foi 109% e para piraclostrobina de 75% (SOUZA *et al.*, 2009).

Em 2010, mais três métodos para determinação de pesticidas foram publicados, utilizando GC-MS. Dois trabalhos foram do mesmo grupo de pesquisa, sendo que o primeiro método desenvolvido foi aplicado para análise de mangas de modo a fazer a determinação simultânea de resíduos de 14 pesticidas (entre eles a azoxistrobina e piraclostrobina) (FILHO *et al.*, 2010a) e o segundo com o objetivo de determinar 16 pesticidas (incluindo azoxistrobina e piraclostrobina) em amostras de águas subterrâneas (FILHO *et al.*, 2010b). Nos dois trabalhos o pré-tratamento das amostras foi realizado com a microextração em fase sólida (SPME). No método para análise de mangas, os valores dos LOQ de azoxistrobina e da piraclostrobina foram 6,70 e 16,60  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e as recuperações variaram de 80,0 a 84,7 % e de 74,2 a 115,9 %, respectivamente. No método para análise de águas naturais, os valores dos LOQ foram 0,05 e 1,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  e as recuperações variaram de 70,2 a 93,8% e de 87,4 a 93,4% para azoxistrobina e piraclostrobina respectivamente. Em outro trabalho publicado em 2010, utilizou GC-MS para a determinação de estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina), simultaneamente com outros sete fungicidas, em amostras de frutas e de suco de frutas. O pré-tratamento das amostras foi realizado com microextração líquido-líquido assistido por ultrassom. Os valores de LOQ obtidos foram 0,07  $\mu\text{g L}^{-1}$  (azoxistrobina), 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  (cresoxim-metílico), 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  (dimoxistrobina), 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$  (metominostrobin), 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  (picoxistrobina), 0,06  $\mu\text{g L}^{-1}$  (piraclostrobina) e 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  (trifloxistrobina). As recuperações variaram de 83,6 a 115,0% para azoxistrobina, de 79,0 a 110,0% para cresoxim-metílico, de 86,9 a 118,0% para dimoxistrobina, de 80,9 a 113,0% para metominostrobin, de 80,0 a 114,0% para picoxistrobina, de 91,5 a 117,0% para piraclostrobina e de 80,5 a 117,0% para trifloxistrobina (VIÑAS *et al.*, 2010). O mesmo grupo de pesquisa publicou no mesmo ano um trabalho visando à determinação de sete estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, metominostrobin, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) simultaneamente em frutas utilizando HPLC com detecção absorciométrica (detector do tipo DAD). A eluição de fase móvel foi feita em modo



isocrático (acetonitrila/água 50:50% v/v), com um tempo total de corrida cromatográfica de 13 min, usando uma coluna C-18 de 150 mm de comprimento e detecção em 200 nm. O pré-tratamento das amostras foi feito através de uma extração adsortiva em barra de agitação (SBSE) modificada com uma camada de adsorvente, que consiste de um polímero de polidimetilsiloxano. Os valores de LOQ foram: 5,3 ng g<sup>-1</sup> (azoxistrobina), 1,1 ng g<sup>-1</sup> (cresoxim-metílico), 2,0 ng g<sup>-1</sup> (dimoxistrobina), 6,7 ng g<sup>-1</sup> (metominostrobin), 1,8 ng g<sup>-1</sup> (picoxistrobina), 1,1 ng g<sup>-1</sup> (piraclostrobina) e 0,9 ng g<sup>-1</sup> (trifloxistrobina). As recuperações obtidas variaram de 88 ± 6 a 96 ± 3% para azoxistrobina, de 91 ± 3 a 97 ± 4% para cresoxim-metílico, de 88 ± 7 a 95 ± 4% para dimoxistrobina, de 89 ± 5 a 98 ± 6% para metominostrobin, de 90 ± 7 a 101 ± 4% para picoxistrobina, de 92 ± 5 a 100 ± 3% para piraclostrobina e de 89 ± 6 a 98 ± 4% para trifloxistrobina (CAMPILLO *et al.*, 2010). Também em 2010 foi publicado o primeiro trabalho para a determinação simultânea de azoxistrobina e dimoxistrobina utilizando uma técnica eletroanalítica, no caso a voltametria adsortiva de redissolução, em amostras de batata e uva. O eletrodo de trabalho utilizado foi o de gota pendente de mercúrio no qual se aplicava um potencial de deposição de -300 mV durante um tempo de 30 s. As medições foram feitas variando o potencial de -300 a -1000 mV em um eletrólito suporte que consistiu de uma solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Antes de realizar a primeira análise na célula eletroquímica, foi necessário fazer a desoxigenação da solução por 300 s com gás nitrogênio. Voltamogramas cíclicos apresentaram apenas um pico catódico tanto para azoxistrobina (em potencial máximo, E, de -1016 mV) como para dimoxistrobina (E = -680 mV). A extração dos fungicidas nas amostras foi realizada por SPE (cartucho de C18). Os valores dos LOQ para azoxistrobina variaram de 36 a 119 µg L<sup>-1</sup>, já para dimoxistrobina foram de 27 a 238 µg L<sup>-1</sup>. Estes valores foram calculados para os diferentes tipos de matrizes. As recuperações ficaram em uma faixa de 86 ± 9 a 102 ± 4% para azoxistrobina e de 72 ± 9 a 97 ± 9% para dimoxistrobina (PACHECO *et al.*, 2010). Apesar dos bons resultados obtidos pelos autores, o uso do mercúrio tem sido desestimulado por conta da sua elevada toxicidade e persistência que causam grande impacto no ambiente e alto risco à saúde do analista por exposição. Até o desenvolvimento dos trabalhos desta tese, este era o único trabalho publicado na literatura para se determinar estrobilurinas utilizando técnicas eletroanalíticas.

No ano de 2011 foram desenvolvidas colunas de imunoafinidade para piraclostrobina para serem utilizadas no pré-tratamento de amostras de suco de frutas, com isso extraindo os analitos da matriz e concentrando-os. Após este processo as amostras foram analisadas por HPLC com detector absorciométrico no UV (272 nm). A eluição da fase móvel foi isocrática (acetonitrila/água 80/20% v/v) com uma coluna C-18. Um valor de LOD de 0,01 mg L<sup>-1</sup> foi alcançado, com recuperações que variaram de 92,5 a 104,0 %. Um fator de pré-concentração de 50 vezes foi conseguido (ESTEVE-TURRILLAS *et al.*, 2011).

Um estudo dos mecanismos de retenção de quatro estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e trifloxistrobina) e outros cinco triazóis em diferentes fases estacionárias modificadas foi realizado em 2012, com base em dados experimentais e de modelagem matemática. As modificações nas fases estacionárias foram com compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e os estudos de retenção desenvolvidos por HPLC (detecção absorciométrica em 220 nm). Para cada fase estacionária testada, diferentes proporções de fase móvel (acetonitrila/água acidificada com ácido acético com pH 3) foram utilizadas em eluições isocráticas. Os autores verificaram para estrobilurinas que o fator de retenção diminuía com o aumento da proporção de acetonitrila nas colunas testadas e que a partição era semelhante à de colunas de fase reversa convencional (NOGA *et al.*, 2012). Neste mesmo ano, um estudo foi realizado para avaliar a degradação fotocatalítica de piraclostrobina em solução aquosa na presença de TiO<sub>2</sub> em suspensão. A fotodegradação de piraclostrobina foi acompanhada por HPLC (detecção absorciométrica usando um DAD) e os intermediários da reação de fotodegradação foram concentrados em cartuchos de SPE (C18) e identificados por LC-MS-MS. A cinética de fotodegradação para piraclostrobina foi de pseudo-primeira ordem, com a degradação completa após 60 min de irradiação com a lâmpada ultravioleta (UV de 125 W de potência) (LAGUNAS-ALLUÉ *et al.*, 2012a). O mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um trabalho avaliando quatro diferentes tipos de extração de oito pesticidas, entre eles piraclostrobina, em amostras de uva, com a determinação por GC-MS. As extrações comparadas foram a assistida por micro-ondas (LOQ = 5,8 µg kg<sup>-1</sup>) e por dispersão da matriz em fase sólida, que combina diretamente a amostra sólida com um adsorvente (dispersante), usando solvente orgânico para extrair o pesticida. Os pares adsorventes/sistema de solventes avaliados para extrair os pesticidas foram: sílica de fase reversa

C18/diclorometano/acetato de etila (1:1, v/v) (LOQ = 8,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ); cloreto e sulfato de sódio/acetato de etila (LOQ = 13,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e mistura de sulfato de magnésio e cloreto de sódio/ acetato de etila (LOQ = 14,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). As recuperações variaram de 85 a 100% para piraclostrobina nos quatro métodos de extração diferentes (LAGUNAS-ALLUÉ *et al.*, 2012b). Um método que mede a quimiluminescência em sistema de injeção em fluxo para determinação de picoxistrobina foi publicado também em 2012. A picoxistrobina foi determinada usando um tubo fotomultiplicador operando a -700 V, alocada na frente da célula reacional. A picoxistrobina foi injetada em uma corrente mista de luminol com  $\text{KMnO}_4$ , sendo o sinal de quimiluminescência de picoxistrobina foi melhorado com um pré-tratamento das soluções com ultrassom. O método foi aplicado em amostras de águas naturais e água da torneira. O LOD obtido foi de 0,27  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com recuperações variaram de 93 a 107% (ZHANG *et al.*, 2012).

Um método para determinar simultaneamente cresoxim-metílico e mais quatro pesticidas foi desenvolvido em 2013 utilizando a técnica HPLC com detecção absorciométrica no UV (220 nm). Os pesticidas foram extraídos de amostras de açaí por dispersão da matriz em fase sólida, com um adsorvente sólido de alumina e uma mistura de ciclohexano/acetato de etila (1:1, v/v). A eluição foi por gradiente de acetato de etila/água 50/50 (0 min) até 90/10 (45 min) com uma coluna C-18 de 250 mm de comprimento. O LOQ obtido para cresoxim-metílico foi de 0,10  $\text{mg kg}^{-1}$ , com uma recuperação de 126% (FRÓES *et al.*, 2013). Em um outro trabalho se estudou a cinética e o padrão de degradação de cresoxim-metílico e trifloxistrobina em polpa e casca de frutas cítricas. Os resíduos de estrobilurinas foram extraídos em cartuchos SPE e determinados por cromatografia líquida com detecção absorciométrica no UV. Mais de 97% dos dois fungicidas haviam se degradado após 15 dias da sua aplicação na casca. O declínio da concentração seguiu um padrão de cinética de primeira ordem. Na polpa das frutas os resíduos estavam abaixo do LOQ (0,01  $\text{mg kg}^{-1}$ ) após 9 dias (ZHU *et al.*, 2013). Um mesmo grupo de pesquisa publicou em 2013 dois trabalhos utilizando HPLC (detecção em 210 nm) visando a determinação de pesticidas. No primeiro método, a azoxistrobina e o cresoxim-metílico, juntamente com outros dois pesticidas, foram extraídos em amostras de águas naturais por microextração assistida por ultrassom. A corrida cromatográfica foi realizada com eluição isocrática de fase móvel (metanol/solução aquosa 0,045% de ácido fosfórico 63/37, v/v). LOD de 2,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  foi obtido para

azoxistrobina e de  $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cresoxim-metílico. As recuperações foram de  $105,9 \pm 9,2$  a  $114,2 \pm 6,4\%$  para azoxistrobina e de  $83,9 \pm 8,4$  a  $98,2 \pm 7,2\%$  para cresoxim-metílico (LIANG *et al.*, 2013a). No segundo método (HPLC com detecção em 210 nm), cresoxim-metílico, picoxistrobina, piraclostrobrina e trifloxistrobina foram extraídos de amostras de suco de frutas através do procedimento de microextração assistida por ultrassom em meio contendo surfactante. A eluição de fase móvel também foi isocrática com metanol/água (70/30, v/v), em uma coluna C-18. LOD de  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  foi obtido para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobrina. Já para trifloxistrobina, o LOD foi de  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$ . As recuperações obtidas em dois níveis de fortificação variaram de  $85,5 \pm 3,6$  a  $89,7 \pm 5,0\%$  para cresoxim-metílico, de  $82,6 \pm 5,9$  a  $95,7 \pm 4,2\%$  para picoxistrobina, de  $87,1 \pm 4,7$  a  $96,8 \pm 4,6\%$  para piraclostrobrina, e de  $88,5 \pm 4,7$  a  $97,5 \pm 5,6\%$  para trifloxistrobina (LIANG *et al.*, 2013b).

Em 2014 foi publicado um trabalho visando à avaliação da existência de metabólitos de 47 pesticidas (entre eles azoxistrobina e cresoxim-metílico) em urina de 3421 mulheres grávidas de diferentes regiões da França. A técnica analítica escolhida para identificar e quantificar esses metabólitos foi a cromatografia líquida de ultraeficiência (ou de resolução rápida) com detecção por espectrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS). Metabólitos de apenas dois pesticidas, entre eles a azoxistrobina, foram encontrados na urina de 40 mulheres de regiões rurais próximas a lavouras de cereais tratadas com estes pesticidas. No trabalho se determinou quantidades-traço de azoxistrobina na urina além da identificação de três metabólitos de azoxistrobina, indicando o risco de contaminação em regiões mais próximas ao plantio (JAMIN *et al.*, 2014). Um estudo para avaliar a eficiência da lavagem ou aquecimento do feijão colhido de lavouras tratadas com quatro pesticidas, entre eles cresoxim-metílico, foi realizado. O tratamento das amostras foi feito através da lavagem com fluxo contínuo de água ou aquecimento a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. A técnica utilizada para a detecção foi a GC-EC e a extração dos pesticidas nas amostras foi feita com solventes orgânicos. As concentrações dos pesticidas recuperadas após os tratamentos foram comparadas com as concentrações dos pesticidas obtidas em amostras de feijão que não sofreram tratamento. A concentração de cresoxim-metílico encontrada nas amostras que foram aquecidas diminuiu de 30 a 50%, já as amostras que foram lavadas, a diminuição foi de 40 a 70%. A conclusão foi que o risco de contaminação por

ingestão pode ser diminuído com a realização de um procedimento simples de lavagem do feijão após a colheita (AGUILERA *et al.*, 2014).

## **2.2. Voltametria.**

Entre as técnicas eletroquímicas, a voltametria é uma das mais importantes do ponto de vista das análises quantitativas e do diagnóstico de processos eletroquímicos. A voltametria se baseia no estudo da relação entre a diferença de potencial (“voltagem”) aplicada em um eletrodo de trabalho, a corrente produzida no processo reacional entre as espécies químicas na interface eletrodo/solução e, em algumas abordagens, o perfil de corrente em função do tempo. As abordagens voltamétricas modernas envolvem o uso de uma célula com três eletrodos, sendo um deles o eletrodo de trabalho, que medeia o processo redox que envolve a espécie química de interesse, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. A taxa de variação da diferença de potencial é mantida constante e quando o potencial crítico é atingido, transferência de elétrons ocorre entre a espécie química de interesse e o eletrodo ou vice-versa. A corrente gerada nesse processo é dita faradaica e, do ponto de vista quantitativo, é importante que a intensidade dessa corrente seja proporcional ao número de espécies químicas de interesse na interface eletrodo/solução. Obviamente, a quantidade de espécies químicas de interesse na interface eletrodo/solução deve guardar relação direta com a quantidade delas no meio da solução. Outra corrente importante decorrente do processo de aplicação de potencial é a dita capacitiva, e que não guarda relação com a presença da espécie química que sofre o processo redox. A corrente capacitiva é decorrente do armazenamento de cargas na dupla camada eletrodo/solução. Essa corrente gera um sinal de fundo e pode ser minimizada pelo uso de eletrodos de área superficial pequena (microeletrodos) e com o uso de técnicas apropriadas de aplicação de potencial e de seleção da aquisição de sinal num instante em que a corrente capacitiva se torna insignificante em relação à faradaica, já que as duas tem um perfil temporal de decaimento bem distinto. A curva que relaciona a corrente em função do potencial aplicado é denominada voltamograma (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005; SKOOG *et al.*, 2002; BARD e FAULKNER, 2001).

A escolha do potencial a ser aplicado ao eletrodo de trabalho proporciona ao analista certo grau de controle sobre o processo redox permitindo até mesmo a seletividade em relação à detecção da espécie química eletroativa de interesse contida na amostra. A diferença de potencial aplicada no sistema é a força motriz da reação eletroquímica. No caso da aplicação de potenciais positivos, a oxidação das espécies é favorecida, pois o eletrodo de trabalho funciona como um sorvedouro de elétrons. Já quando o potencial aplicado é negativo, o eletrodo é fonte de elétrons, o que favorece a redução das espécies químicas eletroativas presentes na interface eletrodo/solução (SKOOG *et al.*, 2002; BARD e FAULKNER, 2001).

A varredura na direção negativa de potencial aplicado denomina-se varredura catódica, e produz uma corrente elétrica medida em função da quantidade de analito (presente na interface eletrodo de trabalho-solução) reduzido no processo. Por outro lado, a varredura na direção de potencial mais positivo é denominada varredura anódica, que gera uma corrente elétrica em função da quantidade de analito oxidado no processo (SKOOG *et al.*, 2002; BARD e FAULKNER, 2001).

Nas reações redox, as etapas mais importantes do processo são o transporte das espécies eletroativas até a interface eletrodo/solução e a reação que envolve a transferência de elétrons. A taxa de transferência de elétrons, que indica a velocidade da reação redox, é governada por processos como a transferência de massa; a transferência de carga e, eventualmente, por reações químicas que acontecem antes ou depois da transferência de elétrons para o eletrodo de trabalho (ALEIXO, 2001).

O transporte das espécies eletroativas que estão do seio da solução para a interface eletrodo/solução é denominado como transporte de massa. Este processo pode ocorrer de três formas: (i) a difusão (provocado pelo gradiente de concentração de espécie eletroativa entre o seio da solução e a região próxima à superfície do eletrodo de trabalho); (ii) a convecção (provocada pela movimentação da solução forçada por um processo físico, como a agitação da solução propriamente dita ou a rotação do eletrodo de trabalho imerso na solução) e (iii) a migração (provocada pelo gradiente de cargas elétricas existente entre o seio da solução e a região próxima à superfície do eletrodo de trabalho) (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005). Para que a relação entre as concentrações da espécie eletroativa de interesse na interface eletrodo/solução e seio da solução seja mantida durante a medição de sinal, os transportes de massa devem ser minimizados. O processo de difusão é

muito lento em relação à velocidade de varredura, já a medição feita com a solução em repouso minimiza o processo de convecção (esse processo não é eliminado totalmente, pois sempre existe o fluxo de matéria originado pelas variações térmicas locais na solução). No caso da migração, ela é minimizada com a adição de um eletrólito não reativo nas condições do experimento (eletrólito suporte) em concentração bem maior que aquela do analito (pelo menos duas ordens de grandeza) na célula eletroquímica. O eletrólito suporte minimiza a formação de um campo elétrico devido ao gradiente de cargas (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005; BAREK *et al.*, 2010; MIRCESKI *et al.*, 2007).

Quando o eletrodo de trabalho é carregado, em função do potencial aplicado, imediatamente produz-se uma orientação nas moléculas do solvente na interface eletrodo/solução criando uma contra camada elétrica de carga total igual, porém com o sinal oposto. A região de fronteira formada por duas camadas de carga oposta em sinais é chamada de dupla camada elétrica. Alguns modelos são descritos para explicar o que acontece nesta região. O modelo descrito por Stern é um resumo dos modelos de dupla camada elétrica propostos por Helmholtz, Gouy e Chapman. Neste modelo propõe-se uma primeira camada compacta adjacente ao eletrodo. Ela é composta de moléculas do solvente e íons de carga contrária, sem mobilidade, adsorvidos na superfície do eletrodo (plano interno de Helmholtz ou camada interna). Uma segunda camada é formada subsequentemente à primeira e é denominada plano externo de Helmholtz ou de camada difusão. A camada de difusão é composta por moléculas solvatadas da espécie eletroativa de interesse, que devido ao seu raio de hidratação, não conseguem atingir a superfície do eletrodo. Mais externamente, tem-se a região denominada de seio da solução, onde o eletrodo não exerce influência sobre as espécies eletroativas. Existe proporcionalidade entre as concentrações do analito presentes na camada de difusão e seio da solução, o que viabiliza a realização de análises quantitativas (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005; BARD e FAULKNER, 2001). Na Figura 3 é apresentado um esquema do modelo de Stern para a dupla camada elétrica.

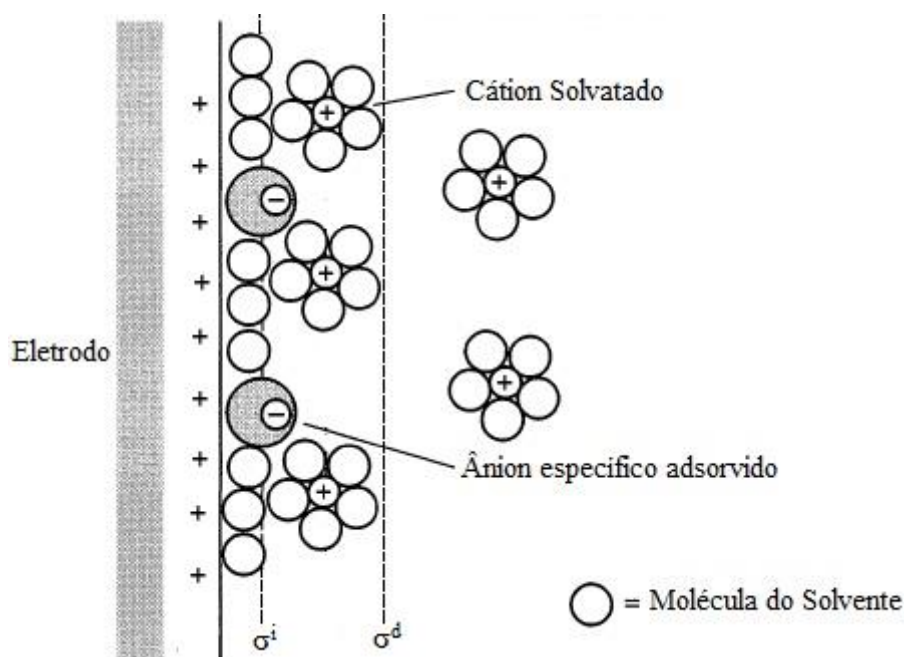


Figura 3 - Representação esquemática da dupla camada elétrica segundo a síntese de Stern dos modelos propostos por Helmholtz, Gouy e Chapman, onde:  $\sigma^i$  é a camada interna e  $\sigma^d$  a camada de difusão. Fonte: Adaptado de TICIANELLI e GONZALEZ, 2005.

A camada de difusão é mais espessa que a camada interna, o que possibilita certa mobilidade às espécies eletroativas solvatadas e o eletrodo exerce, nestas espécies, atração por interações de longa distância. Alguns fatores limitam a largura dessa camada de difusão como a convecção e a composição do eletrólito suporte. Sua espessura em soluções sem agitação mecânica varia entre 0,3 a 0,5 mm e, em soluções com agitação, diminui significativamente, variando de 0,01 a 0,001 mm (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005; BARD e FAULKNER, 2001).

Como mencionado, dois tipos de corrente são gerados em um processo voltamétrico, a corrente faradaica e a capacitiva. A corrente faradaica é gerada apenas pelos processos redox que envolvem espécies eletroativas na interface eletrodo de trabalho/solução, sendo essa a corrente que tem utilidade analítica. A corrente capacitiva é a principal componente da corrente residual ou de fundo, que limita a sensibilidade das técnicas voltamétricas. A corrente capacitiva é proveniente de processos decorrentes do carregamento e descarregamento da dupla camada elétrica, que nesse caso funciona como um capacitor. A corrente residual tem outro componente do tipo corrente faradaica, vinda das impurezas presentes nos reagentes, eletrólito suporte e o oxigênio dissolvido e que podem sofrer



processos redox na região característica do processo relativo ao analito de interesse. A contribuição dessa corrente faradaica pode ser reduzida ou eliminada com uso de reagentes de maior grau de pureza e pela desoxigenação da solução com um gás inerte. Porém, quando amostras complexas são analisadas, sempre existe o risco do aparecimento de corrente faradaica proveniente de espécies químicas interferentes. Assim, quando possível, um controle usando um branco adequado é fundamental para a garantia da obtenção de resultados exatos e sem erro sistemático. (ALEIXO, 2001; TICIANELLI e GONZALEZ, 2005; BAREK *et al.*, 2010; MIRCESKI *et al.*, 2007).

As técnicas voltamétricas são classificadas pela forma em que a diferença de potencial é aplicada e pela forma como a corrente (sinal analítico) é adquirida (Figura 4). A estratégia de obtenção do sinal analítico é fundamental para se minimizar a contribuição da corrente capacitiva, para a discriminação de sinal do analito e de interferentes que produzem corrente na mesma janela de potencial do analito e para a melhoria geral da razão sinal do analito/sinal de fundo. A classificação das técnicas voltamétricas também é feita de acordo com o uso de estratégias prévias à medição de sinal, por exemplo, concentração prévia de analito via processos eletrolíticos (SKOOG *et al.*, 2002).

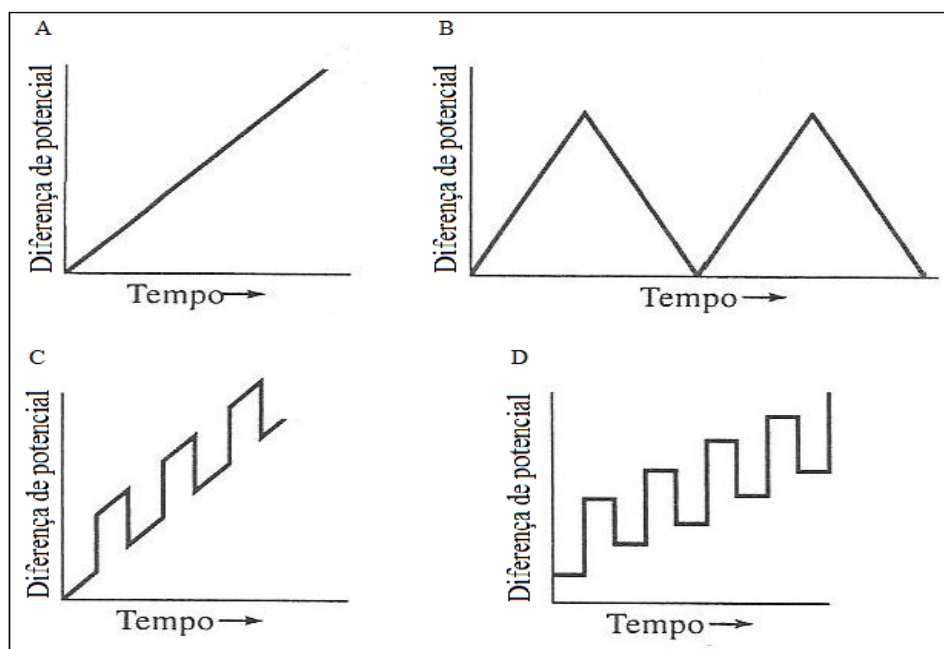


Figura 4 - Estratégias de aplicação da taxa de variação de potencial: A) Voltametria com varredura linear; B) voltametria de varredura do tipo cíclico; C) voltametria com varredura do tipo pulso diferencial e D) voltametria com varredura do tipo onda quadrada. Fonte: Adaptado de SKOOG, *et. al*, 2002.

### 2.2.1. Voltametria de pulso diferencial (DPV).

A técnica de varredura linear, primeiramente utilizada na polarografia clássica e nas primeiras abordagens com eletrodos que não eram de mercúrio, apresentavam baixa sensibilidade causada em grande parte pela falta de discriminação entre as correntes capacitiva e faradaica e também pela resolução pobre entre os sinais (nesse caso dito ondas) de duas ou mais espécies químicas cujos processos redox ocorrem em potenciais característicos (nessa abordagem, ditos potenciais de meia onda  $E_{1/2}$ ) próximos uns dos outros. Com a melhoria da tecnologia da instrumentação, foi possível desenvolver as técnicas de controle na aplicação de pulsos reprodutivos e curtos (técnicas de pulso) e aquisição de sinal (corrente) em tempos específicos da varredura (RILEY E WATSON, 1987; SKOOG *et al.*, 2002).

Na voltametria de pulso diferencial uma programação de potencial é realizada, aplicando pulsos superpostos em uma rampa linearmente crescente. A amostragem da corrente ocorre em dois intervalos de tempo, o primeiro

imediatamente após aplicação do pulso ( $S_1$ ) e o segundo próximo ao final ( $S_2$ ), como ilustrado na Figura 5. O valor final de corrente registrado é igual à diferença entre as intensidades dessas duas correntes. Desse modo, a corrente capacitiva é compensada, sendo o seu valor muito próximo nos dois pontos onde a corrente total é medida. A amplitude do pulso de potencial aplicado (em mV), durante um tempo de aplicação (em ms), separa os pontos de amostragem da corrente (SKOOG *et al.*, 2002; BARD e FAULKNER, 2001).

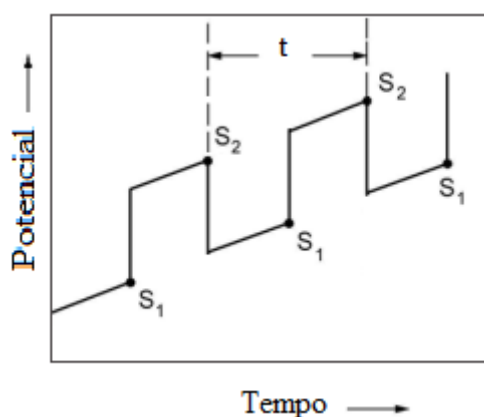


Figura 5 - Aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial. A corrente é amostrada em  $S_1$  e  $S_2$  e a diferença entre elas é que é registrada:  $I = I_{S_2} - I_{S_1}$ , sendo  $t$  o tempo. Fonte: Adaptado de SKOOG, *et. al*, 2002.

As correntes terão uma diferença maior, considerando como referência a voltametria clássica de varredura linear, na região próxima ao  $E_{1/2}$  da espécie eletroativa, onde uma pequena variação de potencial produzirá grande variação de corrente na voltametria de pulso diferencial. Assim, a corrente aumenta até atingir o seu valor máximo em  $E_{1/2}$ , denominado na voltametria de pulso diferencial de potencial de pico ( $E_p$ ), decaindo posteriormente para o nível da corrente de fundo, logo, o formato do voltamograma será o de picos relativamente finos, o que melhora a resolução entre espécies que sofrem processos redox em regiões de potencial próximos (SKOOG *et al.*, 2002; BARD e FAULKNER, 2001).

Na voltametria de pulso diferencial, o valor da corrente máxima em  $E_p$  é denominado corrente de pico ( $I_p$ ), e, dentro de condições ideais, é proporcional à concentração da espécie eletroativa no seio da célula eletroquímica. Como  $I_p$  é uma

corrente de difusão, pode-se utilizar a voltametria de pulso diferencial em análises quantitativas (GREEF, *et al.*, 1985).

### 2.2.2. Voltametria de onda quadrada (SWV).

A voltametria de onda quadrada (SWV do inglês *square wave voltammetry*) é uma técnica, na qual a aquisição da corrente resultante do processo redox é proveniente da sobreposição de uma onda quadrada em uma rampa de potencial na forma de escada, com uma amplitude de pulso ( $a$ ), um incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ), e o tempo ( $\tau$ ) de duração da onda quadrada. Na Figura 6, a forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada é apresentada. A frequência da onda quadrada em Hz é igual a  $1/\tau$ . Assim como na DPV, a medição da corrente é realizada em dois pontos na onda quadrada. A primeira medição (posição 1 na Figura 6) é no final do pulso direto (no sentido da varredura), já a segunda medição (posição 2 na Figura 6) é onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura (SOUZA *et al.*, 2003; MIRCESKI *et al.*, 2007).

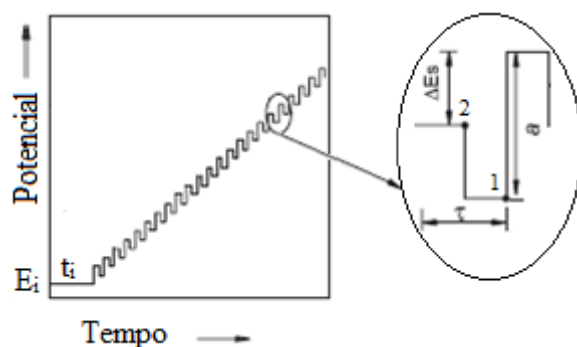


Figura 6 - Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. Onde:  $a$  é a amplitude de pulso;  $\Delta E_s$  é o incremento de varredura e  $\tau$  é o tempo. Fonte: Adaptado de SOUZA, *et. al*, 2003.

A dupla amostragem na corrente minimiza a contribuição da corrente capacitiva. Já a amostragem da corrente nos dois sentidos de varredura de potencial contribui também para um ganho na sensibilidade quando a espécie eletroativa tem um mecanismo redox reversível, pois as correntes de pico de redução e de oxidação

da espécie são somadas, gerando um sinal analítico (corrente resultante) maior do que quando apenas uma dessas correntes é medida. Para espécies com o mecanismo redox irreversível ou quase-reversível essa vantagem já não é significativa, pois apenas a corrente de um dos processos é relevante. Estes fatores contribuem para que a voltametria de onda quadrada permita, muitas vezes, o alcance de limites de detecção menores do que aqueles observados para a voltametria de pulso diferencial (SOUZA *et al.*, 2003; MIRCESKI *et al.*, 2007).

A voltametria de onda quadrada permite a realização de medições mais rápidas, por causa da alta frequência de aplicação dos pulsos, quando comparada à voltametria de pulso diferencial. A velocidade na medição da corrente para uma análise por voltametria de onda quadrada é dada em função do incremento de varredura de potencial ( $\Delta E_s$ ) e da frequência ( $f$ ) de aplicação dos pulsos de potencial (SOUZA *et al.*, 2003; MIRCESKI *et al.*, 2007).

O pico voltamétrico resultante apresenta a posição na escala de potencial, a largura, a altura (intensidade) e a relativa simetria de pico que reflete as características do tipo de sistema redox. Ademais, a voltametria de onda quadrada possui modelos matemáticos que podem ser utilizados para diagnosticar o mecanismo dos processos redox das espécies eletroativas que interagem com o eletrodo de trabalho, e permite calcular parâmetros importantes como, por exemplo, o número de elétrons envolvidos no processo redox nas reações irreversíveis. Assim, esta técnica se torna uma ferramenta importante para o estudo dos mecanismos redox de compostos orgânicos (SOUZA *et al.*, 2003; LOVRIC e BRANICA, 1987).

No estudo dos mecanismos redox, por voltametria de onda quadrada, os sistemas irreversíveis são caracterizados por uma relação linear entre a corrente de pico ( $I_p$ ) e a frequência ( $f$ ) de aplicação dos pulsos, como mostrado na Equação 1, onde  $K_r$  é a constante de velocidade do processo redox (SOUZA *et al.*, 2003).

$$I_p = K_r f \quad (\text{Eq. 1})$$

Desse modo, a Equação 1 indica que para sistemas redox irreversíveis, o aumento da frequência tende a melhorar a sensibilidade da resposta analítica.

Em reações irreversíveis, existe uma relação linear entre o potencial de pico ( $E_p$ ) e o logaritmo da frequência, como mostrado na Equação 2, e que possibilita o

cálculo do coeficiente de transferência eletrônica ( $\alpha$ ) ou do número de elétrons ( $n$ ) através do coeficiente angular dessa relação, onde:  $R$  é a constante dos gases ideais,  $T$  é a temperatura e  $F$  a constante de Faraday (SOUZA *et al.*, 2003; GOSSER, 1993).

$$\Delta E_p / \Delta \log f = -2,3RT / \alpha nF \quad (\text{Eq. 2})$$

Outro fato importante observado em reações redox irreversíveis, é que a largura de meia-altura ( $\Delta E_{p/2}$ ) é independente da amplitude dos pulsos. O valor da largura do pico na meia altura de intensidade de corrente é um indicador usado para o cálculo do número de mol de elétrons envolvidos em reações redox irreversíveis, como indicado na Equação 3 (SOUZA *et al.*, 2003; GOSSER, 1993).

$$\Delta E_{p/2} = (65,5 + 0,5) / \alpha n \quad (\text{Eq. 3})$$

Ao se aproximar o coeficiente de transferência eletrônica para um valor característico de  $\alpha = 0,5$ , a Equação 3 é simplificada (Equação 4) (SOUZA *et al.*, 2003; GOSSER, 1993).

$$\Delta E_{p/2} = 127/n \quad (\text{Eq. 4})$$

Valores de coeficiente menores que 0,5, indicam que a transferência eletrônica acontece muito rapidamente do eletrodo para a espécie eletroativa. Coeficientes com valores mais baixos também podem indicar uma mudança estrutural nos produtos redox gerados na superfície do eletrodo, causando uma barreira para a transferência eletrônica. Já valores de  $\alpha$  maiores que 0,5, podem ocorrer em reações redox que envolvem mais de uma etapa. A aproximação do coeficiente de transferência eletrônica para 0,5 é aceitável ao se considerar sistemas redox irreversíveis, com apenas uma etapa de transferência eletrônica, e com geração de produtos que não interferem na eficiência da transferência de elétrons (SOUZA *et al.*, 2003; GOSSER, 1993).

Outra informação importante que se pode obter dos modelos matemáticos em voltametria de onda quadrada é a concentração de espécie adsorvida ( $\Gamma$ ) na superfície do eletrodo de trabalho. Pode-se calcular  $\Gamma$  pela Equação 5, onde  $\Gamma$  faz

parte do coeficiente angular da relação linear obtida entre a corrente de pico ( $I_p$ ) e a amplitude do pulso (LOVRIC e KOMORSKY-LOVRIC, 1988).

$$I_p/a = (5 \pm 1) 10^2 q \alpha n^2 F f \Delta E_s \Gamma \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde  $q$  é a área da superfície ativa do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $n$  é a quantidade de elétrons (mol),  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica,  $F$  é a constante de Faraday ( $\text{A s mol}^{-1}$ ),  $a$  é a amplitude do pulso de onda quadrada (V),  $f$  é a frequência aplicada de pulso (Hz) e  $\Delta E_s$  é o incremento de varredura (V).

Em sistemas com o mecanismo redox quase-reversíveis não é encontrado comportamento linear na relação entre corrente de pico e frequência de pulso. Já em sistemas reversíveis, a relação linear ocorre quando a corrente de pico é monitorada em função da raiz quadrada da frequência de aplicação do pulso (SOUZA *et al.*, 2003).

### 2.2.3.

#### **Voltametria de redissolução e voltametria adsortiva de redissolução.**

Na abordagem de voltametria de redissolução, uma reação eletroquímica entre a espécie eletroativa e o eletrodo de trabalho é forçada a ocorrer antes da varredura do potencial para a aquisição da corrente. Esta reação ocorre por meio da aplicação de um potencial fixo, durante um período estabelecido e em condições de transporte de massa convectivo (controlado e reproduzível). Assim, o analito é pré-concentrado na superfície do eletrodo de trabalho (etapa de deposição), para posteriormente ser redissolvido para solução na varredura de potencial que força a reação redox inversa. Essa abordagem promove a elevação significativa da corrente final produzida (GREEF *et al.*, 1985).

Existem dois tipos de voltametria de redissolução, a anódica e a catódica. Na voltametria de redissolução anódica, um potencial catódico é aplicado durante a etapa de pré-concentração, reduzindo a espécie eletroativa na superfície do eletrodo, posteriormente o potencial é varrido no sentido anódico oxidando-a para solução. Já na voltametria de redissolução catódica, um potencial anódico é aplicado durante a etapa de pré-concentração oxidando a espécie eletroativa na

superfície do eletrodo e posteriormente o potencial é varrido no sentido catódico reduzindo-a para solução (SKOOG *et al.*, 2002; GREEF *et al.*, 1985).

Uma variante é a voltametria adsortiva de redissolução, técnica utilizada quando não ocorre uma reação eletroquímica entre o analito e a superfície do eletrodo de trabalho. O princípio dessa técnica está baseado na capacidade de alguns compostos se adsorverem espontaneamente na superfície de um eletrodo comum ou quimicamente modificado. A acumulação destes compostos não envolve processo faradaico, mantendo-se ligados ao eletrodo por interações eletrostáticas, covalentes ou de troca iônica. Diversos fatores influenciam a quantidade de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo, com destaque para o tipo de solvente, a constituição do eletrodo de trabalho, a força iônica e pH do meio, o transporte de massa, o potencial aplicado ou a temperatura do sistema. Para que a voltametria adsortiva seja utilizada no desenvolvimento de um método eletroanalítico, o processo de adsorção do analito deve ser reprodutível, sem ocorrer a passivação da superfície do eletrodo. Em concentrações relativamente altas, pode ocorrer perda de linearidade das curvas analíticas, podendo ser minimizada pela utilização de tempos menores de acumulação e baixa velocidade de agitação (GARAY, 2001; VIRE *et al.*, 1989; PACHECO *et al.*, 2013).

#### **2.2.4. Voltametria cíclica (CV).**

Como na voltametria de varredura de potencial linear, na voltametria cíclica (CV), a diferença de potencial é aplicada numa taxa constante, produzindo uma variação de potencial linear em função do tempo, partindo de um valor inicial, até atingir um valor final. Porém, ao contrário da voltametria tradicional, no instante em que o potencial final é atingido, a varredura é invertida até atingir novamente o potencial de partida. Estas duas etapas de varredura fazem parte de um ciclo, podendo ser repetido quantas vezes se desejar. A corrente produzida no processo é graficada em função do potencial aplicado, gerando o chamado voltamograma cíclico. Na voltametria cíclica, os processos de oxidação e de redução da espécie química de interesse podem ocorrer no eletrodo de trabalho e, quando ocorrem, são representados por correntes de pico anódica ( $I_{p,a}$ ) catódica ( $I_{p,c}$ ). No mais alto valor



de corrente anódica, o  $I_{p,a}$ , tem-se o potencial de pico anódico ( $E_{p,a}$ ). Similarmente, o mais alto valor de corrente catódica, o  $I_{p,c}$ , ocorre no potencial de pico catódico ( $E_{p,c}$ ) (GOSSER, 1993).

O valor de corrente de pico ( $I_p$ ) depende de vários parâmetros indicados na Equação 6.

$$I_p = (2,686 \times 10^5) n^{3/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde  $n$  é a quantidade de elétrons, em mol, envolvidos na semi-reação;  $A$  é a área eletroativa do eletrodo ( $\text{cm}^2$ );  $C$  é a concentração da espécie eletroativa ( $\text{mol L}^{-1}$ );  $D$  é o coeficiente de difusão da espécie no meio ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).

Esta equação também possibilita o cálculo da área eletroativa do eletrodo de trabalho. No caso, se uma relação linear for encontrada para a relação entre a corrente de pico e a raiz de velocidade de varredura, no coeficiente angular encontrado para a reta se tem embutido vários desses parâmetros (GOSSER, 1993).

A voltametria cíclica pode ser usada como uma ferramenta para estudo da eletroatividade de compostos inorgânicos e moléculas orgânicas. A técnica também fornece informações a respeito do mecanismo redox e do transporte de massa de uma espécie eletroativa. A reversibilidade eletroquímica está associada à troca rápida de elétrons entre as espécies eletroativas e o eletrodo. Quando a espécie eletroativa tem mecanismo redox reversível, uma relação linear se estabelece entre a raiz da velocidade de varredura de potencial e a corrente de pico (tanto a anódica quanto a catódica). Para um transporte de massa controlado por difusão, a relação linear se estabelece entre o valor do pico de corrente (catódico ou anódico) e a raiz da velocidade de varredura de potencial. Nas espécies com o transporte de massa controlado adsorção, tal relação não é linear. Estas informações em conjunto com as obtidas por voltametria de onda quadrada possibilitam propor mecanismos redox e o transporte de massa para as espécies eletroativas estudadas (GOSSER, 1993).

A CV é utilizada principalmente em estudos exploratórios do comportamento redox de espécies eletroativas no eletrodo de trabalho utilizado. Seu emprego é limitado quando se deseja aplicá-la quantitativamente na determinação de baixas concentrações (menores que  $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Isto se deve principalmente a interferência da corrente capacitiva na corrente final resultante, já que a varredura

é basicamente a linear clássica. Em algumas situações, a relação sinal ruído pode ser melhorada fazendo-se uma amostragem num tempo específico a cada incremento de variação de potencial, de modo a se ter um experimento similar à voltametria cíclica, mas com variação de potencial em incrementos definidos. Nesse caso, a aplicação quantitativa pode ser viabilizada, porém ainda tendo limitações em termos de sensibilidade (PACHECO *et al.*, 2013; GOSSER, 1993).

### **2.3. Amperometria.**

A amperometria é uma técnica eletroquímica que se baseia na aplicação de pulsos de diferença de potencial (potencial fixo) que força a oxidação ou redução de uma espécie química, gerando uma corrente faradaica. O gráfico que relaciona a corrente medida num potencial fixo em função do tempo é denominado amperograma e a intensidade da corrente produzida, dentro de condições ideais, é proporcional a concentração da espécie eletroativa no seio da solução (ANGLESON e BETZ, 1997).

Diferente das técnicas voltamétricas, na amperometria a corrente capacitiva é baixa, pois ao se manter o potencial constante, essa corrente também se torna constante e próxima ao zero. Além disso, a amperometria apresenta maior sensibilidade que as técnicas voltamétricas, em função da redução na interferência da corrente de fundo (QUINTINO e ANGNES, 2004).

Quando a amperometria é associada a abordagens analíticas como a análise por injeção em fluxo (FIA) ou em sistema por análise de injeção em batelada (BIA), é aconselhável utilizar concentração relativamente alta do eletrólito suporte. Tal eletrólito presente na amostra e nas soluções padrões deve ser o mesmo presente no carregador para o FIA ou no interior da célula BIA. Isso é necessário para manter a força iônica do meio, minimizando variações na região da dupla camada elétrica e garantindo que o sinal transiente registrado seja atribuído apenas ao processo faradaico (QUINTINO e ANGNES, 2004).

Essa técnica é utilizada, na eletroanálise, em aplicações variadas e, sua associação ao FIA e BIA a torna mais atraente para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos. Nesse caso, as medições são dos picos transientes de corrente em função do tempo, obtidos por um potencial fixo aplicado ao eletrodo de trabalho.

Vale ressaltar que os potenciais de oxidação ou redução, adequados à análise a ser realizada, devem ser obtidos a partir de estudos prévios usando técnicas voltamétricas (ANGLESON e BETZ, 1997).

A amperometria de múltiplos-pulsos é mais uma abordagem amperométrica, a qual permite a aplicação simultânea de dois ou mais pulsos de potenciais na superfície do eletrodo de trabalho. O monitoramento das correntes geradas em função do tempo pode ser realizado através de amperogramas independentes (LIMA *et al.*, 2013).

A principal limitação das técnicas amperométricas é a sua baixa seletividade. Se a análise for realizada em potenciais muito positivos ou negativos, pode ocorrer a oxidação ou redução de todas as espécies eletroativas na solução, com potenciais abaixo do aplicado. O cálculo de um fator permite a identificação da presença de espécies eletroativas interferentes no sinal analítico. Para analitos com dois ou mais picos de oxidação ou de redução, esse fator pode ser calculado pela razão entre a corrente do pico mais intensa ( $I_E$ ) gerada pela aplicação de um pulso de potencial específico e a corrente do pico menos intensa ( $I'_E$ ) gerada pela aplicação de um pulso de outro potencial específico, utilizando a amperometria de múltiplos-pulsos. O fator ( $I_E/I'_E$ ) é constante e maior que a unidade para o analito na ausência de interferência, não importando a concentração do mesmo. A presença de outras espécies eletroativas na solução que produzam sinal analítico interferente tende a distorcer o valor desse fator (LIMA *et al.*, 2013).

#### 2.4.

#### **Análise por injeção em batelada (BIA).**

A análise por injeção em batelada (BIA), do inglês *batch injection analysis*, é uma abordagem analítica que teve seu início há duas décadas e foi associada inicialmente com detecção por amperometria. No BIA, pequenos volumes do analito são injetados, com o auxílio de uma micropipeta eletrônica, diretamente sobre o eletrodo de trabalho imerso em um grande volume de eletrólito suporte. O contato entre a zona injetada do analito e a superfície do eletrodo resulta em sinais transientes semelhantes aos obtidos em FIA. Esta técnica possui características análogas ao FIA como a rapidez, simplicidade, uso de volumes pequenos de amostra, repetibilidade e sensibilidade, porém, no BIA não se tem o processo

automatizado, já que não utiliza bombas, tubos de conexão e válvulas que mantêm fase móvel constantemente fluindo no sistema de modo a carrear a zona de analito (WANG e TAHA, 1991).

Na Figura 7a é apresentado o esquema do primeiro sistema BIA construído. A célula era feita de acrílico, com a distância da superfície eletroativa do eletrodo de trabalho para ponteira da micropipeta de 2 mm (WANG e TAHA, 1991). As etapas envolvidas em uma injeção no sistema BIA estão esquematizadas na Figura 7b. A solução de amostra é injetada (em volumes na ordem de microlitros) através de uma micropipeta eletrônica formando uma zona que entra em contato direto com o eletrodo, por causa da proximidade da ponta da micropipeta e do eletrodo, se dispersa no eletrólito suporte tendendo a alcançar diluição infinita. O transporte da zona até o eletrodo é reprodutível e a dispersão controlada. Como consequência, a resposta tem um sinal transiente na forma de pico, seguido de uma queda do sinal até a linha base. A queda relativamente instantânea do sinal se dá devido a corrente de difusão da espécie ser mínima (desprezível) em relação a corrente gerada pelo BIA (alta vazão). A queda do sinal pode ser mais lenta em sistemas em que o analito tende a se adsorver na superfície do eletrodo, necessitando de agitação mecânica do eletrólito suporte para auxiliar a limpeza da superfície do eletrodo. Ajustadas as condições experimentais e antes do limite de saturação da resposta analítica, a intensidade do sinal obtido em um sistema com a abordagem do BIA é proporcional à concentração do analito na solução injetada na superfície do eletrodo (QUINTINO e ANGNES, 2004).

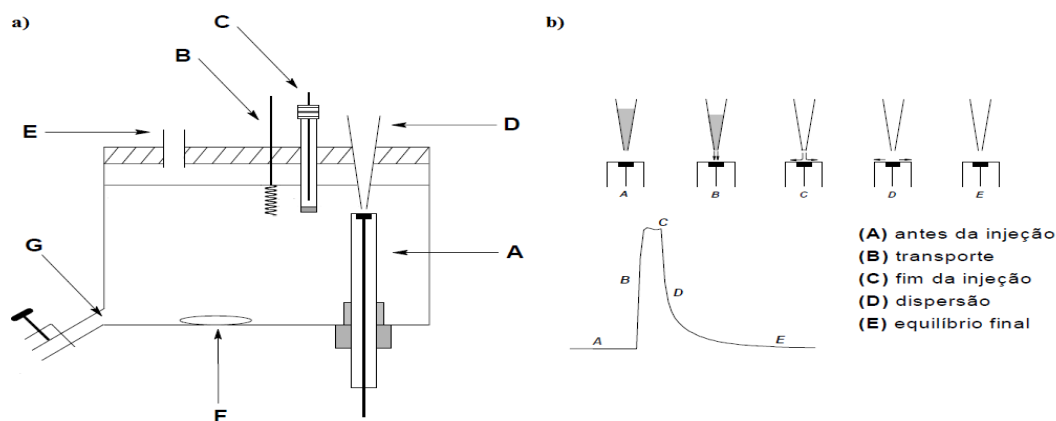


Figura 7 - a) Diagrama esquemático da primeira célula BIA: A - eletrodo de trabalho; B - eletrodo auxiliar; C - eletrodo de referência; D - ponteira da micropipeta; E - orifício para preenchimento da célula; F - barra de agitação; G - dreno. b) Etapas envolvidas em uma injeção no BIA. Fonte: Adaptado de WANG e TAHA, 1991 e QUINTINO e ANGNES, 2004.

O volume das primeiras células construídas para BIA variava de 250 a 700 mL, porque se acreditava na necessidade de uma grande diluição do microvolume de solução de analito injetado de forma a produzir uma volta rápida do sinal transiente para a linha base. No entanto, células de volumes menores (de 40 a 200 mL) se mostraram suficientes para realizar uma série de análises relativamente numerosa. Os parâmetros que influenciam a resposta do sinal em um método analítico baseado no uso da abordagem BIA são a velocidade de injeção da solução; o volume de solução injetado; a necessidade ou não de agitação e, caso seja necessário agitar, a sua velocidade (QUINTINO e ANGNES, 2004).

A abordagem de BIA pode ser associada a técnicas de detecção como a espectrofotometria (WANG e ANGNES, 1993), calorimetria (THAVARUNGKUL *et al.*, 1999), fluorescência (WANG *et al.*, 1992; AMORNTHAMMARONG *et al.*, 2011), potenciometria (LU *et al.*, 1993; FERNANDES *et al.*, 1998), voltametria (BRETT *et al.*, 1999; BRETT *et al.*, 2000). Porém, a principal associação desta abordagem analítica é com a amperometria. O BIA-amperometria pode ser usada para análise de diversas matrizes como combustíveis (TORMIN *et al.*, 2011; TORMIN *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012), alimentos (DA-SILVA *et al.*, 2012) e fármacos (GIMENES *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012).

## 2.5. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).

O diamante é uma forma cristalina do carbono, extremamente dura, sendo considerado um excelente material para muitas aplicações tecnológicas, por causa de suas propriedades físicas e químicas singulares, tais como alta resistividade elétrica, elevada condutividade térmica e boa resistência à corrosão. Além disso, esse material tem baixo coeficiente de atrito, é praticamente inerte quimicamente e possui transparência óptica. O diamante sintético não-dopado e livre de impurezas tem propriedades isolantes, com resistividade  $> 10^8 \Omega \text{ cm}$ . Porém quando dopado com elementos químicos adequados, sua propriedade de condução se modificam significativamente (SWAIN e RAMESHAM, 1993).

A fabricação do primeiro diamante sintético dopado com boro foi datada de 1903 através do processo de crescimento em altas pressões e temperaturas (BURTON, 1905). Várias técnicas foram desenvolvidas para a fabricação de filmes ultrafinos de diamante dopado com boro (DDB), sendo a deposição química a partir da fase de vapor (CVD do inglês *chemical vapor deposition*), a mais utilizada e aprimorada. A dopagem do diamante com boro, pelo processo CVD, é geralmente feita com gás trimetil-boro, em concentrações que variam de 10 a 20.000 mg L<sup>-1</sup>, fornecendo ao material, dependendo da concentração de boro, características de um semimetal ou semicondutor. Metano, metanol ou acetona podem ser utilizados como fontes de carbono para a fabricação do DDB, sendo o metano o mais utilizado por ser um gás, e por causa disso ser mais conveniente o seu uso no sistema CVD (ZHANG *et al.*, 1996).

O boro possui três elétrons na camada de valência, e tende a doar os elétrons ao carbono do diamante, gerando no material resultante as propriedades semicondutoras tipo-p, com a redução do nível de Fermi, em função do aumento do número de elétrons. Esta característica que o boro confere ao DDB, o torna atraente para a construção de eletrodos de trabalho. Porém, por causa da alta tecnologia envolvida na preparação do DDB, o seu custo é elevado comparado ao eletrodo de carbono vítreo. No entanto, com o aprimoramento dessa tecnologia e com a fabricação em série, o custo desse material vem diminuindo (SWAIN e RAMESHAM, 1993).

Os eletrodos de DDB são muito utilizados em eletroanálise com vantagens em relação ao eletrodo carbono vítreo e de filmes metálicos. Por exemplo, esse eletrodo possui uma ampla janela de potencial em soluções aquosas, deslocando a região sobrepotencial (com eletrólise da água e/ou oxigênio dissolvido) para valores acima de  $\pm 2200$  mV. Esta característica possibilita a determinação de espécies que tenham o seu potencial redox característico acima de  $\pm 1000$  mV, o que não pode ser feito utilizando o eletrodo de carbono vítreo. Além disso, produz baixa corrente capacitiva, tem alta estabilidade (química/física) e baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido na solução, não necessitando, na maioria dos casos, de uma desoxigenação do eletrólito suporte. O DDB abre novas oportunidades para o trabalho em condições extremas, tais como potencial anódico elevado e meio quimicamente agressivo, por exemplo, fortemente ácido. Essas propriedades do DDB, aliadas à sua robustez, indicam que ele é adequado para análises com técnicas eletroanalíticas, sendo um dos materiais mais promissores para a construção de eletrodos de trabalho na atualidade. Uma desvantagem é que quando se usa o DDB em potenciais tão extremos, muitas espécies químicas sofrerão processo redox e o risco de interferências é maior (DRAGOE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011).

Na literatura, pode-se verificar a aplicação do DDB em diversas áreas de pesquisa, tais como tratamento de águas residuais com a oxidação de poluentes orgânicos (SAEZ *et al.*, 2013), em análises bioquímicas, detectando células cancerosas por meio da medição da variação de impedância (WENG *et al.*, 2011), em análises ambientais determinando, por exemplo, manganês em material particulado atmosférico com a voltametria de onda quadrada (FELIX *et al.*, 2005), e eletroanálise com o objetivo de quantificar moléculas orgânicas como fenol (INIESTA *et al.*, 2001), pesticidas organofosforados (WEI *et al.*, 2014), hidrazina (CHANNON *et al.*, 2013) aminobifenil e aminoftalenos (ZAVÁZALOVÁ *et al.*, 2012) e 2-naftol (PANIZZA *et al.*, 2001). Nenhum método foi descrito na literatura científica, até os trabalhos realizados nesta tese para a determinação de estrobilurinas utilizando o DDB como eletrodo de trabalho.

## 2.6. Eletrodos de filme metálico.

O eletrodo de trabalho feito de mercúrio (filme ou gota pendente) tem sido comumente utilizado durante várias décadas na execução de análises eletroquímicas, em especial nas aplicações voltamétricas (polarográficas no caso da gota de mercúrio), apesar de sua elevada toxicidade. Em particular, o eletrodo de filme de mercúrio é frequentemente empregado devido ao procedimento de preparo relativamente simples e à comodidade de sua aplicação em sistemas em fluxo (ECONOMOU e FIELDEN, 1998). Muitos outros materiais são sugeridos como substitutos para o filme de mercúrio na fabricação de eletrodos de trabalho para voltametria/amperometria, como, por exemplo, eletrodos modificados com ouro, platina, prata, irídio, diversas ligas e amálgamas. Porém, nenhum deles apresentou o excelente desempenho dos eletrodos de mercúrio na janela de potencial negativa (FISCHER *et al.*, 2006; ACHTERBERG e BRAUNGARDT, 1999; WANG e TIAN, 1993; MIKKELSEN e SCHRØDER, 2001; WANG *et al.*, 2001).

### 2.6.1. Eletrodo de filme de bismuto (BiFE).

Uma das alternativas que merece destaque, para substituição do eletrodo de mercúrio é o eletrodo de filme de bismuto (BiFE), por causa da baixa toxicidade do Bi, alta capacidade de pré-concentração e janela de operação similar à do mercúrio (WANG *et al.*, 2000).

Assim como o mercúrio, a utilidade do bismuto como um eletrodo é baseada em sua capacidade de formar amálgamas com íons metálicos, na interface com a solução, e de adsorver outras espécies químicas tais como substâncias orgânicas e complexos metálicos. O BiFE consiste de um filme fino de bismuto depositado em um substrato adequado como, por exemplo, o carbono vítreo, cuja função é fornecer sítios para a formação do filme. O carbono vítreo é preferido como substrato, pois possui alta condutividade elétrica, boa estabilidade mecânica, baixo custo, além de produzir baixa corrente de fundo. Acreditava-se, até o trabalho realizado nesta tese, que a janela de potencial para trabalhos com BIFE era de -1200 mV a -180 mV, sendo o filme completamente oxidado em potenciais mais positivos (DEMETRIADES *et al.*, 2004).



O filme de bismuto pode ser preparado pelo método *in situ* e *ex situ*. No processo *in situ*, o  $\text{Bi}^{3+}$  é adicionado na solução da cela de trabalho, sendo o filme formado simultaneamente com a etapa de concentração do analito (da abordagem de voltametria de redissolução). Assim, durante a formação do filme, em geral, o analito de interesse é concomitantemente pré-concentrado, sendo que a concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na cela deve ser otimizada, pois existe uma relação entre esta e o sinal analítico das espécies químicas que serão determinadas. Na medida em que se aumenta a concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na cela eletroanalítica, mais efetiva é a formação do filme, o que possibilita o acúmulo de maior quantidade da espécie eletroativa de interesse no filme, aumentando conseqüentemente o sinal analítico. Já no processo *ex situ*, o filme é formado separadamente em outra cela eletroanalítica, contendo solução de  $\text{Bi}^{3+}$ . Em seguida, o eletrodo é imerso na cela de trabalho que contém a amostra aquosa para se fazer a determinação analítica. Essa abordagem é a mais empregada quando as condições de análise não são extremas. Já quando ocorre aplicação de potenciais muito negativos ou eletrólitos com valores de pH muito ácidos, a sensibilidade das medições é afetada. Isso porque pode haver formação de gás hidrogênio, devido ao sobrepotencial gerado pelas reações redox de outras espécies presentes em solução e que ocasiona a remoção do filme da superfície do substrato (ECONOMOU, 2005).

O BiFE foi introduzido na voltametria de redissolução anódica inicialmente para a determinação de íons metálicos em soluções aquosas, sendo posteriormente utilizado em detecção eletroquímica de moléculas orgânicas. Tem como vantagem o fato de a renovação do filme de bismuto ser simples e rápida, com possibilidade de modificação química com adição de ligantes. Além disso, em muitos casos, a eliminação do oxigênio dissolvido na solução não é necessária (HUTTON *et al.*, 2001). Em abordagens de redissolução, todos os trabalhos mostram que a operação do BiFE deve ser feita em potenciais menores do que o da oxidação do  $\text{Bi}^{3+}$  (em torno de -150 mV, nas condições de trabalho do potenciostato com arranjo de três eletrodos sendo o de BiFE formado em substrato de carbono vítreo, com o eletrodo de referência de Ag/AgCl e um eletrodo auxiliar de platina), pois teoricamente o filme seria redissolvido em potenciais mais positivos.

Na literatura científica, vários trabalhos foram publicados utilizando BiFE como eletrodo de trabalho. A maior aplicação deste eletrodo é na determinação de metais em diversas matrizes (WANG e LU, 2000; PACHECO *et al.*, 2008;

SIRIANGKHAWUT *et al.*, 2009; ZONG e NAGAOSA, 2009; MIGUEL *et al.*, 2010; JORGE *et al.*, 2010). BiFE também é utilizado na determinação de moléculas orgânicas (NIGOVIĆ *et al.*, 2009; CAMPESTRINI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2006). Como no caso do DDB, este eletrodo ainda não foi utilizado no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de estrobilurinas. Também não existe uma aplicação eletroanalítica utilizando BiFE em potenciais mais positivos, acima do seu potencial de oxidação.

### **3. Material e métodos.**

#### **3.1. Reagentes.**

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade inferior a  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) obtida de um purificador de água Milli-Q (Millipore, EUA). As soluções aquosas estoque de  $\text{Bi}^{3+}$  foram preparadas a partir de solução padrão de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, EUA). Acetonitrila (ACN), metanol e etanol foram de grau HPLC Merck (Alemanha). Ácido sulfúrico (98,0%, m/v), hidróxido de sódio (98,0%, m/m), ácido clorídrico (37,0%, m/v), ácido acético (65,0%, m/v), acetato de sódio (99,0%, m/m), ácido bórico (99,8% m/m) e ácido fosfórico (85,0%, m/v) foram grau analítico da marca Merck (Alemanha). Os padrões utilizados, com suas respectivas purezas, foram azoxistrobina (99,0%), cresoxim-metílico (99,0%), dimoxistrobina (99,0%), fluoxastrobina (99,0%), picoxistrobina (99,0%), piraclostrobina (99,0%), trifloxistrobina (99,0%), todos da marca Riedel-de-Haen (Alemanha). Ácido nítrico, metanol e ACN, todos de grau analítico, utilizados na limpeza da vidraria e do eletrodo de DDB foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Sulfato de potássio e ferrocianeto de potássio foram da Sigma-Aldrich. Óxido de alumínio  $0,3 \mu\text{m}$  foi obtido da Metrohm, Suíça. Carbonato de sódio anidro, e hidrogenoftalato de potássio foram da Nacalai Tesque (Japão).

#### **3.2. Soluções e amostras.**

As soluções estoque de azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina foram preparadas em acetonitrila, nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-2}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Quando fora de uso, as soluções foram armazenadas sob o abrigo de luz na temperatura de  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . A solução de tampão de Britton-Robinson (tampão BR) foi preparada na concentração de  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , por uma mistura de ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico com os valores de pH ajustados com hidróxido de sódio sólido. Amostras de água da torneira foram obtidas do laboratório do Departamento de Química da PUC-Rio. As amostras de água mineral foram obtidas no comércio local. A amostra do rio Uberabinha (Uberlândia, Minas Gerais), do riacho Rainha (Campus PUC-Rio, RJ) e da lagoa Rodrigo de Freitas (Rio de Janeiro, RJ) foram

coletadas pelo próprio autor da Tese. Todas as amostras de águas foram analisadas sem qualquer pré-tratamento. O suco de uva integral não fermentado, o suco de uva fermentado e o suco de uva preparado com leite de soja analisados foram adquiridos em comércio local. Todas essas amostras de suco foram armazenadas depois de aberto na temperatura de 4°C e foram fortificadas com uma quantidade específica dos analitos antes das determinações. As amostras de urina foram coletadas do próprio autor deste trabalho e armazenadas na temperatura de 4°C até o momento da fortificação com o analito e posterior análise.

### 3.3.

#### **Materiais.**

Os cartuchos de SPE com fase estacionária C18 (500 mg de fase estacionária e 3,0 mL de volume), da marca AccuBond, foram adquiridos da Agilent Technologies (Reino Unido). Para a filtração das amostras, foram usadas seringas de 5 e 10 mL adquiridas da Becton Dickinson (Brasil) e filtros de seringa (17 mm de diâmetro e 0,45 µm de diâmetro de poro) adquiridos da National Scientific Company (Reino Unido). As membranas para filtragem dos eluentes orgânicos (47 mm de diâmetro) foram adquiridas da Fiber filter/Tokyo Soshi Kaisha Ltda (Japão) e as membranas para a filtração de soluções aquosas (1,2 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro) foram adquiridas da Schleicher & Schuell (EUA). O DDB policristalino foi adquirido na forma de placas (1,0 cm por 1,0 cm e 1,0 mm de espessura) da Adamant Technologies, Suíça. O revestimento do DDB tinha de 1,0 a 1,5 µm de espessura e de 6000 a 8000 mg L<sup>-1</sup> de dopagem com boro (dopagem tipo-p). O eletrodo auxiliar (fio de platina), eletrodo de referência (Ag/AgCl), eletrodo de carbono vítreo e as células eletroquímicas de borosilicato foram adquiridos da Bio Analytical System Inc (EUA). A ponteira plástica de micropipeta eletrônica do tipo Combitip® de 1,0 mL foi a adquirida da Eppendorf (Alemanha).

### 3.4. Instrumentação.

#### 3.4.1. Analisadores voltamétricos.

Os estudos eletroquímicos e o desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos utilizando o eletrodo de trabalho de DDB foram feitos usando um potenciostato/galvanostato (Tipo III  $\mu$ -AUTOLAB, Metrohm, Holanda) ligado a um notebook, de onde se controlou o sistema usando o programa GPES da Metrohm.

A célula de trabalho (de aproximadamente 15 mL de volume) tinha uma forma cilíndrica e foi construída em Teflon (Figura 8). O eletrodo auxiliar (fio de platina) e o de referência (o de Ag/AgCl) ficavam posicionados na parte de cima da célula para ficarem imersos na solução a partir da parte superior da célula, enquanto o eletrodo DDB foi fixado numa posição no fundo da célula, sobre uma placa de cobre, que serviu para estabelecer o contato elétrico com o potenciostato.

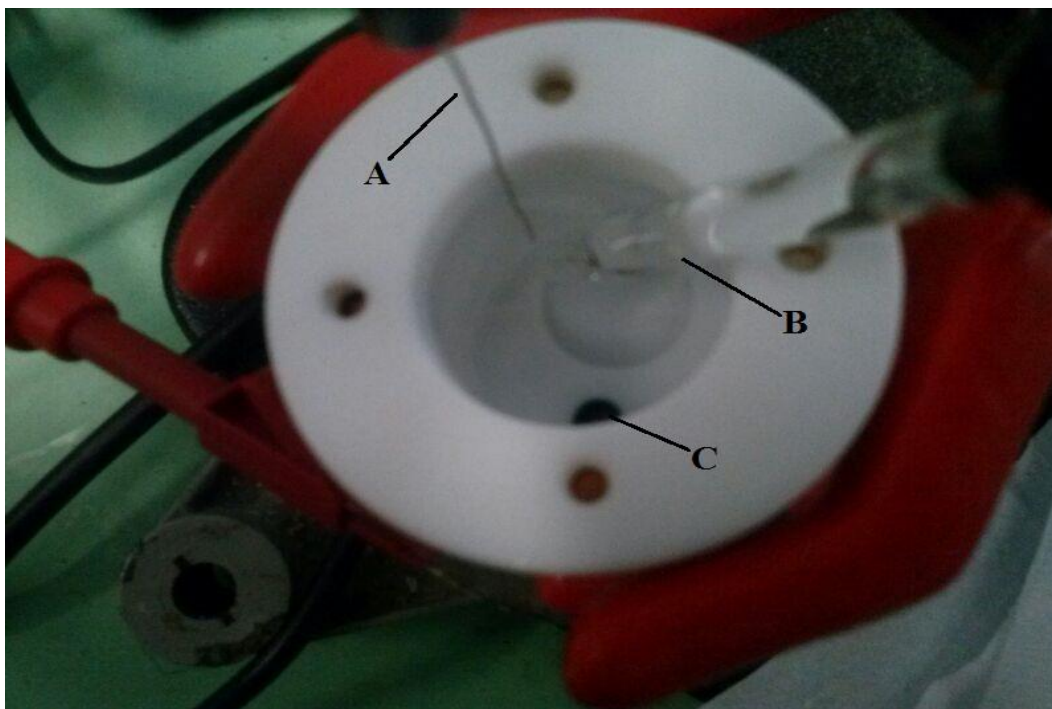


Figura 8 - Célula eletroquímica de Teflon construída no laboratório: (A) Eletrodo auxiliar de platina; (B) Eletrodo de referência de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub>; (C) Eletrodo de trabalho de DDB.

Para os métodos baseados em BIA-amperometria, uma célula, com volume total de aproximadamente 250 mL, foi construída no laboratório usando polietileno e vidro (Figura 9). A tampa da célula, na parte superior da mesma, tinha quatro entradas, uma para o eletrodo de referência (de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ), outra para eletrodo auxiliar (fio de platina), uma terceira para alojar a ponteira da micropipeta eletrônica e uma última entrada, onde um bastão de Teflon, acoplado a um micromotor, serviu como barra de agitação da solução. O eletrodo de trabalho de DDB ficava posicionado na parte inferior da célula, sobre uma placa de cobre. A distância entre a ponteira e a superfície do DDB era de aproximadamente 2,0 mm.

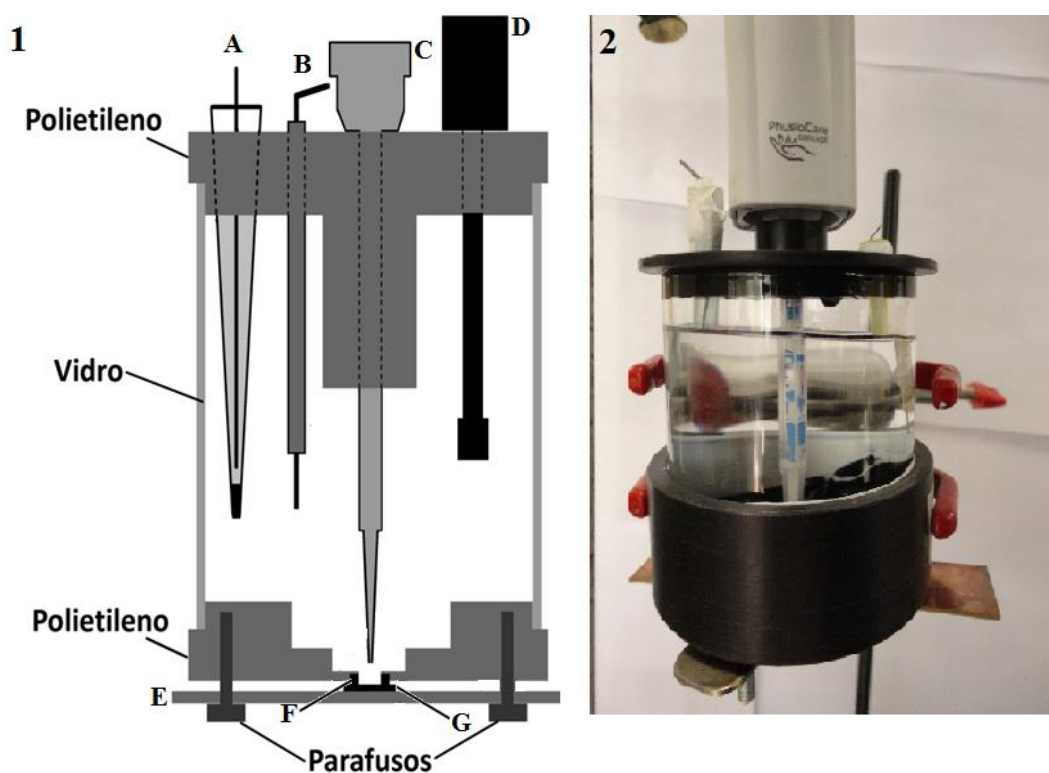


Figura 9 – 1) Representação esquemática de uma célula para realização dos experimentos de BIA-amperometria: (A) Eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ; (B) eletrodo auxiliar; (C) ponteira plástica de micropipeta eletrônica do tipo Combipip®; (D) barra de Teflon utilizada como agitador; (E) placa de cobre para estabelecer contato elétrico com o potenciostato; (F) Anel de vedação de borracha; (G) eletrodo de DDB. 2) Foto da célula utilizada na abordagem BIA-amperometria. Fonte: Adaptado de *TORMIN et al.*, 2011.

No método desenvolvido utilizando BiFE como eletrodo de trabalho, o sistema voltamétrico utilizado foi um potenciostato BAS modelo CV-50W da Bio Analytical System Inc (EUA), acoplado a um computador pessoal e controlado pelo software BAS CV50W versão 2.0 (Bio Analytical System Inc). As células de trabalho foram copos de borosilicato, com volume interno de 15 mL, onde eram imersos o eletrodo de referência de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub>, o eletrodo auxiliar de platina e o eletrodo de carbono vítreo (GCE), que foi o substrato para a formação do filme de bismuto.

### **3.4.2. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.**

O cromatógrafo de fase móvel líquida utilizado para comparar os resultados analíticos obtidos com os métodos desenvolvidos neste trabalho foi um Perkin-Elmer Series 200 HPLC system (Perkin-Elmer, USA). O sistema é equipado com uma bomba binária, uma unidade de degaseificação, um detector espectrofotométrico de absorção no UV-Vis e injetor automático. O sistema tem interface com um computador pessoal controlado pelo software TOTALChrom da Perkin-Elmer.

Todas as separações foram feitas numa coluna cromatográfica com fase estacionária C-18 (250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de diâmetro médio da partícula interna).

### **3.4.3. Reator fotoquímico.**

O reator fotoquímico utilizado para avaliar a degradação UV das estrobilurinas foi construído no laboratório e é constituído por seis lâmpadas de vapor de mercúrio, 6 W cada. Na parte de trás, foi acoplada uma mesa de notebook com ventilador (Nylon, China) de 3010 RPM e seis reatores de 9 W (ECP, Brasil) (um para cada lâmpada fluorescente). As lâmpadas foram colocadas na parte interna de uma secção de tubo de PVC, de 0,22 m de diâmetro interno, 0,30 m de largura (Figura 10), que serviu de carcaça do reator. O aparato foi feito para que pudessem ser acionadas duas, quatro ou seis lâmpadas, de forma independente de acordo com o experimento a ser realizado. As lâmpadas de mercúrio são comercialmente

vendidas para esterilização bacteriológica com emissão mais intensa em 253 nm e na faixa entre 296-313 nm. O fluxo de ar estabelecido pelo ventilador da mesa de notebook manteve as soluções dentro do reator com temperatura próxima a 25°C.

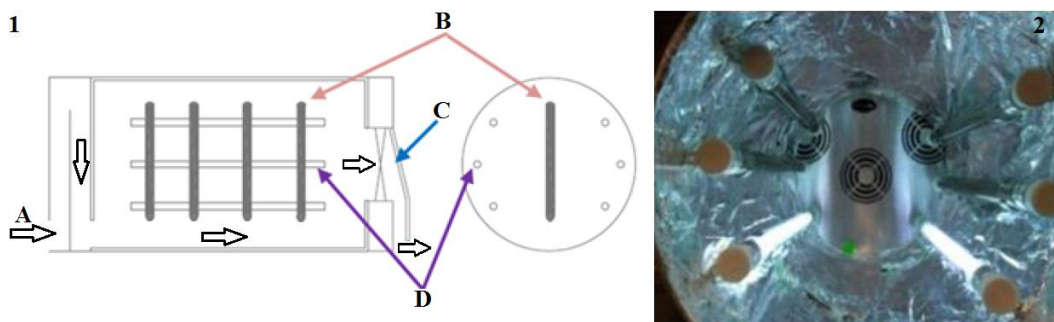


Figura 10 - 1) Representação esquemática do reator fotoquímico utilizado no estudo da degradação UV das estrobilurinas, onde: (A) Sentido do fluxo de ar no reator; (B) tubos de quartzo; (C) extrator de ar (mesa com ventilador de notebook); (D) lâmpadas de vapor de mercúrio. 2) Foto do interior do fotoreator com duas lâmpadas ligadas. Fonte: Adaptado de ANTONIO, 2012.

#### 3.4.4. Outros equipamentos.

Um analisador de carbono total, modelo TOC-VCNP da Shimadzu (Japão) foi utilizado para determinar o carbono orgânico e total presente na amostra de água da Lagoa Rodrigo de Freitas. A condutividade da amostra foi medida com um medidor de condutividade MA150, MS da Technopon, Brasil. Os estudos de degradação térmica das estrobilurinas foram feitas em um banho termostático modelo 316-6DN, Nova Ética, Brasil.

As injeções de soluções padrão ou amostras nos métodos analíticos desenvolvidos com a abordagem BIA-amperometria, foram realizadas utilizando micropipetas eletrônicas da Stream Multipette (Eppendorf, Alemanha) e BRND705000 (Handy Step, USA). Ambas as micropipetas permitiam injeções de 10 a 1000  $\mu\text{L}$ , utilizando um Combipip® (ponteira) de 1000  $\mu\text{L}$ . A taxa de injeção era programável em uma faixa de 1,7 a 20,7  $\text{mL min}^{-1}$  para a Eppendorf e de 5,7 a 13,3  $\text{mL min}^{-1}$ , para a Handy Step.

A balança com precisão analítica de cinco casas decimais foi da marca Shimadzu modelo AUW220D (Japão). As medições de pH foram feitas com um



pHmetro modelo mPA 210, versão 2.3 fornecido pela Tecnocon (Brasil). O eletrodo para medição de pH foi um de membrana de vidro conjugado com um eletrodo de referência de Ag/AgCl. A centrífuga foi uma do modelo BE 400 - Brushless da Bio Eng (Brasil). O banho ultrassônico foi o modelo USC 1800 da Unique (Brasil), utilizado na limpeza do material, homogeneização das amostras e degaseificação dos solventes. As micropipetas reguláveis de 10 a 100  $\mu\text{L}$ , 20 a 200  $\mu\text{L}$  e 100 a 1000  $\mu\text{L}$  foram da Brand (Alemanha).

### **3.5. Procedimentos nas determinações voltamétricas e por BIA-amperometria das estrobilurinas com eletrodo de trabalho de DDB.**

#### **3.5.1. Preparo das soluções padrões de dimoxistrobina e picoxistrobina para as determinações por BIA-amperometria.**

Para as medições eletroquímicas de dimoxistrobina, as soluções padrões foram preparadas diariamente antes do trabalho por diluição de alíquotas das soluções estoque, mantendo constante o volume de acetonitrila em 2 mL. O volume final da solução era ajustado para 10 mL com tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> de pH 10,0.

Para as medições eletroquímicas de picoxistrobina, as soluções eram preparadas da mesma forma que as de dimoxistrobina, diferindo pelo pH do tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup>, nesse caso pH 2,0.

#### **3.5.2. Preparo das amostras.**

##### **3.5.2.1. Preparo das amostras para a determinação de cresoxim-metílico por SWV.**

Uma fração de 5 mL de cada suco de uva (aproximadamente 0,9 g de massa sólida) foi fortificada com cresoxim-metílico nos níveis de concentração de 6,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (1,9 mg L<sup>-1</sup>) e 11,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (3,7 mg L<sup>-1</sup>) e o volume foi ajustado para 10 mL com água ultrapura. A amostra foi, em seguida, carregada num cartucho de SPE C18 e lavou-se posteriormente, com 20 mL de água ultrapura. O cartucho foi

previamente tratado com 2 mL de acetonitrila, seguido por 2 mL de água ultrapura. O analito retido foi eluído com acetonitrila (1 mL) e em seguida diluído para 2 mL com água ultrapura.

As massas de uva presentes nos volumes selecionados de amostra de suco foram estimadas levando o suco de uva até à secura num forno a 110 °C durante 3 h. O resíduo sólido foi pesado e usado como uma estimativa da massa de uva em amostras de suco de uva.

Seis amostras de água do Riacho Rainha foram fortificadas com cresoxim-metílico ( $66,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $20,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) para a análise por HPLC e comparadas com o método voltamétrico proposto. A amostra de água requereu apenas uma filtração através de um filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  antes da injeção no HPLC.

### **3.5.2.2.**

#### **Preparo das amostras para determinação de dimoxistrobina por BIA-amperometria.**

Para a análise por BIA-amperometria 5 mL de cada amostra de água (mineral, torneira e do Rio Uberabinha) foi fortificada com dimoxistrobina nas concentrações de  $5,0$  e  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mantendo-se constante a proporção de 2 mL de acetonitrila e o volume foi ajustado para 10 mL com tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 10,0). Nenhum outro tipo de pré-tratamento nas amostras foi necessário.

Seis amostras de água mineral foram enriquecidas com dimoxistrobina ( $66,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $21,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) para a análise por HPLC e comparadas com o método BIA-amperométrico proposto. A amostra de água requereu apenas uma filtração através de um filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  antes da injeção no HPLC.

### **3.5.2.3.**

#### **Preparo das amostras para determinação de picoxistrobina por SWV e BIA-amperometria.**

No método desenvolvido para a determinação de picoxistrobina por SWV, não foi necessário nenhum pré-tratamento para análise das amostras de água mineral e da Lagoa Rodrigo de Freitas. Volumes de 1 mL destas amostras foram diretamente introduzidos na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito

suporte para a determinação por SWV. A fortificação foi feita em dois níveis de concentração na célula (5,4 e 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 2,0 e 3,3  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Seis amostras de água mineral foram fortificadas com picoxistrobina (66,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 24,1  $\text{mg L}^{-1}$ ) para a análise por HPLC e comparadas com o método voltamétrico proposto. A amostra de água requereu apenas uma filtragem através de um filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da injeção no HPLC.

Para a análise por BIA-amperometria 5 mL de cada amostra de água (mineral e lagoa Rodrigo de Freitas) foram fortificados com picoxistrobina nas concentrações de 30,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , mantendo-se constante a proporção de 2 mL de acetonitrila e o volume foi ajustado para 10 mL com tampão BR 0,04  $\text{mol L}^{-1}$  de pH 2,0. Nenhum outro tipo de pré-tratamento das amostras foi necessário.

#### **3.5.2.4.**

#### **Preparo das amostras para determinação de piraclostrobina por SWV.**

As amostras de água mineral e da Lagoa Rodrigo de Freitas não foram submetidas a nenhum pré-tratamento antes da análise. Volumes de 1 mL das amostras de água foram introduzidos diretamente na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte. A fortificação foi feita em dois níveis de concentração na célula (5,4 e 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Uma fração de 5 mL de suco de uva não fermentado foi fortificada com piraclostrobina nos níveis de concentração de 5,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (2,1  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (3,5  $\text{mg L}^{-1}$ ) e o volume foi ajustado até 10 mL com água ultrapura. A amostra foi, em seguida, carregada num cartucho de SPE C18 e lavou-se posteriormente, com 20 mL de água ultrapura. O cartucho foi previamente tratado com 2 mL de acetonitrila, seguido por 2 mL de água ultrapura. O analito retido foi eluído com acetonitrila (1 mL) e em seguida diluído para 2 mL com água ultrapura.

Seis amostras de água mineral foram enriquecidas com piraclostrobina (66,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 25,4  $\text{mg L}^{-1}$ ) para a análise por HPLC e comparadas com o método voltamétrico proposto. A amostra de água requereu apenas a filtragem através de um filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da injeção no HPLC.

### 3.5.3.

#### **Caracterização da amostra de água da Lagoa Rodrigo de Freitas.**

A Lagoa Rodrigo de Freitas é uma mistura de água do mar e de água doce proveniente de vários cursos d'água. A caracterização foi feita com um analisador de carbono total, indicando 27,87 mg L<sup>-1</sup> do carbono total presente na amostra do lago (6,89 mg L<sup>-1</sup> de carbono orgânico). O pH da amostra foi de 7,5 e a sua condutividade foi de 13,70 mS cm<sup>-1</sup>.

### 3.5.4.

#### **Procedimento para ativação do eletrodo de DDB.**

Um tratamento do eletrodo de DDB foi realizado diariamente utilizando a técnica de cronopotenciometria galvanostática. Inicialmente DDB foi imerso em uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,10 mol L<sup>-1</sup> e submetido a um tratamento na faixa anódica de potencial através da aplicação de uma diferença de potencial que gera uma corrente de +0,01 A por 1000 s. Em seguida, um tratamento catódico foi realizado, aplicando uma diferença de potencial que gera uma corrente de -0,01 A por 1000 s. Tal procedimento foi necessário, para garantir a repetibilidade da resposta do DDB. Posteriormente, o eletrodo foi submetido a varreduras de voltametria cíclica (de 30 a 60 ciclos), no intervalo de potencial -500 a +1500 mV e velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>, até estabilização da corrente medida. Este parâmetro é considerado estável após a obtenção de ciclos voltamétricos constantes para o branco, em comparação a outros registros do branco obtidos.

### 3.5.5.

#### **Procedimento de limpeza do eletrodo de DDB.**

Um procedimento de limpeza era realizado no DDB a medida em que ocorria perda sistemática de sensibilidade no sinal do analito. Este procedimento era feito por meio de amperometria de múltiplos pulsos, aplicando pulsos de potencial no valor de +1200 e +1800 mV, com o tempo para a aplicação de cada pulso de 0,03 e 0,3 s respectivamente. O procedimento era realizado durante um tempo de 1000 s em um eletrólito suporte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, 30 varreduras sequenciais de voltametria cíclica, com intervalo de potencial +1200 a +2200 mV e velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>, eram realizadas até a estabilização da corrente medida. Quando este procedimento de limpeza não era suficiente para restaurar o sinal do analito, um novo procedimento de ativação (já descrito) era

realizado. Caso esses processos não fossem suficientes para produzir resposta analítica adequada, em termos de intensidade e repetibilidade, a placa de DDB era substituída por uma nova.

Outro procedimento de limpeza era realizado semanalmente na superfície do eletrodo de DDB. A placa era colocada em um copo Becker contendo acetonitrila suficiente para cobri-la totalmente, deixando-a em repouso por um período de aproximadamente 12 h. Posteriormente, a placa de DDB era lavada com água ultrapura antes da aplicação do procedimento de ativação. Quanto a aplicação do método analítico para a análise das amostras de suco, este procedimento de limpeza era repetido ao final de cada dia de trabalho.

### **3.5.6. Procedimento para as medições eletroquímicas de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina por SWV.**

Medições analíticas quantitativas foram realizadas utilizando a SWV. Para a determinação de cresoxim-metílico, a cela eletroquímica foi preenchida com 10 mL do eletrólito suporte, que consistiu de tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,0). Após 15 s de repouso (tempo de equilíbrio), o potencial aplicado foi variado de +1000 a +1750 mV com o pico de cresoxim-metílico aparecendo com o máximo em cerca de +1420 mV. A frequência de aplicação dos pulsos de 30 Hz, o incremento de varredura de potencial de 15 mV e a amplitude de pulso de 50 mV completaram as condições instrumentais.

Para a determinação de picoxistrobina, foi utilizado como eletrólito suporte tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,0). Após 15 s de tempo de equilíbrio, o potencial aplicado foi variado +1100 a +1800 mV com o pico de picoxistrobina aparecendo com o máximo em cerca de +1450 mV. A frequência de aplicação dos pulsos de 30 Hz, o incremento de varredura de potencial de 5 mV e a amplitude de pulso de 50 mV completaram as condições instrumentais.

Para a determinação de piraclostrobina, foi utilizado como eletrólito suporte tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH 4,0). Após 15 s de tempo de equilíbrio, o potencial aplicado foi variado +1050 a +2100 mV com o pico de picoxistrobina aparecendo com o máximo em cerca de +1280 mV. A frequência de aplicação dos pulsos de 30 Hz, o incremento de varredura de potencial de 30 mV e a amplitude de pulso de 40 mV completaram as condições instrumentais.

Todos os cálculos para fins de quantificação de analito foram feitos com base na área do pico integrada. As quantificações cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina foram feitas pelo método de adição de analito (abordagem múltipla).

Para as análises das amostras, um volume de 1 mL de cada amostra foi adicionado à célula eletroquímica para posterior determinação de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina. As análises foram feitas em triplicatas autênticas em três dias diferentes.

### **3.5.7.**

#### **Procedimentos para determinações de dimoxistrobina e picoxistrobina com a abordagem BIA-amperometria e eletrodo de DDB.**

Nas determinações de dimoxistrobina e picoxistrobina foi utilizada a amperometria (juntamente com o sistema BIA) em um potencial constante de +1900 mV com pulsos de 70 ms. Para dimoxistrobina, o eletrólito suporte utilizado foi o tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>; pH 10,0). As determinações foram realizadas com a solução no interior da célula mantida sob agitação, com uma velocidade de agitação constante de 280 ± 10 rpm. A velocidade de injeção de 20,7 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de 100 µL completam os parâmetros do sistema BIA. Para picoxistrobina, o eletrólito suporte utilizado foi o tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>; pH 2,0). A velocidade de injeção de 13,3 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de 50 µL completam os parâmetros do sistema BIA. As análises foram feitas em triplicata e a quantificação de dimoxistrobina e de picoxistrobina foi através de interpolação de sinal em curva analítica baseada na altura do pico. A quantificação das estrobilurinas nas amostras de águas naturais foi realizada por meio da interpolação de sinal na curva analítica em triplicata, por dois dias diferentes para dimoxistrobina e três dias diferentes para picoxistrobina.

Amperometria de múltiplos-pulsos foi usada para obter o voltamograma hidrodinâmico de dimoxistrobina e picoxistrobina. Dez pulsos de potenciais sequenciais (+1100 a +2000 mV com pulsos de 70 ms) foram aplicados para injeções em triplicata de soluções padrão de dimoxistrobina e picoxistrobina através do sistema BIA. Esta técnica também foi aplicada para detectar a presença de possíveis moléculas interferentes eletroativos em amostras de água. Para este fim,

dois pulsos de potenciais foram selecionados com base na oxidação eletroquímica de dimoxistrobina e picoxistrobina (+1600 e +1900 mV).

### 3.5.8. Procedimento para a determinação de cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobrina por HPLC.

As condições cromatográficas escolhidas para a determinação de cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobrina consistiram no uso de uma coluna de fase reversa C18, eluição isocrática, utilizando como fase móvel acetonitrila/solução aquosa de ácido fosfórico (0,1% v/v) 60/40% v/v com um fluxo de 1,4 mL min<sup>-1</sup>. O volume injetado de amostra foi 10 µL e a detecção absorciométrica em 220 nm. Essas condições foram adaptadas de Campillo e colaboradores (2010). Sob tais condições, cresoxim-metílico apresentou um tempo de retenção de 7,0 min, dimoxistrobina apresentou um tempo de retenção de 5,8 min, picoxistrobina apresentou um tempo de retenção de 8,2 min e piraclostrobrina apresentou um tempo de retenção de 8,9 min. A determinação foi feita através da interpolação de sinal na curva analítica construída com cinco níveis de concentração (30,0; 50,0; 70,0; 90,0; 110,0 µmol L<sup>-1</sup>).

As análises foram feitas em triplicata e a média das concentrações obtidas foram comparadas com a obtida pelos métodos voltamétricos ou amperométricos usando teste *t de Student* (Comparação de duas médias experimentais, bicaudal de mesmas variâncias) através da Equação 7 (SKOOG *et al.*, 2002).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{comb} \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:  $\bar{x}_1$  é a média das concentrações obtidas pelo primeiro método;  $\bar{x}_2$  é a média das concentrações obtidas pelo segundo método;  $S_{comb}$  é o desvio padrão combinado;  $N_1$  é o número de réplicas de análises feitas pelo primeiro método e  $N_2$  é o número de réplicas de análises feitas pelo segundo método.

### 3.5.9.

#### Estudo do mecanismo redox e transferência de massa para as estrobilurinas no eletrodo de DDB.

Os estudos de diagnóstico dos mecanismos redox e transferência de massa foram feitos usando a CV e a SWV. Na CV, a velocidade de varredura foi variada de 10 a 200  $\text{mV s}^{-1}$  e foram utilizados o incremento de varredura de 2 mV em um intervalo de potencial +1200 a +2200 mV. Solução de tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$  com pH 2,0) foi o eletrólito suporte. Para estes estudos, a concentração da estrobilurina na célula eletroquímica foi fixada em 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Com o uso da SWV para obter diagnóstico dos mecanismos redox, o eletrólito suporte também foi o tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$  com pH 2,0) e após 15 s de tempo de equilíbrio, o potencial foi varrido de +1000 a +2200 mV. A frequência de aplicação dos pulsos foi estudada em uma faixa de 10 a 50 Hz, com um incremento de varredura de 20 mV e amplitude de pulso de 40 mV. A concentração da estrobilurina na célula eletroquímica foi fixada em 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 3.5.10.

#### Cálculo da área eletroativa do eletrodo de DDB.

A placa DDB utilizada tinha uma área superficial de 10  $\text{mm}^2$ . No entanto, parte desta superfície era isolada pelo anel de vedação de borracha da célula eletroquímica, deixando exposto para o contato com a solução apenas a área referente ao diâmetro interno do anel de vedação. Essa área eletroativa do eletrodo de trabalho foi estimada através da realização de uma sequência de medições de voltametria cíclica (-250 a +650 mV) de uma solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , na concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Uma solução aquosa de sulfato de potássio (0,5  $\text{mol L}^{-1}$ ) foi o eletrólito suporte e a velocidade de varredura variou sequencialmente em ascensão de 20 a 100  $\text{mV s}^{-1}$ . Um gráfico de corrente de pico ( $I_p$ ) em função da raiz da velocidade de varredura ( $v$ ) foi construído com um coeficiente angular encontrado igual a  $2,36 \times 10^{-5}$ . O coeficiente de difusão ( $D$ ) de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  é igual a  $6,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , com 1 mol de elétron por mol de molécula envolvida no processo redox. A concentração da espécie eletroativa ( $C^*$ ) foi de  $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ . Substituindo estes valores na equação  $I_p/v^{1/2} = (2,686 \times 10^5) n^{3/2} AC^*D^{1/2}$  a área



eletroativa (A) encontrada para o eletrodo de DDB utilizado nos trabalhos dessa tese foi igual a  $0,035 \text{ cm}^2$ .

### **3.5.11.**

#### **Estudo da degradação por exposição ao UV de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.**

Soluções de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina, na concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , foram preparados em acetonitrila (10,0 mL) e colocados em frascos de quartzo com tampa. Os frascos foram colocados no reator UV em um suporte metálico na parte central. Apenas duas lâmpadas de vapor de mercúrio posicionadas na parte inferior do reator foram utilizadas para o estudo. Alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  eram retiradas de cada frasco após um tempo de exposição à radiação UV que variou de 5 a 90 min. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  desta solução era adicionada a célula eletroquímica e a quantificação feita por adição de analito (abordagem múltipla). A degradação UV foi avaliada a partir da concentração medida, em porcentagem da concentração que deveria ser encontrada na célula ( $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). As análises foram feitas em triplicata para cada estrobilurina separadamente.

### **3.5.12.**

#### **Estudo da degradação térmica de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.**

Soluções de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina, na concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , foram preparadas (10,0 mL) e colocadas em tubos de ensaio com tampa. Os tubos foram colocados em um banho termostático que teve sua temperatura variada de 30 a  $60^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 400  $\mu\text{L}$  foram retiradas de cada frasco após o tempo de 10, 30, 60 e 120 min em cada temperatura. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  destas soluções foi adicionada a célula eletroquímica e analisado pelo respectivo método proposto com a quantificação por adição de analito (abordagem múltipla). A degradação térmica foi avaliada a partir da concentração medida, em porcentagem da concentração que deveria ser encontrada na célula ( $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). As análises foram feitas em triplicata.

### 3.5.13.

#### **Estudo na eficiência do processo de pré-concentração com SPE no cartucho C18 para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.**

Uma fração de 50 mL de suco de uva foi fortificada com cresoxim-metílico, na concentração máxima de resíduo (LMR) permitida pela legislação em uva ( $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de concentração final) e o volume foi completado até 100 mL com água ultrapura. A amostra foi em seguida, carregada num cartucho C18 de SPE e lavou-se com 20 mL de água ultrapura. O cartucho foi previamente tratado com 2 mL de acetonitrila, seguido por 2 mL de água ultrapura. O analito retido foi eluído com acetonitrila (4 mL) e em seguida diluído para 10 mL com água ultrapura. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi adicionada à célula e a análise eletroquímica foi feita utilizando o procedimento de adição de analito (abordagem múltipla). O mesmo procedimento foi repetido para o picoxistrobina ( $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) e piraclostrobina ( $5,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Para cresoxim-metílico uma outra fração de 50 mL de suco de uva foi fortificada na concentração de  $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o volume foi ajustado para 200 mL com água ultrapura. O procedimento de pré-concentração foi repetido, com a eluição do analito retido realizada com 4 mL de acetonitrila e a diluição para 10 mL com água ultrapura.

Soluções-padrões de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina foram preparadas no volume de 100 mL cada, em dois níveis de concentração ( $7,9$  e  $11,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Elas foram submetidas ao mesmo procedimento de pré-concentração descrito anteriormente, com a eluição do analito retido realizada com 4 mL de acetonitrila e a diluição para 10 mL com água ultrapura. Uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi adicionada à célula e a quantificação foi feita utilizando o procedimento de adição de analito (abordagem múltipla). O resultado obtido foi comparado com soluções-padrões das estrobilurinas nas concentrações de  $7,9$  e  $11,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  que não foram submetidas ao procedimento de pré-concentração.

### **3.6. Metodologia de trabalho para a determinação voltamétrica de picoxistrobina em filme de bismuto (BiFE).**

#### **3.6.1. Preparo das amostras.**

As amostras de urina, fortificadas em dois níveis de concentração (4,8 e 12,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 1,8 e 4,7  $\text{mg L}^{-1}$ ) com picoxistrobina, foram submetidas a SPE com cartuchos contendo fase estacionária C18. Antes da extração, 2 mL de acetonitrila foi adicionado a 5 mL de amostra, seguido pelo ajuste do volume para 10 mL com água ultrapura. A solução foi centrifugada durante 20 min a 3000 rpm. O sobrenadante da amostra de urina foi, em seguida, passado através do cartucho C18 previamente ativado com 2 mL de acetonitrila, seguido de 2 mL de água. A amostra foi carregada no cartucho de SPE e lavada com 20 mL de água a 50 °C para remover as impurezas retidas a partir da urina.

As amostras de água do Riacho Rainha e da Lagoa Rodrigo de Freitas não foram submetidas a nenhum pré-tratamento antes da análise. Volumes de 1 mL das amostras de água foram introduzidos diretamente na célula eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte. A fortificação foi feita em dois níveis de concentração na célula (4,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 13,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Seis amostras de água mineral foram enriquecidas com picoxistrobina (66,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 24,2  $\text{mg L}^{-1}$ ) para a análise por HPLC e comparadas com o método voltamétrico proposto. A amostra de água requereu apenas a filtração através de um filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da injeção no HPLC.

#### **3.6.2. Procedimento de limpeza dos eletrodos.**

A superfície do eletrodo de carbono vítreo era polida com óxido de alumínio 0,3  $\mu\text{m}$  antes do início de uma análise, a cada troca de solução. Semanalmente os eletrodos de carbono vítreo e auxiliar de platina eram imersos em ácido nítrico (10 %, v/v), durante 24 h para limpeza das suas superfícies. Quando necessário era feita a manutenção do eletrodo de referência (limpeza da membrana porosa e a substituição da solução interna).

### 3.6.3. Procedimento para medição eletroquímica.

Todas as medidas foram realizadas com voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica. A fim de realizar as determinações utilizando picoxistrobina, um potencial inicial (-700 mV) foi aplicado durante 60 s, sob agitação contínua numa célula contendo HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, em que 300 µL de uma solução padrão Bi<sup>3+</sup> 1000 mg L<sup>-1</sup> foi adicionado previamente. Durante o processo, o filme de bismuto foi formado *in situ* e a picoxistrobina foi acumulada simultaneamente. Após 15 s de tempo de equilíbrio, o potencial foi variado de +790 a +1050 mV, com o pico máximo para picoxistrobina aparecendo em cerca de +954 mV. A velocidade de varredura de 40 mV s<sup>-1</sup> e amplitude de 75 mV completam os parâmetros eletroquímicos. Um procedimento de limpeza eletroquímica, que consiste na aplicação de +400 mV durante 90 s, foi usado a fim de eliminar quaisquer efeitos de memória de uma medição prévia. O procedimento adotado para a obtenção dos resultados de medição em triplicata era de ter em conta apenas os resultados obtidos a partir do quinto ciclo de medição. Sob estas condições, as medições repetitivas de picoxistrobina (em uma célula contendo HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>) indicaram a estabilidade do analito no presente eletrólito suporte ao longo de um dia de trabalho (8 h). A quantificação do analito foi realizada utilizando a adição de analito (abordagem múltipla). Os cálculos foram feitos com base na área do pico integrado. A quantificação de picoxistrobina nas amostras foi feita por adição de analito (abordagem múltipla) em triplicata e as análises feitas em três dias diferentes.

#### **4. Desenvolvimento de métodos voltamétricos com varredura de potencial do tipo onda quadrada para a determinação cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina e estudo do comportamento eletroquímico das estrobilurinas em meio aquoso usando o DDB.**

##### **4.1. Testes preliminares.**

Alguns testes foram realizados com o intuito de verificar se seria viável produzir sinal analítico para sete estrobilurinas utilizando o eletrodo de trabalho de DDB. Nesses testes preliminares utilizou-se as técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV), abrangendo uma faixa de potencial ampla, entre -500 a +2200 mV, tanto na direção de varredura anódica como na da catódica. Soluções de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e de tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) com pH 2,0, foram os eletrólitos suporte testados, sendo que na cela eletrolítica se colocou 7,0 mL de uma dessas soluções juntamente com 3,0 mL de acetonitrila, para se garantir a solubilização total das estrobilurinas. Em tais condições, foram identificados picos de oxidação para as sete estrobilurinas (100,0 μmol L<sup>-1</sup> na célula), nos potenciais acima de +1000 mV. Como pode ser visto na Figura 11 e na Figura 12, todas as estrobilurinas apresentaram dois picos de oxidação com potenciais bem distintos, com exceção da fluoxastrobina que apresentou apenas um pico de oxidação na concentração avaliada.

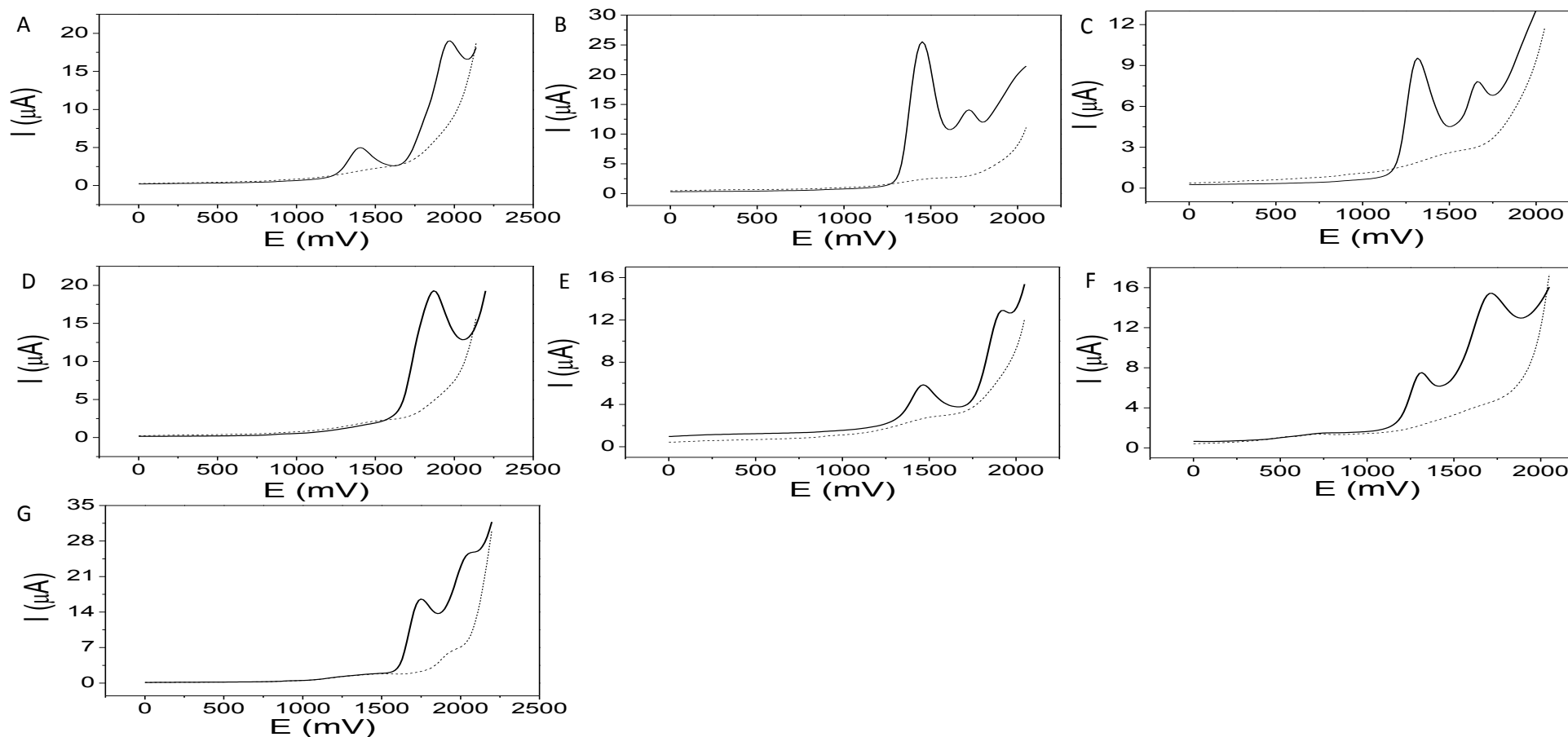


Figura 11 – Voltamogramas com uma varredura anódica de potencial em uma faixa de 0 a +2200 mV para as estrobilurinas ( $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) utilizando eletrodo de trabalho de DDB. (A) azoxistrobina ( $E_{p1} = +1390$  mV e  $E_{p2} = +1958$  mV); (B) cresoxim-metilico ( $E_{p1} = +1420$  mV e  $E_{p2} = +1700$  mV); (C) dimoxistrobina ( $E_{p1} = +1350$  mV e  $E_{p2} = +1750$  mV); (D) fluoxastrobina ( $E_p = +1884$  mV); (E) picoxistrobina ( $E_{p1} = +1450$  mV e  $E_{p2} = +1950$  mV); (F) piraclostrobina ( $E_{p1} = +1280$  mV e  $E_{p2} = +1650$  mV) e (G) trifloxistrobina ( $E_{p1} = +1734$  mV e  $E_{p2} = +2048$  mV). Parâmetros instrumentais: 25 mV de amplitude de pulso; 15 mV de incremento de varredura; 30 Hz de frequência e célula contendo tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). Traço pontilhado é o voltamograma da mistura de tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0/acetonitrila (70/30%).

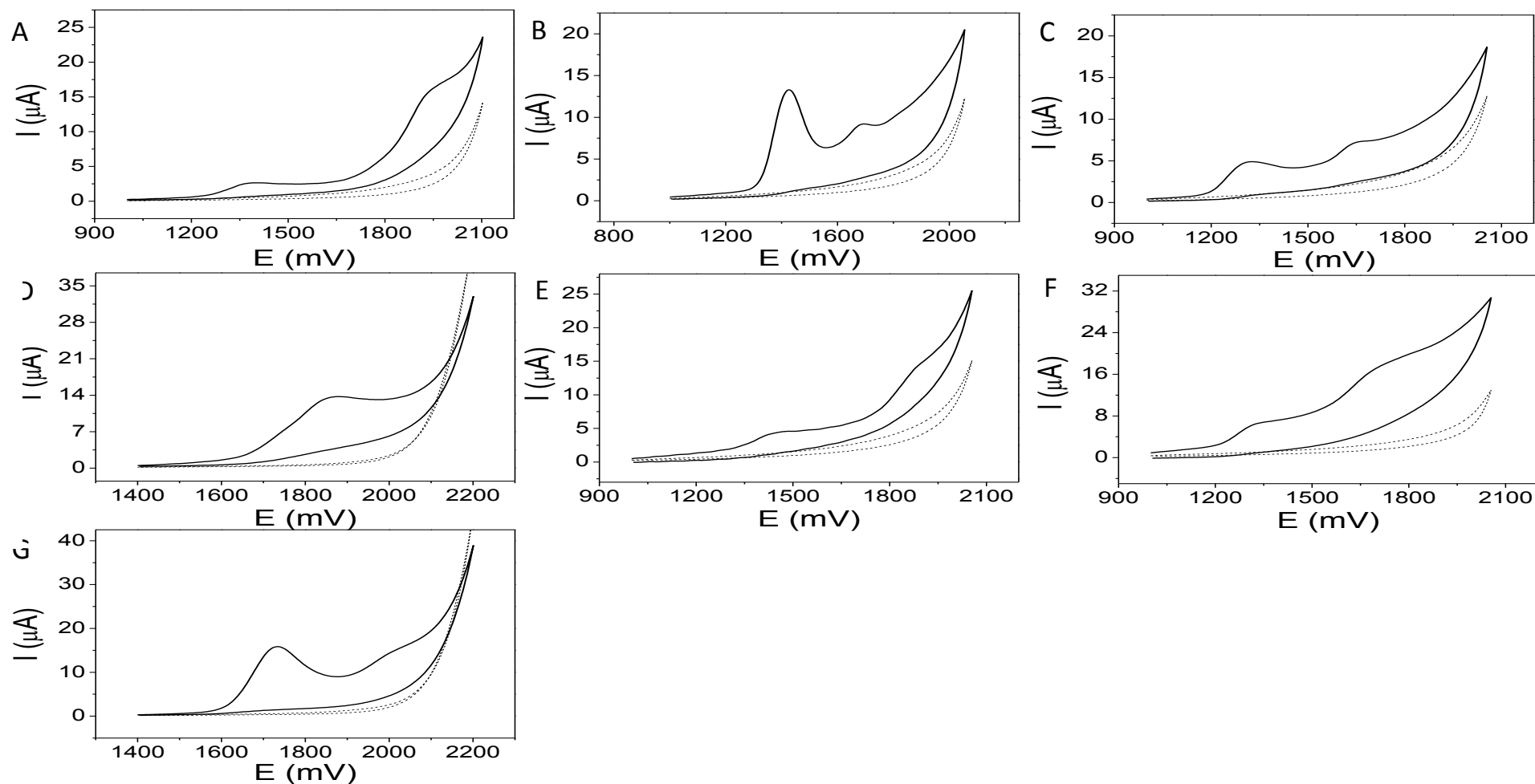


Figura 12 – Voltamogramas cíclicos obtidos para as estrobilurinas utilizando como eletrodo de trabalho o DDB. (A) azoxistrobina; (B) cresoxim-metílico; (C) dimoxistrobina; (D) fluoxastrobina; (E) picoxistrobina; (F) piraclostrobina e (G) trifloxistrobina. Parâmetros instrumentais: 100  $\text{mV s}^{-1}$  de velocidade de varredura; 5  $\text{mV}$  de incremento de varredura e célula contendo tampão BR 0,04  $\text{mol L}^{-1}$  pH 2,0/ acetonitrila (70/30%). Traço pontilhado é o voltamograma da mistura de tampão BR 0,04  $\text{mol L}^{-1}$  pH 2,0/ acetonitrila (70/30%).

Vale ressaltar que a magnitude dos picos de oxidação aumentava de maneira diretamente proporcional em função do aumento da concentração (dobro da concentração) da estrobilurina testada na célula o que indicou que os picos que surgiram eram característicos para cada analito.

O estudo usando SWV foi repetido para fluoxastrobina, com uma concentração menor ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na célula eletroquímica, para que se verificasse se a mesma possuía apenas um pico de oxidação ou se existia picos próximos que se sobrepunham em concentrações mais elevadas. Como pode ser observado na Figura 13, o voltamograma da fluoxastrobina também apresentou dois picos de oxidação muito próximos ( $E_{p1} = +1820 \text{ mV}$  e  $E_{p2} = +1910 \text{ mV}$ ). Os resultados obtidos poderiam indicar que para as estrobilurinas ocorreria um processo de oxidação em duas etapas ou dois processos de oxidação distintos no eletrodo de DDB.

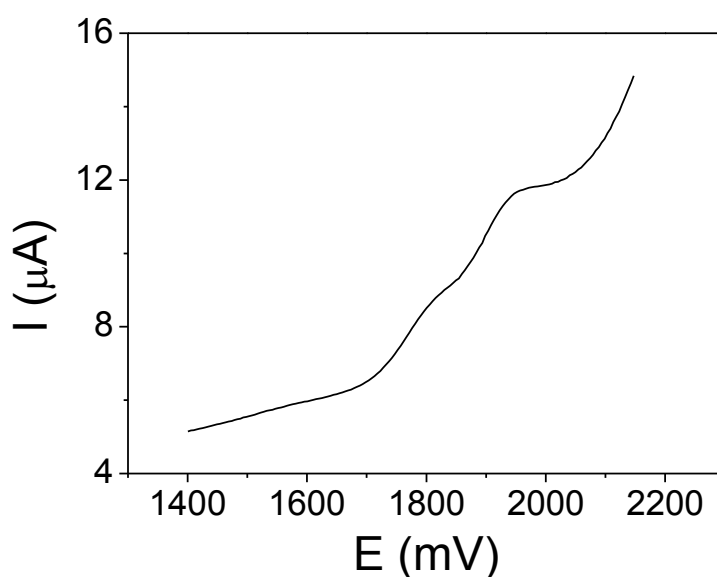


Figura 13 – Voltamogramas obtidos com uma varredura anódica de potencial em uma faixa de +1400 a +2200 mV para as fluoxastrobina ( $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) utilizando como eletrodo de trabalho o DDB. Parâmetros instrumentais: 25 mV de amplitude de pulso; 15 mV de incremento de varredura; 30 Hz de frequência e célula contendo tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 2,0/ acetonitrila (70/30%).



As medidas com SWV foram repetidas, aplicando potenciais de deposição que variaram de -500 a +1700 mV por 60 s, seguido de uma varredura ao longo do intervalo de potencial de +1000 a +2200 mV. Este estudo foi realizado para avaliar se as estrobilurinas podiam acumular-se diretamente sobre a superfície do DDB, a fim de serem redissolvidas durante a varredura anódica. Os resultados obtidos com tais testes de voltametria de redissolução anódica não apresentaram diferença significativa em relação ao sinal obtido originalmente (sem a etapa de espera na aplicação de potencial fixo), indicando que as estrobilurinas não se acumulam na superfície do DDB, sendo a reação de oxidação apenas eletrocatalisada por este material durante a varredura anódica de potencial.

Não foram observados picos de redução para as estrobilurinas nas varreduras de potencial no sentido catódico com as condições experimentais avaliadas.

#### 4.2.

#### **Estudo do mecanismo redox e transferência de massa para as estrobilurinas no eletrodo de DDB.**

As estrobilurinas escolhidas para o desenvolvimento de métodos analíticos por SWV ou BIA-amperometria (descritos no capítulo seguinte) com o eletrodo de DDB, por apresentarem maior sensibilidade ou estabilidade do sinal nos testes iniciais, foram cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclastrobina. O mecanismo redox e a transferência de massa para os dois picos de oxidação destas estrobilurinas foi estudado no DDB. O estudo foi realizado no intuito de confirmar se os processos eram irreversíveis ou quase-reversíveis, já que estas estrobilurinas apresentavam apenas picos de oxidação. Os diagnósticos foram realizados com CV e SWV. Na CV, foi avaliada a transferência de massa a partir da existência de relação linear no gráfico que relacionou a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico ( $I_p$ ) do analito. Na SWV, a avaliação foi feita através da existência ou não na relação linear dos gráficos: i) frequência de aplicação dos pulsos ( $f$ ) em função de  $I_p$  do analito e ii) do logaritmo da frequência ( $\log f$ ) em função do potencial de pico ( $E_p$ ).

Para cresoxim-metílico, no primeiro pico de oxidação ( $E_p = +1420$  mV), os estudos de diagnóstico por CV indicaram a irreversibilidade do processo com transferência de massa controlada por difusão, com uma relação linear (Figura 14A)

entre o valor medido para  $I_p$  e  $\sqrt{v}$ , no qual  $v$  foi variado entre 40 e 280  $\text{mV s}^{-1}$ . A relação linear entre a intensidade de  $I_p$  para cresoxim-metílico e  $f$  (Figura 14B) confirmou a irreversibilidade do processo de oxidação eletroquímico que ocorre em +1420 mV.

Para sistemas irreversíveis, a largura máxima à meia altura do pico ( $\Delta E_{p/2}$ ) em SWV é definida pela Equação 3 ( $\Delta E_{p/2} = (65,5 + 0,5)/\alpha n$ ), onde  $n$  é o número de elétrons envolvidos no processo e  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica (SOUZA *et al.*, 2003; GOSSER, 1993). Considerando-se o sistema com o valor  $\alpha$  igual a 0,5, tem-se a Equação 4 ( $\Delta E_{p/2} = 127/n$ ). Como o valor de  $\Delta E_{p/2}$  foi igual a 78 mV, o valor de  $n$  era de 1,6, sugerindo que a oxidação envolve dois mols de elétrons por mol de analito. Para reações totalmente irreversíveis existe uma relação linear no gráfico entre  $E_p$  e os valores de  $\log f$ , com o coeficiente angular igual a  $-2,3RT/\alpha nF$  (SOUZA *et al.*, 2003). Como pode ser observado na Figura 15A, existe relação linear para este gráfico no primeiro pico de oxidação de cresoxim-metílico, possibilitando calcular o valor de  $\alpha$  e verificar se a aproximação feita no cálculo anterior estava correta. O produto  $\alpha n$  (produto do coeficiente de transferência eletrônica e o número de elétrons envolvidos na reação do eletrodo) encontrado foi de 1,04, que conduziria ao valor de  $\alpha$  igual a 0,52 para dois mols de elétrons. Estes resultados confirmaram a perda de dois elétrons por molécula de cresoxim-metílico envolvida no processo de oxidação.

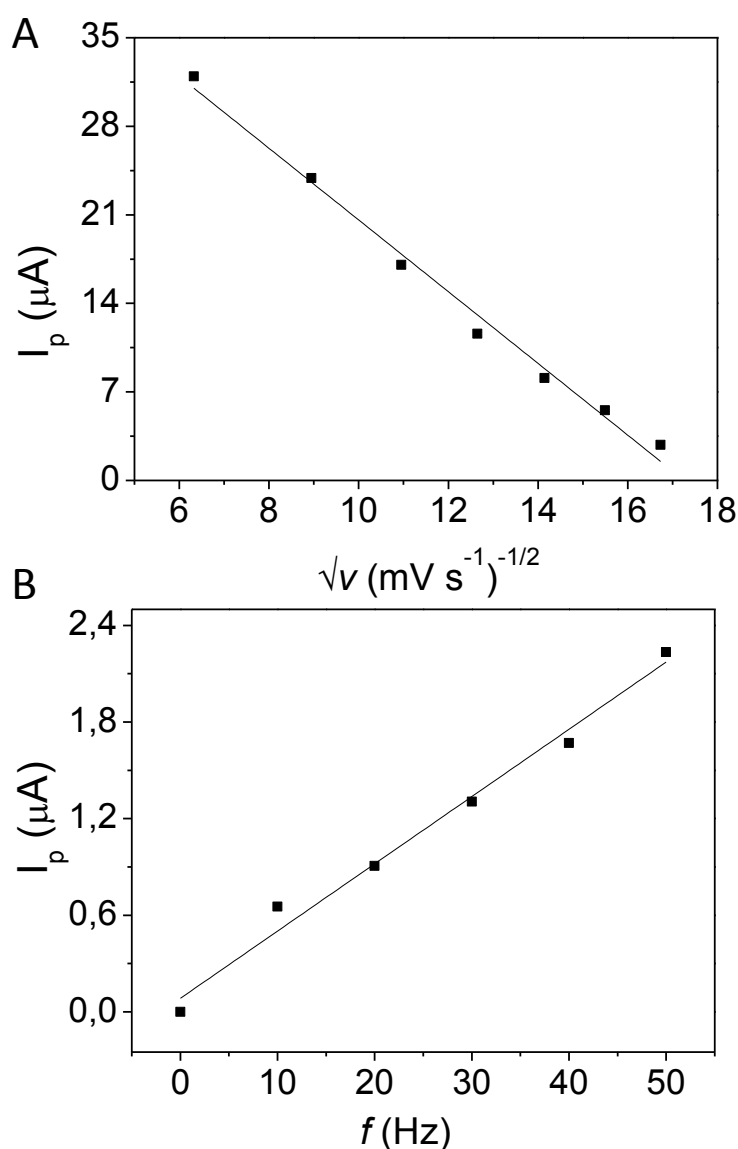


Figura 14 - (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico de cresoxim-metílico ( $I_p$ ) de cresoxim-metílico. (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico.

Como pode ser observado na Figura 15B, para cresoxim-metílico, o valor de  $I_p$  varia linearmente em função da amplitude de pulso ( $a$ ) (até 50 mV). Esta relação permite o cálculo da concentração de espécies adsorvidas na superfície ( $\Gamma$ ) do DDB

através do coeficiente angular, utilizando a Equação 5 ( $I_p/a = (5 \pm 1)10^2 q \alpha n^2 F f \Delta E_s \Gamma$ ). Com a área eletroativa ( $q$ ) calculada de  $0,035 \text{ cm}^2$ , número de elétrons ( $n$ ) igual a 2, coeficiente de transferência eletrônica ( $\alpha$ ) de 0,52, a concentração na superfície das espécies adsorvidas ( $\Gamma$ ) foi igual a  $1,3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$  (LOVRIC e KOMORSKY-LOVRIC, 1988).

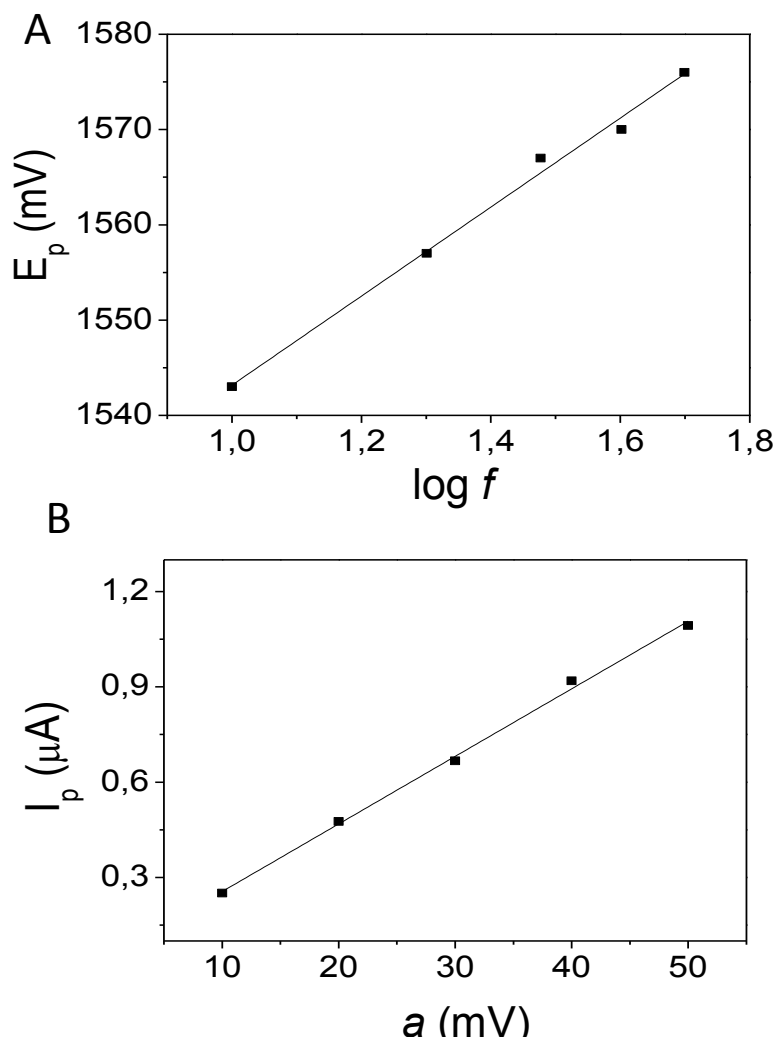


Figura 15 - (A) Potencial de pico ( $E_p$ ) em função do logaritmo da frequência ( $\log f$ ) aplicada a uma amplitude de pulso ( $a$ ) de 30 mV. (B) Variação da corrente de pico ( $I_p$ ) em função de  $a$  para  $f$  de 30 Hz. Parâmetros instrumentais: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico.

Com base nos resultados experimentais e em informações da literatura (ver abaixo), foi proposto um mecanismo para o processo de oxidação irreversível de cresoxim-metílico. Uma vez que esta estrobilurina não apresenta grupos químicos que podem ser facilmente oxidados, um potencial elevado é necessário para

permitir que a reação química aconteça. O mecanismo baseia-se na oxidação dos grupos aromáticos presentes na estrutura de cresoxim-metílico, em conformidade com os dados da literatura, que descreve a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos e alquil aromáticos em meio aquoso (WEINBERG e WEINBERG, 1968). Nestes casos, o solvente (água) presente no sistema promove um ataque nucleofílico num átomo de carbono deficiente em elétrons, levando à formação de um produto de substituição. Na Figura 16 dois possíveis mecanismos são propostos, ambos começando com a perda de um elétron para formar um carbocátion radical (em duas possíveis posições indicadas no mecanismo 1 e no mecanismo 2). Em seguida, a perda de um próton, conduz à formação do radical. Uma vez formado, este radical perde outro elétron promovendo a formação do carbocátion intermediário (estrutura I seguindo o mecanismo 1) ou (estrutura V seguindo o mecanismo 2). Ambos carbocátions têm boa estabilidade, devido à possibilidade de ressonância da carga positiva ao longo dos anéis aromáticos (HOWELL *et al.*, 1984). Na presença de solventes polares, carbocátions são altamente susceptíveis ao ataque nucleofílico, por isso, é plausível que uma molécula de água participe no processo, gerando as espécies (II seguindo o mecanismo 1) ou (VI seguindo o mecanismo 2). No entanto, é importante notar que a espécie (II) pode sofrer uma clivagem formando as substâncias (III) e (IV), como observado em sistemas que permitem a eliminação de moléculas neutras (BUSSY *et al.*, 2012). Portanto, os mecanismos propostos justificam a oxidação irreversível, promovido pela perda de dois elétrons.

## Mecanismo 1

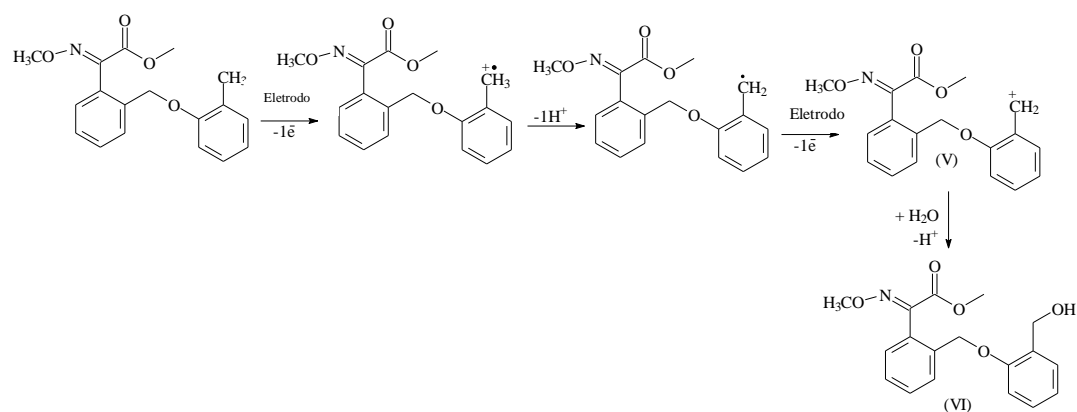
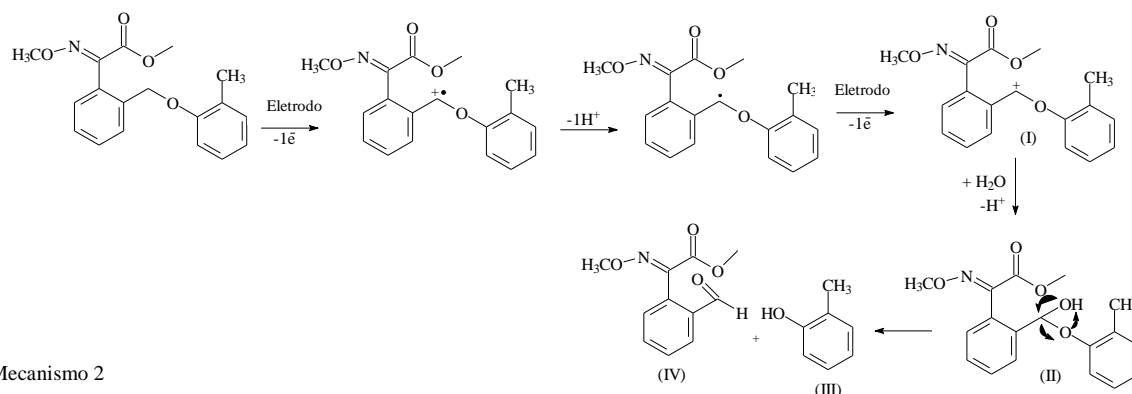


Figura 16 - Mecanismos propostos para a oxidação de cresoxim-metílico.

Estudos de diagnóstico realizados para o segundo pico de oxidação ( $E_p = +1700$  mV) de cresoxim-metílico indicaram um mecanismo quase-reversível com transferência de massa controlada por adsorção. Esta evidência vem de: (i) a relação entre  $I_p$  e  $\sqrt{\nu}$  em CV (com  $\nu$  entre 10 e 280  $\text{mV s}^{-1}$ ) e (ii) a relação entre  $I_p$  e  $f$  (com  $f$  entre 10 a 50 Hz) em SWV não serem lineares (Figura 17).

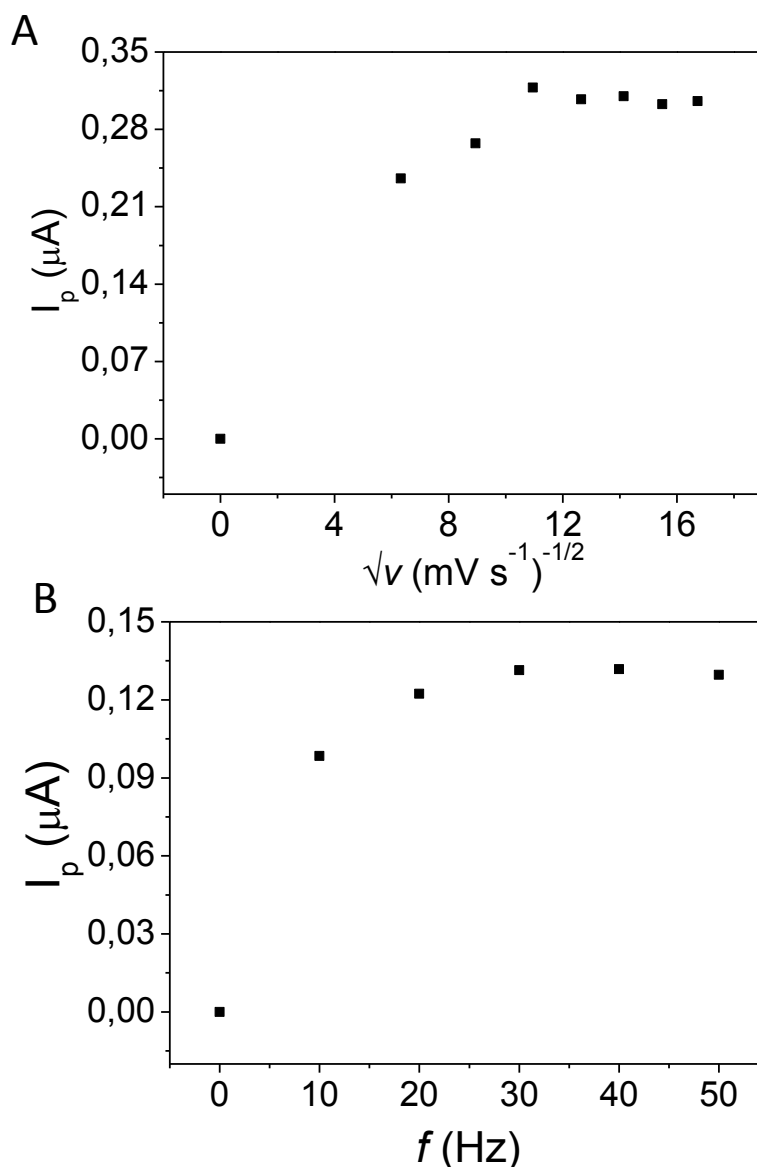


Figura 17 - (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico de cresoxim-metílico ( $I_p$ ). (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cresoxim-metílico.

Para dimoxistrobina, no estudo do mecanismo redox do primeiro pico de oxidação ( $E_p = +1350 \text{ mV}$ ), o gráfico que relaciona  $\sqrt{v}$  (com  $v$  variado de 10 a 200  $\text{mV s}^{-1}$ ) e a  $I_p$  produziu resposta linear, indicando que transferência de massa é controlada por difusão (Figura 18A). Um perfil linear também foi observado no

gráfico do  $f$  (de 10 a 50 Hz) em função de  $I_p$  (Figura 18B), o que confirmou o processo eletroquímico irreversível.

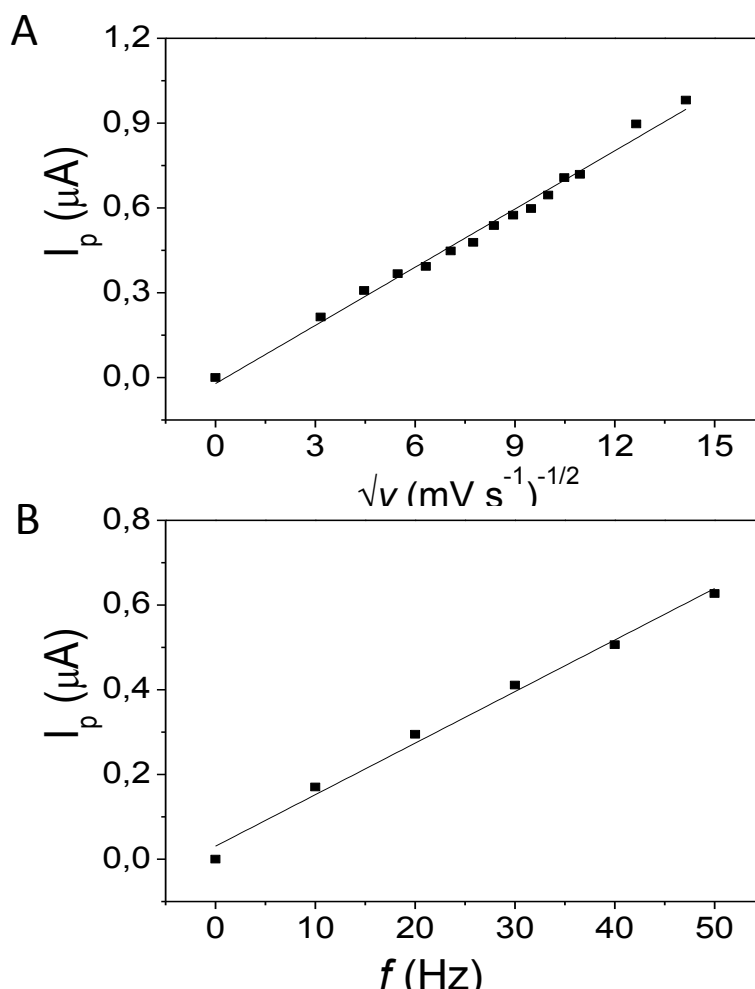


Figura 18 – (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico ( $I_p$ ) da dimoxistrobina. (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina.

Ao avaliar o perfil do pico, substituiu-se o valor de  $\Delta E_{p/2}$  de 79 mV na Equação 4 ( $\Delta E_{p/2} = 127/n$ ), o que indicou o valor de  $n$  igual a 1,6, sugerindo que a oxidação envolve 2 mols de elétrons por 1 mol de dimoxistrobina.

Como os resultados foram similares aos obtidos para o cresoxim-metílico e em virtude da semelhança nas estruturas da dimoxistrobina e cresoxim-metílico, o



mecanismo reacional similar ao da Figura 16 também pode ser atribuído para a dimoxistrobina.

O estudo feito com o segundo pico de oxidação de dimoxistrobina ( $E_p = +1750$  mV) indicou que diferentemente do que foi descrito para o primeiro pico, ambos os gráficos,  $I_p$  em função de  $\sqrt{v}$  (Figura 19A), e  $f$  em função de  $I_p$ , não apresentaram uma resposta linear, indicando um mecanismo redox quase-reversível com transferência de massa controlada por difusão (GOSSER, 1993).

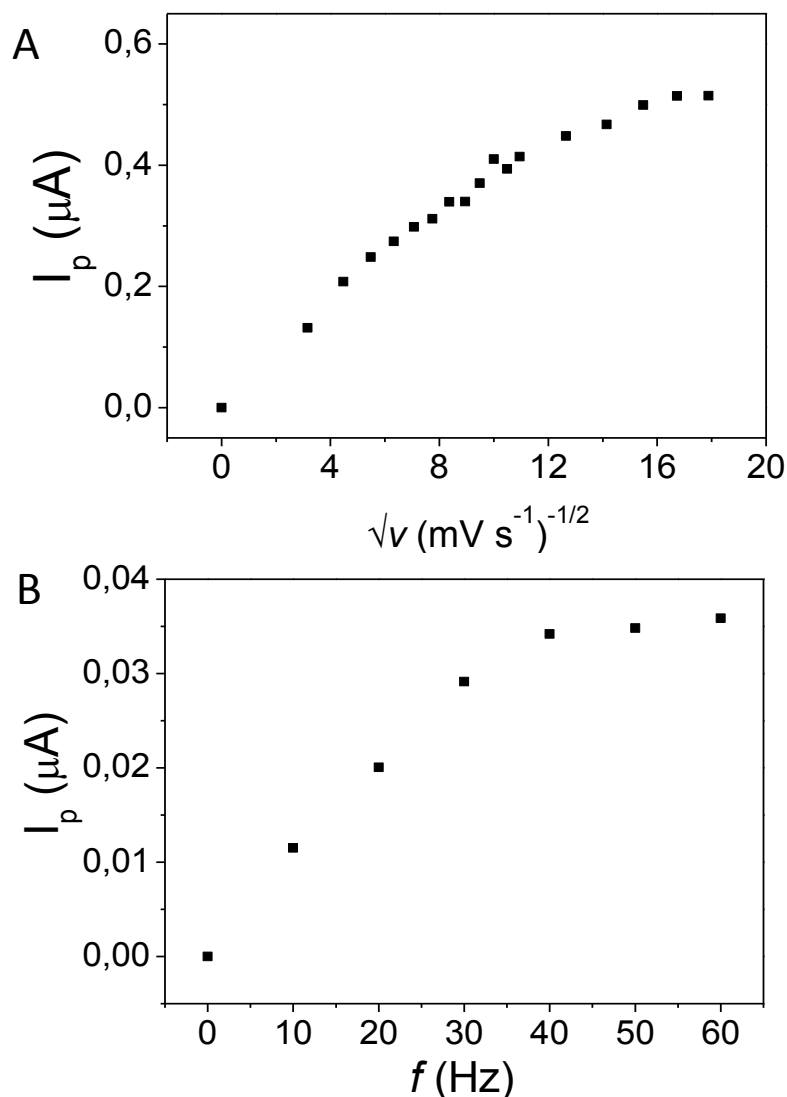


Figura 19 – (A) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $\sqrt{v}$ ) em função da corrente de pico ( $I_p$ ) de dimoxistrobina. (B)  $I_p$  em função da frequência ( $f$ ). Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e  $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de dimoxistrobina.

Para picoxistrobina, os estudos com os dois picos de oxidação indicaram que ambos os processos redox são irreversíveis com transferência de massa controlada por difusão, pois os gráficos de  $I_p$  em função de  $\sqrt{v}$  e de  $I_p$  em função de  $f$  mostraram comportamento linear para os dois processos de oxidação de picoxistrobina em DDB (Figura 20).

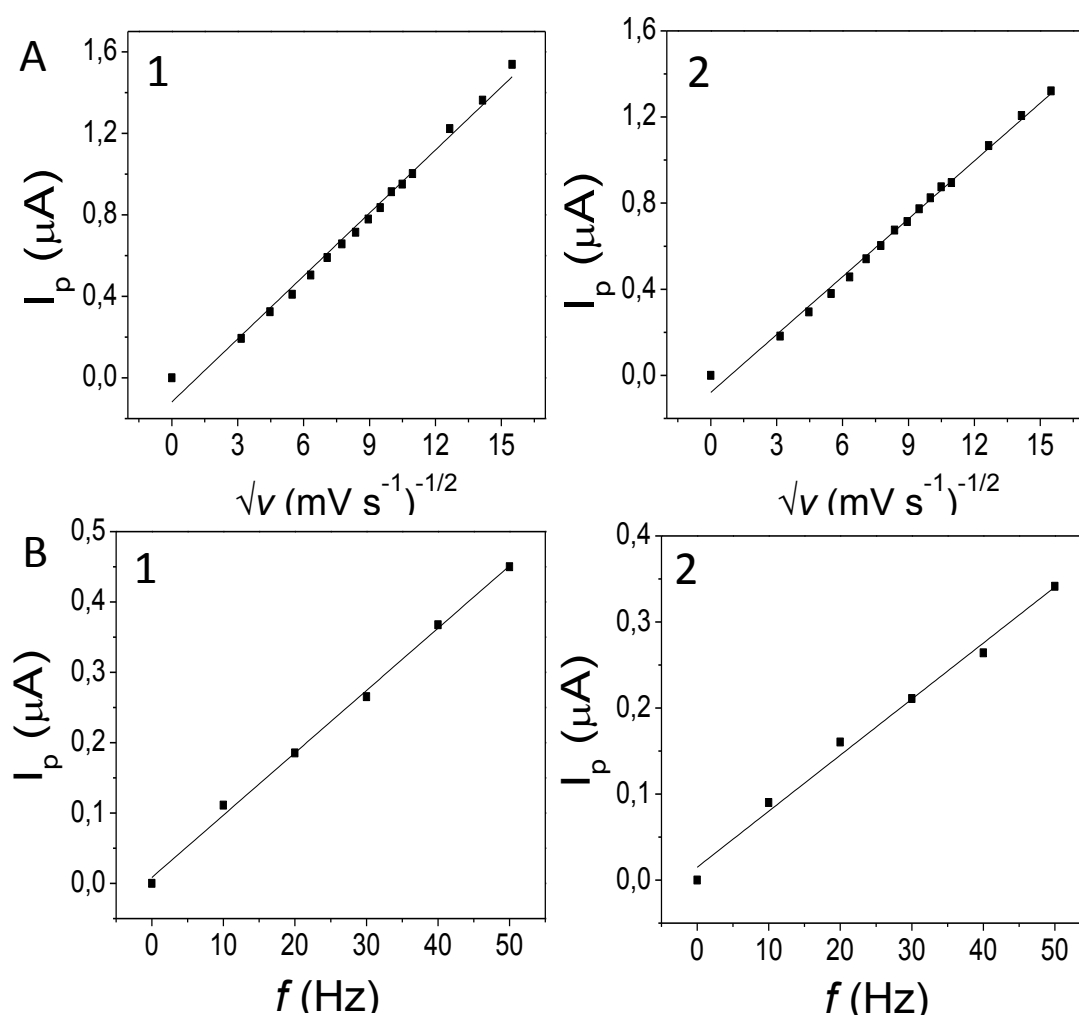


Figura 20 - (A) Corrente de pico em função de frequência ( $f$ ). (B) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura em função de  $I_p$  de picoxistrobina. (1) Pico de oxidação com máximo em +1450 mV e (2) pico de oxidação com máximo em +1950 mV. Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9 µmol L<sup>-1</sup> de concentração final de picoxistrobina.

Utilizando a Equação 4 ( $\Delta E_{p/2} = 127/n$ ) e substituindo os valores para  $\Delta E_{p/2}$  de 80 mV e 74 mV, os valores de  $n$  encontrados foram 1,6 e 1,7, sugerindo que a oxidação, que ocorre em ambos os potenciais, envolve dois elétrons. Processos similares aos mecanismos propostos para o cresoxim-metílico (Figura 16) podem ser atribuídos para a oxidação de picoxistrobina, já que estas duas estrobilurinas são semelhantes em termos de estrutura.

Já para piraclostrobrina, os estudos dos dois picos de oxidação indicaram que ambos os processos são quase-reversíveis com a transferência de massa controlada por adsorção. Os gráficos de  $I_p$  em função de  $\sqrt{v}$  e de  $I_p$  em função de  $f$  não foram lineares para os dois processos de oxidação de piraclostrobrina em DDB (Figura 21).

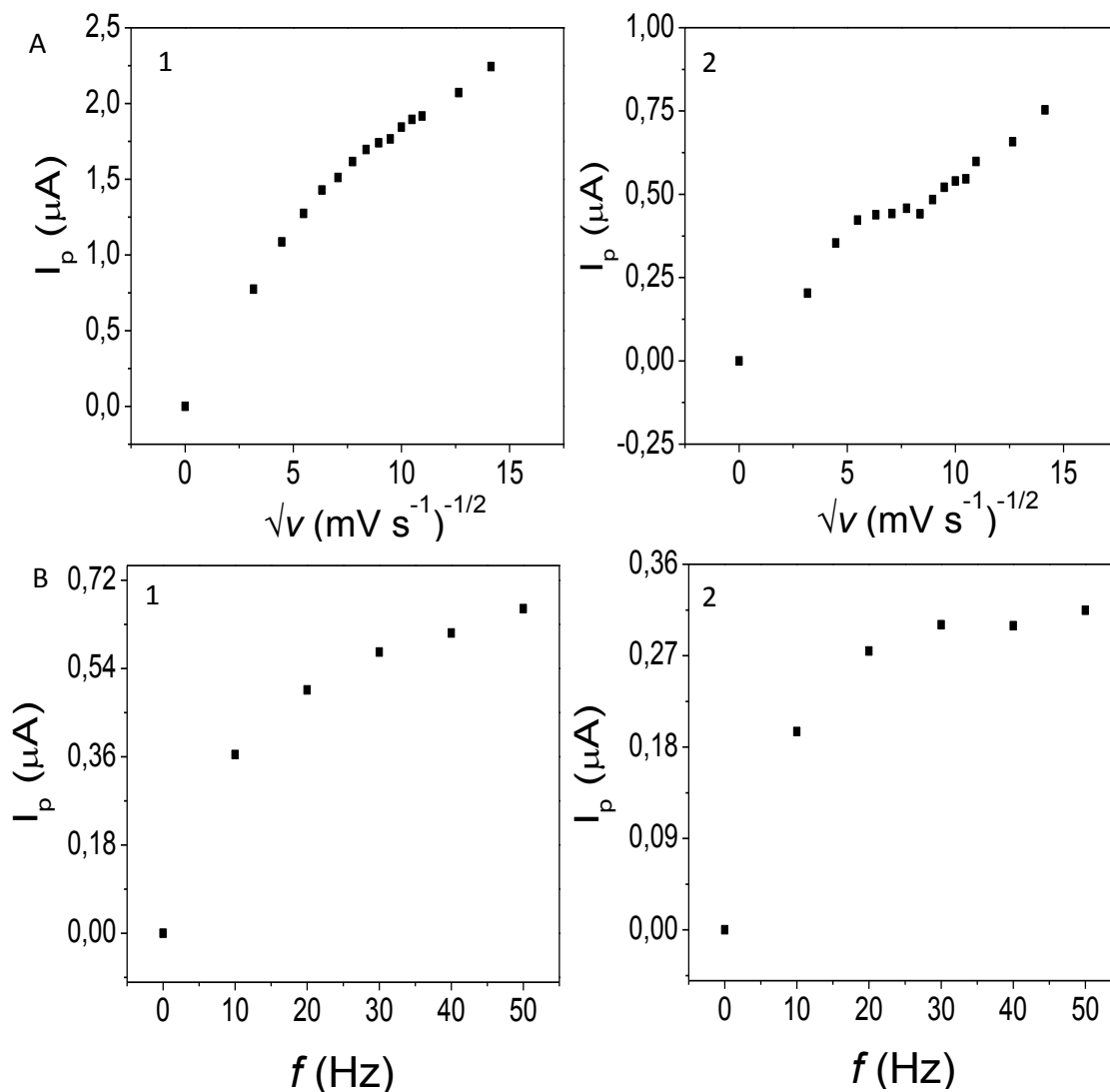


Figura 21 - (A) Corrente de pico em função de frequência ( $f$ ) e (B) Variação da raiz quadrada da velocidade de varredura em função de  $I_p$  de piraclostrobina. (1) Pico de oxidação com máximo em +1280 mV e (2) pico de oxidação com máximo em +1650 mV. Parâmetros instrumentais para CV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 2 mV de incremento de varredura; +1200 a +2200 mV de intervalo de potencial e 15,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de piraclostrobina. Parâmetros instrumentais para SWV: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) pH 2,0 foi o eletrólito suporte; 20 mV de incremento de varredura; 40 mV de amplitude de pulso e 9,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de piraclostrobina.

### 4.3.

#### Seleção das condições experimentais e instrumentais.

A fim de alcançar as melhores condições experimentais e instrumentais para a determinação voltamétrica com varredura de potencial do tipo onda quadrada para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobinas usando o eletrodo de DDB, um estudo exaustivo foi realizado levando em consideração os parâmetros críticos que afetam a intensidade, estabilidade e reprodutibilidade do sinal. A escolha dos parâmetros a serem estudados se baseou no procedimento geral de análise, que consistiu na adição da amostra ou solução padrão de analito em uma célula que continha apenas o eletrólito suporte (tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> e pH 4,0 ou tampão acetato 0,05 mol L<sup>-1</sup> e pH 4,0). O ciclo de medição era feito por uma varredura anódica de potencial sem a utilização de potencial ou tempo de deposição. Assim, os parâmetros críticos que foram estudados consistiram em: (i) tipo e concentração do eletrólito suporte, (ii) frequência de aplicação dos pulsos ( $f$ ), (iii) amplitude de pulso ( $a$ ) e (iv) o incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ). Todos os estudos foram feitos de forma univariada, em triplicata e avaliando apenas o primeiro pico de oxidação de cada uma das estrobilurinas.

#### 4.3.1.

##### Estudo do eletrólito suporte.

A primeira opção crítica foi a escolha do eletrólito suporte a ser empregado. Estudos utilizando tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>), que é uma mistura dos tampões acetato, fosfato e borato, em uma faixa de pH entre 2,0 a 12,0, foram realizados para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobinas. Observaram-se correntes características das três estrobilurinas em todos os pH avaliados (Figura 22).

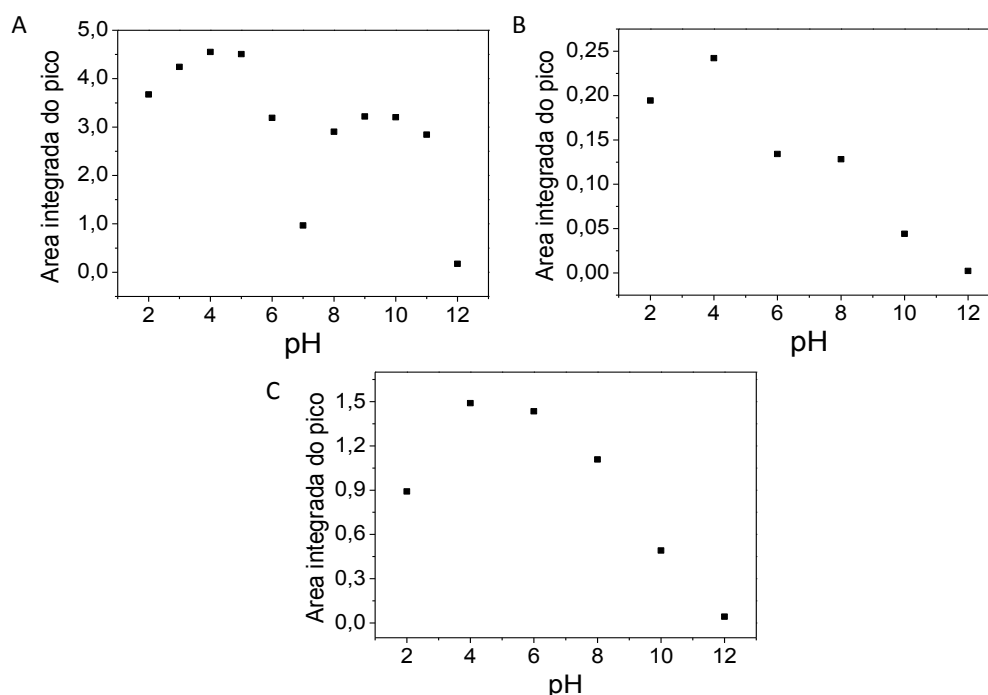


Figura 22 – Influência do pH no eletrólito suporte para a área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 2,0 a 12,0 foi o eletrólito suporte; 40 Hz de frequência; 10 mV de incremento de varredura; 20 mV de amplitude de pulso e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula.

Como pode ser observado na Figura 22, as áreas integradas do pico para as três estrobilurinas são influenciadas pelo pH do sistema aquoso. Para todas as estrobilurinas avaliadas as maiores intensidades de sinal foram obtidas em meio ácido. Em meio básico, o segundo pico de oxidação desaparece, além de ocorrer um ligeiro deslocamento no  $E_p$  (sentido de potencial mais positivo) do primeiro pico de oxidação para todos os analitos. Embora tenha sido observada correntes de difusão significativa para os analitos ao longo de toda a faixa de pH estudada, a faixa ácida foi preferida para o desenvolvimento dos métodos analíticos de forma a preservar a integridade do eletrodo (o filme de DDB é depositado sobre um substrato de silício), porque em meio básico o substrato sofre degradação devido a reação entre silício e a hidroxila. O pH 4,0 foi escolhido para a determinação de todas as estrobilurinas, uma vez que a resposta analítica é máxima e porque pode ser prontamente coberto pela utilização do tampão de acetato.

Testes utilizando solução de tampão acetato pH 4,0 ( $0,001$  a  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram realizados e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 23.

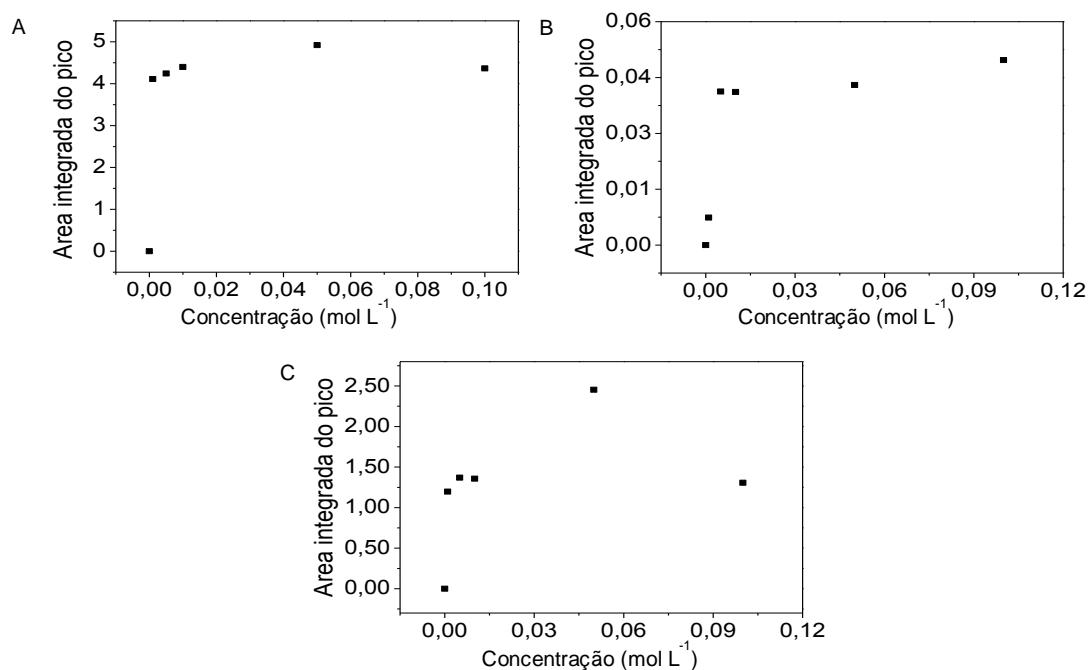


Figura 23 – Influência na concentração da solução de tampão acetato na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão acetato pH 4,0 foi o eletrólito suporte; 40 Hz de frequência; 10 mV de incremento de varredura; 20 mV de amplitude de pulso e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula.

Verificou-se que o sinal analítico no tampão de acetato (pH 4,0) em uma concentração de  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  tinha uma maior intensidade para o cresoxim-metílico e piraclostrobina, sendo portanto, escolhido como eletrólito suporte nas determinações analíticas destas estrobilurinas. Para picoxistrobina, o sinal analítico em uma solução de tampão acetato pH 4,0 era em torno de 70% menor (ver Figura 22) que no tampão BR (pH 4,0), sendo este último o escolhido como eletrólito suporte para as determinações analíticas. As soluções aquosas de HCl e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,01$  a  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) também foram testadas para todas as estrobilurinas. Os sinais analíticos obtidos com estes eletrólitos suporte foram consideravelmente menores que os observados com os outros tampões testados.

### 4.3.2.

#### Estudo da frequência, amplitude e incremento de varredura.

A fim de permitir maior resposta analítica usando a SWV, as condições instrumentais foram otimizadas: amplitude de pulso ( $a$ ) ao longo do intervalo 10 a 100 mV; a frequência dos pulsos aplicados ( $f$ ) ao longo do intervalo 10 a 50 Hz e o incremento de potencial ( $\Delta E_s$ ) ao longo do intervalo 5 e 35 mV.

O primeiro parâmetro avaliado foi a amplitude do pulso e os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 24.

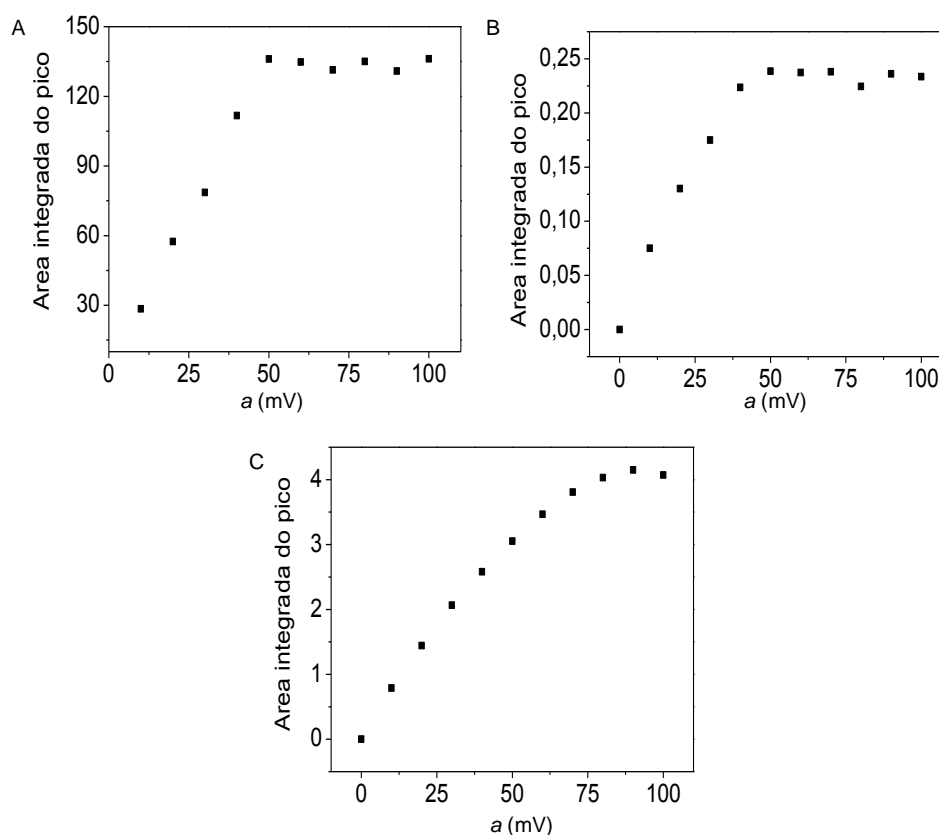


Figura 24 – Influência da amplitude de pulso ( $a$ ) na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0, para cresoxim-metílico e piraclostrobina e tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0 para picoxistrobina foram os eletrólitos suporte; 40 Hz de frequência; 10 mV de incremento de varredura e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula.

Para cresoxim-metílico e picoxistrobina, a intensidade do sinal (medida em área) aumentou até a amplitude de 50 mV, sem variações significativas para os



valores maiores. Esta amplitude foi escolhida para as determinações analíticas destas duas estrobilurinas. Para piraclostrobina ocorreu um aumento na área integrada do pico até se atingir o patamar de valor máximo de 80 a 100 mV (Figura 24C). Com o aumento na área integrada do pico, sua largura foi aumentando (o que pode afetar a resolução dos picos na hipótese de outras substâncias na amostra oxidem quando usado o DDB), por conseguinte, um valor de amplitude igual a 40 mV foi selecionado por ter uma boa relação entre sinal e largura de pico.

A frequência de aplicação dos pulsos foi avaliada para as três estrobilurinas em uma faixa que variou de 10 a 50 Hz (Figura 25). Nos três casos avaliados foram observados aumento na área integrada do pico com o aumento da frequência. Como também foi observado um aumento na largura do pico com a frequência, um melhor compromisso entre a intensidade do sinal e largura do pico foi obtido com 30 Hz para todos os analitos.

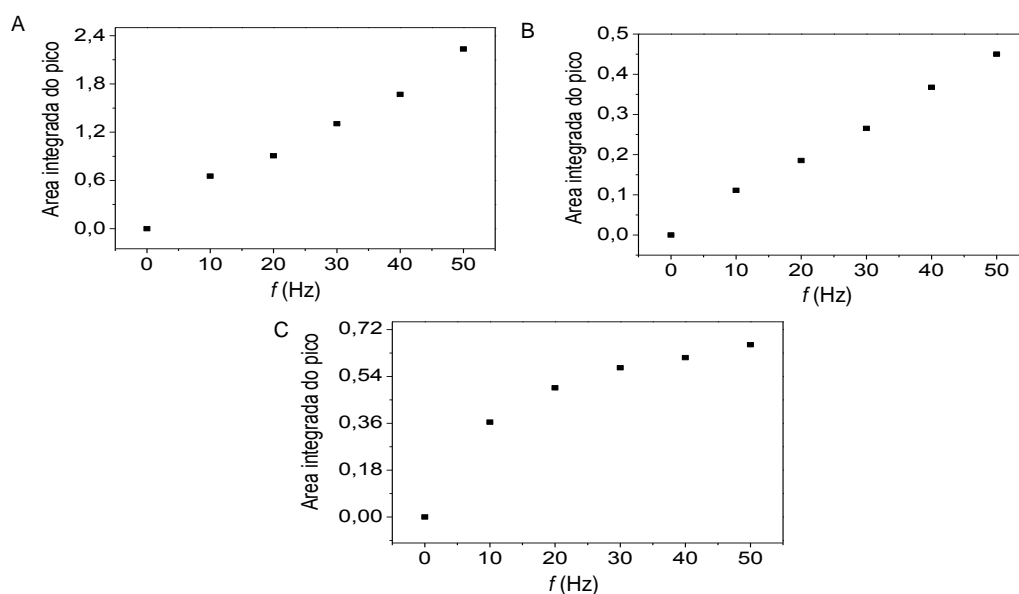


Figura 25 – Influência da frequência de pulso ( $f$ ) na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metilico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0, para cresoxim-metilico e piraclostrobina e tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0 para picoxistrobina foram os eletrólitos suporte; 50 mV de amplitude para cresoxim-metilico e picoxistrobina e 40 mV de amplitude para piraclostrobina; 10 mV de incremento de varredura e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula.

O último parâmetro instrumental avaliado foi o incremento de varredura em uma faixa que variou de 5 e 35 mV (Figura 26). A velocidade na análise voltamétrica por varredura do tipo onda quadrada é diretamente influenciada por esse parâmetro sendo a velocidade de varredura um produto da  $f$  e do  $\Delta E_s$ . O valor de  $\Delta E_s$  pode aumentar o sinal medido e afetar a largura do pico voltamétrico. Para cresoxim-metílico e piraclostrobina ocorreu um aumento na intensidade de sinal com a variação de  $\Delta E_s$ . Já para picoxistrobina a variação do valor de  $\Delta E_s$  não trouxe mudanças significativas na intensidade de sinal. Em todos os casos a variação do  $\Delta E_s$  afetou diretamente a largura do pico, o que pode afetar a resolução nas medições analíticas. Assim, com o melhor compromisso intensidade do sinal e largura do pico, o  $\Delta E_s$  de 15 mV foi escolhido para a determinação de cresoxim-metílico, 5 mV para a determinação de picoxistrobina e 30 mV para a determinação de piraclostrobina.

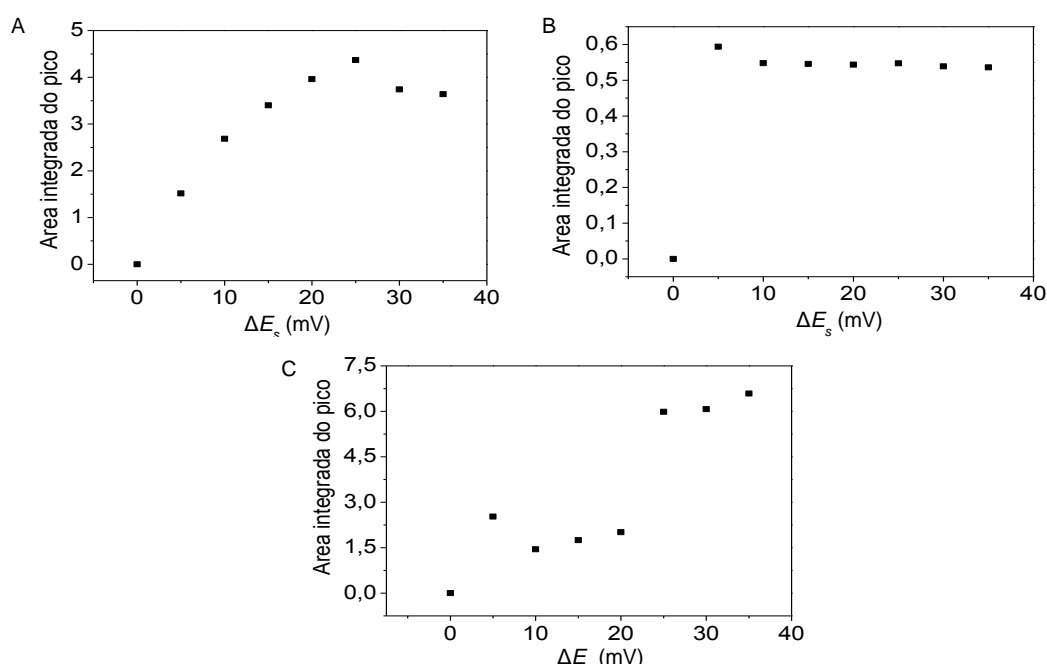


Figura 26 – Influência do incremento de varredura na área integrada do pico. (A) Cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: tampão acetato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0, para cresoxim-metílico e piraclostrobina e tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 4,0 para picoxistrobina foram os eletrólitos suporte; 50 mV de amplitude para cresoxim-metílico e picoxistrobina e 40 mV de amplitude para piraclostrobina; 30 Hz de frequência e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula.

Os parâmetros experimentais escolhidos para a voltametria de onda quadrada em um eletrodo de trabalho de DDB estão descritos na Tabela 8 para a determinação de cresoxim-metílico, na Tabela 9 para a determinação de picoxistrobina e na Tabela 10 para a determinação de piraclostrobina.

Tabela 8 - Condições experimentais selecionadas para a determinação voltamétrica de cresoxim-metílico usando o eletrodo de trabalho de DDB.

Parâmetro	Valor
Eletrólito suporte	Tampão acetato 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 4,0
Amplitude ( <i>a</i> )	50 mV
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ )	15 mV
Frequência ( <i>f</i> )	30 Hz
Sinal monitorado	em +1420 mV
Faixa de potencial varrido	de +1000 para +1750 mV

Tabela 9 - Condições experimentais selecionados para a determinação voltamétrica de picoxistrobina usando o eletrodo de trabalho DDB.

Parâmetro	Valor
Eletrólito suporte	Tampão BR 0,04 mol L <sup>-1</sup> pH 4,0
Amplitude ( <i>a</i> )	50 mV
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ )	5 mV
Frequência ( <i>f</i> )	30 Hz
Sinal monitorado	em +1450 mV
Faixa de potencial varrido	de +1100 para +1800 mV

Tabela 10 - Condições experimentais selecionados para a determinação voltamétrica de piraclostrobina usando o eletrodo de trabalho DDB.

Parâmetro	Valor
Eletrólito suporte	Tampão acetato 0,05 mol L <sup>-1</sup> pH 4,0
Amplitude ( <i>a</i> )	40 mV
Incremento de varredura ( $\Delta E_s$ )	30 mV
Frequência ( <i>f</i> )	30 Hz
Sinal monitorado	em +1280 mV
Faixa de potencial varrido	de +1050 para +2100 mV

Na Figura 27 são apresentados voltamogramas característicos para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina (todos na concentração de  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  na célula de medição) utilizando as condições experimentais selecionadas com um eletrodo de DDB.

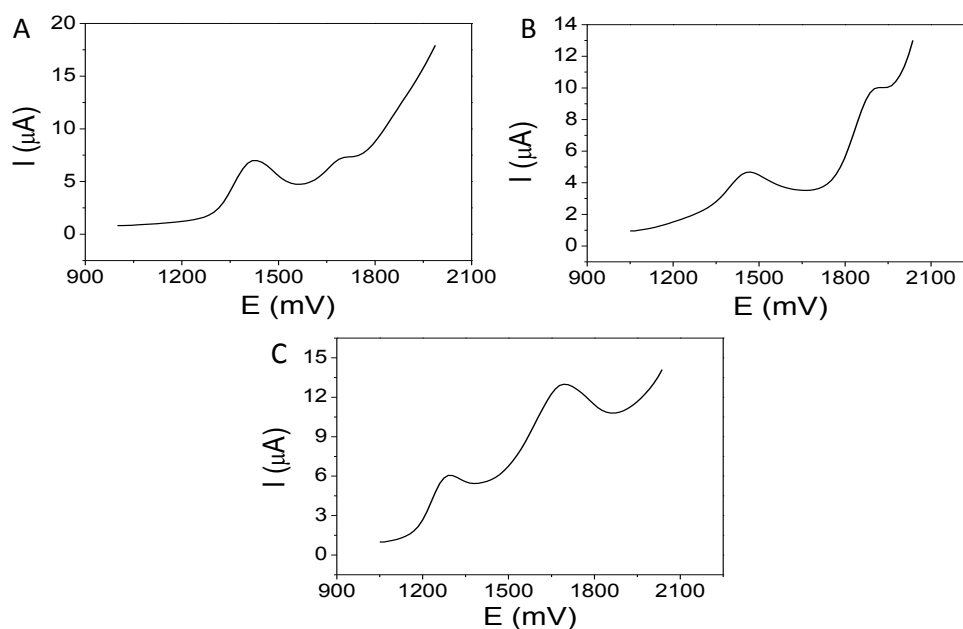


Figura 27 – Voltamogramas característicos utilizando eletrodo de trabalho DDB nas condições experimentais escolhidas para: (A) cresoxim-metílico; (B) picoxistrobina; (C) piraclostrobina. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 8 para cresoxim-metílico; ver Tabela 9 para picoxistrobina; ver Tabela 10 para piraclostrobina e  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final de cada estrobilurina na célula.

Um estudo foi realizado com medições sequenciais ( $n = 50$ ) de uma solução padrão de estrobilurina (cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina nas concentrações de  $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  na célula) nas condições experimentais selecionadas para SWV com DDB para verificar se era necessário aplicar um procedimento de limpeza do eletrodo de modo a se evitar a influência de sinal residual do processo de medição anterior na medida subsequente. O resultado confirmou que não houve efeito de memória entre as medições sequenciais das estrobilurinas, não sendo necessário procedimento de limpeza entre medições. As medições sequenciais resultaram em variação aleatória de sinal com desvio padrão relativo de 4,8% para cresoxim-metílico, 2,7% para picoxistrobina e 2,8% para piraclostrobina.

#### 4.4. Desempenho analítico.

Os parâmetros analíticos de mérito dos métodos foram obtidos usando as condições experimentais selecionadas para determinar cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina. Uma sequência de voltamogramas de soluções contendo concentrações crescentes de cresoxim-metílico é apresentada na Figura 28A. A área do pico de redissolução foi diretamente e linearmente proporcional à concentração de cresoxim-metílico na célula eletroquímica (Figura 28B). A curva analítica,  $Y = (3,3 \times 10^{-2} \pm 2,5 \times 10^{-4} \mu\text{A L mol}^{-1}) X - (2,1 \times 10^{-3} \pm 5,3 \times 10^{-4})$ , apresentou uma resposta linear ( $R^2 = 0,9995$ ) a partir do limite de quantificação (LOQ) até  $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O limite de detecção (LOD) na célula analítica foi de  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ ) para cresoxim-metílico. O LOQ calculado na célula foi de  $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ ). O LOD foi calculado usando os critérios  $3s_B/S$  e o LOQ foi calculado usando os critérios  $10 s_B/S$ , onde  $s_B$  é o desvio padrão de 10 medições consecutivas da menor concentração do analito na curva e  $S$  é a inclinação da curva analítica. Na Figura 29 é apresentada a diferença entre o sinal produzido pela concentração do LOQ ( $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de cresoxim-metílico e o produzido pelo branco.

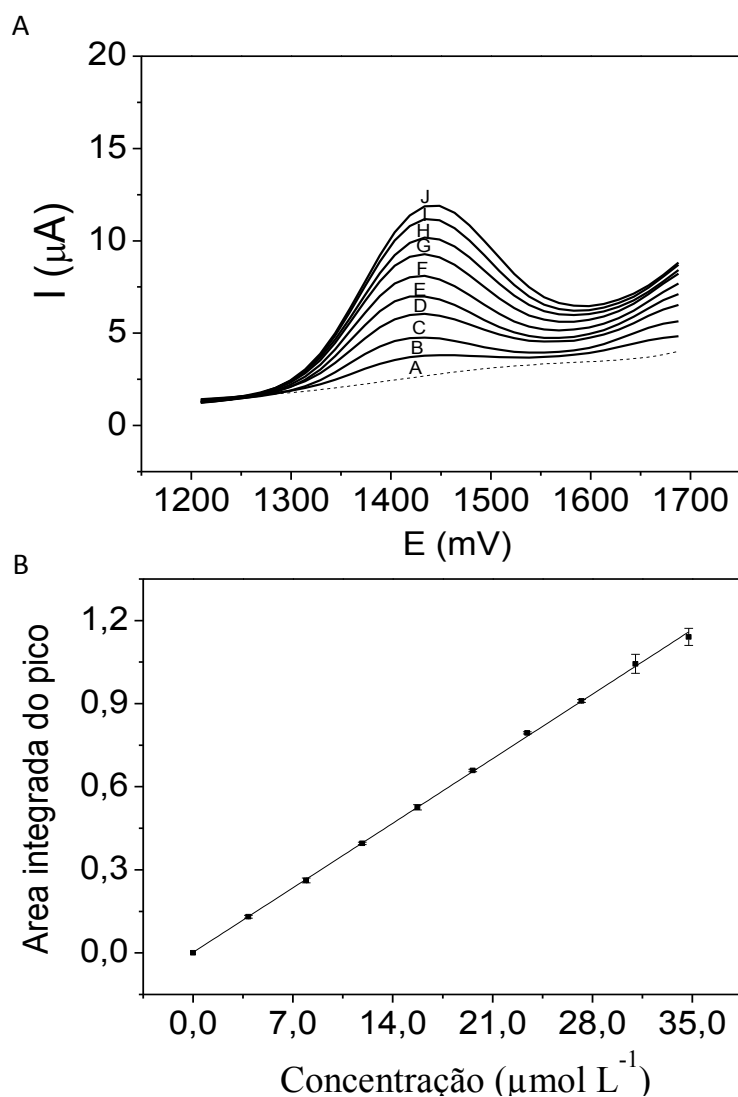


Figura 28 - (A) Voltamogramas de concentrações crescentes de cresoxim-metilico: (A) branco; (B)  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (C)  $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (D)  $12,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (E)  $16,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (F)  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (G)  $23,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (H)  $27,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (I)  $31,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (J)  $34,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica com  $Y = (3,3 \times 10^{-2} \pm 2,5 \times 10^{-4} \mu\text{A L mol}^{-1}) X - (2,1 \times 10^{-3} \pm 5,3 \times 10^{-4})$  e  $R^2 = 0,9995$ . Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 8.

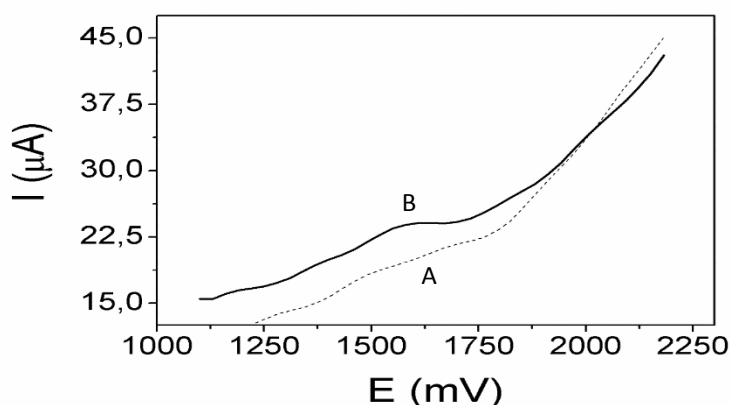


Figura 29 – Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) branco e (B) por uma concentração de cresoxim-metílico equivalente ao LOQ ( $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 8.

Para picoxistrobina, a sequência de voltamogramas de concentrações crescentes e a curva analítica são apresentadas na Figura 30. A curva analítica ( $Y = (2,0 \times 10^{-2} \pm 7,1 \times 10^{-4} \mu\text{AL mol}^{-1}) X + (1,1 \times 10^{-2} \pm 8,4 \times 10^{-3})$ ) apresentou uma relação linear ( $R^2 = 0,9941$ ) entre a área integrada do pico e a concentração do analito na célula eletroquímica. O LOD na célula foi de  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ ) e LOQ foi de  $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ). A Figura 31 apresenta a diferença entre o sinal produzido pela concentração do LOQ ( $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de picoxistrobina e o branco.

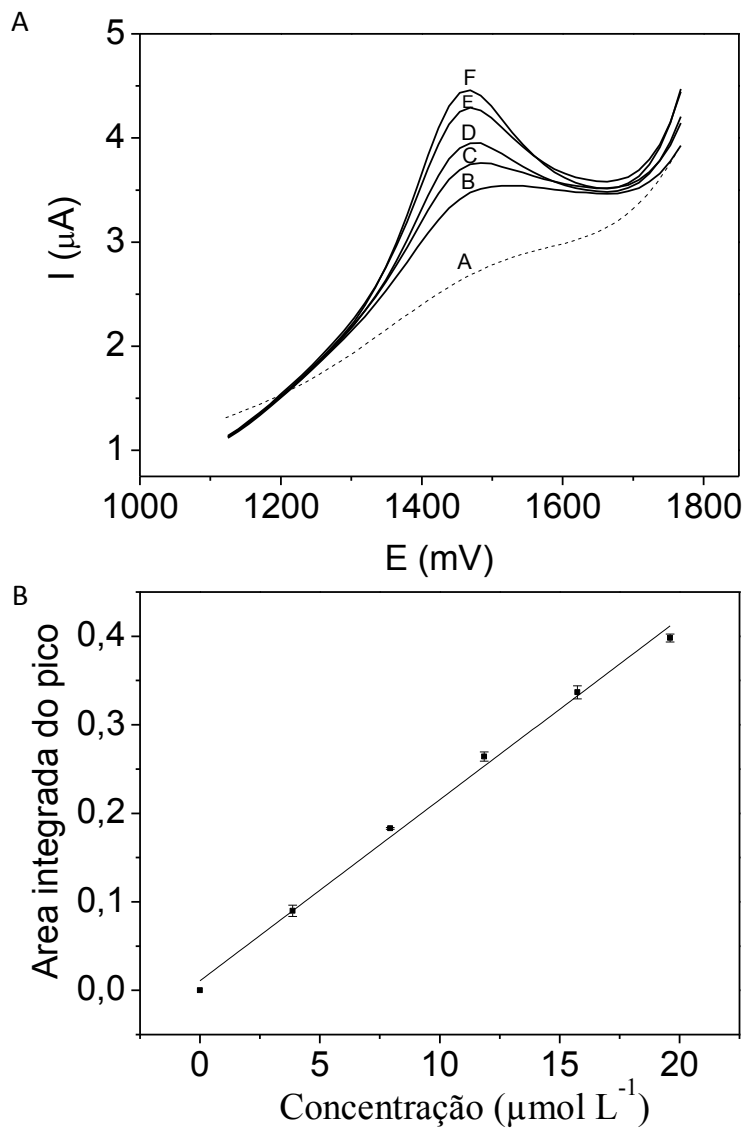


Figura 30 - (A) Voltamogramas de concentrações crescentes de picoxistrobina: (A) branco; (B) 3,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (C) 7,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (D) 12,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (E) 16,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (F) 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica com  $Y = (2,0 \times 10^{-2} \pm 7,1 \times 10^{-4} \mu\text{A L mol}^{-1}) X + (1,1 \times 10^{-2} \pm 8,4 \times 10^{-3})$  e  $R^2=0,9941$ . Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 9.



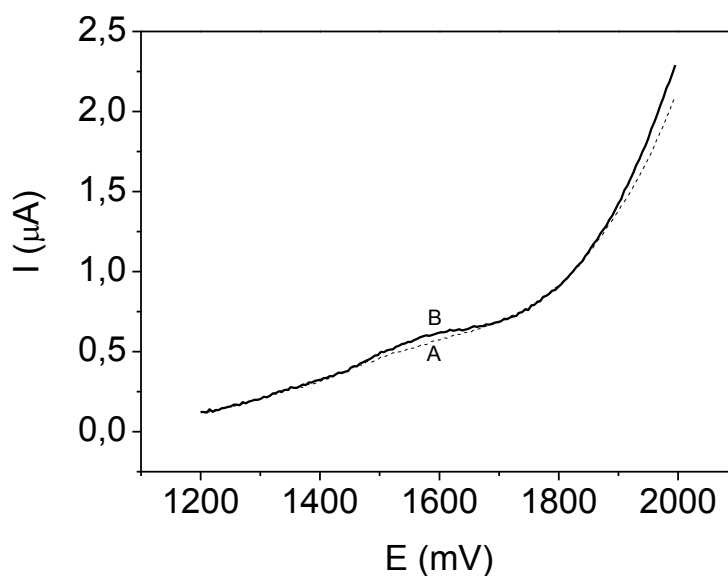


Figura 31 – Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) branco e (B) por uma concentração de picoxistrobina equivalente ao LOQ ( $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 9.

Para piraclostrobina, a sequência de voltamogramas de concentrações crescentes desse analito e a curva analítica são apresentadas na Figura 32. A curva analítica ( $Y = (5,5 \times 10^{-2} \pm 2,3 \times 10^{-3} \mu\text{AL mol}^{-1}) X + (4,5 \times 10^{-2} \pm 2,7 \times 10^{-3})$ ) apresentou uma relação linear ( $R^2 = 0,9912$ ) entre a área integrada do pico e a concentração do analito na célula eletroquímica. O LOD na célula foi de  $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ ) e LOQ foi de  $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,32 \text{ mg L}^{-1}$ ). A Figura 33 apresenta a diferença entre o sinal produzido pela concentração do LOQ ( $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de piraclostrobina e o branco.

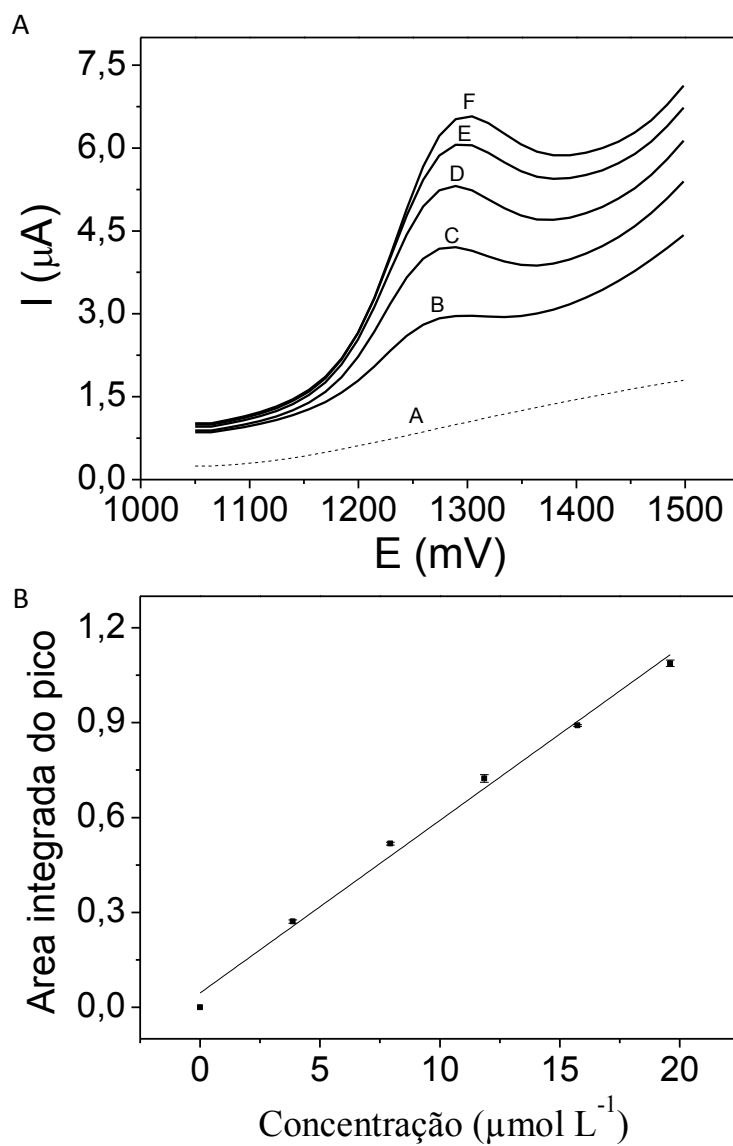


Figura 32 - (a) Voltamogramas de concentrações crescentes de piraclostrobina: (A) branco; (B) 3,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (C) 7,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (D) 12,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (E) 16,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (F) 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (b) Curva analítica com  $Y = (5,5 \times 10^{-2} \pm 2,3 \times 10^{-3} \mu\text{AL mol}^{-1}) X + (4,5 \times 10^{-2} \pm 2,7 \times 10^{-3})$  e  $R^2 = 0,9912$ . Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 10.

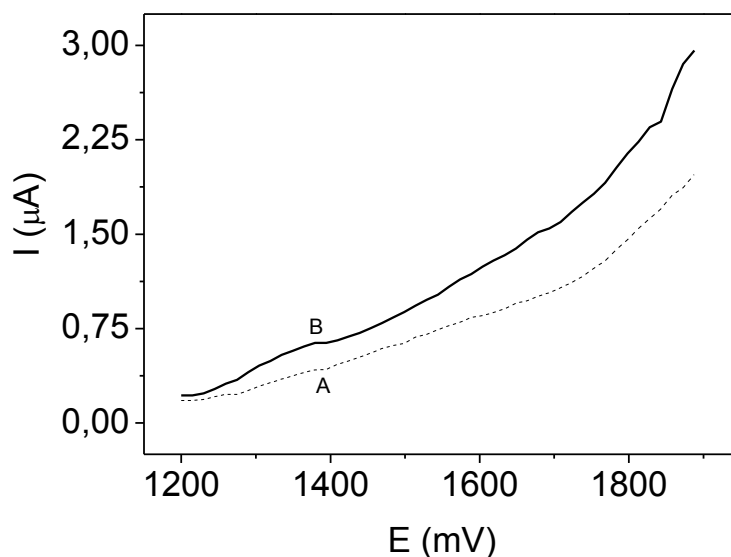


Figura 33 - Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) Branco e (B) por uma concentração de piraclostrobina equivalente ao LOQ ( $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e o (A) branco. Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 10.

A precisão de cada método foi avaliada por estudos de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada pelo coeficiente de variação de dez medições consecutivas do sinal produzido por cada um dos analitos na concentração de  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A precisão intermediária foi determinada pela comparação dos resultados obtidos a partir da análise (dez repetições independentes) de soluções aquosas de cada estrobilurina feitas por dois analistas diferentes (cada analista preparou o seu próprio conjunto de solução). As repetibilidades foram representadas por valores de coeficiente de variação de 3,6; 4,8 e 4,2% e as precisões intermediárias foram 4,7; 4,9 e 5,3% para cresoximetílico, picoxistrobina e piraclostrobina, respectivamente.

Embora seja incomum o uso combinado de diferentes estrobilurinas no tratamento das culturas, os estudos de interferência foram feitos através da avaliação no efeito da presença de outras estrobilurinas no sinal do analito. A interferência foi avaliada através dos valores de  $I_{\text{analito}} / I_{(\text{analito} + \text{interferente})}$ , que é dada pela relação entre o sinal obtido a partir de uma solução contendo apenas o analito e o sinal medido a partir de uma solução contendo a mistura do analito com outra estrobilurina (neste caso, a concentração de analito é igual nas duas soluções). Valores de razão próximos à unidade não indicaram interferência. Valores

superiores a 1 indicaram uma diminuição do sinal do analito devido à presença de outra estrobilurina. Os testes foram feitos com proporções crescentes de estrobilurina interferente/analito. As medições foram efetuadas em triplicata e os cálculos basearam-se na área integrada do pico. Os resultados de interferência no sinal analítico para cresoxim-metílico são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação da interferência de outros estrobilurinas no sinal de eletroanalítico de cresoxim-metílico (3,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Interferente	Proporção (Estrobilurina/cresoxim -metílico)	$I_{\text{cresoxim-metílico}} /$
		$I_{\text{(cresoxim-metílico + interferente)}}$
Fluoxastrobina	0:1	1,00
	1:1	0,94
	2:1	1,27
Trifloxistrobina	0:1	1,00
	1:1	1,05
	2:1	1,05
	3:1	1,05
	5:1	0,93
	10:1	1,19

Para condições instrumentais ver Tabela 8.

Azoxistrobina, picoxistrobina e piraclastrobina são oxidados em potenciais muito próximos ao de cresoxim-metílico, por conseguinte, a interferência destes pesticidas foi observada com razão molar de (1:1). Uma situação mais satisfatória foi encontrada quando cresoxim-metílico é medida na presença de trifloxistrobina ou fluoxastrobina, porque estas estrobilurinas são oxidadas em potencial mais alto (acima de +1700 mV). Não foi observada interferência em misturas contendo trifloxistrobina em concentrações de até cinco vezes mais elevada do que a do analito. Por outro lado, fluoxastrobina impôs interferências em misturas contendo duas vezes a concentração do analito com a relação  $I_{\text{cresoxim-metílico}} / I_{\text{(cresoxim-metílico + interferente)}}$  aumentando para 1,27.

Os resultados de interferência no sinal analítico para picoxistrobina são apresentados na Tabela 12. Azoxistrobina, cresoxim-metílico e piraclostrobina também impõem interferência com a razão molar de (1:1) para a determinação de picoxistrobina, devido à proximidade dos picos de oxidação. Não foi observada interferência em misturas contendo trifloxistrobina ou fluoxastrobina em concentrações de até duas vezes mais elevada do que a do analito.

Tabela 12 - Avaliação da interferência de outros estrobilurinas no sinal de eletroanalítico de picoxistrobina ( $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Interferente	Proporção (Estrobilurina/picoxistrobina)	$I_{\text{picoxistrobina}} /$
		$I_{(\text{picoxistrobina} + \text{Interferente})}$
Fluoxastrobina	0:1	1,00
	1:1	1,08
	2:1	1,15
	3:1	1,52
Trifloxistrobina	0:1	1,00
	1:1	1,01
	2:1	1,13
	3:1	1,60

Para condições instrumentais ver Tabela 9.

Os resultados de interferência no sinal analítico para piraclostrobina são apresentados na Tabela 13. Picoxistrobina, dimoxistrobina e a cresoxim-metílico impõem interferência com a razão molar de (1:1) para a determinação de piraclostrobina, devido à proximidade dos picos de oxidação. A azoxistrobina apresenta picos de oxidação próximos aos da piraclostrobina, assim, a interferência foi encontrada quando a concentração é duas vezes mais elevada do que a do analito. Para fluoxastrobina e trifloxistrobina foram obtidos resultados mais satisfatórios na recuperação de piraclostrobina, mesmo quando a concentração destas outras estrobilurinas é cinco vezes mais elevada do que a do analito.

Tabela 13 - Avaliação da interferência de outros estrobilurinas no sinal de eletroanalítico de piraclostrobina ( $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Interferente	Proporção (Estrobilurina/piraclostrobina)	$I_{\text{piraclostrobina}} / I_{\text{(piraclostrobina + i_{interferente})}}$
Azoxistrobina	0:1	1,00
	1:1	0,99
	2:1	0,94
	3:1	6,96
Fluoxastrobina	0:1	1,00
	1:1	0,98
	5:1	0,98
	10:1	1,07
	15:1	1,13
	20:1	1,15
Trifloxistrobina	0:1	1,00
	1:1	1,01
	5:1	1,02
	10:1	1,10
	15:1	1,19
	20:1	1,33

Para condições instrumentais ver Tabela 10.

Para todos os métodos avaliados a interferência no sinal analítico não é significativa, porque as amostras reais não devem conter outra estrobilurina, devido ao fato de não ser comum o uso de misturas destes fungicidas para tratar as culturas.

#### 4.5. Aplicação dos métodos.

Os métodos propostos utilizando a voltametria de onda quadrada com eletrodo de trabalho de DDB para a determinação de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina foram aplicados na análise de amostras de águas naturais, sucos comerciais de uva (fermentado e não fermentado), e suco de uva com leite de soja. A quantificação dessas estrobilurinas foi feita por adição de analito (abordagem múltipla). Na Tabela 14, os resultados para a análise de cresoxim-metílico (em três dias diferentes) são listados, indicando as concentrações recuperadas do analito em três amostras diferentes de suco de uva, fortificadas em dois níveis de concentração ( $6,0$  e  $11,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $1,9$  e  $3,7 \text{mg L}^{-1}$ ). Os valores

de recuperação ficaram na faixa de 93 % e 105%, o que pode ser considerado como aceitável. Valores de LOD e LOQ na amostra foram da ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  devido ao fator de diluição nas amostras (cerca de 10 vezes). No entanto, conforme indicado no procedimento de extração, a utilização do cartucho C18 para limpeza da matriz da amostra pode também ser utilizado para pré-concentração do analito, compensando este fator de diluição.

Tabela 14 - Recuperação de cresoxim-metílico (n = 3) em amostras de suco de uva fortificadas em dois níveis de concentração (6,0 e 11,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Amostra	Cresoxim-metílico ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	Dia	
Suco de uva fermentado	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	6,0	5,7 ± 0,6	1	96,3 ± 9,0
			2	96,0 ± 7,7
			3	93,1 ± 6,5
	11,8	11,5 ± 0,5	1	97,1 ± 4,1
			2	101,5 ± 4,5
			3	96,1 ± 2,3
Suco de uva não fermentado	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	6,0	6,0 ± 0,3	1	100,0 ± 5,8
			2	91,6 ± 8,6
			3	105,3 ± 5,4
	11,8	12,4 ± 1,0	1	105,3 ± 8,1
			2	94,3 ± 7,1
			3	103,0 ± 14,5
Suco de uva com leite de soja	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	6,0	6,0 ± 0,3	1	100,0 ± 5,8
			2	91,6 ± 5,3
			3	100,9 ± 6,2
	11,8	12,1 ± 0,3	1	102,6 ± 2,7
			2	93,6 ± 10,1
			3	101,7 ± 5,9

Para condições instrumentais ver Tabela 8.

Para picoxistrobina o método proposto foi aplicado na análise de amostras de água naturais. As amostras não indicaram a presença de picoxistrobina acima do limite de determinação do método. Assim, as amostras foram fortificadas com o analito em duas concentrações diferentes (5,4 e 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 2,0 e 3,3  $\text{mg L}^{-1}$ ). As medições foram realizadas em triplicata, em três dias diferentes. As recuperações são apresentadas na Tabela 15, variando de 93 a 104%, o que pode ser considerado aceitável.

Tabela 15 - Recuperação de picoxistrobina (n = 3) em amostras de águas naturais fortificadas em dois níveis de concentração (5,4 e 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Amostra	Picoxistrobina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			Recuperado (%)
	Adicionado	Encontrado	Dia	
Água mineral	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	5,4	5,7 ± 0,8	1	104,3 ± 6,3
			2	94,7 ± 2,0
			3	93,1 ± 0,9
	9,0	8,6 ± 0,0	1	96,0 ± 0,5
			2	100,3 ± 6,0
			3	100,5 ± 5,6
Água da lagoa Rodrigo de Freitas	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	5,4	5,2 ± 0,1	1	95,8 ± 2,2
			2	97,9 ± 2,0
			3	98,0 ± 4,1
	9,0	9,3 ± 0,3	1	103,5 ± 3,9
			2	97,5 ± 4,0
			3	98,3 ± 3,0

Para condições instrumentais ver Tabela 9.

Para piraclostrobina o método foi aplicado em amostras de água naturais e de sucos de uva. As amostras originais não apresentaram a presença de piraclostrobina acima do limite de determinação do método. Assim, as amostras foram fortificadas com o analito em duas concentrações diferentes. As recuperações são apresentadas na Tabela 16 e foram obtidos resultados satisfatórios em todos os casos, com recuperações que variaram de 92 a 102%.



Tabela 16 - Recuperação de piraclostrobina ( $n = 3$ ) em amostras de águas naturais em dois níveis de concentração ( $5,4$  e  $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Amostra	Piraclostrobina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			Recuperado (%)
	Adicionado	Encontrado	Dia	
Água mineral	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	5,4	$5,2 \pm 0,1$	1	$99,8 \pm 1,6$
			2	$102,5 \pm 4,6$
			3	$94,2 \pm 0,3$
	9,0	$9,2 \pm 0,7$	1	$102,1 \pm 8,2$
			2	$94,6 \pm 4,0$
			3	$94,4 \pm 1,6$
Água da lagoa Rodrigo de Freitas	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	5,4	$5,2 \pm 0,2$	1	$95,7 \pm 3,1$
			2	$92,8 \pm 2,8$
			3	$95,8 \pm 0,8$
	9,0	$8,5 \pm 0,7$	1	$94,3 \pm 7,7$
			2	$95,4 \pm 6,3$
			3	$94,9 \pm 2,1$

Para condições instrumentais ver Tabela 10.

O método para piraclostrobina também foi aplicado na análise de uma amostra de suco de uva ( $n = 3$ ), fortificada em dois níveis de concentração. Na concentração fortificada de  $5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) a recuperação foi  $102,0 \pm 13,8$  %, enquanto que a recuperação das amostras fortificadas em  $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi de  $98,7 \pm 3,4$  % ( $n = 3$ ).

O desempenho dos métodos propostos para a análise de amostras fortificadas com cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina ( $66,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  na amostra ou  $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  na célula eletroquímica) foram comparados com o obtido por meio de um método usando HPLC com detecção absorciométrica. Seis réplicas autênticas de água mineral e suco de uva (apenas para cresoxim-metílico) foram analisadas e os resultados médios obtidos pelos métodos voltamétricos de onda quadrada com DDB propostos e o de comparação foram comparados pelo teste *t de Student* em um intervalo de confiança de 95%. Os valores para *t* experimental de 1,11 (água) e 2,14 (suco de uva) para cresoxim-metílico, 1,67 para picoxistrobina e 1,38 para piraclostrobina foram menores do que o valor de *t* tabelado (2,23) para 10

graus de liberdade. Portanto, os resultados indicaram que não houve diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois métodos diferentes para cada estrobilurina.

#### 4.6.

#### **Estudo da degradação térmica e fotoquímica (por exposição ao UV) de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.**

A degradação fotoquímica por exposição ao UV de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina foi avaliada monitorando o primeiro pico de oxidação de cada estrobilurina. As soluções dos analitos foram preparadas em acetonitrila, numa concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , e armazenadas em tubos de quartzo. Posteriormente, foram expostas a radiação UV em um intervalo de tempo entre 5 e 90 min. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  destas soluções foram colocadas na célula eletroquímica e analisadas utilizando os métodos propostos. As concentrações determinadas, a partir das soluções contendo o analito exposto a radiação UV, foram representadas por sinal proporcional a 100% da concentração da estrobilurina original não degradada. As determinações foram realizadas em triplicata, utilizando adição de analito (abordagem múltipla).

Na Figura 34A é apresentado o perfil de degradação para cresoxim-metílico com a exposição ao UV. Os resultados obtidos mostram uma resiliência desta estrobilurina até 15 min de exposição ao UV, começando posteriormente a se degradar. Em 80 min a degradação do analito é completa. Não foi possível propor uma cinética para a degradação de cresoxim-metílico, porque os resultados obtidos não se enquadram em nenhum perfil cinético simples já que os gráficos que relacionam o log da razão entre a concentração inicial ( $C_0$ ) e a concentração medida ( $C$ ) em função do tempo (que indica cinética de primeira ordem) (Figura 34B) e o da relação entre o inverso da concentração de cresoxim-metílico e o tempo (que indica cinética de segunda ordem) (Figura 34C) não são lineares. Um estudo mais profundo deve ser realizado para se entender o perfil de degradação por exposição ao UV de cresoxim-metílico.

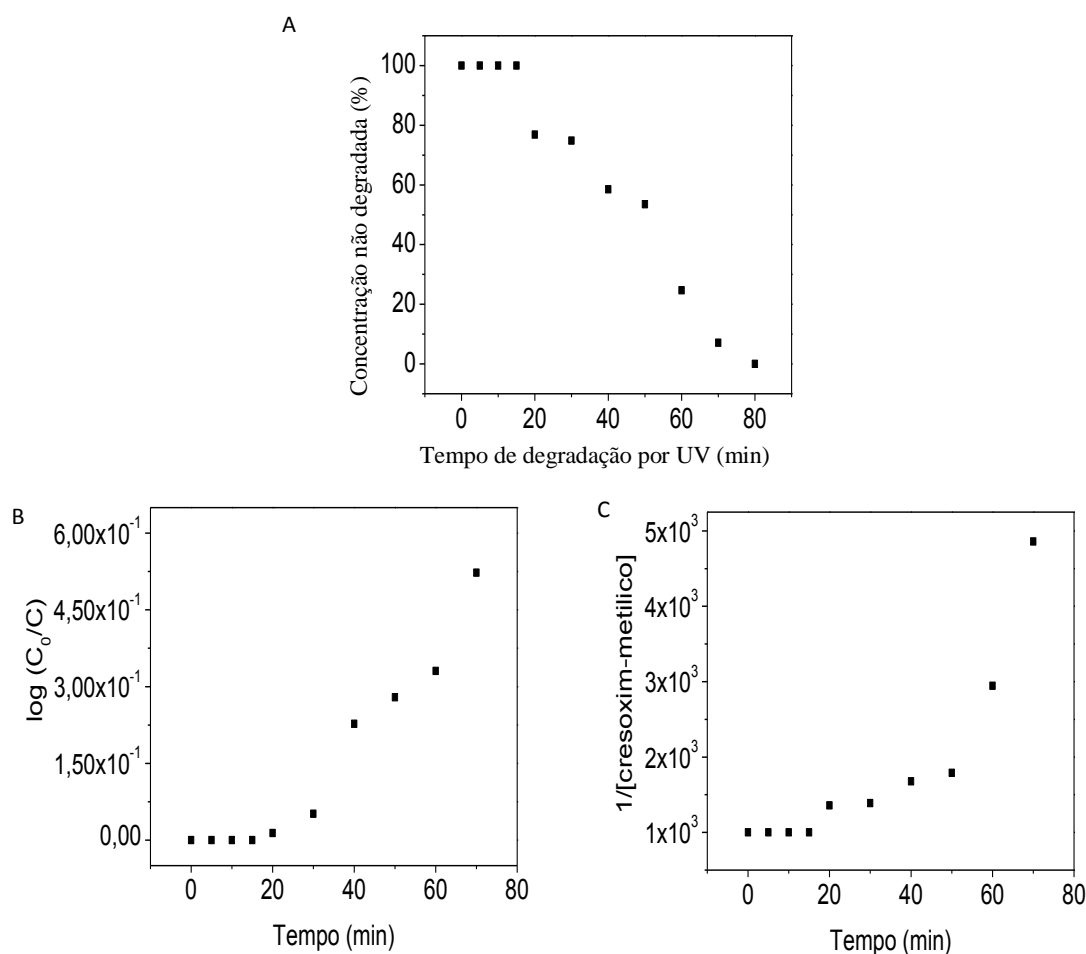


Figura 34 – (A) Degradação de cresoxim-metilico (%) em função do tempo de exposição à radiação UV. (B) Log da razão entre a concentração inicial ( $C_0$ ) e a concentração medida (C) de cresoxim-metilico em função do tempo. (C) Relação entre o inverso da concentração de cresoxim-metilico e o tempo. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 8.

Para picoxistrobina, a diferença entre a concentração original do analito e as concentrações recuperadas nas alíquotas, recolhidas a cada 5 ou 10 min de exposição à radiação UV, indicou a degradação do analito (Figura 35). Pode se observar uma degradação muito rápida de picoxistrobina com 5 min de exposição ao UV, se tornando completa após 30 min. O perfil indicou que a cinética de degradação se aproxima de um modelo de segunda ordem, com uma constante de velocidade ( $k$ ) de  $1,06 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de 0,9 min. O modelo de segunda ordem para a degradação ( $Y = (1,06 \times 10^3 \pm 120,90) X + (252,09 \pm 14,80)$ ,  $R^2 = 0,9503$ ) indica que em 20 min apenas 4,6 % da picoxistrobina

não degradada permanece na solução, o que se aproxima do valor experimental (4,3%), medida com o método.

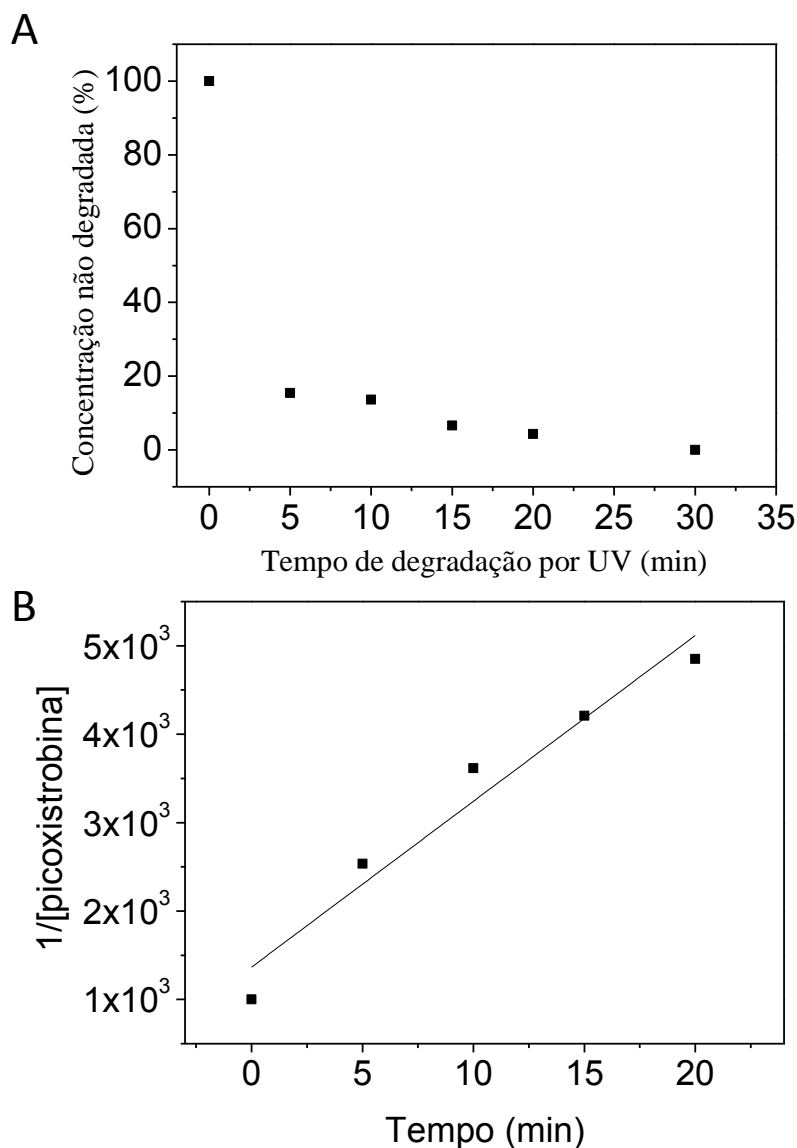


Figura 35 - (A) Degradação de picoxistrobina (%) em função do tempo de exposição à radiação UV. (B) Cinética de segunda ordem para degradação de picoxistrobina com  $k = 1,06 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e  $t_{1/2} = 0,9 \text{ min}$ . Parâmetros instrumentais: ver Tabela 9.

Para piraclostrobina, a diferença entre a concentração original do analito e as concentrações recuperadas nas alíquotas, recolhidas a cada 5 ou 10 min de exposição à radiação UV, indicou a degradação do analito. Na Figura 36, o perfil de degradação é apresentado. O perfil indicou uma cinética de degradação de segunda ordem, com uma constante de velocidade ( $k$ ) de  $1,02 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  e

o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) de 9,8 min. O modelo de segunda ordem de degradação ( $Y = (1,02 \times 10^2 \pm 3,98) X + (1132 \pm 195)$ ,  $R^2 = 0,9836$ ) indica que em 90 min apenas 9,6 % da piraclostrobina não degradada permanece na solução, que se aproxima do valor experimental (10,2%), medida com o método. De acordo com este modelo, a concentração de piraclostrobina diminuiria a  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (99,9 % de degradação) após aproximadamente  $10^4$  min.

Em comparação, Lagunas-Allué e colaboradores (2012a) estudaram a fotodegradação por UV de piraclostrobina ( $5,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , cerca de três ordens de grandeza menos concentrada do que o utilizado no presente trabalho) em uma suspensão aquosa de pó de  $\text{TiO}_2$  ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e usando um reator contendo uma lâmpada de mercúrio de 125 W. Sob tais condições, os autores encontraram uma cinética de primeira ordem para a degradação da piraclostrobina com  $k$  de  $1,45 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  e  $t_{1/2}$  de 47,8 minutos. A degradação de 99% de piraclostrobina foi atingida após 60 min. Essa comparação mostra que mesmo na presença de catalisador ( $\text{TiO}_2$ ) a degradação total ocorre em questão de poucas horas. Não é possível comparar o efeito das radiâncias dos dois experimentos, pois apesar de Lagunas-Allué utilizar uma fonte muito mais intensa, a mistura irradiada tinha material particulado que espalha grande parte da luz incidente.

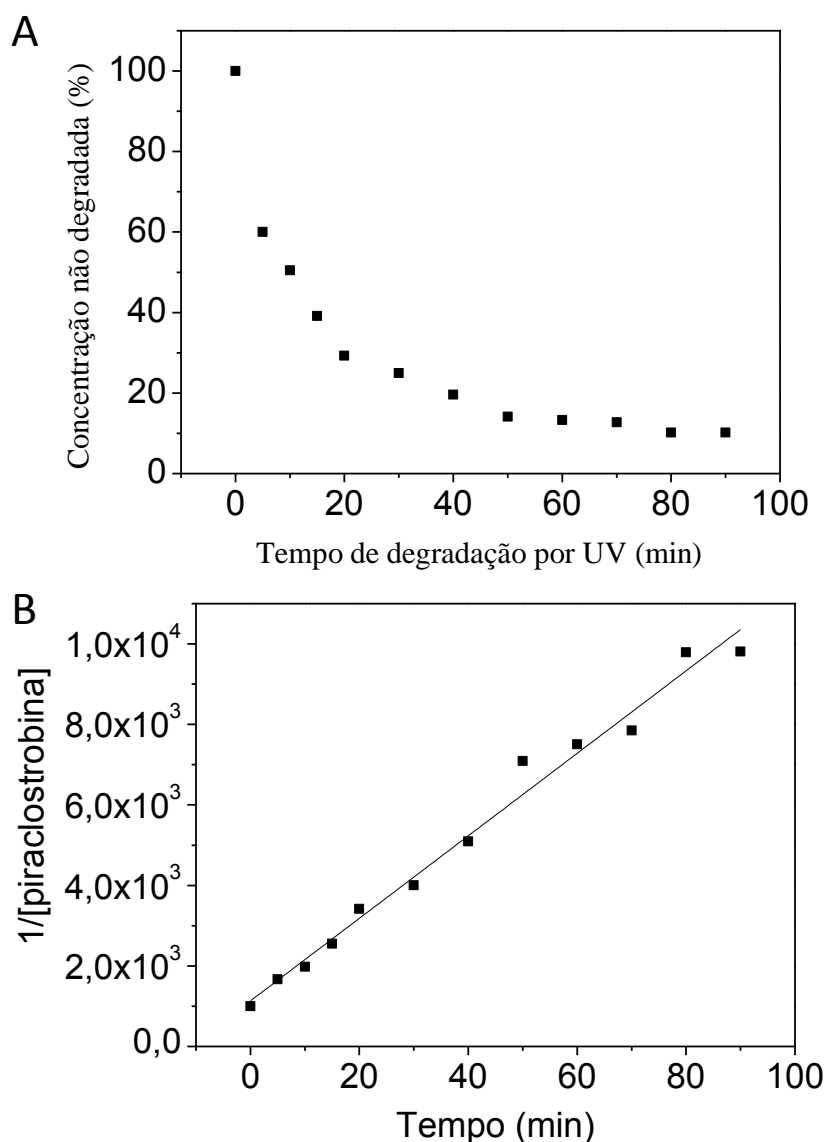


Figura 36 - (A) Degradação de piraclostrobina (%) em função do tempo de exposição à radiação UV. (B) Cinética de segunda ordem para degradação de piraclostrobina com  $k=1,02 \times 10^2$  e  $t_{1/2} = 9,8$  min. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 10.

A degradação térmica de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> preparadas em acetonitrila) foi avaliada nas temperaturas de 30 a 60 °C durante um tempo de 10 a 120 min. Alíquotas de 100 µL destas soluções foram colocadas na célula eletroquímica e analisadas utilizando os métodos propostos. As determinações foram realizadas em triplicata, utilizando adição de analito (abordagem múltipla). Os resultados obtidos mostram que não ocorreu degradação relevante destas estrobilurinas sob tais condições.

#### 4.7.

#### **Estudo na eficiência do processo de pré-concentração para cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina.**

A eficiência do processo de pré-concentração das estrobilurinas por extração em fase sólida (SPE), com cartucho contendo fase estacionária C18, foi avaliada. Amostras de suco de uva comercial foram fortificadas na concentração do limite máximo de resíduo (LMR) permitido pela legislação em uva para cresoxim-metílico e piraclostrobina com o procedimento de carregamento e eluição ajustado para se alcançar a pré-concentração de dez vezes de analito no eluato em relação à concentração na amostra. Para o cresoxim-metílico o procedimento foi ajustado também visando um fator de concentração de 20 vezes. Para a picoxistrobina o procedimento foi ajustado visando um fator de pré-concentração de 10 vezes em uma amostra de suco de uva fortificada em  $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , para avaliar a eficiência do procedimento, já que não existe um LMR para este analito em uva e derivados. Uma alíquota de 1,0 mL de cada eluato foi adicionada a célula eletroquímica e analisada utilizando os métodos propostos. As determinações foram realizadas em triplicata, utilizando adição de analito (abordagem múltipla). O fator de enriquecimento (FE) foi utilizado para avaliar a eficiência do procedimento de pré-concentração no fator de dez vezes por SPE, com cartucho contendo fase estacionária C18. O fator (Equação 8) foi calculado pela razão entre a concentração do analito pré-concentrado ( $C_c$ ) e a concentração do analito original ( $C_a$ ), sem passar pelo cartucho:

$$\text{FE} = C_c/C_a \quad (\text{Eq. 8})$$

Quanto maior os valores do fator, mais eficiente é o processo de pré-concentração (FERREIRA *et al.*, 2000). Dois níveis de concentração de 7,9 e 11,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram utilizados para avaliar a eficiência na pré-concentração de cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina. As determinações foram realizadas em triplicata, utilizando adição de analito (abordagem múltipla). Os resultados obtidos são representados na Tabela 17.

Tabela 17 – Recuperações de amostras de suco de uva (n = 3) pré-concentradas por SPE em cartucho C18 e fortificadas para picoxistrobina (1,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou com concentrações no limite máximo de resíduos (LMR) permitido pela legislação para cresoxim-metílico (1,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e piraclostrobina (5,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Cálculo do fator de enriquecimento (FE) pela razão entre a concentração do analito pré-concentrado ( $C_c$ ) dez vezes e a concentração do analito original ( $C_a$ ) sem passar pelo cartucho, em duas concentrações (7,9 e 11,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Estrobilurina	Amostra	Concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperado (%)	FE ( $C_c/C_a$ )
		Adicionado	Encontrado		
Cresoxim-metílico	Suco de uva <sup>a</sup>	1,6	1,6 $\pm$ 0,2	99,5 $\pm$ 2,4	-
	Suco de uva <sup>b</sup>	1,6	1,8 $\pm$ 0,1	111,2 $\pm$ 2,6	-
	$C_a$	7,9	7,9 $\pm$ 0,2	100,9 $\pm$ 1,0	-
		11,8	11,9 $\pm$ 0,3	101,3 $\pm$ 2,8	-
	$C_c$	7,9	79,7 $\pm$ 2,0	999,9 $\pm$ 11,2	10,0
		11,8	119,1 $\pm$ 2,1	1007,0 $\pm$ 7,0	10,0
Picoxistrobina	Suco de uva	1,9	1,9 $\pm$ 0,2	98,9 $\pm$ 1,9	-
	$C_a$	7,9	7,9 $\pm$ 0,2	99,7 $\pm$ 1,5	-
		11,8	11,9 $\pm$ 0,8	100,9 $\pm$ 2,3	-
	$C_c$	7,9	79,2 $\pm$ 1,4	1011,0 $\pm$ 0,6	10,0
		11,8	120,0 $\pm$ 5,0	1021,0 $\pm$ 31,0	10,1
Piraclostrobina	Suco de uva	5,1	4,9 $\pm$ 0,1	95,4 $\pm$ 2,2	-
	$C_a$	7,9	7,8 $\pm$ 0,1	99,3 $\pm$ 0,8	-
		11,8	12,1 $\pm$ 0,7	102,3 $\pm$ 5,0	-
	$C_c$	7,9	79,0 $\pm$ 1,2	998,0 $\pm$ 6,2	10,1
11,8		122,0 $\pm$ 5,2	1034,0 $\pm$ 45,0	10,1	

<sup>a</sup>Amostra pré-concentrada 10 vezes.

<sup>b</sup>Amostra pré-concentrada 20 vezes.

Para condições instrumentais ver: Tabelas 8, Tabela 9 e Tabela 10.



Os resultados obtidos para as amostras variaram de 95 a 99% para a pré-concentração de dez vezes e de 111% para a pré-concentração vinte vezes de cresoxim-metílico. Estes resultados indicam que a pré-concentração em cartucho C18 foi eficiente para atingir as concentrações no LMR para a determinação destes analitos com os métodos analíticos propostos. Os valores do FE encontrados variaram de 10,0 a 10,1 indicando que o procedimento por SPE com cartucho C18 foi eficiente para a pré-concentração de dez vezes destas estrobilurinas, não ocorrendo perdas do analito.

## **5. Desenvolvimento de métodos baseados no uso da abordagem BIA para determinar dimoxistrobina e picoxistrobina.**

### **5.1. Otimização dos parâmetros para determinação de dimoxistrobina e picoxistrobina na célula BIA.**

Os parâmetros críticos estudados que influenciam a resposta do sinal em um método analítico baseado no uso da abordagem BIA são: (i) pH da solução de eletrólito suporte; (ii) potencial aplicado; (iii) necessidade ou não de agitação do eletrólito suporte e, caso seja necessário a agitação, a velocidade; (iv) velocidade de injeção da amostra e (v) volume de amostra injetado.

#### **5.1.1. Estudo do pH e potencial aplicado.**

Nos estudos exploratórios para dimoxistrobina e picoxistrobina usando o eletrodo de trabalho de DDB foram observados dois picos de oxidação bem definidos para dimoxistrobina, nos potenciais +1350 e +1750 mV, e dois picos de oxidação para picoxistrobina, em +1450 e +1950 mV, utilizando SWV em solução tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0).

A partir destes resultados, um estudo sistemático foi realizado visando encontrar o melhor pH e potencial aplicado para promover a reação de oxidação dessas duas estrobilurinas. Assim, soluções-tampão BR 0,04 mol L<sup>-1</sup> foram testadas na faixa de pH entre 2,0 e 12,0. Para verificar as intensidades relativas dos sinais medidos em cada uma dessas condições, o teste hidrodinâmico foi feito numa faixa de potencial entre +1100 a +2000 mV, usando a amperometria de múltiplos pulsos. Na Figura 37, se tem as correntes de pico medidas para dimoxistrobina (20,0 μmol L<sup>-1</sup>) e para picoxistrobina (60,0 μmol L<sup>-1</sup>) obtidos nesses voltamogramas hidrodinâmicos (sinais obtidos em triplicata de injeção num sistema BIA-amperometria).

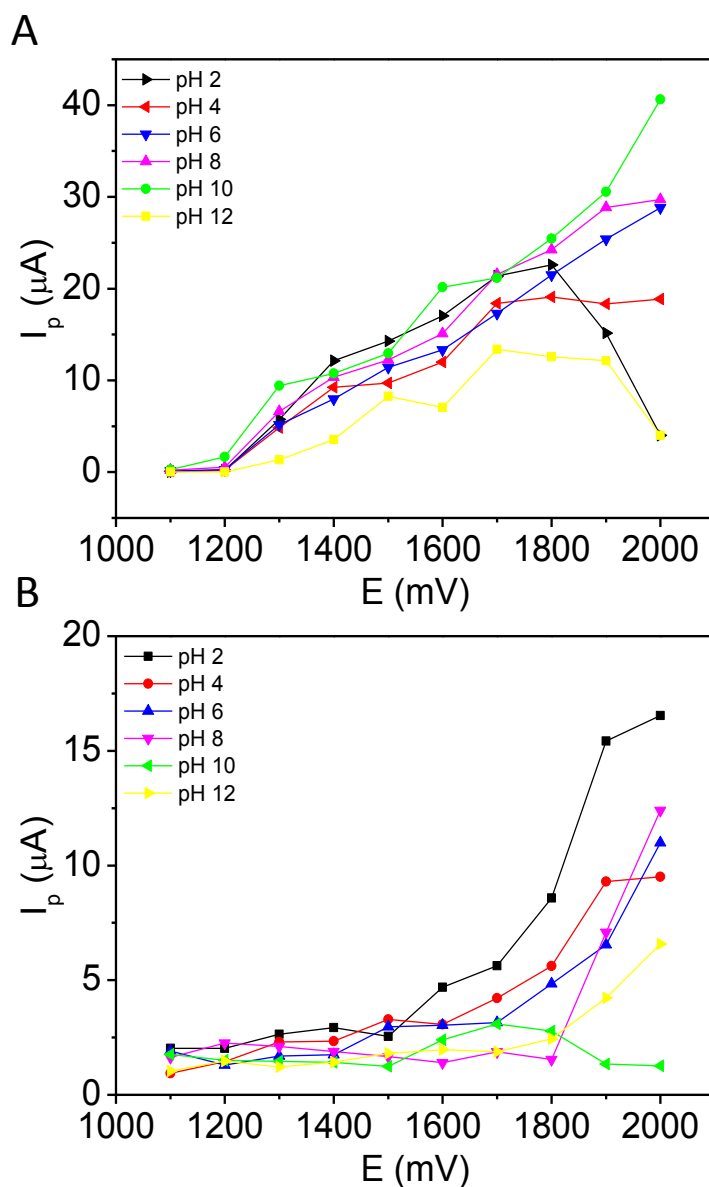


Figura 37 - Voltamogramas hidrodinâmicos de (A) dimoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) picoxistrobina ( $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em soluções de tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  com o pH ajustado para diferentes valores de 2,0 a 12,0; obtidos através da corrente de pico em função dos pulsos de potenciais aplicados (+1100 a +2000 mV). Velocidade de injeção:  $11,6 \text{ mL min}^{-1}$  para dimoxistrobina e  $9,6 \text{ mL min}^{-1}$  para picoxistrobina; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ .

Diferentes perfis de resposta podem ser observados nos voltamogramas hidrodinâmicos de dimoxistrobina (Figura 37A) em função do pH. O início da oxidação do analito ocorreu a partir de +1200 mV em soluções com pH ajustado em toda a faixa testada. O sinal de corrente mais baixo foi verificado na solução tamponada de pH 12,0. Por outro lado, os sinais de corrente mais elevados foram

obtidos nas soluções tamponadas de pH 6,0; 8,0 e 10,0, em potenciais superiores a +1900 mV. A corrente de pico máxima para a oxidação de dimoxistrobina foi observada na solução tamponada em pH 10,0, sendo esta condição selecionada para as posteriores medições amperométricas. O potencial escolhido para as medições foi +1900 mV mesmo sendo as correntes mais intensas observadas em +2000 mV. Este potencial não foi utilizado porque um sinal decorrente da oxidação de acetonitrila (solvente utilizado no preparo das soluções das estrobilurinas e injetado na célula na ordem de  $\mu\text{L}$ ) foi observado, impondo um significativo sinal de fundo. Para comprovar que a oxidação da acetonitrila era a responsável pelo sinal de fundo no potencial de +2000 mV, monitorou-se o sinal produzido no sistema após a injeção da solução de branco, que continha somente água e acetonitrila em uma proporção equivalente à da usada na injeção da solução de analito (20% em volume). Nessa circunstância, o sinal foi observado, ao contrário do que ocorreu quando se injetou apenas água na célula BIA.

Na Figura 37B podem ser observados os diferentes perfis nos voltamogramas hidrodinâmicos de picoxistrobina obtidos nas diferentes condições de pH. A oxidação de picoxistrobina foi observada em todas as condições testadas a partir do pulso de potencial de +1100 mV. As menores correntes foram obtidas nas soluções tamponadas com pH na faixa básica (8,0 a 12,0), sendo que no pH 8,0 ocorre um aumento de corrente significativo a partir do pulso de potencial +1900 mV. O pH 2,0 foi o que produziu as maiores intensidades de corrente de pico a partir do pulso de potencial igual a +1600 mV. Este pH então foi escolhido para as medições de BIA-amperometria de picoxistrobina. Pelo mesmo motivo citado na descrição nos estudos da dimoxistrobina, o potencial escolhido para a determinação de picoxistrobina também foi o +1900 mV em detrimento do potencial em +2000 mV.

Estudos eletroquímicos foram realizados com varredura em uma faixa de potencial entre -1000 a -2000 mV, porém, não foram observados picos de redução para a dimoxistrobina nem para a picoxistrobina.

### 5.1.2.

#### Estudo da agitação na solução do eletrólito suporte.

A necessidade de se realizar a agitação da solução de eletrólito suporte ao longo do processo de injeção e determinação das estrobilurinas no sistema BIA foi avaliada. Para tal, o sistema foi ajustado para que a detecção amperométrica fosse realizada com a aplicação de potencial constante de +1900 mV. No primeiro conjunto de experimentos foram feitas medições sequenciais ( $n=10$ ) de solução padrão de dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de volume injetado) e picoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de volume injetado) sem utilizar agitação da solução. Para dimoxistrobina, uma diminuição constante na corrente de pico para o processo de oxidação foi verificada depois de sucessivas injeções. Este resultado indicou a adsorção de dimoxistrobina (ou dos seus produtos de oxidação) na superfície do eletrodo de DDB, diminuindo assim a superfície de contato para a oxidação de analito nas adições subsequentes. Este fato está de acordo com as experiências com voltametria cíclica e que revelaram um processo de oxidação controlada por adsorção (segundo pico de oxidação). Por conseguinte, as medições analíticas foram efetuadas sob a agitação constante da solução dentro da célula BIA, de tal maneira que a zona da solução de amostra injetada fosse imediatamente removida por convecção da interface da solução com o eletrodo. Velocidades diferentes de agitação (até 560 rpm) foram testadas para a solução na célula BIA. Um aumento na intensidade da corrente de pico para dimoxistrobina pode ser observado (Figura 38) quando a agitação inicial de 116 rpm foi aplicada. A magnitude de sinal permaneceu constante em velocidades de agitação de 250 a 350 rpm. Em velocidades maiores, ocorreu uma queda de sinal, provavelmente devido à remoção de uma fração de analito antes deste sofrer o processo de oxidação na superfície do eletrodo. A velocidade de agitação escolhida foi a de 280 rpm para as determinações de dimoxistrobina por BIA-amperometria por estar na faixa robusta da resposta analítica. Vale ressaltar também, que os sinais transientes de dimoxistrobina foram mais estreitos (picos com maior resolução) com a utilização da agitação.

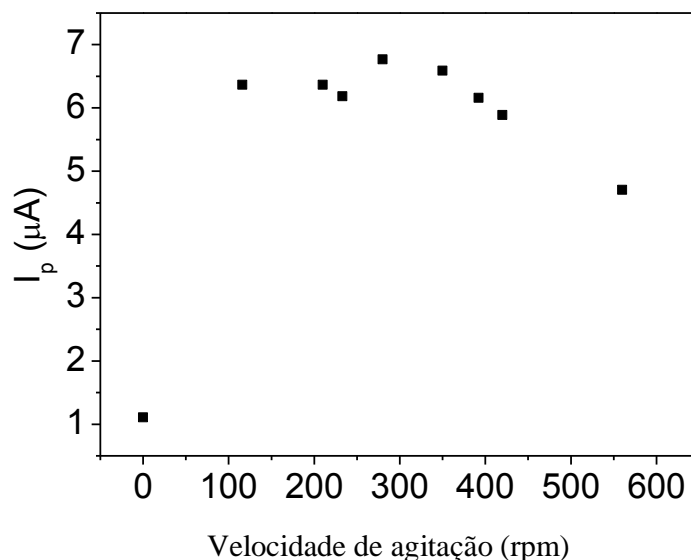


Figura 38 – Velocidade de agitação da solução na célula BIA em função da corrente de pico para dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Velocidade de injeção:  $11,6 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ ; eletrólito suporte: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}=10$  e 0 a 560 rpm de agitação.

Nas medições sequenciais de picoxistrobina, não ocorreu diminuição no sinal de oxidação após as injeções, indicando que não ocorre adsorção de picoxistrobina, ou de seus produtos de oxidação, na superfície do eletrodo. Este comportamento também está de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de voltametria cíclica, que indicam que os dois processos de oxidação são controlados por difusão. A agitação da solução foi testada para verificar se isso influenciaria alguma variação de magnitude do sinal medido, porém nenhuma mudança significativa foi observada. Sendo assim, as medições analíticas de picoxistrobina foram realizadas sem agitação da solução na célula BIA.

### 5.1.3. Estudo da velocidade e volume de injeção.

A velocidade e o volume de injeção da solução de amostra também foram estudados de modo a se otimizar o procedimento de determinação usando BIA. Os estudos para a dimoxistrobina foram realizados utilizando uma micropipeta eletrônica da Eppendorf, com velocidade de injeção variável e ajustada em valores

entre 1,7 a 20,7 mL min<sup>-1</sup>. Já para picoxistrobina, a micropipeta utilizada foi a da marca Handy Step, com velocidade de injeção variável e ajustada em valores entre 5,7 a 13,3 mL min<sup>-1</sup>. Na Figura 39 são apresentados os resultados obtidos com a variação da velocidade de injeção em função da intensidade de corrente de pico para as duas estrobilurinas, com medições feitas em triplicata para cada uma das velocidades testadas.

A corrente de pico aumentou à medida que a velocidade de injeção de ambas as estrobilurinas foi aumentada, resultando na escolha dos valores máximos de 20,7 mL min<sup>-1</sup> para dimoxistrobina e 13,3 mL min<sup>-1</sup> para picoxistrobina. Este resultado era esperado de acordo com os estudos realizados em célula wall-jet por Brett e colaboradores (1995).

Já os resultados do estudo da variação do volume de injeção para dimoxistrobina (20 a 200 µL) e de picoxistrobina (10 a 100 µL) em função da corrente de pico podem ser observados na Figura 40.

Verificou-se que a corrente de pico aumentou significativamente com o aumento do volume de injeção (entre 20 e 70 µL) para dimoxistrobina. Tal sinal analítico continuou a aumentar, mas com menor taxa de incremento, quando o volume de injeção foi ajustado na faixa acima de 70 µL (até 150 µL) como indicado na Figura 40A. O volume de injeção de 100 µL foi selecionado para as determinações de dimoxistrobina no sistema BIA-amperometria, porque os volumes superiores a este, não apresentam mudança significativa na corrente. Para picoxistrobina (Figura 40B), o aumento do volume de injeção entre 10 e 40 µL provocou um aumento na corrente de pico. A partir de 40 µL, o sinal permaneceu estável até o volume de injeção de 100 µL. O volume de injeção de 50 µL foi selecionado para a determinação de picoxistrobina por BIA-amperometria.

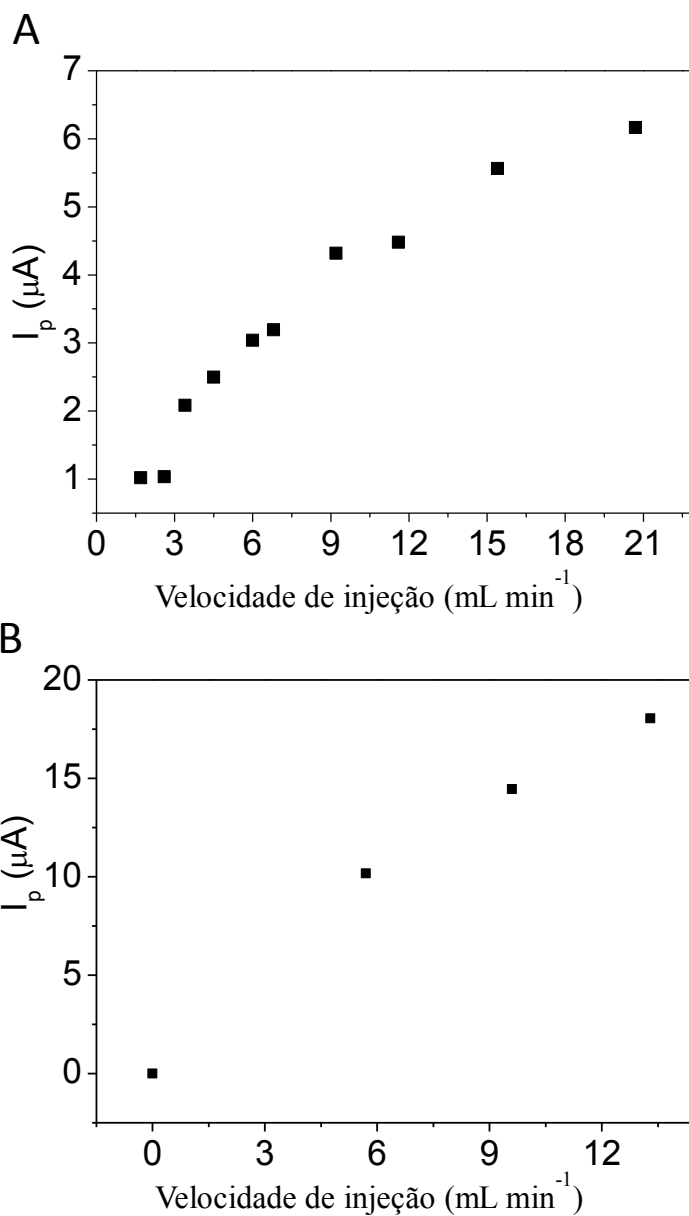


Figura 39 - Efeito da variação na velocidade de injeção sobre a corrente de pico para as estrobilurinas: (A) dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) picoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 10,0 para dimoxistrobina e pH 2,0 para picoxistrobina; potencial de trabalho +1900 mV; volume de injeção de  $100 \mu\text{L}$  e 280 rpm de agitação para dimoxistrobina.



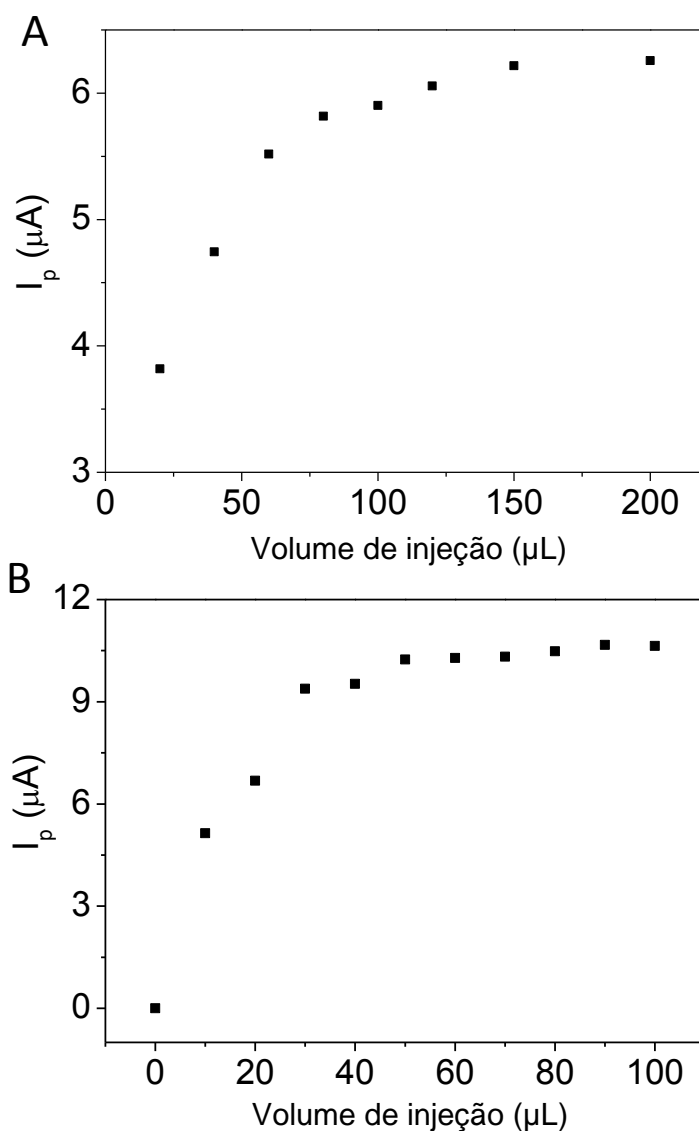


Figura 40 - Efeito do volume de injeção sobre a corrente de pico: (A) dimoxistrobina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (B) picoxistrobina ( $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Eletrólito suporte: tampão BR  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$  pH 10,0 para dimoxistrobina e pH 2,0 para picoxistrobina; potencial de trabalho +1900 mV; velocidade de injeção de  $20,7 \text{ mL min}^{-1}$  para dimoxistrobina e de  $13,3 \text{ mL min}^{-1}$  para picoxistrobina e 280 rpm de agitação para dimoxistrobina.

Os parâmetros experimentais escolhidos para o sistema BIA-amperometria estão descritos na Tabela 18 para a determinação de dimoxistrobina e na Tabela 19 para picoxistrobina.

Tabela 18 - Condições experimentais escolhidas para o método BIA-amperométrico de determinação para dimoxistrobina.

Parâmetro	Valor
Eletrólito suporte	Tampão BR 0,04 mol L <sup>-1</sup> pH 10,0
Potencial de trabalho	+1900 mV
Velocidade de injeção	20,7 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	100 µL
Agitação	280 rpm

Tabela 19 - Condições experimentais escolhidas para o método BIA-amperométrico de determinação para picoxistrobina.

Parâmetro	Valor
Eletrólito suporte	Tampão BR 0,04 mol L <sup>-1</sup> pH 2,0
Potencial de trabalho	+1900 mV
Velocidade de injeção	13,3 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	50 µL

No biograma da Figura 41A são apresentadas cinco injeções sequenciais de uma solução padrão de 5,0 µmol L<sup>-1</sup> dimoxistrobina seguido por injeções de uma solução padrão de 10,0 µmol L<sup>-1</sup> nas condições experimentais escolhidas. O resultado confirmou que não houve efeito de memória decorrente de injeções prévias de dimoxistrobina. As medições sequenciais resultaram num desvio padrão relativo de 2,9 e 3,9 % para as dez injeções das soluções padrão de dimoxistrobina nos níveis de concentração de 5,0 e 10,0 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para picoxistrobina, as medições sequenciais nas condições experimentais escolhidas para o sistema BIA-amperometria sem agitação, produziu um desvio padrão relativo de 4,9 e 4,4 %, para dez injeções de soluções padrão de picoxistrobina (Figura 41B), com os níveis de concentração de 10,0 e 20,0 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

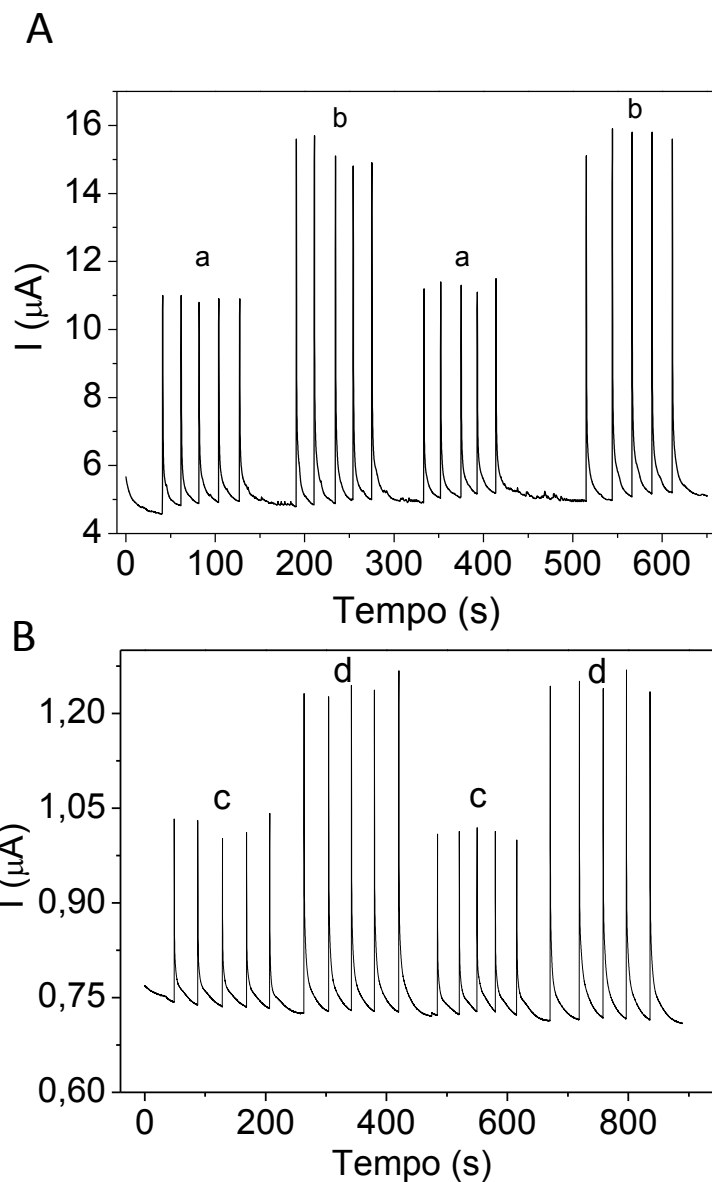


Figura 41 – Biograma mostrando injeções sequenciais de uma solução de: (A) dimoxistrobina nos níveis de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (a) e  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (b); (B) picoxistrobina nos níveis de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (c) e  $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (d). Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18 para dimoxistrobina e Tabela 19 para picoxistrobina.

## 5.2. Desempenho analítico.

As respostas amperométricas, obtidas nas condições otimizadas, para injeções em triplicata de concentrações crescentes (a-f) e decrescentes (f'-a') de dimoxistrobina e as respectivas curvas analíticas são apresentadas na Figura 42. Um comportamento linear foi observado com injeções das soluções de dimoxistrobina

na faixa de concentração de 1,0 a 60,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  tanto para concentrações crescentes como decrescentes, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,999 e sensibilidade de  $8,21 \times 10^{-1} \pm 1,19 \times 10^{-2} \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  para curva analítica crescente e  $8,44 \times 10^{-1} \pm 1,69 \times 10^{-2} \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  para curva analítica decrescente. A faixa dinâmica linear pode ser estendida até 250,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de dimoxistrobina (Figura 43), mantendo-se ainda o comportamento linear ( $R^2 = 0,998$ ). No entanto, nessas condições, a sensibilidade da curva é ligeiramente reduzida ( $7,37 \times 10^{-1} \pm 7,68 \times 10^{-3} \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ ), o que pode ser consequência de processos adsorptivos na superfície do eletrodo quando maiores concentrações de analito estão presentes na interface eletrodo/solução. Com base no registro amperométrico da Figura 42, a frequência de análise pode ser estimada em 180 injeções  $\text{h}^{-1}$ . Os LOD e LOQ foram de 0,38  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0,12  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 1,27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0,41  $\text{mg L}^{-1}$ ), respectivamente (LOD =  $3s_B/S$  e LOQ =  $10 s_B/S$ , onde  $s_B$  é o desvio padrão de 10 medições consecutivas de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e S é a inclinação da curva analítica crescente).

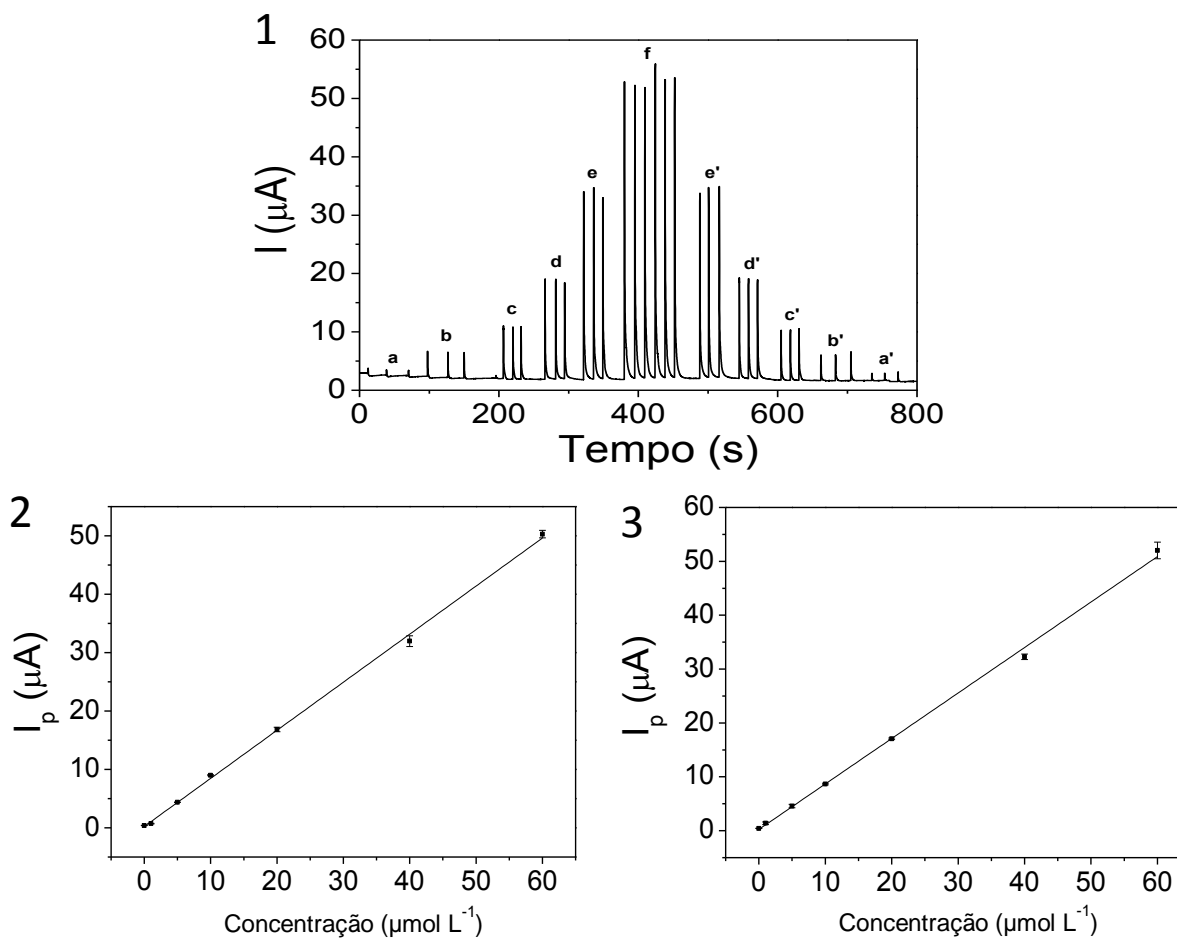


Figura 42 - (1) Respostas no sistema BIA-amperometria com eletrodo de DDB para injeções em triplicata de (a) 1,0; (b) 5,0; (c) 10,0; (d) 20,0; (e) 40,0 e (f) 60,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  soluções padrão de dimoxistrobina. (2) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (8,21 \times 10^{-1} \pm 1,19 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1}) X + 3,11 \times 10^{-7} \pm 3,41 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99987$  para concentrações crescentes de dimoxistrobina. (3) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (8,44 \times 10^{-1} \pm 1,69 \times 10^{-2} \text{ L mol}^{-1}) X + 2,34 \times 10^{-7} \pm 4,82 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99976$  para concentrações decrescentes de dimoxistrobina. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18.

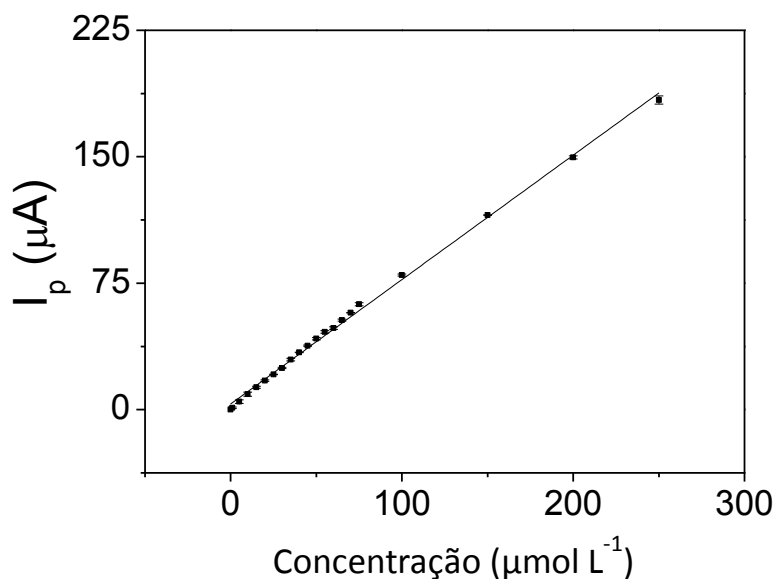


Figura 43 - Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (7,37 \times 10^{-1} \pm 7,68 \times 10^{-3} \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1}) X + 3,37 \times 10^{-6} \pm 6,83 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,998$  para concentrações crescentes de dimoxistrobina (1,0 a 500,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18.

Para picoxistrobina, as respostas amperométricas obtidas sob as condições otimizadas para injeções em triplicata de concentrações crescentes (a-f 10,0 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e decrescentes (f'-a' 100,0 a 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e suas respectivas curvas analíticas são apresentadas na Figura 44. Um comportamento linear para a resposta analítica foi observado nesta faixa de concentrações de 10,0 a 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na direção crescente ( $R^2 = 0,999$ ), com o modelo de equação  $Y = (2,65 \times 10^{-1} \pm 2,63 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1}) X + 1,80 \times 10^{-7} \pm 1,48 \times 10^{-7}$ , e também na direção descendente ( $R^2 = 0,999$ ), com equação igual a  $Y = (2,61 \times 10^{-1} \pm 3,44 \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1}) X + 1,10 \times 10^{-7} \pm 1,93 \times 10^{-7}$ . Nenhum efeito de memória foi observado durante a adição de diferentes concentrações, o que indica que a agitação da solução não é mesmo necessária. Com base no registro amperométrico da Figura 44, a frequência de análise pode ser estimada em 108 injeções  $\text{h}^{-1}$ . Os LOD e LOQ foram 1,59  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (0,58  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 5,30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (1,95  $\text{mg L}^{-1}$ ), respectivamente ( $\text{LOD} = 3s_B/S$  e  $\text{LOQ} = 10 s_B/S$ , onde  $s_B$  é o desvio padrão de 10 medições consecutivas de 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $S$  é a inclinação da curva de calibração curva com concentrações crescente).

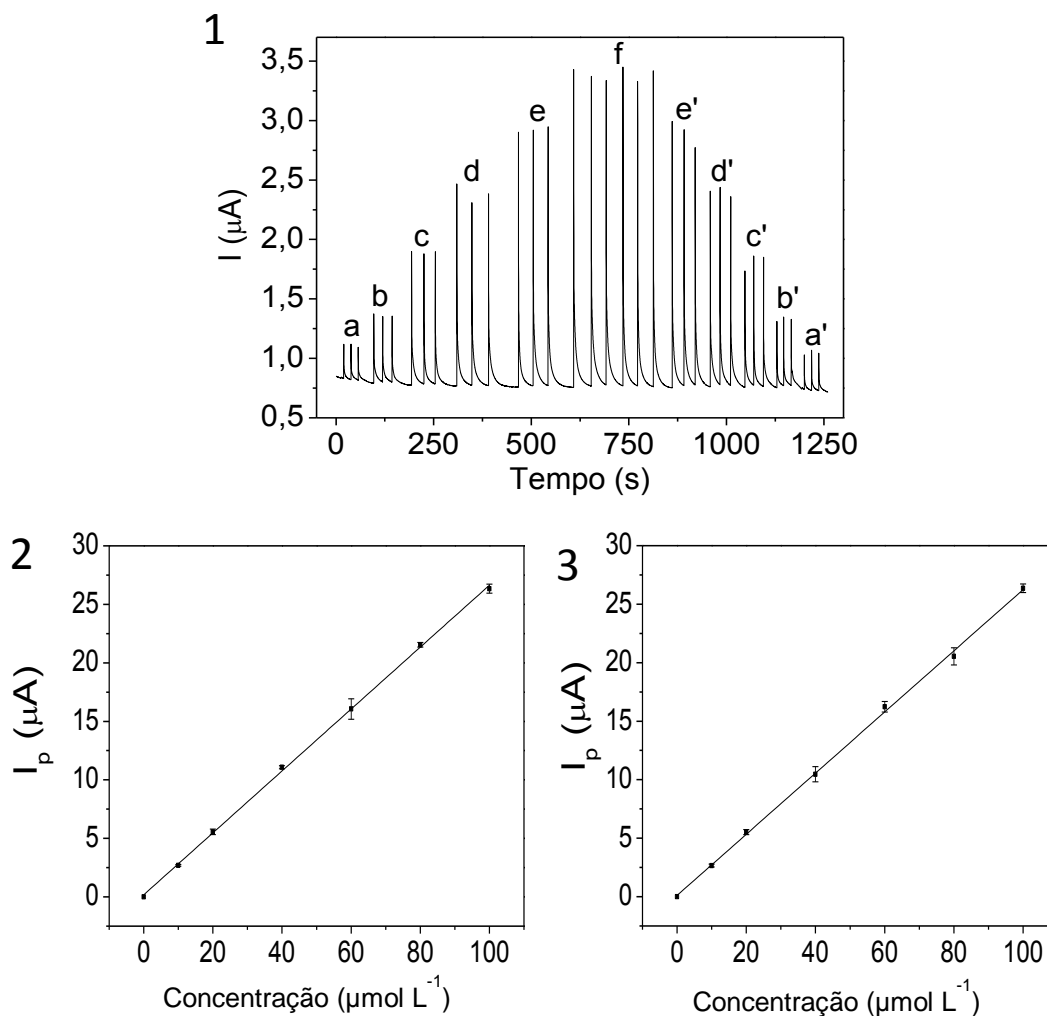


Figura 44 – (1) Respostas no sistema BIA-amperometria com eletrodo de DDB para injeções em triplicata de (a) 10,0; (b) 20,0; (c) 40,0; (d) 60,0; (e) 80,0 e (f) 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  soluções padrão de picoxistrobina. (2) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (2,65 \times 10^{-1} \pm 2,63 \times 10^{-3} \mu\text{A L mol}^{-1}) X + 1,80 \times 10^{-7} \pm 1,48 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99941$  para concentrações crescentes de picoxistrobina. (3) Curva analítica com modelo de equação de  $Y = (2,61 \times 10^{-1} \pm 3,44 \times 10^{-3} \mu\text{A L mol}^{-1}) X + 1,10 \times 10^{-7} \pm 1,93 \times 10^{-7}$  e  $R^2 = 0,99986$  para concentrações decrescentes de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 19.

### 5.3.

#### Aplicação dos métodos de BIA-amperometria.

Os métodos propostos utilizando a abordagem BIA-amperometria para a determinação de dimoxistrobina e picoxistrobina foram aplicados na análise de amostras de água naturais com a quantificação dessas estrobilurinas feita através de interpolação na curva analítica. Na Tabela 20, os resultados para a análise de

dimoxistrobina (em dois dias diferentes) são listados, indicando as concentrações recuperadas do analito em três amostras diferentes (água mineral, torneira e rio Uberabinha), fortificadas em dois níveis de concentração. Os valores de recuperação ficaram entre uma faixa de 80 % e 105 %, o que pode ser considerado como aceitável para as concentrações de dimoxistrobina de 5,0 e 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Estes resultados sugerem que o método de BIA-amperometria proposto para determinar a dimoxistrobina também não sofreu a interferência de outros componentes potencialmente presentes nas matrizes das diferentes amostras de água. Uma tendência de recuperações menores para a concentração de 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi observada. Na rotina de análise do laboratório, as amostras de maior concentração foram determinadas após a curva analítica e todas as amostras de menor concentração (5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Assim, a provável causa na queda no valor de recuperação, se deve a adsorção do analito e da matriz das amostras na superfície do eletrodo, diminuindo a sua sensibilidade. O procedimento de limpeza eletroquímico para o eletrodo de DDB pode ser realizado após algumas medições para solucionar este problema.



Tabela 20 - Concentração dimoxistrobina em amostras naturais de água analisadas pelo método BIA proposto e os testes de recuperação (n=3).

Amostra	Dimoxistrobina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Dia	Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado		
Água de torneira	0,0	< LOD	1	-
			2	-
	5,0	$5,0 \pm 0,4$ $5,0 \pm 0,5$	1	$100,7 \pm 9,0$
			2	$100,4 \pm 9,3$
	20,0	$18,2 \pm 1,1$ $16,9 \pm 1,5$	1	$91,1 \pm 5,5$
			2	$84,4 \pm 7,7$
Água mineral	0,0	< LOD	1	-
			2	-
	5,0	$5,2 \pm 0,4$ $5,1 \pm 0,5$	1	$104,9 \pm 7,1$
			2	$102,5 \pm 9,6$
	20,0	$18,2 \pm 1,6$ $16,6 \pm 0,7$	1	$90,9 \pm 8,1$
			2	$83,2 \pm 3,3$
Água do rio Uberabinha	0,0	< LOD	1	-
			2	-
	5,0	$5,0 \pm 0,5$ $5,0 \pm 0,4$	1	$100,3 \pm 8,7$
			2	$99,4 \pm 7,5$
	20,0	$17,9 \pm 1,2$ $16,0 \pm 0,7$	1	$89,3 \pm 6,1$
			2	$80,2 \pm 3,4$

Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18.

Na Tabela 21, os resultados para a análise de picoxistrobina (em três dias diferentes) são listados, indicando as concentrações recuperadas do analito em duas amostras diferentes (água mineral, lagoa Rodrigo de Freitas), fortificadas em dois níveis de concentração ( $30,0$  e  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os valores de recuperação estão entre uma faixa de 93 % e 105 %, o que é bastante aceitável. Estes resultados sugerem que o método de BIA-amperometria proposto para determinar a picoxistrobina também não sofreu a interferência de outros componentes potencialmente presentes nas matrizes das diferentes amostras de água.

Tabela 21 – Concentração de picoxistrobina em amostras naturais de água analisadas pelo método BIA proposto e os testes de recuperação (n=3).

Amostra	Picoxistrobina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	Dia	
Água mineral	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	30,0	$27,9 \pm 1,2$	1	$93,1 \pm 4,1$
			2	$95,6 \pm 8,4$
			3	$98,6 \pm 10,4$
	50,0	$49,5 \pm 0,7$	1	$99,1 \pm 1,5$
			2	$100,3 \pm 6,2$
			3	$100,4 \pm 7,7$
Água da lagoa Rodrigo de Freitas	0,0	< LOD	1	-
			2	-
			3	-
	30,0	$30,7 \pm 2,3$	1	$102,2 \pm 7,5$
			2	$102,0 \pm 6,6$
			3	$105,6 \pm 7,4$
	50,0	$50,1 \pm 3,8$	1	$100,3 \pm 7,5$
			2	$100,8 \pm 3,4$
			3	$101,9 \pm 2,3$

Parâmetros instrumentais: ver Tabela 19.

Existe a possibilidade de outras espécies eletroativas estarem presentes em águas naturais, como por exemplo, resíduos da indústria farmacêutica, tais como o ácido acetilsalicílico, paracetamol, dipirona, e diclofenaco (MELO *et al.*, 2009), ou até mesmo outras estrobilurinas. Nesse caso, como o DDB opera com um potencial de oxidação elevado, a interferência na determinação de dimoxistrobina ou de picoxistrobina pela abordagem de BIA-amperometria poderá ocorrer.

A fim de pelo menos detectar a presença dessas possíveis moléculas eletroativas interferentes nas amostras de água, uma estratégia simples pode ser adotada com base no comportamento eletroquímico peculiar de dimoxistrobina ou de picoxistrobina utilizando a amperometria de múltiplos pulsos. Nos estudos preliminares de avaliação do comportamento redox das estrobilurinas no eletrodo de DDB, dois processos eletroquímicos independentes foram observados tanto para dimoxistrobina, como para picoxistrobina. Assim, pode-se calcular um fator amperométrico, selecionando dois pulsos de potencial por meio da técnica de amperometria de múltiplos pulsos, de tal maneira que dois eventos eletroquímicos

diferentes relacionados com a dimoxistrobina ou com picoxistrobina são controlados de uma maneira sequencial. O cálculo na relação das correntes ( $I_{E2}/I_{E1}$ ), onde  $I_{E2}$  é a corrente de pico mais intensa gerada pelo pulso de potencial referente ao segundo pico de oxidação e  $I_{E1}$  é a corrente de pico menos intensa gerada pelo pulso de potencial referente ao primeiro pico de oxidação, resulta no valor do fator (sempre maior do que a unidade). Esse fator permanece constante se apenas dimoxistrobina ou picoxistrobina está presente na amostra como espécie eletroativa para o método. A presença de outras espécies eletroativas na mesma amostra deve alterar o valor do fator, mas não necessariamente mantendo-o constante, devido principalmente a dois fatores: (i) adsorção da molécula interferente ou do produto de oxidação na superfície do eletrodo diminuindo a corrente final medida; (ii) a oxidação destas espécies produzindo correntes que se somam a do analito aumentando o valor final medido (LIMA *et al.*, 2013).

Seguindo esta ideia, os valores do fator ( $I_{E2}/I_{E1}$ ) foram calculados a partir de dados coletados pela amperometria de múltiplos pulsos em +1600 mV ( $E_1$ ) e +1900 mV ( $E_2$ ) para dimoxistrobina na ausência e na presença de potenciais interferentes. Como pode ser visto na Tabela 22, o valor obtido para o fator de dimoxistrobina na ausência de espécies interferentes químicos ( $1,62 \pm 0,10$ ) é alterado quando outras espécies químicas eletroativas estão presentes na amostra. Portanto, a simples avaliação deste fator permite a detecção da presença de espécies eletroativas interferentes na amostra. Quando resíduos de um desses fármacos são encontrados numa amostra de água, a determinação por BIA-amperometria não pode ser realizada, porém a voltametria de onda quadrada, poderia ser utilizada para determinar dimoxistrobina, porque o potencial de oxidação dessas espécies químicas testadas é menos positivo do que o primeiro potencial de oxidação da dimoxistrobina.

Tabela 22 - Valores do fator ( $I_{E2}/I_{E1}$ ) calculado para dimoxistrobina na ausência e na presença de diferentes substâncias concomitantes em solução ( $n = 5$ ), sob condição experimental escolhidas<sup>a</sup>.

	$I_{E1}$ ( $\mu\text{A}$ ) <sup>b</sup>	$I_{E2}$ ( $\mu\text{A}$ ) <sup>b</sup>	$I_{E2}/I_{E1}$
Dimoxistrobina	$9,78 \pm 0,37$	$15,83 \pm 0,74$	$1,62 \pm 0,10$
Dimoxistrobina + Ácido acetilsalicílico	$6,35 \pm 0,44$	$11,51 \pm 0,73$	$1,81 \pm 0,17$
Dimoxistrobina + Diclofenaco	$15,86 \pm 1,31$	$31,93 \pm 4,56$	$2,01 \pm 0,33$
Dimoxistrobina + Dipirona	$15,78 \pm 1,30$	$30,87 \pm 4,62$	$2,02 \pm 0,34$
Dimoxistrobina + Paracetamol	$4,00 \pm 0,28$	$4,88 \pm 0,51$	$1,22 \pm 0,15$

<sup>a</sup>Parâmetros instrumentais: ver Tabela 18.

<sup>b</sup>Os desvios padrão indicados são propagados com base em:  $s(i_{E2}/i_{E1}) = i_{E2}/i_{E1} \times [(s(i_{E1}/i_{E1}))^2 + (s(i_{E2}/i_{E2}))^2]^{1/2}$ , onde  $s(i_{E1})$  e  $s(i_{E2})$  foram obtidos a partir de medições em triplicata.

Para picoxistrobina, os valores do fator ( $I_{E2}/I_{E1}$ ) também foram calculados a partir de dados coletados pela amperometria múltiplos pulsos em +1600 mV ( $E_1$ ) e +1900 mV ( $E_2$ ) na ausência e presença de potenciais estrobilurinas interferentes (cresoxim-metílico, piraclostrobrina e trifloxistrobrina). O valor obtido para o fator de picoxistrobina na ausência de espécies químicas interferentes ( $2,96 \pm 0,18$ ) também é alterado na presença de piraclostrobrina ( $1,81 \pm 0,17$ ), trifloxistrobrina ( $6,89 \pm 0,50$ ) e cresoxim-metílico ( $1,95 \pm 0,18$ ). Quando uma dessas estrobilurinas são encontradas numa amostra de água, a determinação por BIA-amperometria não pode ser realizada, porém a voltametria de onda quadrada, como visto anteriormente, poderia ser utilizada para determinar picoxistrobrina.

O desempenho do método proposto para a análise de amostras de água fortificadas com dimoxistrobina ( $66,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  na amostra ou  $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  na célula BIA) foi comparado com o obtido por meio de um método usando HPLC com detecção absorciométrica. Seis réplicas autênticas de água mineral foram analisadas e os resultados médios obtidos pelo método BIA-amperométrico proposto e o de comparação foram comparados pelo teste *t de Student* em um intervalo de confiança de 95%. O valor de *t* experimental (0,55) para dimoxistrobrina

foi menor do que o valor de  $t$  tabelado (2,23) para 10 graus de liberdade. Portanto, os resultados indicaram que não houve diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois métodos diferentes.

## 6. Voltametria de pulso diferencial para determinar picoxistrobina mostrando a viabilidade do uso do eletrodo de filme de bismuto em potenciais acima do de oxidação do Bi.

### 6.1. Testes preliminares.

Alguns testes foram realizados com o intuito de verificar se seria viável produzir sinal analítico da picoxistrobina com o eletrodo de carbono vítreo, o substrato utilizado para a formação do filme de bismuto. Os testes preliminares foram realizados usando voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), abrangendo uma faixa de potencial que variou de -1000 a +1000 mV, tanto na direção de varredura anódica como na da catódica. Soluções de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e de tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>), em uma faixa de pH entre 2,0 a 4,0, foram os eletrólitos suporte testados. Em tais condições, nenhum pico de oxidação ou de redução característico de picoxistrobina (nas concentrações de 1,0 ou 10,0 μmol L<sup>-1</sup>) foi identificado. Os testes com CV e DPV também foram realizados, usando concentração mais elevada de picoxistrobina (1,0 mmol L<sup>-1</sup>), em uma célula eletroquímica que continha uma mistura de 7,0 mL de HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> e 3,0 mL de acetonitrila, porém, nenhum sinal analítico foi observado.

O teste usando DPV foi repetido após a adição de nitrato de bismuto (concentração final de 47,0 μmol L<sup>-1</sup>) na célula eletroquímica visando à formação *in situ* de um filme de Bi na superfície do eletrodo de carbono vítreo. A deposição Bi foi feita em -900 mV por 60 s. Em tais condições, um pico (com valor máximo de +954 mV) foi observado tanto no tampão BR (pH 2,0) como em HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>, quando o potencial foi varrido no sentido anódico (de +500 a +1000 mV). Como esta faixa de potencial está acima do potencial de oxidação do bismuto (cerca de -180 mV), mais estudos foram necessários para avaliar o papel do Bi neste processo eletrolítico.

As medidas com DPV foram repetidas em uma célula na ausência de Bi<sup>3+</sup>, utilizando como eletrodo de trabalho o eletrodo de carbono vítreo, aplicando -900 mV por 60 s de tempo de deposição, seguido de uma varredura ao longo do intervalo de potencial de +790 a +1050 mV. Esta experiência foi realizada para avaliar se o

analito pode acumular-se diretamente sobre a superfície do carbono vítreo, a fim de voltar a ser redissolvido durante a varredura anódica. Os resultados obtidos na célula contendo picoxistrobina ( $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) não foram diferentes da obtida na célula que continha apenas o eletrólito suporte ( $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ), como pode ser visto nos voltamogramas A e B da Figura 45. No entanto, tal como indicado no estudo preliminar, a adição de  $\text{Bi}^{3+}$  ( $47,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final na célula) promoveu o aparecimento de um pico com uma corrente máxima em  $+954 \text{ mV}$ . Este pico mudava a sua magnitude de uma forma proporcional, à medida que concentrações diferentes de picoxistrobina eram adicionadas na célula, o que indica um pico característico do analito. A magnitude do pico também foi maior à medida que o tempo de deposição foi aumentado para  $90 \text{ s}$ , demonstrando que o analito é acumulado na medida em que o filme de Bi era formado, e que a presença de Bi é importante para o processo de acumulação de analito. Além disso, quando medições sequenciais foram feitas na mesma célula, o sinal aumentou após cada ciclo de medição (formação do filme em  $-900 \text{ mV}$  por  $60 \text{ s}$  e varredura anódica de  $+790$  a  $+1050 \text{ mV}$ ), indicando um efeito de memória sobre a superfície do eletrodo. Como este processo não é observado na célula não contendo  $\text{Bi}^{3+}$ , é possível que parte do filme de Bi com o analito adsorvido ainda está presente na superfície do carbono vítreo, após a varredura anódica.

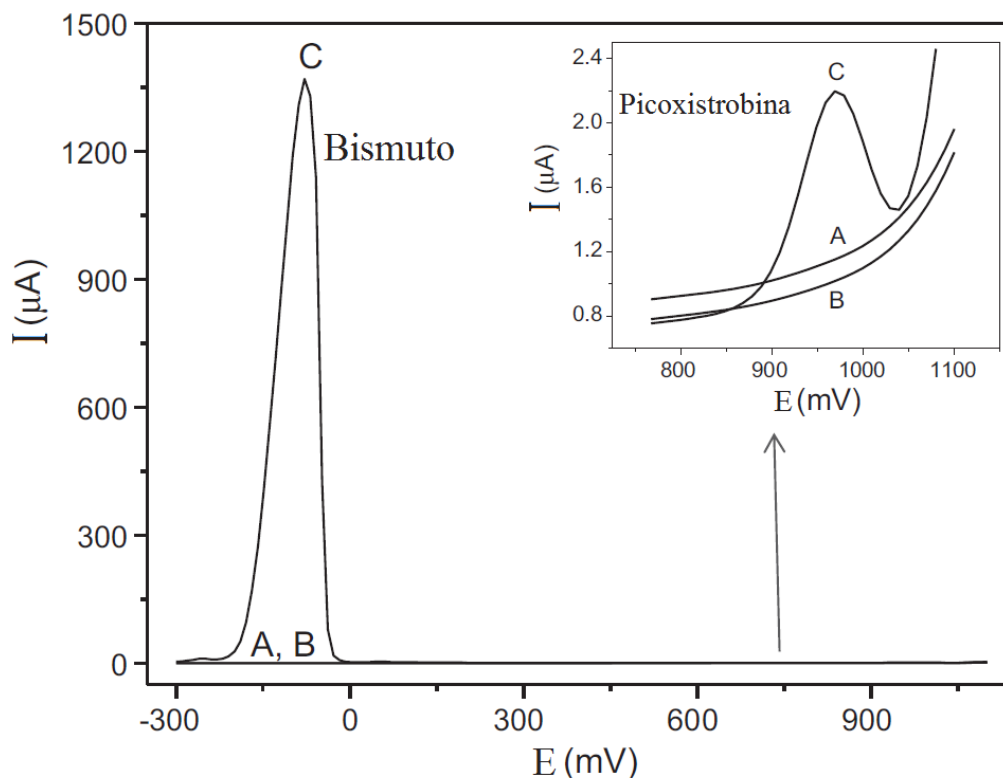


Figura 45 - Voltamogramas obtidos com varredura anódica de potencial em uma faixa de -300 a 1050 mV utilizando eletrodo de carbono vítreo: (A) HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> com a presença de picoxistrobina (9,9 µmol L<sup>-1</sup>); (B) HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> sem picoxistrobina; (C) HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> com a presença de picoxistrobina (9,9 µmol L<sup>-1</sup>) e Bi<sup>3+</sup> (47,0 µmol L<sup>-1</sup>). Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; 50 mV de amplitude de pulso e 25 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura.

## 6.2.

### Avaliação da oxidação do filme de bismuto após a varredura anódica de potencial.

Outros testes foram realizados para avaliar a extensão da oxidação do Bi após varredura anódica na faixa de potencial de +790 a +1050 mV com o objetivo de investigar se ainda haveria bismuto deixado na superfície do carbono vítreo, mesmo operando em potenciais positivos. Em primeiro lugar, o filme de Bi foi formado (60 s de tempo de deposição em -900 mV) numa célula contendo Bi<sup>3+</sup> (47,0 µmol L<sup>-1</sup>) dissolvido no eletrólito suporte (HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>). Em seguida, o eletrodo foi lavado com água ultrapura antes de ser imerso em uma outra célula contendo apenas o eletrólito suporte. Uma varredura anódica de -300 a +50 mV foi realizada a fim de se obter o pico de redissolução do Bi<sup>3+</sup> (voltamograma A da Figura 46.1). A



superfície do eletrodo foi polida com óxido de alumínio para remover todos os resíduos, antes que outro processo de formação *ex situ* do filme fosse efetuado. Depois do novo filme formado, o eletrodo foi lavado com água ultrapura, e novamente imerso em uma célula que continha apenas o eletrólito suporte, a fim de executar uma varredura na faixa de potencial positiva (de +790 a +1050 mV) antes de se repetir a varredura de -300 a +50 mV. Surpreendentemente, um pico de redissolução do Bi (voltamograma B da Figura 46.1) ainda foi observado, apresentando cerca de 26% da área do pico obtido no experimento anterior. Após cinco varreduras sequenciais na faixa de +790 a +1050 mV, o pico de redissolução do Bi diminuiu para cerca de 3% do sinal original. Este resultado indicou que ainda existia resíduo de bismuto na superfície do carbono vítreo, mesmo após a varredura em potenciais positivamente elevados. Uma série semelhante de experimentos (varreduras de +790 a +1050 mV feitas depois da formação do filme de bismuto) foram repetidas em uma célula que continha o eletrólito suporte, onde a picoxistrobina ( $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de concentração final) foi adicionada. O voltamograma feito logo após a oxidação do filme de Bi indicou um pico de redissolução do Bi com cerca de 20% da área do pico obtido com o filme de Bi sem passar pela varredura anódica de potencial positivo. Após cinco varreduras sequenciais, o pico de redissolução do Bi diminuiu para cerca de 1% do sinal original. Embora não conclusivo, este experimento realizado na presença do analito indicou que picoxistrobina pode afetar o processo de oxidação do Bi, o que implicaria em algum tipo de interação entre eles. Os resultados normalizados obtidos com as experiências realizadas na ausência e na presença de picoxistrobina são mostrados na Figura 46.2.

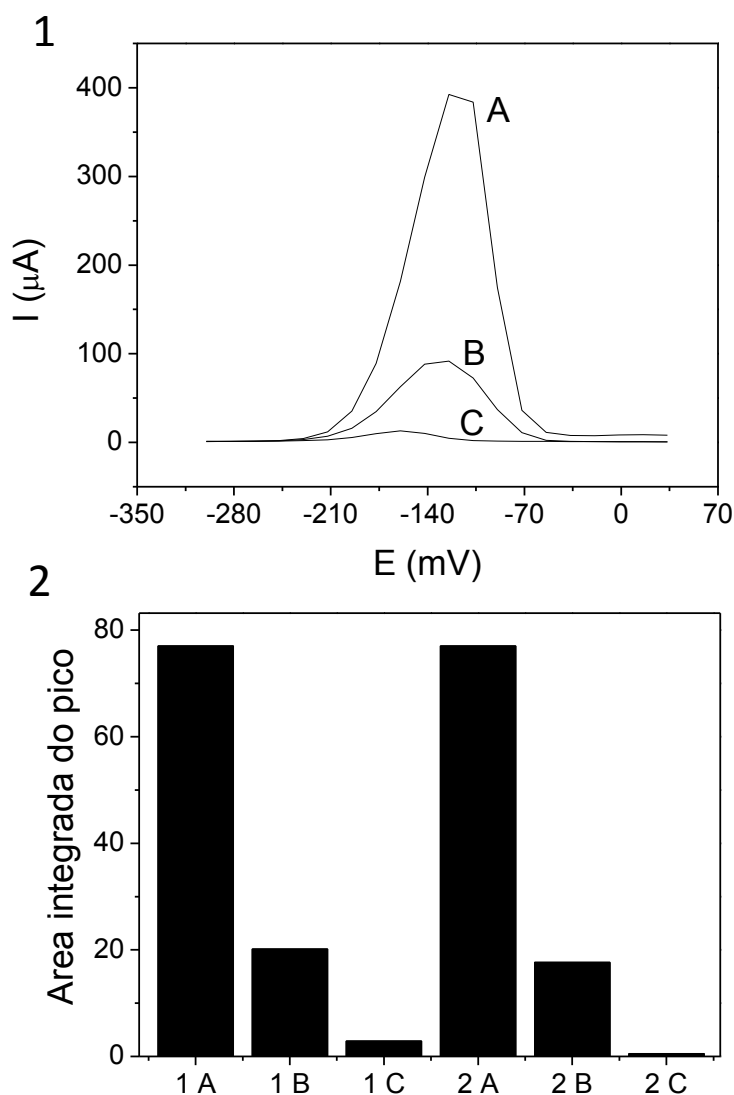


Figura 46 - (1) Picos de redissolução do Bi (medidos pela varredura de -300 a +50 mV) a partir do eletrodo de carbono de vítreo revestido com o filme de Bi (formado pela aplicação de -900 mV por 60 s) após a realização (A) 0; (B) 1; e (C) 5 varreduras anódicas de potencial na faixa de +790 a +1050 mV. (2) Correntes de pico normalizada após a realização (A) 0; (B) 1; e (C) 5 varreduras anódicas de +790 a +1050 mV em uma célula na ausência (A1, B1 e C1) de picoxistrobina e em uma célula com  $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de picoxistrobina (A2, B2 e C2). Parâmetros instrumentais: o eletrólito suporte foi o HCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ; a concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula foi de  $47,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; a amplitude de pulso de  $50 \text{ mV}$  e a velocidade de varredura de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ .

A diminuição da magnitude do pico de redissolução do Bi foi inversamente proporcional ao número das varreduras anódicas (+790 a +1050 mV) efetuadas antes da medição do sinal, na faixa de -300 a +50 mV. Este fato pode ser comprovado na Figura 46.1, sendo que no voltamograma C, o pico de redissolução do Bi, observado após cinco varreduras anódicas sequenciais, tem cerca de 3% da área do pico de redissolução inicial.

A quantidade de Bi residual na superfície do carbono vítreo também foi dependente da velocidade de varredura realizada na faixa positiva de potencial, como indicado por experimentos feitos usando varreduras anódicas (+790 a +1050 mV) com diferentes velocidades de varredura (de 5 a 50  $\text{mV s}^{-1}$ ). Os resultados (Figura 47) indicam que quanto menos tempo o potencial ficar em um valor maior do que o da oxidação de bismuto (maior velocidade de varredura), maior é a quantidade residual do filme de bismuto na superfície do eletrodo de carbono vítreo.

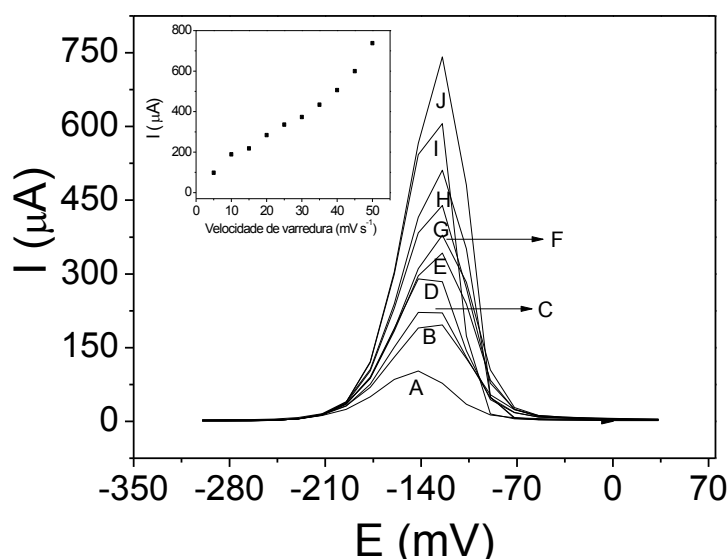


Figura 47 - Picos de redissolução do Bi em um eletrodo de carbono de vítreo revestido com filme de Bi após a realização de uma varredura anódica (+790 a +1050 mV) com diferentes velocidades: (a) 5; (B) 10; (C) 15; (D) 20; (E) 25; (F) 30; (G) 35; 40 (H); (I) 45; e (J) 50  $\text{mV s}^{-1}$ . Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; faixa de potencial varrida de -300 a +50 mV; eletrólito suporte foi o HCl 0,10 mol  $\text{L}^{-1}$  e a concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula de 47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Estes estudos preliminares demonstraram claramente que uma parte significativa do Bi ainda está presente na superfície do eletrodo quando a varredura anódica é feita, e que o Bi pode contribuir tanto para a eletrocatalise da picoxistrobina, como para pré-concentração deste analito no eletrodo de trabalho.

### **6.3.**

#### **Estudo do mecanismo redox de picoxistrobina e sua próton-dependência no filme de bismuto.**

Os estudos de diagnóstico foram feitos usando SWV, a fim de obter conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos nos processos eletroquímicos da picoxistrobina. No primeiro estudo, a variação da frequência do pulso aplicada ( $f$ ), de 10 a 50 Hz, não foi linearmente correlacionada com o valor da área integrada do pico de corrente, o que é indicativo de sistemas redox quase-reversíveis (Figura 48A). Além disso, não existiu uma relação linear entre o logaritmo da  $f$  e o potencial de pico (Figura 48B), o que descartou a possibilidade de que o sistema redox fosse irreversível (SOUZA *et al.*, 2003). Informações complementares não puderam ser alcançadas por CV, uma vez que a realização de tais estudos não é possível usando o filme de bismuto na faixa de potencial positiva e também porque a picoxistrobina não sofre oxidação direta na superfície do carbono vítreo.

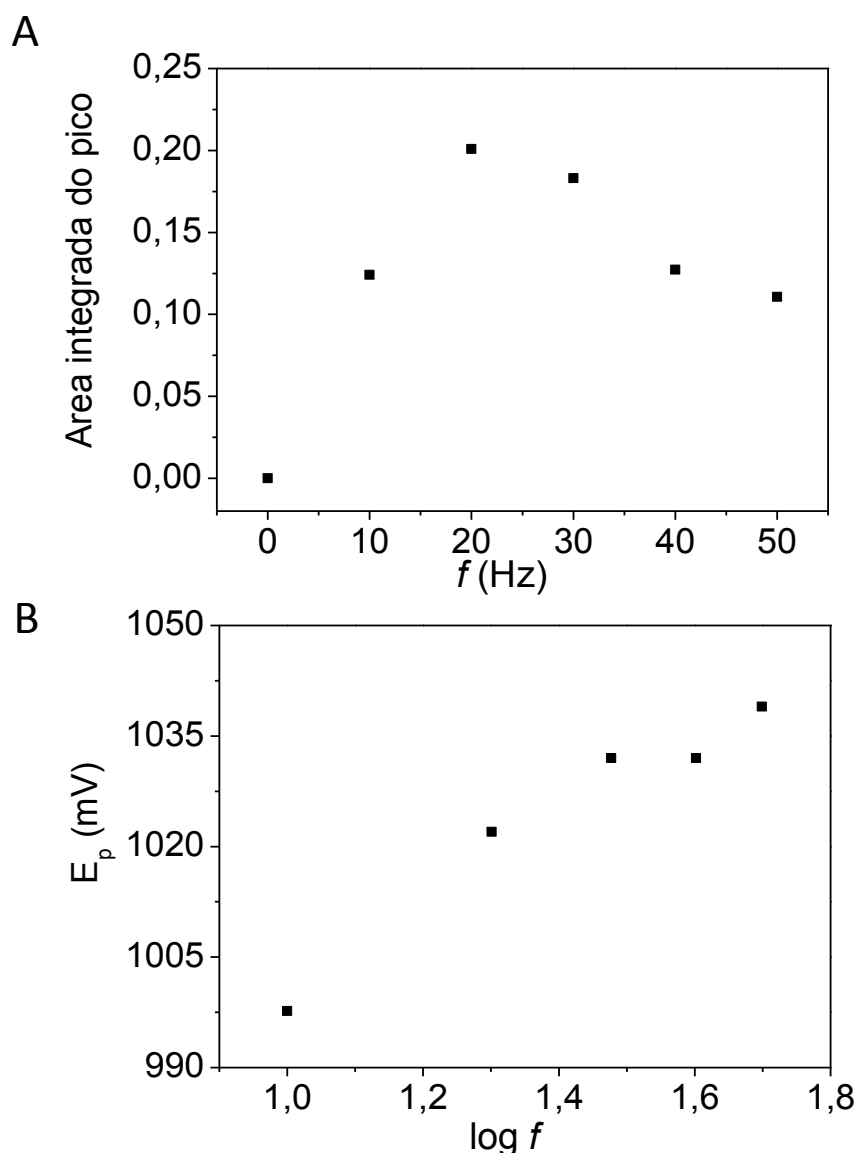


Figura 48 – (A) Área integrada do pico de picoxistrobina em função da  $f$  (10 a 50 Hz). (B) Potencial de pico ( $E_p$ ) em função do logaritmo da frequência. Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; amplitude de pulso de 30 mV; incremento de varredura de potencial de 10 mV; HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; concentração de Bi<sup>3+</sup> na célula de 47,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e a concentração de picoxistrobina de 100,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>.

Para avaliar a próton-dependência no processo redox da picoxistrobina, um estudo foi feito relacionando o sinal da área integrada do pico em função da concentração de HCl, que foi variada de 0,0050 a 1,00 mol L<sup>-1</sup> (Figura 49). A próton-dependência do processo foi provada, onde o sinal do analito aumentou significativamente quando a concentração de HCl, utilizado como o eletrólito

suporte, foi aumentada. De forma a manter a força iônica da célula relativamente constante, com diminuição da concentração de HCl, uma quantidade equivalente de KCl foi adicionada, a fim de manter constante a concentração de  $\text{Cl}^-$ , que era equivalente à soma de cátions ( $\text{H}^+ + \text{K}^+$ ). Embora nenhum mecanismo possa ser descrito por causa da falta de dados, acredita-se que a picoxistrobina é reduzida e adsorvida no filme de bismuto, durante a etapa de acumulação, através da recepção de prótons. Em seguida, o produto de redução é oxidado pela varredura anódica de potencial.

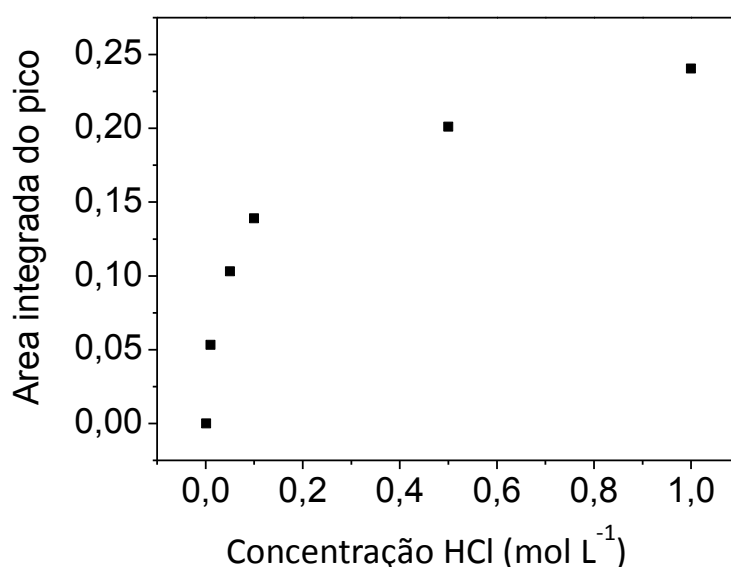


Figura 49 - Relação entre a área integrada do pico de redissolução da picoxistrobina e a concentração de HCl (0,0050 a 1,00 mol L<sup>-1</sup>). Parâmetros instrumentais: potencial de deposição de -900 mV; tempo de deposição de 60 s; amplitude de pulso de 30 mV, incremento de varredura de potencial de 10 mV; concentração de  $\text{Bi}^{3+}$  na célula de 47,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de picoxistrobina de 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

#### 6.4.

##### **Seleção das condições experimentais e instrumentais.**

A fim de alcançar as melhores condições experimentais e instrumentais para a determinação voltamétrica de pulso diferencial da picoxistrobina usando o eletrodo de BiFE, um estudo exaustivo foi realizado levando em consideração o procedimento de análise global e os parâmetros críticos que afetam a intensidade, estabilidade e reprodutibilidade do sinal. O BiFE foi preparado com a deposição de

Bi *in situ* sob a superfície do eletrodo carbono vítreo. O procedimento geral consistiu na adição de ambos (uma solução padrão de Bi<sup>3+</sup> e o analito) em uma célula que contém o eletrólito suporte. O ciclo de medição era iniciado com um potencial de deposição negativo aplicado durante um tempo específico, a fim de formar o filme e acumular o analito. Em seguida, a varredura anódica de potencial na faixa de +790 a +1050 mV era realizada. Este ciclo podia ser repetido sequencialmente a fim de se obter conjunto de sinais analíticos reproduzíveis na célula. Uma etapa de limpeza era feita para deixar a superfície do eletrodo preparada para um outro conjunto de ciclo de medição com outra célula eletroquímica. Portanto, os parâmetros críticos que foram otimizados consistiram de: (i) tipo e concentração do eletrólito suporte, (ii) a concentração de Bi<sup>3+</sup> na célula, (iii) o potencial de deposição, (iv) tempo de deposição, (v) velocidade de varredura, (vi) amplitude de pulso e (vii) o procedimento de limpeza do eletrodo.

#### **6.4.1. Estudo do eletrólito suporte.**

A primeira opção crítica foi a escolha do eletrólito suporte a ser empregado. Estudos anteriores utilizando tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) em uma faixa de pH que variou de 2,0 a 12,0, indicaram que a corrente característica do analito era observada apenas em pH 2,0. Assim, os testes foram realizados utilizando sistemas não tamponados tais como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,00; 0,10 e 0,01 mol L<sup>-1</sup>) e HCl (1,00; 0,10; 0,05 e 0,01 mol L<sup>-1</sup>). Um efeito de memória significativo nas medições sequenciais foi encontrado em soluções ácidas menos concentradas e os melhores perfis de sinal (de intensidade mais elevada e picos mais nítidos) foram obtidos em HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup>, por conseguinte, que esta solução foi escolhida para análise. Mesmo nessas condições, um sinal do analito reproduzível é conseguido apenas após cerca de dez medições, como mostrado na Figura 50. Ao longo destas últimas quatro ou cinco medições consecutivas do ciclo, o sinal de redissolução tornou-se constante e estável. Tal comportamento foi causado provavelmente pelo equilíbrio de adsorção lenta do analito na interface filme de Bi/solução. De fato, ao se determinar azoxistrobina e dimoxistrobina usando o eletrodo de gota pendente de mercúrio com HCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte, Pacheco e colaboradores (2010) também apontaram comportamento semelhante. Portanto, os dados considerados

para a determinação de picoxistrobina foram as medidas sequenciais após o quinto ciclo de medição.

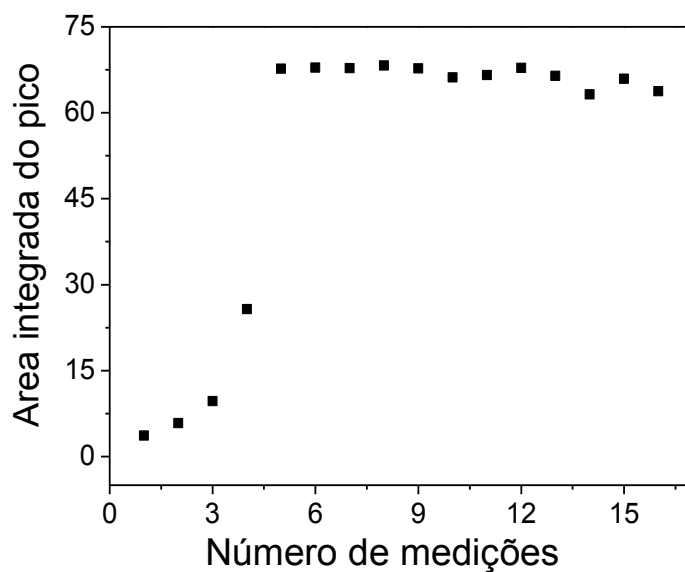


Figura 50 - Medidas voltamétricas sequenciais de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: -900 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (60,0 μmol L<sup>-1</sup>); 50 mV de amplitude de pulso; 25 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial anódica varrida de +790 a +1050 mV e a concentração de picoxistrobina de 10,0 μmol L<sup>-1</sup>.

Outros testes foram feitos para tentar correlacionar o aumento do sinal da picoxistrobina, durante os primeiros ciclos de medição até estabilização do sinal, e a variação do pico de redissolução do Bi. Os resultados (Figura 51) mostraram que o pico de redissolução do Bi (picos de C a H) apresenta uma tendência para aumentar ao longo dos ciclos (provavelmente devido ao Bi residual deixado sobre a superfície do carbono vítreo depois de cada corrida), se estabilizando quando o sinal do analito também estabiliza. O resultado indicou que a variação no sinal do analito pode ser correlacionada com as variações da quantidade de filme de Bi formada na superfície do substrato.



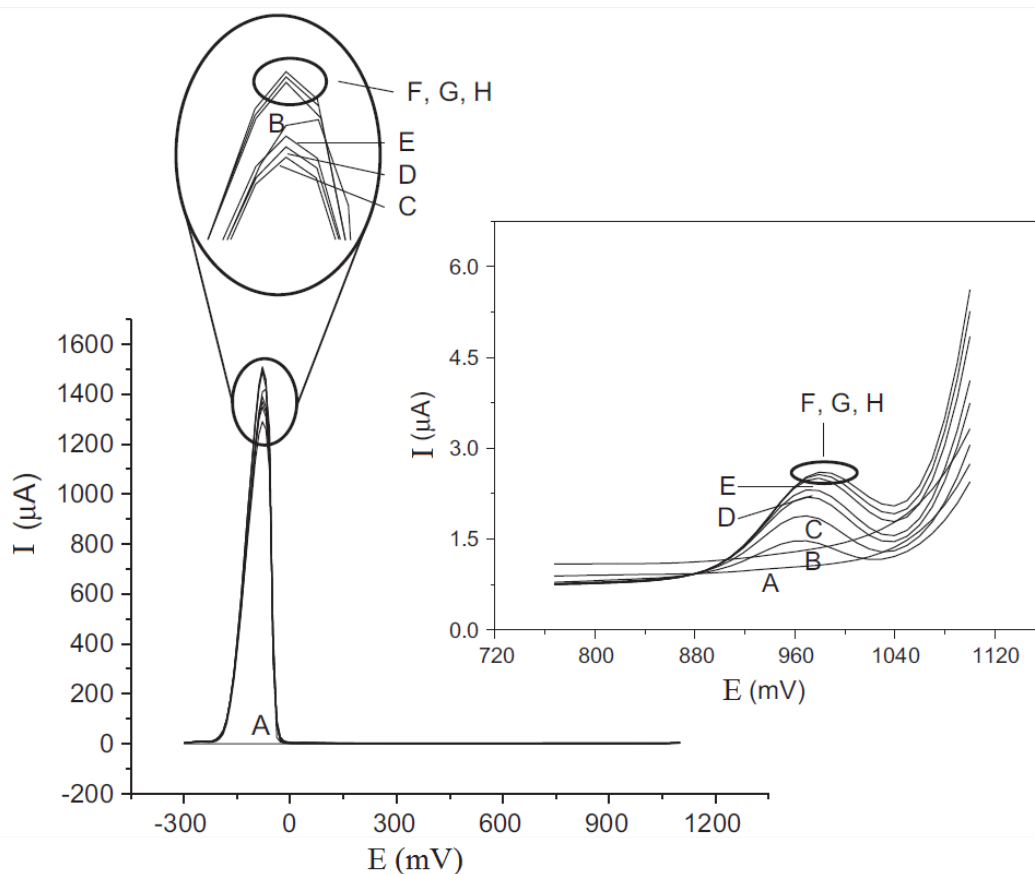


Figura 51 – Picos de redissolução sequenciais do Bi e picoxistrobina em um eletrodo de carbono vítreo revestido com um filme de Bi. (A) Sem Bi e analito; (B) com Bi e sem analito; (C) primeira corrida com ambos Bi e analito; (D) terceira corrida com ambos Bi e analito; (E) quinta corrida com ambos Bi e analito; (F) sexta corrida com ambos Bi e analito; (G) nona corrida com ambos Bi e analito; e (H) décima segunda corrida com ambos Bi e analito. Parâmetros instrumentais: -900 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (47,0 μmol L<sup>-1</sup>); 50 mV de amplitude de pulso; 25 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 μmol L<sup>-1</sup>.

#### 6.4.2. Estudo do procedimento de limpeza eletroquímica no carbono vítreo.

Um procedimento de limpeza eletroquímica na superfície do carbono vítreo, que consistiu na aplicação de um potencial de +400 mV durante 90 s, foi usado a fim de eliminar quaisquer efeitos de memória de uma análise prévia. Vale salientar que a aplicação de qualquer valor de diferença de potencial limpeza acima do potencial de oxidação do Bi levaria a uma limpeza adequada do eletrodo, não

importando se o potencial está abaixo do potencial de oxidação do analito. A aplicação de potenciais de limpeza acima +1000 mV (acima do potencial de oxidação da picoxistrobina) provoca uma passivação do eletrodo e uma sistemática diminuição do sinal analítico. Portanto, esse potencial de limpeza foi evitado.

#### **6.4.3. Estudo da concentração de Bi<sup>3+</sup> na célula eletroquímica.**

A concentração de bismuto adicionada na célula eletroquímica para a formação do filme *in situ* foi avaliada. As concentrações finais de Bi<sup>3+</sup> na célula foram testadas, variando de 0,0 a 270,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 52.

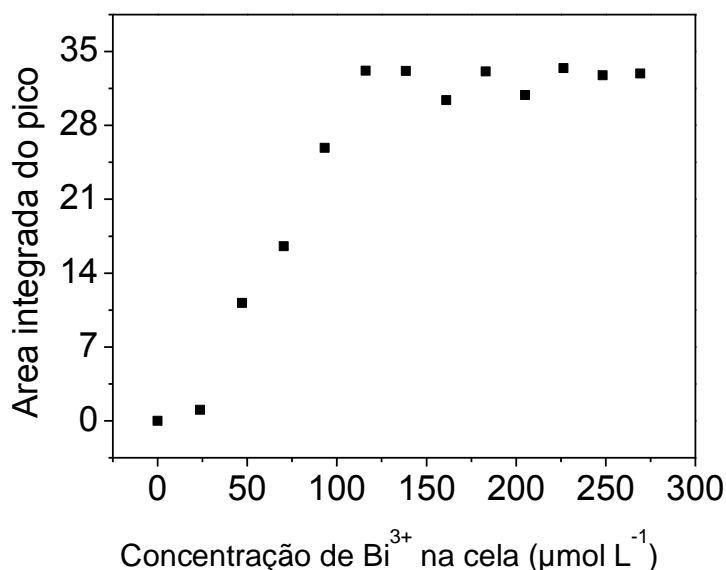


Figura 52 – Área integrada do pico de redissolução da picoxistrobina em função da concentração de Bi<sup>3+</sup> na célula. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (0,0 a 270,0 µmol L<sup>-1</sup>); -900 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; 50 mV de amplitude de pulso; 35 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 µmol L<sup>-1</sup>.

O sinal do analito aumentou à medida que a concentração de Bi<sup>3+</sup> cresceu até 120,0 µmol L<sup>-1</sup> e tornou-se estável na presença de concentrações mais elevadas de Bi<sup>3+</sup> na célula. A concentração de bismuto de 140,0 µmol L<sup>-1</sup> foi escolhida uma vez que estava na faixa robusta da resposta analítica.

#### 6.4.4. Estudo do tempo de deposição.

O estudo para a escolha do tempo de deposição do filme (com acumulação concomitante do analito) foi realizado variando o tempo de deposição de 0 a 300 s. O sinal de redissolução do analito sofreu um aumento até o tempo de deposição de 210 s (Figura 53), tendo uma queda quando se aplicou tempos maiores. Tais dados foram obtidos usando uma superfície limpa do GCE (depois do polimento com óxido de alumínio) para cada um dos tempos de deposição estudados.

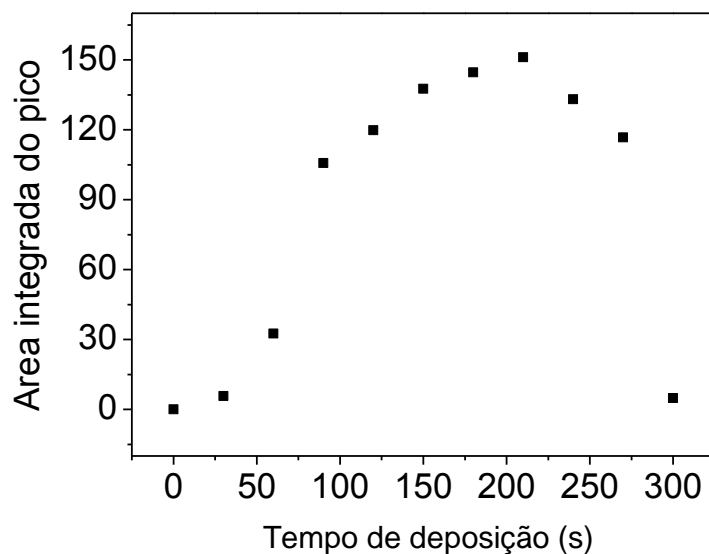


Figura 53 - Efeito de diferentes tempos de deposição sobre área do pico de redissolução da picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (140,0 μmol L<sup>-1</sup>); -900 mV de potencial de deposição; 0 a 300 s de tempo de deposição; 50 mV de amplitude de pulso e 35 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 μmol L<sup>-1</sup>.

Quando os tempos de deposição aplicados foram maiores do que 90 s, a passivação do eletrodo foi observada depois de sucessivas medições, usando o mesmo eletrodo de carbono vítreo. Este processo de passivação foi provavelmente devido a formação de óxido de bismuto, que se liga ao carbono vítreo, impedindo assim o seu contato elétrico com a solução para a formação do filme de Bi. De modo a restaurar a capacidade de detecção do eletrodo, a sua superfície foi limpa mecanicamente com uma lixa de 0,45 mm, seguida pela imersão do eletrodo em solução de ácido nítrico (10%, v/v), durante 24 h. Por vezes, também foi necessária a limpeza da superfície do eletrodo auxiliar, bem como a manutenção do eletrodo de referência. A fim de evitar a passivação do eletrodo e poder realizar análises durante todo o dia de trabalho, o tempo de deposição foi ajustado para um valor mais curto (60 s). Sob tais circunstâncias, a análise pode ser realizada, sem a passivação da superfície do eletrodo, por pelo menos 60 ciclos de medição antes de executar a limpeza do eletrodo.

#### 6.4.5. Estudo do potencial de deposição.

O estudo do potencial de deposição foi realizado em uma faixa de potencial que variou de 0 a -1000 mV, de modo a permitir a medição de sinais intensos e reprodutivos. Para o potencial de deposição aplicado, o filme de bismuto é formado (*in situ*) em conjunto com a acumulação do analito. A Figura 54 apresenta os resultados obtidos.

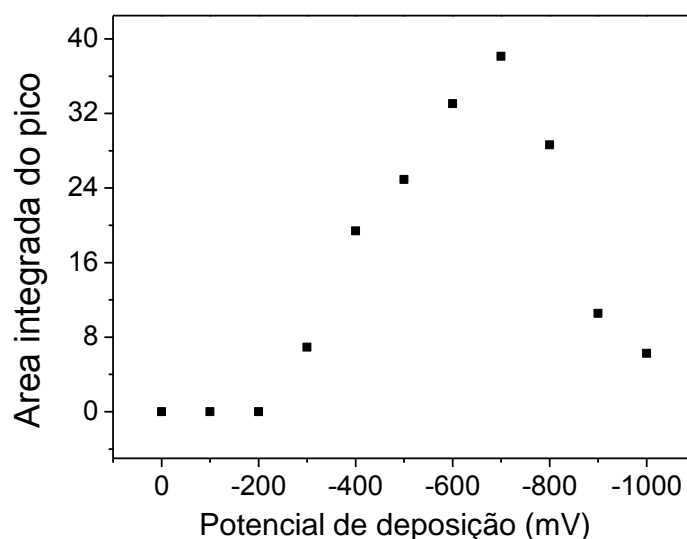


Figura 54 - Efeito de diferentes potenciais de deposição sobre área do pico de redissolução da picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (140,0 μmol L<sup>-1</sup>); de 0 a -1000 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; 50 mV de amplitude de pulso e 35 mV s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 μmol L<sup>-1</sup>.

O sinal de picoxistrobina aumentou até -700 mV de potencial de deposição, diminuindo quando os valores mais elevados foram aplicados. Esta queda de sinal ocorreu principalmente pela formação de bolhas na superfície do eletrodo devido ao sobrepotencial com eletrólise de (redução de H<sup>+</sup> a H<sub>2(g)</sub>). O potencial de deposição de -700 mV foi escolhido para o método propiciar sinais mais intensos e também por ser mais reprodutível após uma série de varreduras consecutivas.

#### 6.4.6. Otimização da velocidade de varredura e amplitude de pulso.

A fim de se obter máximo de sinal para o pico de redissolução da picoxistrobina, a velocidade de varredura e a amplitude do pulso ( $a$ ) foram otimizadas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 55.

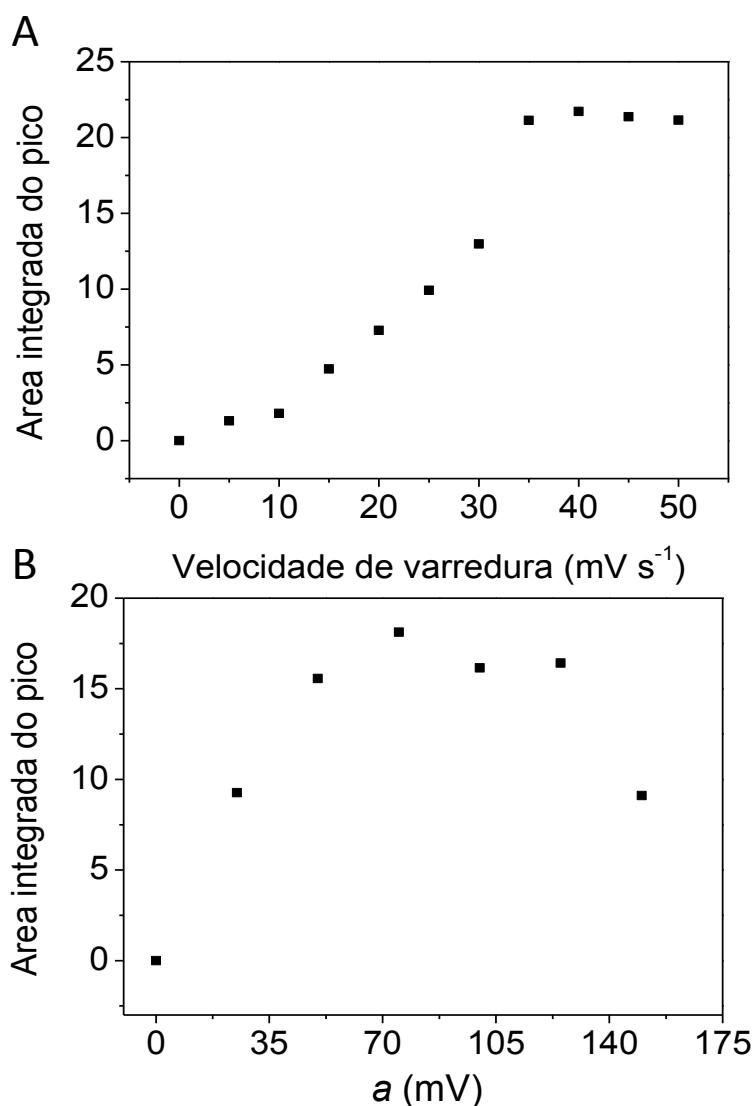


Figura 55 – (A) Estudo da velocidade de varredura (0 a 50 mV s<sup>-1</sup>) em função da área integrada do pico de redissolução de picoxistrobina. (B) Estudo da amplitude de pulso (0 a 150 mV) em função da área integrada do pico de redissolução de picoxistrobina. Parâmetros instrumentais: HCl 1,00 mol L<sup>-1</sup> de eletrólito suporte; Bi<sup>3+</sup> (140,0 μmol L<sup>-1</sup>); -700 mV de potencial de deposição; 60 s de tempo de deposição; faixa de potencial varrida de +790 a +1050 mV e a concentração final de picoxistrobina de 10,0 μmol L<sup>-1</sup>.

Avaliando o perfil das respostas, a velocidade de varredura de potencial de  $40 \text{ mV s}^{-1}$  foi escolhida por estar na faixa robusta ( $35$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) que permitiu uma maior área de redissolução do analito. A amplitude do pulso ( $75 \text{ mV}$ ) foi também escolhida dentro da faixa que permitia sinal máximo ( $60$  a  $120 \text{ mV}$ ). As condições otimizadas para realizar as determinações de picoxistrobina são indicadas na Tabela 23.

Tabela 23 - Condições experimentais escolhidas para o método voltamétrico de determinação da picoxistrobina.

Parâmetro	Valor
Eletrólito suporte	HCl $1,00 \text{ mol L}^{-1}$
Potencial de limpeza	$400 \text{ mV}$
Tempo de limpeza	$90 \text{ s}$
Concentração de $\text{Bi}^{3+}$ na célula	$140,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$
Potencial de deposição	$-700 \text{ mV}$
Tempo de deposição	$60 \text{ s}$
Amplitude	$75 \text{ mV}$
Velocidade de varredura	$35 \text{ mV s}^{-1}$

## 6.5. Desempenho analítico.

Os parâmetros analíticos de mérito do método foram obtidos usando as condições experimentais selecionadas para determinar picoxistrobina. Uma sequência de voltamogramas de soluções contendo concentrações crescentes de picoxistrobina é apresentada na Figura 56A. A área de redissolução do pico é diretamente e linearmente proporcional à concentração de picoxistrobina na célula eletroquímica (Figura 56B). A curva analítica,  $Y = (4,29 \times 10^{-3} \pm 1,41 \times 10^{-4} \text{ L mol}^{-1}) X + (2,42 \times 10^{-9} \pm 1,64 \times 10^{-9})$ , apresentou uma resposta linear ( $R^2 = 0,9945$ ) a partir do limite de quantificação (LOQ) até  $19,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . O LOD na célula foi de  $0,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ) e LOQ foi de  $2,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $1,03 \text{ mg L}^{-1}$ ). A Figura 57 apresenta a diferença entre o sinal produzido pela concentração do LOD ( $0,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de picoxistrobina e o branco.

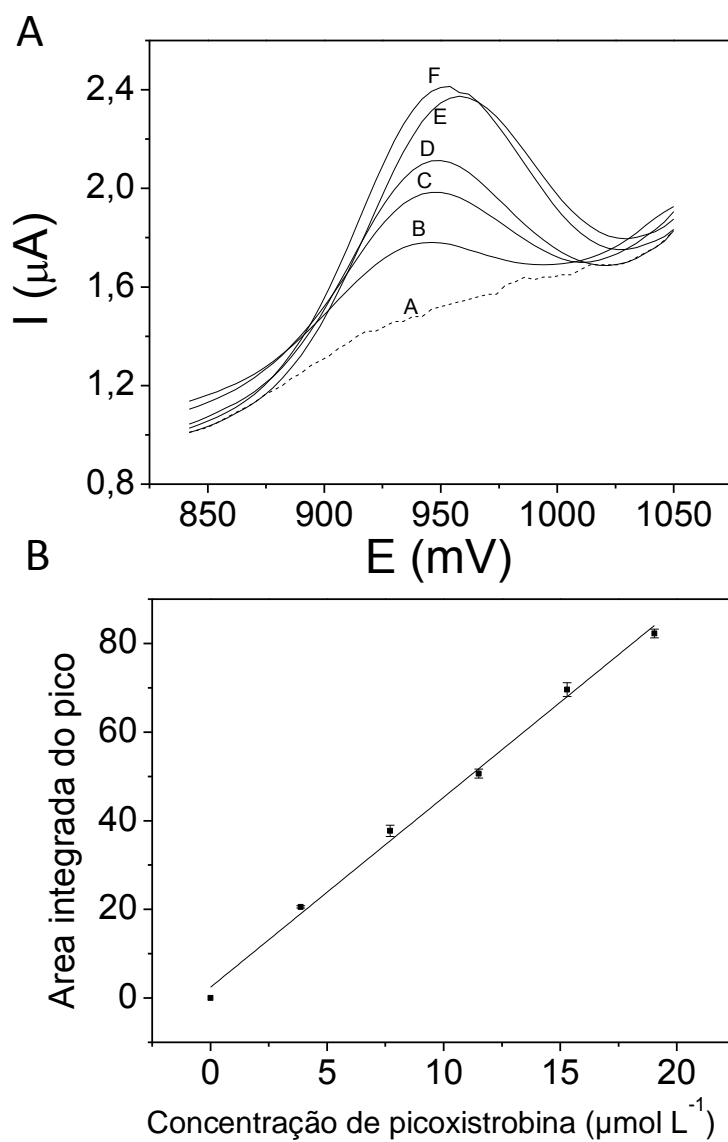


Figura 56 - (A) Voltamogramas de concentrações crescentes de picoxistrobina: (a) branco; (b) 3,9 μmol L<sup>-1</sup>; (c) 7,7 μmol L<sup>-1</sup>; (d) 12,0 μmol L<sup>-1</sup>; (e) 15,0 μmol L<sup>-1</sup>; (f) 19,0 μmol L<sup>-1</sup>. (B) curva analítica com o modelo de equação de  $Y = (4,29 \times 10^{-3} \pm 1,41 \times 10^{-4} \mu\text{A L mol}^{-1}) X + 2,42 \times 10^{-9} \pm 1,64 \times 10^{-9}$  e  $R^2 = 0,9945$ . Parâmetros instrumentais: ver Tabela 23.



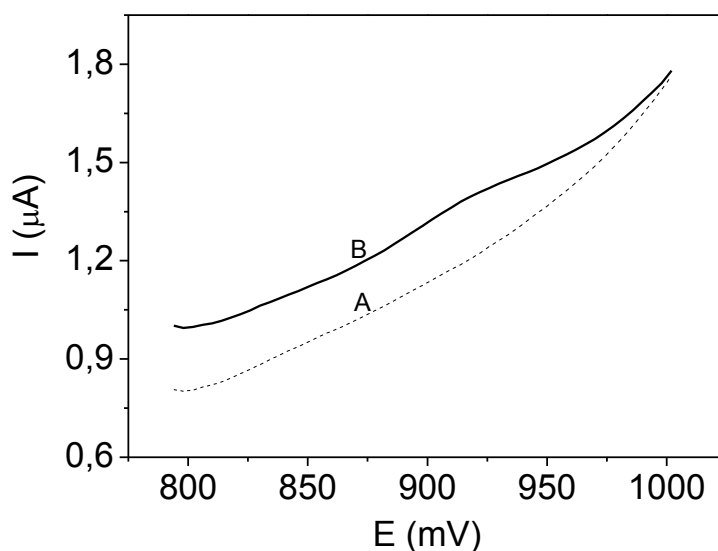


Figura 57 - Voltamogramas que mostram a diferença entre o sinal produzido pelo (A) Branco e (B) por uma concentração de picoxistrobina equivalente ao LOD ( $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Parâmetros eletroquímicos utilizados estão descritos na Tabela 23.

A precisão foi avaliada através dos estudos de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por dez medições de sinais consecutivos (após as cinco ou seis primeiras varreduras voltamétricas para estabilização do sinal) de uma solução contendo  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de picoxistrobina. A precisão intermediária foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos a partir das análises feitas por dois analistas diferentes, no qual cada um realizou dez medições de sinal de uma solução contendo o analito (cada analista preparou a sua própria solução). Estes experimentos foram repetidos em três dias diferentes, utilizando soluções de analitos preparados no próprio dia da análise. Os resultados indicaram a repetibilidade de 4,1% e a precisão intermediária de 2,7% (valor que indica a diferença dos resultados alcançados pelos analistas).

A seletividade foi avaliada por testes de recuperação, no qual a influência das outras estrobilurinas (azoxistrobina, dimoxistrobina, fluoxastrobina, cresoximetílico, piraclostrobina e trifloxistrobina) foi testada. As relações entre o sinal obtido a partir de um padrão de picoxistrobina e o sinal de uma mistura de picoxistrobina e proporções crescentes de outra estrobilurina ( $I_{\text{picoxistrobina}}/I_{\text{(picoxistrobina + interferente)}}$ ) foram avaliados. Valores de razão próximos à unidade não

indicaram interferência. Valores superiores a 1 indicaram uma diminuição do sinal do analito devido à presença de outra estrobilurina.

Nenhum sinal analítico de piraclostrobina, fluoxastrobina, cresoxim-metílico e trifloxistrobina foram encontrados nas condições experimentais definidas neste trabalho. Fluoxastrobina e cresoxim-metílico não apresentaram quaisquer interferências, quando estão presentes em concentrações cinco vezes maiores do que a da picoxistrobina na célula eletroquímica (ver Tabela 24). Quando a proporção destes interferentes foi aumentada, o sinal de analito diminuiu, no entanto, mesmo em tais casos, o analito ainda poderia ser determinado pelo método de adição analito (abordagem múltipla). A presença de piraclostrobina ou trifloxistrobina, mesmo em proporções equimolares, diminuiu o sinal de picoxistrobina. Interferência de trifloxistrobina pode ser corrigida pela técnica de adição de analito. No entanto, a interferência de piraclostrobina é maior, a ponto de eliminar o sinal de analito quando esse interferente está presente em proporção de apenas duas vezes mais elevada do que a picoxistrobina.

Tabela 24 – Avaliação da interferência de outras estrobilurinas no sinal eletroanalítico de picoxistrobina.

Interferente	Proporção (Picoxistrobina:Interferente)	$I_{\text{Picoxistrobina}} / (I_{\text{Picoxistrobina}} + I_{\text{Interferente}})$
Cresoxim-metílico	1:0	1,00
	1:1	1,00
	1:5	1,00
	1:20	3,97
	1:30	13,09
Fluoxastrobina	1:0	1,00
	1:1	1,00
	1:5	1,00
	1:10	1,48
	1:20	5,03
	1:30	30,82
Piraclostrobina	1:0	1,00
	1:1	6,59
	1:2	1232,20
Trifloxistrobina	1:0	1,00
	1:1	1,27
	1:5	2,50
	1:10	7,23

Potencial de pico medido em +954 mV (varredura +790 a +1050 mV).

Parâmetros instrumentais: ver Tabela 23.

Sob as condições experimentais selecionadas foram observados sinais analíticos para azoxistrobina (+920 mV) e dimoxistrobina (+882 mV) próximos ao potencial característico de picoxistrobina. Portanto, estas duas estrobilurinas impõem interferência crítica para o método. Os voltamogramas dos picos de redissolução para azoxistrobina e dimoxistrobina em BiFE podem ser vistos na Figura 58.

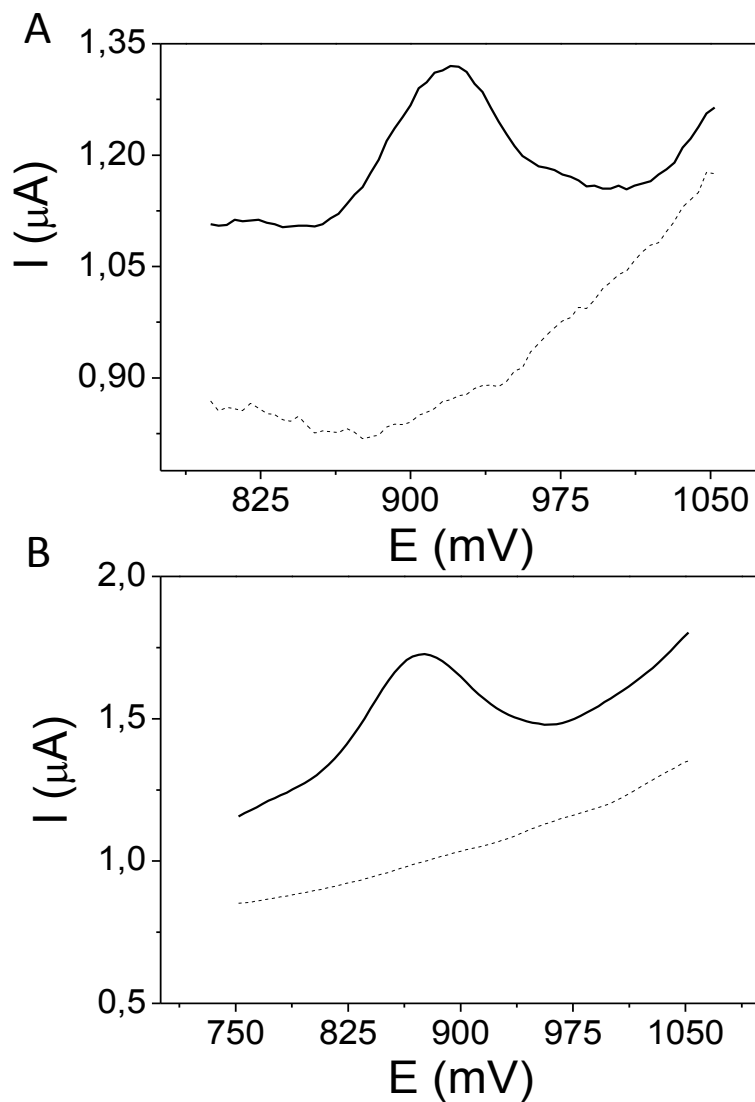


Figura 58 – Voltamogramas do pico de redissolução para (A) azoxistrobina e (B) dimoxistrobina na concentração de  $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em filme de bismuto. Parâmetros instrumentais: ver Tabela 23. Traço pontilhado é o voltamograma da solução de HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

## 6.6. Aplicação do método.

Estudos utilizando amostras de urina fortificadas com picoxistrobina foram realizadas. A fortificação foi feita em dois níveis de concentração ( $4,85$  e  $12,82 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Observou-se uma forte interferência da matriz de urina, que eliminou o sinal do analito. Portanto, um procedimento de extração de fase sólida com cartucho C-18 foi utilizado para separar o analito dos componentes interferentes da matriz.

Amostras de água do Riacho Rainha e da Lagoa Rodrigo de Freitas foram analisados diretamente.

A exatidão do método foi avaliada através de testes de recuperação realizados em três dias diferentes, com as amostras fortificadas nos dois níveis de concentração, utilizando a técnica de adição de analito (abordagem múltipla) para quantificação da picoxistrobina. Os resultados são apresentados na Tabela 25, com resultados satisfatórios em todos os casos. Os valores de LOD e de LOQ na amostra foram na ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  uma vez que o fator de diluição das amostras na célula foi cerca de 10 vezes.

O desempenho do método proposto para a análise de amostras de água fortificadas com picoxistrobina ( $66,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  na amostra ou  $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  na célula eletroquímica) foi comparado com o obtido por meio de um método usando HPLC com detecção absorciométrica. Seis réplicas autênticas de água do Riacho Rainha foram analisadas e os resultados médios obtidos pelo método voltamétrico proposto e o de comparação foram comparados pelo teste *t de Student* em um intervalo de confiança de 95%. O valor *t* experimental (0,52) foi menor do que o valor de *t* tabelado (2,23) para 10 graus de liberdade. Portanto, os resultados indicaram que não houve diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois métodos diferentes.

Tabela 25 - Recuperação de picoxistrobina em amostras de água e urina fortificadas em dois níveis de concentração (4,8 e 12,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

Amostra	Picoxistrobina ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Dia	Recuperação (%)	
	Adicionado	Encontrado			
Água do Riacho Rainha	0,0	< LOD	1	-	
			2	-	
			3	-	
	4,8	5,1 $\pm$ 0,2	1	104,2 $\pm$ 0,5	
			2	108,3 $\pm$ 0,6	
			3	107,8 $\pm$ 1,0	
		12,8	12,7 $\pm$ 0,7	1	98,8 $\pm$ 3,1
				2	100,4 $\pm$ 1,4
				3	100,4 $\pm$ 2,2
Água da lagoa Rodrigo de Freitas	0,0	< LOD	1	-	
			2	-	
			3	-	
	4,8	4,6 $\pm$ 0,0	1	94,8 $\pm$ 0,1	
			2	108,1 $\pm$ 1,3	
			3	106,2 $\pm$ 1,5	
	12,8	10,8 $\pm$ 0,2	1	84,4 $\pm$ 0,9	
			2	101,4 $\pm$ 2,5	
			3	102,0 $\pm$ 2,1	
Urina	0,0	< LOD	1	-	
			2	-	
			3	-	
	4,8	4,6 $\pm$ 0,0	1	94,8 $\pm$ 0,1	
			2	92,5 $\pm$ 0,3	
			3	94,1 $\pm$ 0,6	
	12,8	11,5 $\pm$ 0,3	1	90,0 $\pm$ 1,4	
			2	90,1 $\pm$ 0,8	
			3	90,8 $\pm$ 1,1	

Parâmetros instrumentais: ver Tabela 23.

## 7. Conclusão.

A oxidação eletroquímica de cresoxim-metílico, dimoxistrobina, picoxistrobina e piraclostrobina usando o eletrodo de DDB foi apresentada pela primeira vez e uma proposta para o mecanismo do processo foi apresentada. Os métodos eletroanalíticos desenvolvidos para determinar cresoxim-metílico (amostras de suco de uva), picoxistrobina (amostras de águas naturais) e piraclostrobina (amostras de águas naturais e suco de uva) usando a técnica de SWV com o eletrodo de trabalho de DDB foram precisos (coeficiente de variação <5%) e a recuperação foi satisfatória.

As estrobilurinas não se degradaram termicamente em soluções aquecidas a 60 °C por duas horas, indicando que as estrobilurinas nas lavouras não devem ser degradadas pelo calor no qual são expostas. Nos estudos da degradação por exposição ao UV, os resultados obtidos mostram que todas as estrobilurinas avaliadas se degradam com o tempo, assim uma das possíveis causas da degradação destes fungicidas nas lavouras pode ser decorrente da exposição à radiação UV ambiente.

Novos métodos analíticos usando a abordagem de BIA-amperometria com eletrodo de DDB foram desenvolvidos para a determinação de dimoxistrobina e picoxistrobina em amostras de águas naturais. O processo eletroquímico foi dependente do pH e do potencial aplicado, apresentando corrente de pico mais intensa para dimoxistrobina em pH 10,0 e para picoxistrobina em pH 2,0 no potencial +1900 mV. Os parâmetros de BIA-amperometria foram ajustados para obter uma boa precisão (coeficiente de variação = 3% para dimoxistrobina e 5% para picoxistrobina) e uma boa frequência de análise (180 e 108 injeções h<sup>-1</sup> para dimoxistrobina e picoxistrobina, respectivamente). A exatidão foi avaliada por testes de recuperação com valores satisfatórios (80,2 a 105,6% dependendo da estrobilurina).

Apesar de se identificar outras moléculas interferentes em amostras de água através de uma estratégia simples com a amperometria de múltiplos pulsos, os métodos de BIA-amperometria desenvolvidos não podem ser utilizados para determinar as estrobilurinas quando os interferentes estiverem presentes, necessitando de um pré-tratamento na amostra como a extração.

Um novo método para a determinação de picoxistrobina utilizando como eletrodo de trabalho o BiFE e a técnica de voltametria de pulso diferencial foi desenvolvido. A abordagem utilizando o BiFE em potenciais acima do potencial de oxidação do Bi é nova e a importância de Bi no processo, mesmo em potenciais positivos, foi provada. O método foi utilizado para determinar o analito em amostras de urina e águas naturais. SPE permitiu a pré-concentração do analito e eliminou as interferências nas amostras de urina. Recuperações satisfatórias de 89,3 a 104,8% foram encontradas e o método foi seletivo em relação a outras estrobilurinas.

Na análise de amostras com picoxistrobina, o tempo de deposição para a formação *in situ* do BiFE pode ser aumentado até 210 s, a fim de se pré-concentrar mais analito na superfície do eletrodo e conseguir determinar concentrações menores que o LOQ estabelecido pelo método proposto. Porém, um procedimento de limpeza deve ser realizado após as análises para evitar uma passivação do substrato (eletrodo de carbono vítreo) onde o BiFE é depositado.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que os métodos analíticos propostos mostraram-se eficientes e reprodutíveis para a análise destas estrobilurinas nas matrizes avaliadas. Apesar da potencial limitação em termos de seletividade, o bom desempenho analítico obtido, o curto tempo de análise e o baixo consumo de reagente em todos os métodos propostos neste trabalho os tornam uma alternativa atraente em relação às técnicas mais complexas e caras, como a eletroforese capilar, cromatografia gasosa e cromatografia líquida para a determinação de estrobilurinas.

Picoxistrobina foi determinada por métodos analíticos desenvolvidos com três diferentes técnicas eletroquímicas, possibilitando uma comparação dos resultados obtidos pelos mesmos. A faixa linear para os métodos desenvolvidos com as técnicas de SWV e DPV foi próxima, a partir do LOQ até 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 19,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Já para a técnica de amperometria ela foi mais ampla, a partir do LOQ até 100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o que possibilita a análise de amostras com concentrações mais elevadas do analito. Os coeficientes de determinação para as três técnicas são semelhantes, com valores próximos a 1. Em termos de sensibilidade, o método desenvolvido com a técnica de SWV foi o que obteve os menores LOD (0,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 0,07  $\text{mg L}^{-1}$ ) e LOQ (0,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 0,25  $\text{mg L}^{-1}$ ); já o método com a técnica de DPV, foi o segundo a apresentar menores valores de LOD (0,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 0,31  $\text{mg L}^{-1}$ ) e LOQ (2,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ou 1,03  $\text{mg L}^{-1}$ ) e o método



com a técnica de amperometria o menos sensível dos três, com os maiores valores de LOD ( $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $0,58 \text{ mg L}^{-1}$ ) e LOQ ( $5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  ou  $1,95 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estes resultados, corroboram com o que seria esperado para a sensibilidade destas técnicas eletroquímicas pela teoria. Em termos de seletividade, o método desenvolvido com a técnica de DPV foi o melhor, porque sofreu interferência significativa na proporção 1:1 apenas de azoxistrobina e dimoxistrobina, diferente do método com a técnica de SWV que sofreu interferência na mesma proporção para três estrobilurinas (azoxistrobina, cresoxim-metílico e piraclostrobina). As outras estrobilurinas interferentes avaliadas apresentaram uma interferência significativa em proporções maiores no método com DPV em relação ao método com SWV. O método desenvolvido com a técnica de amperometria não apresentou seletividade. A frequência analítica foi maior, com 108 injeções  $\text{h}^{-1}$  no método desenvolvido com amperometria. O segundo método com maior frequência analítica foi o desenvolvido com SWV, por não necessitar de uma etapa de pré-concentração entre as varreduras de potencial. Já o método desenvolvido com DPV apresentou a menor frequência analítica, por necessitar de uma etapa de pré-concentração do analito na superfície do eletrodo, aplicando um tempo de deposição de 60 s entre as varreduras de potencial. A escolha do método mais adequado para determinar picoxistrobina vai depender das condições da amostra a ser analisada.

### **7.1. Perspectivas de trabalhos futuros.**

Desenvolver métodos eletroanalíticos utilizando a técnica de SWV com o eletrodo de DDB para determinar azoxistrobina, fluoxastrobina e trifloxistrobina.

Desenvolver método eletroanalítico com eletrodo de DDB e detecção amperométrica em uma célula de fluxo acoplada a um sistema de bomba e coluna cromatográfica para a determinação simultânea de azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina.

Desenvolver métodos eletroanalíticos utilizando a voltametria de pulso diferencial com o eletrodo de BiFE para determinar azoxistrobina e dimoxistrobina.

Aplicar os métodos desenvolvidos no presente trabalho para quantificar as estrobilurinas em amostras reais de regiões onde estes pesticidas são utilizados nas lavouras.

Avaliar a ecotoxicidade destas estrobilurinas em peixes e pequenos crustáceos.

## Referências bibliográficas

ABREU, S. M.; CORREIA, M.; HERBERT, P.; SANTOS, L.; ALVES, A.; Screening of grapes and wine for azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin fungicides by HPLC with diode array detection, *Food Addit. Contam.*, 2005, **22**, 549.

ABREU, S. M.; CABONI, P.; CABRAS, P.; GARAU, V. L.; ALVES, A.; Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573–574**, 291.

ACHTERBERG, E. P.; BRAUNGARDT, C.; Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **400**, 381.

AENDA - Associação Brasileira de Defensores Genéricos - Notícias AENDA Setembro 2013, <http://www.aenda.org.br/Arquivos/NoticiasSet13.pdf> [acessado em março de 2014].

ALEIXO, L. M.; Voltametria: Conceitos e técnicas, Wiley: Chemkey, 2001.

ANGLESON, J. K.; BETZ, W. J.; Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared, *Trends Neurosci.*, 1997, **20**, 281.

AGUILERA, A.; VALVERDE, A.; CAMACHO, F.; BOULAUD, M.; GARCÍA-FUENTES, L.; Household processing factors of acrinathrin, fipronil, kresoxim-methyl and pyridaben residues in green beans, *Food Contr.*, 2014, **35**, 146.

ANTONIO, J. J. G.; Desenvolvimento e validação metrológica de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de ciclofenil após derivação fotoquímica, (Dissertação de mestrado na área DE Metrologia para Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2012, 114.

AMORNTHAMMARONG, N.; ZHANG, J. Z.; ORTNER, P. B.; An autonomous batch analyzer for the determination of trace ammonium in natural waters using fluorometric detection, *Anal. Methods*, 2011, **3**, 1501.

ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G.; The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*, *J. Antibiot.*, 1977, **30**, 806.

ASHOURNIA, M.; ALIAKBAR, A.; Determination of Se (IV) in natural waters by adsorptive stripping voltammetry of 5-nitropiazselenol, *J. Hazardous Mat.*, 2010, **174**, 788.

BAI, X.; YE, Z.-F.; LI, Y.-F.; ZHOU, L.-C.; YANG L.-Q.; Preparation of crosslinked macroporous PVA foam carrier for immobilization of microorganisms, *Proc. Biochem.*, 2010, **45**, 60.

BALBA, H.; Review of strobilurin fungicide chemicals, *J. Environ. Sci. Health, Part b*, 2007, **42**, 441.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.; Electrochemical methods: fundamentals and applications, 2. ed., New York: John Wiley & Sons, 2001.

BAREK, J.; FOGG, A. G.; MUCK, A.; Polarography and voltammetry at mercury electrodes, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2010, **31**, 2001.

BARTLETT, D.W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PAR-DOBRZANSKI, B.; The Strobilurin Fungicides, *Pest Manage. Sci.*, 2002, **58**, 649.

BATTAGLIN, W.; FAIRCHILD, J.; Potential toxicity of pesticides measured in midwestern streams to aquatic organisms, *Water Sci.Technol.*, 2002, **45**, 95.

BEMPELOU, E .D.; LIAPIS K.S.; Validation of a multi-residue method for the determination of pesticide residues in apples by gas chromatography, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2006, **86**, 63.

BO, H. B.; WANG, J. H.; GUO, C. H.; QIN, R.; LU, X. Y.; Determination of strobilurin fungicide residues in food by gas chromatography-mass spectrometry, *Chinese J. Anal. Chem.*, 2008, **36**, 1471.

BRASIL. Poder Executivo. Decreto nº 4074, Seção 1. 4 de Janeiro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. 10 de Agosto de 2009, 128.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. 29 de Setembro de 2009, 50.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. 11 de Fevereiro de 2010, 55.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. 21 de Janeiro de 2011, 63.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. 5 de Outubro de 2012, 90.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIO, L. C.; Amperometric batch injection-analysis - theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous-flow, *Electroanalysis*, 1995, **7**, 225.

BRETT, C. M. A.; FUNGARO, D. A.; MORGADO, J. M.; GIL, M. H.; Novel polymer-modified electrodes for batch injection sensors and application to environmental analysis, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **468**, 26.

BRETT, C. M. A.; FUNGARO, D. A.; Poly(ester sulphonic acid) coated mercury thin film electrodes: characterization and application in batch injection analysis stripping voltammetry of heavy metal ions, *Talanta*, 2000, **50**, 1223.

BURTON, C. V.; Artificial diamonds, *Nature*, 1905, **72**, 397.

BUSSY, U.; FERCHAUD-ROUCHER, F.; TEA, I.; KREMPF, M.; SILVESTRE, V.; BOUJTITA, M.; Electrochemical oxidation behavior of Acebutolol and

identification of intermediate species by liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochim. Acta*, 2012, **69**, 351.

CABRAS, P.; ANGIONI, A.; GARAU, V. L.; PIRISI, F. M.; BRANDOLINI, V.; Gas chromatographic determination of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipyrim, and tetraconazole in grapes, must, and wine, *J. AOAC Int.*, 1998, **81**, 1185.

CABRAS, P.; ANGIONI, A.; GARAU, V. L.; PIRISI, F. M.; ESPINOZA, J.; MENDOZA, A.; CABITZA, F.; PALA, M.; BRANDOLINI, V.; Fate of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipyrim, and tetraconazole from vine to wine, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 3249.

CAMPESTRINI, I.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A.; Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine, *Electrochim. Acta*, 2010, **55**, 4970.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; AGUINAGA, N.; FÉREZ, G.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of strobilurin fungicides in fruit samples, *J. Chromatogr., A*; 2010, **1217**, 4529.

CHANNON, R. B.; NEWLAND, J. C.; BRISTOW, A. W. T.; RAY, A. D.; MACPHERSON, J. V.; Selective detection of hydrazine in the presence of excess electrochemically active pharmaceutical ingredients using boron doped diamond metal nanoparticle functionalised electrodes, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 2613.

CHEMSPIDER, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9111528.html> [acessado em abril de 2014].

CHEMSPIDER, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9223963.html> [acessado em abril de 2014].

CHRISTENSEN, H. B.; GRANBY, K.; Method validation for strobilurin fungicides in cereals and fruit, *Food Addit. Contam.*, 2001, **18**, 866.

DA SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection, *Food Chem.*, 2012, **133**, 200.

DEMETRIADES, D.; ECONOMOU, A.; VOULGAROPOULOS, A.; A study of pencil-lead bismuth-film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **519**, 167.

DRAGOE, D.; SPATARU, N.; KAWASAKI, R.; MANIVANNAN, A.; SPATARU, T.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A.; Detection of trace levels of Pb<sup>2+</sup> in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry, *Electrochim. Acta*, 2006, **51**, 2437.

ECONOMOU, A.; FIELDEN, P. R.; Selective determination of Ni(II) and Co(II) by flow injection analysis and adsorptive cathodic stripping voltammetry on a wall jet mercury film electrode, *Talanta*, 1998, **46**, 1137.

ECONOMOU, A.; Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 334.

ESTEVE-TURRILLAS, F. A.; MERCADER, J. V.; AGULLÓ, C.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ABAD-FUENTES, A.; Development of immunoaffinity columns for pyraclostrobin extraction from fruit juices and analysis by liquid chromatography with UV detection, *J. Chromatogr., A*; 2011, **1218**, 4902.

FAO/WHO, Pesticide residues in food 2006, *Meeting on pesticide Residues - Rome Italy, oct 3-12, 2006*, 107.

FELIX, F. S.; BARROS, R. C. M.; LICHTIG, J.; FERREIRA, N. G.; MASINI, J. C.; Determinação de manganês em material particulado atmosférico de ambientes de trabalho utilizando eletrodo de diamante dopado com boro e voltametria de onda quadrada com redissolução catódica, *Quím. Nova*, 2005, **28**, 1000.

FERNANDES, J. C. B.; GARCIA, C. A. B.; GRANDIN, L. A.; NETO, G. O.; GODINHO, O. E. S.; Determination of Acetylsalicylic Acid in Tablets with Salicylate Ion Selective Electrode in a Batch Injection Analysis System, *J. Braz. Chem. Soc.*, 1998, **9**, 249.

FERREIRA, S. L. C.; LEMOS, V. A.; MOREIRA, B. C.; COSTA, A. C. S.; SANTELLI, R. E.; An on-line continuous flow system for copper enrichment and determination by flame atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **403**, 259.

FERREIRA, L. M. C.; FELIX, F. S.; ANGNES, L.; Fast determination of ciclopirox in pharmaceutical products by amperometry in flow and batch injection systems, 2012, *Electroanalysis*, **24**, 961.

FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P.; Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes, *Talanta*, 2010, **81**, 346.

FILHO, A. M.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P.; Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC–MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples, *Microchem. J.*, 2010, **96**, 139.

FISCHER, J.; BAREK, J.; YOSYPCHUK, B.; NAVRATIL, T.; Voltammetric Determination of Trace Amounts of 2-Methyl-4, 6-Dinitrophenol at a Silver Solid Amalgam Electrode, *Electroanalysis*, 2006, **18**, 127.

FISHEL, F. M.; Pesticide Toxicity Profile: Strobilurins Pesticides, *U. F. IFAS Extention*, 2005, 67.

FRANK, A. L.; MCKNIGHT, R.; KIRKHORN, S. R.; GUNDERSON, S.; Issues of agricultural safety and health, *Annu. Rev. Public Health*, 2004, **25**, 225.

FRÓES, M. B. R.; SANTOS, L. F. S.; NAVICKIENE, S.; Multi-residue determination of pesticides in açai tropical fruit (*Euterpe oleracea*) by matrix solid-phase dispersion combined with liquid chromatography, *Food Anal. Methods*, 2013, **6**, 328.

GARAY, F.; Adsorptive square wave voltammetry of metal complexes. Effect of ligand concentration: Part I. Theory, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **505**, 100.



GARRY, V. F.; Pesticides and Children, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, **198**, 152.

GIMENES, D. T.; PEREIRA, P. F.; CUNHA, R. R.; DA SILVA, R. A. B.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; A simple strategy to improve the accuracy of the injection step in batch injection analysis systems with amperometric detection, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 1805.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, R. M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J.; Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid–liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*; 2009, **1216**, 6033.

GOSSER, D. K.; Cyclic Voltammetry: Simulation and analysis of reaction mechanisms, 1. ed., New York: John Wiley Professio, 1993.

GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B.; The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes, *Trends Anal. Chem.*, 1999, **18**, 525.

GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L. M.; FLETCHER, D.; ROBINSON, J.; Instrumental methods in electrochemistry, Chichester: Ellis Horwood Limited, 1985.

HOWELL, J. O.; GONCALVES, J. M.; AMATORE, C.; KLASINC, L.; WIGHTMAN, R. M.; KOCHI, J. K.; Electron transfer from aromatic hydrocarbons and their  $\pi$ -complexes with metals. Comparison of the standard oxidation potentials and vertical ionization potentials, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 3968.

HOWELL, C. C.; SEMPLE, K. T.; BENDING, G. D.; Isolation and characterisation of azoxystrobin degrading bacteria from soil, *Chemosphere*, 2014, **95**, 370.

HUTTON, E. A.; OGOREVC, B.; HOČEVAR, S. B.; WELDON, F.; SMYTH, M. R.; WANG, J.; An introduction to bismuth film electrode for use in cathodic electrochemical detection, *Electrochem. Commun.*, 2001, **3**, 707.

ILO. World Day for safety and Health at Work 2005, A background paper. Geneva: ILO – International Labour Organization, [http://www.ilo.org/public/english/bureau/inf/download/sh\\_background.pdf](http://www.ilo.org/public/english/bureau/inf/download/sh_background.pdf) [acessado em março de 2014].

ILO/WHO. Joint press Release; Number of Work related Accidents and Illness Continues to Increase in 2005: ILO – International Labour Organization, <http://www.ilo.org/public/english/bureau/inf/pr/2005/21.htm> [acessado em março de 2014].

INIESTA, J.; MICHAUD, P. A.; PANIZZA, M.; CERISOLA, G.; ALDAZ, A.; COMNINELLIS, C. H.; Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode, *Electrochim. Acta*, 2001, **46**, 3573.

JAMIN, E. L.; BONVALLOT, N.; TREMBLAY-FRANCO, M.; CRAVEDI, J.-P.; CHEVRIER, C.; CORDIER, S.; DEBRAUWER, L.; Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC–HRMS: an exposomics tool for human exposure evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 1149.

JEWESS, P.; LEE, P.; NICOLSS, P.; PLIMMER, J.; Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides, *Royal Soc. of Chemistry*, 1999, 1.

JORGE, E. O.; ROCHA, M. M.; FONSECA, I. T. E.; NETO, M. M. M.; Studies on the stripping voltammetric determination and speciation of chromium at a rotating-disc bismuth film electrode, *Talanta*, 2010, **81**, 556.

KEITH, S. D.; Pesticides Usage in the United States: History, Benefits, Risks and Trehd, *Department of Agriculture Extension Service National Agriculture Pesticide Impact Assessment Program Special Project*, 2000, **1121**, 1.

LAGUNAS-ALLUÉ, L.; MARTÍNEZ-SORIA, M.-T.; SANZ-ASENSIO, J.; SALVADOR, A.; FERRONATO, C.; CHOVELON, J. M.; Degradation intermediates and reaction pathway of pyraclostrobin with TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Appl. Catal., B*; 2012, **115-116**, 285.

LAGUNAS-ALLUÉ, L.; SANZ-ASENSIO, J.; MARTÍNEZ-SORIA, M.-T.; Comparison of four extraction methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*; 2012, **1270**, 62.

LIANG, P.; WANG, F.; WAN, Q.; Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of four fungicides in environmental water samples, *Talanta*, 2013, **105**, 57.

LIANG, P.; LIU, G.; WANG, F.; WANG, W.; Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the determination of strobilurin fungicides in fruit juice samples, *J. Chromatogr., B*; 2013, **926**, 62.

LIMA, A. P.; STEFANO, J. S.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, **23**, 1834.

LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; DA SILVA, L. M.; PEREIRA, P. RICHTER, E. M.; DOS SANTOS, W. T. P.; Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos, *Quim. Nova*, 2013, **36**, 1296.

LOVRIĆ, M.; BRANICA, M.; Square-wave voltammetric peak current enhancements by adsorption and reversibility of the redox reaction, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **226**, 239.

LOVRIĆ, M.; KOMORSKY-LOVRIĆ, S.; Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant, *J. Electroanal. Chem.*, 1988, **248**, 239.

LU, J.; CHEN, Q.; DIAMOND, D.; WANG, J.; Inverted poly (vinyl chloride)–liquid membrane ion-selective electrodes for high-speed batch injection potentiometric analysis, *Analyst*, 1993, **118**, 1131.

LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C.; Revisão anual de patologia de plantas, Passo Fundo, 1999, **7**, 103.

MAELE-FABRY, G. V.; DUHAYON, S.; MERTENS, C.; LISON, D.; Risk of leukemia among pesticide manufacturing workers. A review and meta-analysis of cohort studies, *Environ. Res.*, 2008, **106**, 121.

MELO, S. A. S.; TROVO, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P.; Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados, *Quim. Nova*, 2009, **32**, 188.

MIKKELSEN, Ø.; SCHRØDER, K. H.; An oscillating and renewing silver electrode for Cadmium and Lead detection in differential pulse stripping voltammetry, *Electroanalysis*, 2001, **13**, 687.

MIGUEL, E. M.; PACHECO, W. F.; CUNHA, A. L. M.; FARIAS, P. A. M.; AUCÉLIO, R. Q.; Bismuth film anodic stripping voltammetry for the determination of lead in kerosene: A metrological study, *Electroanalysis*, 2010, **22**, 1505.

MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIĆ, S.; LOVRIĆ, M.; Square-wave voltammetry: Theory and Application, Berlin: Springer-Verlag, 2007.

MOYO, M.; OKONKWO, J. O.; AGYEI, N. M.; Recent advances in polymeric materials used as electron mediators and immobilizing matrices in developing enzyme electrodes, *Sensors*, 2012, **12**, 923.

NIGOVIĆ, B.; SIMUNIĆ, B.; HOCEVAR, S.; Voltammetric measurements of aminosalicylate drugs using bismuth film electrode, *Electrochim. Acta*, 2009, **54**, 5678.

NOGA, S.; FELINGER, A.; BUSZEWSKI, B.; Hydrophilic interaction liquid chromatography and per aqueous liquid chromatography in fungicides analysis, *J. AOAC Int.*, 2012, **95**, 1362.

NUWER, M. J.; O'DEA, J. J.; OSTERYOUNG, J.; Analytical and kinetic investigations of totally irreversible electron transfer reactions by square-wave voltammetry, *Anal. Chim. Acta*, 1991, **251**, 13.

PACHECO, W. F. ; MIGUEL, E. M. ; RAMOS, G. V.; CARDOSO, C. E.; FARIAS, P. A. M.; AUCÉLIO, R. Q.; Use of hydrogen peroxide to achieve interference-free stripping voltammetric determination of copper at the bismuth-film electrode, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **625**, 22.

PACHECO, W. F.; DOYLE, A.; DUARTE, D. R. A.; FERRAZ, C. S.; FARIAS, P. A. M.; AUCELIO, R. Q.; Square-wave adsorptive stripping voltammetry for trace determination of dimoxystrobin and azoxystrobin in potatoes and grapes, *Food Anal. Methods*, 2010, **3**, 205.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q., Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos, *Rev. Virtual Quim.*, 2013, **5**, 516.

PANG, G.-F.; FAN, C.-L.; LIU, Y.-M.; CAO, Y.-Z.; ZHANG, J.-J.; FU, B.-L.; LI, X.-M.; LI, Z.-Y.; WU, Y.-P.; Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Addit. Contam.*, 2006, **23**, 777.

PANIZZA, M.; MICHAUD, P. A.; CERISOLA, G.; COMNINELLIS, C. H.; Anodic oxidation of 2-naphthol at boron-doped diamond electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **507**, 206.

PEREIRA, P. F., MARRA, M. C.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; Fast batch injection analysis system for on-site determination of ethanol in gasohol and fuel ethanol, *Talanta*, 2012, **90**, 99.

PSD - Pesticides Safety Directorate, PDS Databases. <https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs/> [Acessado em Abril 2013].

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L.; Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 513.

RAVELO-PÉREZ, L. M. R.; BORGES, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, M. A. R.; Multiple Pesticide Analysis in Wine by MECK Combined with Solid-Phase Microextraction and Sample Stacking, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 4072.

RILEY, T.; WATSON, A.; Polarography and other voltammetric methods, London: John Willey & Sons, 1987.

RODRIGUES, M. A. T., Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC, (Dissertação de mestrado na área de Agronomia), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2005, 242.

SAEZ, C.; CANIZARES, P.; LLANOS, J.; RODRIGO, M. A.; The Treatment of Actual Industrial Wastewaters Using Electrochemical Techniques, *Electrocatal.*, 2013, **4**, 252.

SANNINO, A.; BOLZONI, L.; BANDINI, M.; Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables, *J. Chromatogr., A*; 2004, **1036**, 161.

SCHRAMM, G.; STEGLICH, W.; ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; Antibiotics from basidiomycetes, III. Strobilurin A and B, antifungal metabolites from *Strobilurus tenacellus*, *Chemische Berichte*, 1978, **111**, 2779.

SIRIANGKHAWUT, W.; PENCHAREE, S.; GRUDPAN, K.; JAKMUNEE, J.; Sequential injection monosegmented flow voltammetric determination of cadmium and lead using a bismuth film working electrode, *Talanta*, 2009, **79**, 1118.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; Princípios de análise instrumental, 5. ed., Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUZA, D., MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos, *Quim. Nova*, 2003, **26**, 81.

SOUZA, C. F.; CUNHA, A. L. M. C.; AUCÉLIO, R. Q.; Determination of picoxystrobin and pyraclostrobin by mekc with on-line analyte concentration, *Chromatographia*, 2009, **70**, 1461.

SPADOTTO, A. C.; Abordagem Interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos, Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, <http://www.fmr.edu.br/npi/003.pdf> [acessado em março de 2014].

SWAIN, G. M.; RAMESHAM, R.; The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 345.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R.; Eletroquímica: Princípios e aplicações, São Paulo: Edusp, 2005.

THAVARUNGKUL, P.; SUPPAPITNARM, P.; KANATHARANA, P.; MATTIASSON, B.; Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection, *Biosens. Bioelectron.*, 1999, **14**, 19.

TOMLIN, C. D. S., The pesticide manual: a world compendium, 11 ed., Farnham: British Crop Protection Council, 1997.

TORMIN, T. F., GIMENES, D. T. ; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection, *Talanta*, 2011, **85**, 1274.

TORMIN, T. F., CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A.; Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection, *Talanta*, 2012, **99**, 527.

VIRE, J. C.; KAUFFMANN, J. M.; PATRIARCHE, G. J.; Adsorptive stripping voltammetry applied to drug analysis: A powerful tool, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1989, **7**, 1323.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; MARTÍNEZ-CASTILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*; 2009, **1216**, 140.

VIÑAS, P.; MARTÍNEZ-CASTILLO, N.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.; Liquid–liquid microextraction methods based on ultrasound-assisted emulsification and single-drop coupled to gas chromatography–mass spectrometry for determining strobilurin and oxazole fungicides in juices and fruits, *J. Chromatogr., A*; 2010, **1217**, 6569.

ZAVÁZALOVÁ, J.; DEJMKOVÁ, H.; BAREK, J.; PECKOVÁ, K.; Voltammetric and amperometric determination of mixtures of aminobiphenyls and aminonaphthalenes using boron doped diamond electrode, *Electroanalysis*, 2012, **25**, 253.

ZHANG, R. J.; LEE, S. T.; LAM, Y. W.; Characterization of heavily boron-doped diamond films, *Diamond Relat. Mater.*, 1996, **5**, 1288.

ZHANG, W.-B.; YANG, X.-A.; ZHU, H.-X.; DONG, Y.-P.; A novel method for picoxystrobin determination by flow injection chemiluminescence assistance with ultrasonic treatment, *Anal. Methods*, 2012, **4**, 270.

ZHU, J.; DAI, X. J.; FANG, J. J.; ZHU, H. M.; Simultaneous detection and degradation patterns of kresoxim-methyl and trifloxystrobin residues in citrus fruits by HPLC combined with QuEChERS, *J. Environ. Sci. Health, Part b*, 2013, **48**, 470.

ZONG, P.; NAGAOSA, Y.; Determination of antimony (III) and (V) in natural water by cathodic stripping voltammetry with in-situ plated bismuth film electrode, *Microchim. Acta*, 2009, **166**, 139.

WANG, J.; TAHA, Z.; Batch injection analysis, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1053.

WANG, J.; RAYSON, G. D.; TAHA, Z.; Batch injection analysis using fiber-optic fluorometric detection, *Applied Spectroscopy*, 1992, **46**, 107.

WANG, J.; ANGNES, L.; Batch injection spectroscopy, *Anal. Letters*, 1993, **26**, 2329.

WANG, J.; TIAN, B.; Mercury-free disposable lead sensors based on potentiometric stripping analysis of gold-coated screen-printed electrodes, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1529.

WANG, J.; LU, J. M.; HOCEVAR, S. B.; FARIAS, P. A. M.; OGOREVC, B.; Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 3218.



WANG, J.; HOCEVAR, S. B.; DEO, R. P.; OGOREVC, B.; Carbon-fiber microsensor for in vivo monitoring of trace zinc (II) based on electrochemical stripping analysis, *Electrochem. Commun.*, 2001, **3**, 352.

WANG, Y.; ZHI, J.; LIU, Y.; ZHANG, J.; Electrochemical detection of surfactant cetylpyridinium bromide using boron-doped diamond as electrode, *Electrochem. Commun.*, 2011, **13**, 82.

WARE, G. W.; Fundamentals of pesticides: a selfinstruction guide, 3 ed., California: Thomson Publications Fresno, 1991, 307.

WEI, M.; ZENG, G.; LU, Q.; Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres, *Microchim. Acta*, 2014, **181**, 121.

WEINBERG, N. L.; WEINBERG, H. R.; Electrochemical oxidation of organic compounds, *Chem. Rev.*, 1968, **68**, 449.

WENG, J.; ZHANG, Z.; SUN, L.; WANG, J. A.; High sensitive detection of cancer cell with a folic acid-based boron-doped diamond electrode using an AC impedimetric approach, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, **26**, 1847.

YANG, M.; ZHANG, Z.; HU, Z.; LI, J.; Differential pulse anodic stripping voltammetry detection of metallothionein at bismuth film electrodes, *Talanta*, 2006, **69**, 1162.

YPEMA, H. L.; GOLD, R. E.; Kresoxim-methyl: Modification of natural occurring compound to a new fungicide, *Plant Dis.*, 1998, **83**, 4.