



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
GRUPO DE ELETROQUÍMICA E CORROSÃO

FRANCISCO WILLIAN DE SOUZA LUCAS

*DETECÇÃO ELETROANALÍTICA E ESTUDO DO MECANISMO
DE OXIDAÇÃO DO PESTICIDA DIMETOMORFE*

FORTALEZA-CE, JULHO DE 2012

FRANCISCO WILLIAN DE SOUZA LUCAS

***DETECÇÃO ELETROANALÍTICA E ESTUDO DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO
PESTICIDA DIMETOMORFE***

Dissertação de Mestrado submetida à
Comissão Julgadora do Curso de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal do Ceará, como um dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Química – Área de concentração Química
Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

L966d Lucas, Francisco Willian de Souza.
Detecção eletroanalítica e estudo do mecanismo de oxidação do pesticida dimetomorfe /

Francisco Willian de Souza Lucas. – 2012.
54 f. : il. color.

Dissertação (dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Química Analítica.
Orientação: Profa. Dra. Adriana Nunes Correia.

1. Eletroquímica. 2. Química Analítica. I. Título.

CDD 547

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Francisco Willian de Souza Lucas
Francisco Willian de Souza Lucas

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 17/07/2012

EXAMINADORES:

Adriana Nunes Correia
Profa. Dra. Adriana Nunes Correia
Universidade Federal do Ceará – UFC

Pedro de Lima Neto
Prof. Dr. Pedro de Lima Neto
Universidade Federal do Ceará – UFC

Giancarlo Richard Salazar Banda
Prof. Dr. Giancarlo Richard Salazar Banda
Universidade Tiradentes – UNIT

*A Deus, aos meus pais Luciano Lucas e Claudia
Souza e aos meus irmãos Saulo e Luan Lucas.*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus por me permitir a vida, o conhecimento da sua vontade e dar-me a melhor família.

A minha família por me compreender, por me ajudar nos momentos difíceis e estimular-me a crescer. Em especial, a minha mãe Claudia que propiciou uma sólida formação moral e que, apesar de ser humana, é uma perfeita mãe e amiga e ao meu pai Luciano que me transmitiu sua personalidade e sua moralidade, além de ser sempre companheiro e mestre.

À Universidade Federal do Ceará – UFC, por me propiciar o conhecimento, a oportunidade de graduação e pós-graduação e por ter sido um ambiente suficientemente completo para a minha formação profissional.

A minha orientadora, Profa. Dra. Adriana N. Correia, por ter paciência com a minha ansiedade e complexidade, por corrigir minunciosamente todas as minhas produções acadêmicas durante o mestrado, compartilhar comigo seus imensuráveis conhecimentos e por ser uma pessoa admirável.

Ao Grupo de Eletroquímica e Corrosão – GELCORR [e agregados] (Belmino, Pedro, Adriana, Naftali, Othon, Moisés, Lemuel, Luanna, Avelino, Évilyn, Sâmeque, Thiago Mielle, Vanessa, Wirley, Roger, Rafael, Amanda, Leandro, Cristina, J. Junior, Laudenor, Cristiane, Célia, Luan, Jefferson e Ramon...) por me acolher como filho e irmão, por me ensinar (não somente assuntos acadêmicos, mas moralidade, ética e profissionalismo) e participarem dos meus momentos de trabalho (até de madrugada) e diversão.

Àqueles que me ajudaram diretamente na produção deste estudo, Jefferson (cálculos químico-computacionais), André Luiz e profa. Elisane (experimentos cromatográficos), profa. Adriana e prof. Hugo Suffredini (elucidação do comportamento “paranormal” do eletrodo) e profa. Janete Soares (discussões mecanística).

Aos meus professores de graduação e pós-graduação, por me concederem crescimento acadêmico-profissional, além de desempenharem com louvor a docência.

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente.” (Isaac Newton)

RESUMO

O Dimetomorfe (DIM) pertence à classe dos fungicidas morfolínicos, tem ação sistêmica, é persistente nas matrizes alimentícias e em solos de plantio onde foi aplicado e é um possível interferente endócrino, o que justifica o desenvolvimento de metodologias para detecção e quantificação desse composto. No estudo eletroquímico pode-se observar que DIM apresentou processo eletroquímico controlado por difusão e caracterizado como *quasi-reversível*, com potencial de eletrodo em torno de 1,28 V vs. eletrodo de Ag/AgCl/Cl⁻(KCl sat.), referente à transferência de dois elétrons. No desenvolvimento da metodologia eletroanalítica utilizando voltametria de onda quadrada e o eletrodo de diamante dopado com boro, constatou-se que as melhores condições experimentais e voltamétricas foram obtidas em tampão Britton-Robinson pH 3, como eletrólito de suporte, frequência de aplicação dos pulsos de potencial de 30 s⁻¹, amplitude dos pulsos de potencial de 50 mV e incremento de potencial de 2 mV. Partindo dessas condições foi possível desenvolver uma metodologia analítica com faixa linear de 4,57x10⁻⁶ a 3,78x10⁻⁴ mol L⁻¹, limite de detecção de 3,11x10⁻⁷ mol L⁻¹, limite de quantificação de 1,04x10⁻⁶ mol L⁻¹, repetibilidade de 0,13% (n = 10) e reproduzibilidade de 0,92% (n = 5). A avaliação da interferência das espécies iônicas presentes no eletrólito de suporte e do Mancozebe (MZB), presente em coformulações de DIM, na exatidão e na precisão da metodologia mostrou que essas espécies exercem pouca influência. A recuperação em eletrólito foi de 97,25 ± 0,70 %, com confiança de 95%, e BIAS de 2,74 %. O percentual de interferência do MZB, em diferentes concentrações, foi menor que 10%. A aplicação da metodologia proposta na determinação do DIM em uva *in natura* e em vinho tinto apresentou percentual de recuperação de 101,0 ± 12,1% e 105,1 ± 10,8% com confiança de 95%, respectivamente, e BIAS menor que 6%. Baseando-se nas informações químico-computacionais, pode-se inferir que o sítio de oxidação do DIM é na dupla ligação não aromática. Os dados obtidos por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa levaram à conclusão que a natureza do substrato eletródico não interfere no mecanismo global da reação de eletrooxidação do DIM, sendo formado o (4-clorofenil)-(3,4-dimetoxifenil)metanona como produto majoritário.

Palavras-chave: Eletrodo de diamante dopado com boro. Voltametria de onda quadrada. Dimetomorfe. Estudos químico-computacionais. Estudo mecanístico.

ABSTRACT

Dimethomorph (DIM) belongs to the class of morpholinic fungicides, it has systemic action, it is persistent in food matrices and in planting soils where was applied and a possible endocrine interferent, justifying the development of methodologies for detection and quantification of this compound. In the electrochemical study can be seen that the DIM had electrochemical process diffusion-controlled and characterized as *quasi-reversible*, with electrode potential of approximately 1.28 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻_(KCl sat.) electrode and involving two electrons transfer. In the development of electroanalytical methods using the square-wave voltammetry and the boron-doped diamond electrode, it was found that the best experimental and voltammetric conditions were obtained in Britton-Robinson buffer pH 3, as supporting electrolyte, pulse potential frequency of 30 s⁻¹, square-wave amplitude of 50 mV and potential step increment of 2 mV. From these conditions it was possible to develop an analytical method with a linear range from 4.57x10⁻⁶ to 3.78x10⁻⁴ mol L⁻¹, detection limit of 3.11x10⁻⁷ mol L⁻¹, quantification limit of 1.04x10⁻⁶ mol L⁻¹, 0.13% of repeatability (n = 10) and 0.92% of reproducibility (n = 5). The evaluation of the interference of the ionic compounds present in the supporting electrolyte and the Mancozebe (MZB), present in DIM co-formulations, in the accuracy and precision of the methodology showed that these species have little influence. The recovery in electrolyte was of 97.25 ± 0.70%, with 95% confidence, and BIAS of 2.74%. The percentage of MZB interference, in different concentrations, was less than |10%. The application of the proposed methodology for determining of the DIM in fresh grapes and red wine showed a percent recovery equal to 101.0 ± 12.1% and 105.1 ± 10.8% with 95% confidence, respectively, and BIAS less than 6 %. Based on the quantum-chemicals information, we can infer that the site of oxidation of DIM is the non-aromatic double bond. The data obtained by gas chromatography-mass spectrometry led to the conclusion that the electrodic substrate nature does not interfere in the overall mechanism of the DIM electrooxidation reaction, in which is formed the (4-chlorophenyl)-(3,4-dimethoxyphenyl)methanone as major product.

Keywords: Boron-doped diamond electrode. Square-wave voltammetry. Dimethomorph. Quantum-chemical study. Mechanistic study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Estrutura química do Dimetomorfe com a indicação dos A) isômero E e B) isômero Z.	3
Figura 2 - Estrutura química do A) Mancozebe (sendo x/y = 11), B) Clorotalonil, C) Ditianon e D) Folpet.	4
Figura 3 - Fluxograma do preparo das amostras de uva <u>in natura</u> e vinho tinto.	12
Figura 4 - Voltamogramas cíclicos de $DIM\ 3,44 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com velocidade de varredura de $50\ mV\ s^{-1}$.	15
Figura 5 - Voltamogramas cíclicos para $DIM\ 3,44 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3 em diferentes velocidades de varredura.	16
Figura 6 - A) Dependência do logaritmo da corrente de pico e B) do potencial de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial para a oxidação do $DIM\ 3,44 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3.	16
Figura 7 - Comportamento das correntes e dos potenciais de pico para $DIM\ 3,44 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ sobre EDDB em função do pH, em meio de tampão BR, empregando $f = 100\ s^{-1}$, $a = 50\ mV$ e $\Delta E_s = 2\ mV$.	18
Figura 8 - Comportamento eletroquímico de $DIM\ 3,34 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ sobre EDDB em função do eletrólito de suporte, em pH 3, empregando VOQ com $f = 100\ s^{-1}$, $a = 50\ mV$ e $\Delta E_s = 2\ mV$.	19
Figura 9 - Componentes de corrente do voltamograma de onda quadrada de $DIM\ 2,09 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ em meio de tampão BR pH 3, sobre EDDB, com $f = 100\ s^{-1}$, $\Delta E_s = 2\ mV$ e $a = 50\ mV$.	20
Figura 10 - Comportamento do potencial de pico <u>versus</u> o logaritmo da frequência (○) e da corrente de pico <u>versus</u> frequência (□), para a eletrooxidação de $DIM\ 2,09 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ sobre EDDB, em meio de tampão BR pH 3, empregando $a = 50\ mV$ e $\Delta E_s = 2\ mV$.	21
Figura 11 - A) Dependência da corrente de pico (□) e da razão entre corrente de pico e largura de meia altura (○) e B) do potencial de pico com a amplitude de pulso para $DIM\ 2,09 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ sobre EDDB, em meio de tampão BR pH 3, empregando $f = 100\ s^{-1}$ e $\Delta E_s = 2\ mV$.	22
Figura 12 - Relação entre corrente de pico e incremento de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada de $DIM\ 2,09 \times 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$ em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 100\ s^{-1}$ e $a = 50\ mV$.	23

- Figura 13 - A)** Voltamogramas de onda quadrada e **B)** curva analítica com as barras de erro ($n = 3$) para DIM em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com concentrações variando de $4,56 \times 10^{-6}$ a $4,91 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os parâmetros da VOQ utilizados foram: $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. 24
- Figura 14 -** Relação percentual do sinal de corrente, I (%), para DIM na ausência e na presença do interferente, MZB, em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. 27
- Figura 15 - A)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos no estudo de recuperação de DIM em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. **Inserção:** Relação entre corrente de pico e concentração de DIM para curva de recuperação. 28
- Figura 16 -** Voltamogramas de onda quadrada obtidos no estudo de recuperação de DIM em amostras de (A) uva in natura e (B) vinho tinto em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 20 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. **Inserção:** Relação entre corrente de pico e concentração de DIM para as respectivas curvas de recuperação. 29
- Figura 17 -** Distribuição dos orbitais ocupados de mais alta energia da molécula de DIM. **A)** isômero E **B)** isômero Z. Carbono (esfera cinza), hidrogênio (esfera branca), oxigênio (esfera vermelha), nitrogênio (esfera azul), cloro (esfera verde) e nuvem eletrônica do HOMO (azul e amarela). As setas apontam as regiões de predominância do HOMO; região da dupla ligação não aromática (vermelha), região do anel aromático trissubstituído (preta) e região da metoxila (verde). 31
- Figura 18 -** Voltamogramas cíclicos para DIM em meio de tampão BR pH 3 com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} sobre A) ECV e B) ADE. Linhas tracejadas para o branco e cheias para $[DIM] = 450 \text{ mg L}^{-1}$. 32
- Figura 19 -** Cromatogramas obtidos por CG/EM para os estudos de eletrólise exaustiva do DIM sobre as superfícies de A) ECV, B) ADE e C) EDDB. 34
- Figura 20 -** Esquema da reação de eletrooxidação do Dimetomorfe. 35

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Procedência, fórmula química e pureza dos reagentes utilizados nos experimentos.	7
Tabela 2 - Figuras de mérito para a determinação de DIM sobre EDDB empregando Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) em meio de tampão BR pH 3.	25
Tabela 3 - Resultados de recuperação para DIM sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3.	28
Tabela 4 - Resultados de recuperação para DIM em uva <u>in natura</u> e vinho tinto em meio de tampão BR pH 3 como eletrólito de suporte.	30
Tabela 5 - Cargas de Mulliken dos átomos dos isômeros E e Z do DIM com numeração referente à Figura 1.	31
Tabela 6 - Identificação dos compostos observados nos cromatogramas da Figura 19 seguido dos tempos de retenção e do valor do íon molecular.	34

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 Pesticidas.....	1
I.2 Determinação analítica de pesticidas.....	2
I.3 Dimetomorfe.....	3
II. OBJETIVOS	6
II.1 Objetivo geral.....	6
II.2 Objetivos específicos.....	6
III. MATERIAIS E MÉTODOS	7
III.1 Reagentes e soluções.....	7
III.1.1 Reagentes.....	7
III.1.2 Soluções.....	8
III.1.2.1 Soluções tampão citrato/ácido cítrico e tampão dihidrogenofosfato/ácido fosfórico.....	8
III.1.2.2 Solução tampão Britton-Robinson.....	8
III.1.2.3 Solução tampão McIlvaine.....	8
III.1.2.4 Soluções estoque de Dimetomorfe.....	9
III.1.2.5 Solução de ácido perclórico/perclorato de sódio.....	9
III.1.2.6 Soluções de Mancozebe.....	9
III.2 Sistema eletroquímico.....	9
III.2.1 Eletrodo de trabalho.....	10
III.2.2 Eletrodo de referência.....	10
III.2.3 Eletrodo auxiliar.....	10
III.3 Metodologia eletroanalítica.....	10
III.3.1 Determinação de Dimetomorfe em uva <i>in natura</i> e vinho tinto.....	11
III.4 Estudo mecanístico.....	13
III.4.1 Estudo químico-computacional.....	13
III.4.2 Eletrólise exaustiva de DIM a potencial constante seguida de análises cromatográficas.....	13

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
IV.1 Voltametria Cíclica.....	15
IV.1.1 Avaliação da eletroatividade, caráter adsortivo e mecanismo de transporte de massa do DIM.....	15
IV.2 Voltametria de Onda Quadrada.....	17
IV.2.1 Efeito do pH do meio.....	17
IV.2.2 Efeito do eletrólito de suporte.....	18
IV.2.3 Estudo dos parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada.....	19
IV.2.3.1 Estudo das componentes de corrente.....	20
IV.2.3.2 Estudo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial.....	21
IV.2.3.3 Estudo da amplitude dos pulsos de potencial.....	22
IV.2.3.4 Estudo do incremento de potencial.....	23
IV.3 Construção da curva analítica.....	24
IV.4 Estudo de interferente.....	26
IV.5 Estudos de recuperação de DIM em eletrólito de suporte.....	27
IV.6 Determinação de Dimetomorfe em uva <i>in natura</i> e vinho tinto.....	29
IV.7 Estudo mecanístico.....	30
IV.7.1 Estudo químico-computacional.....	31
IV.7.2 Eletrólise exaustiva de DIM a potencial constante seguida de análises cromatográficas.....	32
V. CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
APÊNDICE I: Espectros de massa dos compostos	40
APÊNDICE II: Proposição mecanística da eletrooxidação do DIM	42

I. INTRODUÇÃO

I.1 Pesticidas

Pesticidas, como definição mais abrangente, são substâncias ou misturas de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doença humana ou animal, as espécies não desejadas de plantas ou animais que causam danos ou interferência na produção, transformação, armazenamento, transporte ou comercialização de alimentos, *commodities* agrícolas, madeira ou produtos de madeira. O termo também inclui substâncias desfolhantes, dessecantes, destinadas para combate a insetos domésticos, para uso como um regulador do crescimento de plantas e prevenção da queda prematura de frutos [1].

O processo histórico da evolução e diversificação da indústria química, que originou a indústria de pesticidas, iniciou-se na Primeira Guerra Mundial com a corrida armamentista para o desenvolvimento e produção de substâncias tóxicas utilizadas na guerra química. No fim da década de 1930 e ao longo da década de 1940, pesquisadores identificaram que as armas químicas eram letais contra pragas que atacavam as culturas agrícolas. No fim da Segunda Guerra Mundial, em 1945, a estratégia de crescimento das empresas do ramo químico baseou-se na migração para novos mercados nos quais pudessem aproveitar as moléculas desenvolvidas para fins bélicos. Foram criadas, então, empresas subsidiárias oriundas principalmente de grandes grupos químicos (Bayer, Basf, Hoescht, DuPont) voltadas à produção de pesticidas organossintéticos [2,3].

O crescimento e diversificação da produção agrícola incentivou o desenvolvimento de substâncias com poder pesticida cada vez maior [2–4]. A ampla e má utilização de pesticidas vem gerando um grande impacto ambiental, aumentando os níveis de resíduos presentes em águas, solos e alimentos [5,6], enquadrando essas substâncias no grupo dos “contaminantes emergentes”. Os “contaminantes emergentes” constituem um grupo de substâncias que tem características peculiares que os tornam ambientalmente destacáveis, devido aos seus níveis crescentes de utilização e contaminação [7].

O Brasil vem se destacando no âmbito dos agrotóxicos, uma vez que, em 2008, o país assumiu o posto de maior consumidor de pesticidas do mundo, ultrapassando os Estados Unidos. Em 2010, o levantamento do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) registrou o melhor ano de vendas da história desse setor. E, segundo as expectativas de Eduardo Daher, diretor-executivo da Associação Nacional de

Defesa Vegetal (ANDEF), o Brasil ultrapassará os Estados Unidos em vendas de agrotóxicos no ano de 2012 [8].

Como os pesticidas são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora, ser cancerígeno, entre outros efeitos maléficos para a biota em geral [2,3,6,7,9], o desenvolvimento de técnicas de quantificação de resíduos de diferentes pesticidas em águas, alimentos e solo tornou-se de fundamental importância [5,10]. Em consequência, nos últimos anos, tem crescido o número de estudos realizados com o intuito de desenvolver metodologias de análise mais precisas, sensíveis, que sejam realizáveis com tempo e custo inferiores e que gerem menos resíduos, utilizando reagentes menos danosos ao ambiente. Nessa linha de raciocínio, surgem os métodos de preparo de amostras denominados como QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) [10]. Essa metodologia foi introduzida por Anastassiades e colaboradores, em 2003, visando à simplificação de etapas de preparo da amostra, de modo que constitua um procedimento dinâmico, rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, que possa ser aplicado em qualquer laboratório [10,11]. Em geral, utiliza-se a menor quantidade possível de amostra e de solventes [10].

I.2 Determinação analítica de pesticidas

O método padrão de determinação de pesticidas é o cromatográfico, sendo que desde os anos de 1970 as técnicas de cromatografia gasosa (CG) acoplada a detectores clássicos, como detecção por captura de elétrons (DCE), detecção de nitrogênio e fósforo (DNF) e detecção por fotometria de chama (DFC) são utilizadas para detecção de resíduos de pesticidas. Porém, com o surgimento de novos pesticidas e com o requerimento de limites de detecção cada vez menores, esses sistemas não se mostraram tão eficientes. Recentemente, as técnicas de cromatografia gasosa e líquida acopladas a um ou dois espectrômetros de massa em sequência [CG(ou CL)-EM e CG(ou CL)-EM/EM, respectivamente] têm sido frequentemente utilizadas para determinação de multirresíduos de pesticidas em alimentos, solo e águas [10–14].

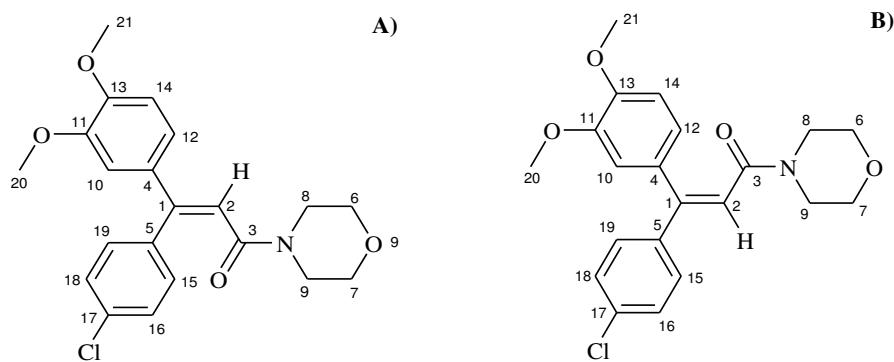
Como uma importante alternativa aos métodos complexos de determinação de pesticidas, como os cromatográficos, os procedimentos voltamétricos vêm ganhando destaque. As técnicas eletroanalíticas baseiam-se na relação entre medidas de quantidades elétricas (corrente, potencial ou carga) e parâmetros químicos [15], com vantagens, tais como:

curto tempo de medida (de fração de segundos a minutos) e possibilidade de análise em tempo real. As determinações podem ser realizadas em misturas heterogêneas que contenham materiais biológicos, proteínas, surfactantes, bem como em colóides e materiais particulados sem etapa de pré-tratamento (*clean-up*), além de apresentarem menor custo final por análise que as técnicas cromatográficas comumente utilizadas [15,16]. Entre as metodologias eletroanalíticas, o eletrodo de Diamante Dopado com Boro (EDDB) tem recebido muita atenção recentemente. Destacado por sua condutividade quase metálica, estabilidade eletroquímica e à corrosão, ampla janela de potencial de trabalho (pode ser maior que 3,5 V), inércia à adsorção de espécies químicas e a facilidade de limpeza, quando comparado com outras superfícies eletródicas [17,18]. O que o torna um dos melhores eletrodos para aplicação em métodos eletroanalíticos de determinação de espécies, em matrizes complexas, que têm facilidade de adsorver na superfície eletródica.

I.3 Dimetomorfe

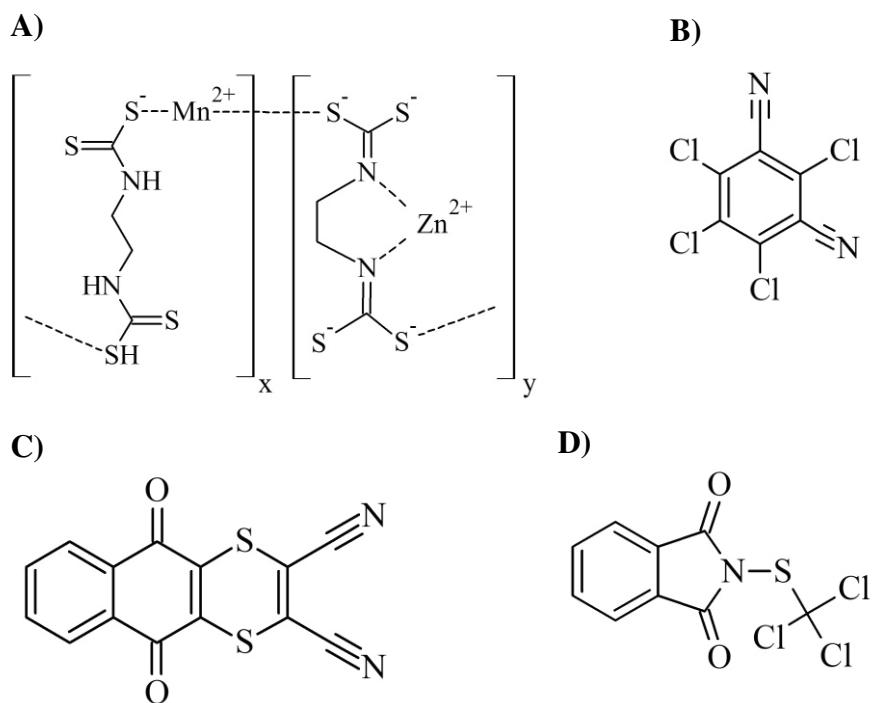
Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (do inglês, *Food and Agriculture Organization* - FAO), o Dimetomorfe, (E,Z)-4-[3-(4-clorofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acriloil]morfolina, massa molecular (MM) igual a 387,9 g mol⁻¹, é um fungicida sistêmico desenvolvido pela Shell Chemicals UK Ltda., para combate do fungo *Phytophthora infestans* [19], mas atualmente já se sabe que ele é efetivo contra diversos membros do grupo *Phytophthora*, bem como contra alguns da família dos *Peronosporaceae* [20]. Ele é um derivado do ácido cinâmico, pertencente à classe dos fungicidas morfolínicos e constituído por uma mistura dos isômeros E e Z na proporção de 48% e 52%, respectivamente, cujas fórmulas estruturais podem ser vistas na Figura 1 [19,20].

Figura 1 - Estrutura química do Dimetomorfe com a indicação dos A) isômero E e B) isômero Z.



As formulações comerciais do Dimetomorfe (DIM) mais comuns são as na forma de suspensões aquosas e de pulverizados e grânulos solúveis em água. Na maioria dos casos, para diminuir a resistência das pragas ao princípio ativo, o DIM é coformulado com outros fungicidas, tais como Mancozebe (o mais utilizado, com MM por monômero = 271,2 g mol⁻¹), Folpet (MM = 296,5 g mol⁻¹), Ditianon (MM = 296,3 g mol⁻¹), Clorotalonil (MM = 265,9 g mol⁻¹) e sulfato de cobre (MM = 159,6 g mol⁻¹), cujas estruturas moleculares podem ser vistas na Figura 2 (com exceção do sulfato de cobre) [19].

Figura 2 - Estrutura química do **A**) Mancozebe (sendo x/y = 11), **B**) Clorotalonil, **C**) Ditianon e **D**) Folpet.



O crescente uso do DIM em culturas de tomate, batata, uva, pepino e outros vegetais, aliado a sua ação sistêmica (ao ser aplicado nas folhas da planta, ele se distribui por meio da seiva para todos os tecidos do vegetal), tem incentivado o desenvolvimento de métodos de determinação de seus resíduos em vegetais, bebidas e solo [20]. Os métodos de quantificação desse pesticida em matrizes, em geral, envolvem procedimentos de extração com acetonitrila, acetona ou metanol seguido de partição com diclorometano, acetato de etila ou ciclohexano, limpeza (*clean-up*) por cromatografia de permeação em gel e pré-concentração, conduzindo a análise por CL-UV, CG-DNF, CG-EM ou CL-EM/EM, atingindo limite de detecção mínimo de 0,01 mg kg⁻¹ [19]. Em ensaios de campo supervisionados de plantações de uvas na Europa, resíduos de DIM foram medidos em vinho e outras frações de processamento a partir de uvas

tratadas com 4 a 10 aplicações foliares de 0,2 a 0,4 kg ha⁻¹ de DIM e colhidas na maturidade, geralmente de 28 a 42 dias após a última aplicação na maior parte dos casos. Foram encontrados resíduos desse pesticida no teor de 0,05 a 1,6 mg kg⁻¹ nas amostras de uva, de 0,19 a 2,2 mg kg⁻¹ no bagaço, de 0,02 a 1,52 mg kg⁻¹ no mosto e de 0,02 a 1,22 mg kg⁻¹ em vinhos [19]. Mayer-Helm e colaboradores determinaram, por meio de extração em fase sólida e utilizando CL-EM, a presença de DIM em tabaco e pepino pós colheita [21]. Čuš e colaboradores estudaram os metabólitos de DIM, entre outros pesticidas, em uvas durante o processo de vinificação, observando teores compreendidos entre 0,01 e 0,08 mg kg⁻¹ [22]. Foram estudadas, também, a dinâmica de degradação e de dissipação desse pesticida e metabólitos em diferentes matrizes como, pimenta, uva, cebolinha e solo [20]. Calza e colaboradores estudaram a degradação fotoinduzida do DIM sobre suspensão de TiO₂. Nesses experimentos foi utilizado CL/EM para a caracterização dos produtos de degradação e concluíram que a mineralização completa foi obtida com 14 horas de irradiação, porém gerava produtos tóxicos durante esse processo. Eles também propuseram o mecanismo de fotodegradação do DIM envolvendo a participação de radicais hidroxilas [23].

No âmbito nacional, apenas a aplicação foliar do DIM nas culturas de cebola (Limite Máximo de Resíduos, LMR = 0,1mg kg⁻¹), tomate (LMR = 0,03 mg kg⁻¹), batata (LMR = 0,03 mg kg⁻¹), melão (LMR = 0,03 mg kg⁻¹), uva (LMR = 2,0 mg kg⁻¹) e rosas (uso não alimentar) é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [24].

Pelo exposto, percebe-se a necessidade de desenvolvimento de uma metodologia eletroquímica de determinação do DIM em diferentes matrizes alimentícias *in natura* e derivados, como uva *in natura* e vinho tinto, já que os métodos consolidados e propostos são, comparativamente, mais caros, trabalhosos e demorados. Também, observa-se a necessidade de elucidação do mecanismo eletroquímico do DIM, já que não existe nenhum relato na literatura.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho é estudar o comportamento eletroquímico do Dimetomorfe (DIM) sobre a superfície do EDDB e os mecanismos de eletrooxidação, bem como desenvolver uma metodologia eletroquímica para a detecção e a quantificação desse pesticida em uva *in natura* e vinho tinto.

II.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento eletroquímico do DIM sobre a superfície do EDDB;
- Otimizar os parâmetros experimentais e voltamétricos para o desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a determinação do DIM;
- Estudar a interferência do Mancozebe (MZB) na determinação eletroanalítica do DIM;
- Desenvolver metodologia de extração, detecção e quantificação de DIM em uva *in natura* e vinho tinto;
- Por meio de Química Computacional/Química-Quântica, calcular a distribuição dos orbitais ocupados de mais alta energia e as cargas de Mulliken dos átomos do DIM, a fim de auxiliar a proposição mecanística;
- Promover a eletrólise exaustiva do DIM sobre a superfície do EDDB, do eletrodo de carbono vítreo (ECV) e do ânodo dimensionalmente estável (ADE) de Ti/Ti_{0,7}Ru_{0,3}O₂, analisando os produtos das eletrólises por cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM);
- Com base nos dados eletroquímicos, nos cálculos computacionais e nas análises cromatográficas, propor o mecanismo de eletrooxidação do DIM em diferentes superfícies, avaliando o efeito do substrato eletródico.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Reagentes e soluções

III.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Na Tabela 1, estão listadas as procedências e as respectivas fórmulas químicas de todos os reagentes utilizados para preparo das soluções.

Tabela 1 - Procedência, fórmula química e pureza dos reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fórmula Química	Procedência	Pureza (%)
Acetonitrila	CH ₃ CN	Vetec	99,8
Ácido acético glacial	CH ₃ COOH	Vetec	99,7
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Vetec	99,5
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Vetec	99,9
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Vetec	99,9
Ácido perclórico	HClO ₄	Vetec	99,0
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Vetec	98,0
Cloreto de potássio	KCl	Vetec	99,0
Citrato de sódio	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Synth	99,0
Dihidrógeno fosfato de sódio	NaH ₂ PO ₄	Vetec	98,0
Dimetomorfe	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	Fluka Analytical	99,0
Hidróxido de sódio	NaOH	Synth	99,0
Perclorato de sódio	NaClO ₄	Vetec	98,0
Mancozebe	C ₈ H ₁₂ N ₄ S ₈ Mn _X Zn _Y *	Fluka Analytical	96,4
Nitrogênio	N ₂	White Martins	99,996
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	Vetec	98,0

* x/y = 11

III.1.2 Soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada por um sistema Milli-Q (Millipore, Inc.), apresentando resistividade 18,2 MΩ cm. As pesagens foram realizadas utilizando uma balança analítica modelo 410 (Kern) com precisão de $\pm 0,1$ mg. As medidas de pH foram realizadas com o auxílio de um pHmetro modelo B474 (Micronal).

III.1.2.1 Soluções tampão citrato / ácido cítrico e tampão dihidrogenofosfato / ácido fosfórico

As soluções tampão 0,04 mol L⁻¹ foram preparadas a partir da mistura equimolar dos respectivos ácidos e bases conjugadas 0,04 mol L⁻¹. O ajuste do pH para o valor desejado foi realizado pela adição de NaOH 1 mol L⁻¹, sendo levada em consideração a faixa de pH de trabalho de cada tampão.

III.1.2.2 Solução tampão Britton-Robinson

A solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ foi preparada a partir da mistura equimolar de CH₃COOH, H₃BO₃ e H₃PO₄ 0,04 mol L⁻¹. O ajuste do pH para o valor desejado foi feito seguindo o mesmo procedimento realizado para os tampões anteriormente descritos. O poder tamponante desse tampão se estende de pH 2 a 12 e, por esse motivo, ele foi escolhido como eletrólito de suporte para estudo do efeito do pH no comportamento eletroquímico do DIM [25].

III.1.2.3 Solução tampão McIlvaine

A solução tampão McIlvaine 0,04 mol L⁻¹ foi preparada a partir da mistura equimolar de C₆H₈O₇ e NaH₂PO₄ 0,04 mol L⁻¹. O ajuste do pH para o valor desejado foi feito seguindo o mesmo procedimento realizado para os tampões anteriormente descritos. O poder tamponante desse tampão se estende de pH 2,2 a 8,0 [26].

III.1.2.4 Soluções estoque de Dimetomorfe

A solução estoque de DIM $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foi preparada pesando-se uma quantidade adequada do composto e solubilizando-a em acetonitrila. A solução foi mantida ao abrigo de luz e sob refrigeração (± 5 °C).

Para os estudos de eletrólise exaustiva, foi preparada uma solução estoque de DIM 5 g L⁻¹ dissolvendo 0,025 g de DIM em 5 mL de acetonitrila, sendo mantida ao abrigo de luz e sob refrigeração (± 5 °C).

III.1.2.5 Solução de ácido perclórico/perclorato de sódio

Nos experimentos de eletrólise exaustiva foi empregada a solução de ácido perclórico/perclorato de sódio com força iônica igual a 0,1 e pH 3 como eletrólito de suporte. Essa solução foi preparada pela dissolução da quantidade ideal de ácido perclórico e perclorato de sódio para preparar uma solução cuja concentração dessas substâncias fosse 0,001 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹, respectivamente.

III.1.2.6 Soluções de Mancozebe

No estudo da interferência do Mancozebe (MZB) na determinação eletroanalítica do DIM, as soluções desse padrão em três níveis diferentes de concentração foram preparadas, no momento da análise, a partir da dissolução das respectivas massas do composto em tampão BR pH 3.

III.2 Sistema eletroquímico

Os experimentos eletroquímicos foram realizados com o auxílio de um potenciómetro / galvanostato Autolab modelo PGSTAT 30 (Eco Chemie) conectado a um microcomputador e usando o programa GPES versão 4.9. O sistema eletroquímico foi composto por uma célula confeccionada em vidro, com capacidade para 25 mL e tampa em Teflon® com cinco orifícios (entrada dos eletrodos de trabalho, de referência e auxiliar; de um tubo de vidro utilizado para passagem do gás nitrogênio, para desaeração da solução e facilitação da desorção de

reagentes/produtos da face do eletrodo de trabalho, melhorando a repetibilidade; e outro para entrada da ponteira do pipetador ajustável na adição de reagentes).

III.2.1 Eletrodo de trabalho

Como eletrodo de trabalho, utilizou-se o diamante dopado com boro, fabricado pelo *Centre Suisse de Eletronique et Microtechnique*, Neuchâtel - Suíça, com $0,25\text{ cm}^2$ de área geométrica e suportado em lâmina de cobre. O grau de dopagem é de, aproximadamente, 8000 ppm de boro. Antes da realização dos experimentos diários, o EDDB era condicionado, em $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0,5\text{ mol L}^{-1}$, durante 5 minutos a 3 V e 10 minutos a -2 V (E vs. eletrodo de referência).

Para os estudos eletrolíticos, além do EDDB, foram utilizados o eletrodo de carbono vítreo (ECV), procedência SIGRADUR[®], e o ânodo dimensionalmente estável (ADE) de $\text{Ti/Ti}_{0,7}\text{Ru}_{0,3}\text{O}_2$, procedência Indústria De Nora S.A, como eletrodos de trabalho. Os dois últimos possuem $1,5\text{ cm}^2$ de área geométrica.

III.2.2 Eletrodo de referência

O eletrodo de referência utilizado nos experimentos foi Ag/AgCl/Cl^- em meio de KCl saturado. O eletrodo foi obtido pelo recobrimento de um fio de prata com $\text{AgCl}_{(s)}$, por um processo de anodização a 3 V, em uma solução de $\text{HCl}\ 0,3\text{ mol L}^{-1}$.

III.2.3 Eletrodo auxiliar

O eletrodo auxiliar foi composto por uma placa de platina com área geométrica total de aproximadamente $0,8\text{ cm}^2$, soldada a um fio de platina com extremidade embutida em vidro cilíndrico temperado. Para os estudos eletrolíticos com ECV e ADE, foi utilizado o eletrodo de aço inox com área de 3 cm^2 de área geométrica como eletrodo auxiliar.

III.3 Metodologia eletroanalítica

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando 10 mL do eletrólito de suporte e, entre cada medida, era realizada a agitação magnética da solução e o

borbulhamento de $N_{2(g)}$, na face do eletrodo de trabalho, durante dois minutos, a fim de obter melhor repetibilidade entre as medidas.

Primeiramente, foi avaliada a eletroatividade do DIM sobre a superfície do EDDB por meio da técnica de voltametria cíclica, também, observou-se o caráter adsorptivo e o mecanismo de transporte de massa da molécula. Posteriormente, utilizando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) para diagnóstico, foi avaliado o efeito do pH no comportamento eletroquímico do DIM em meio de tampão BR. Baseando-se no comportamento da intensidade da corrente de pico (I_p) e do deslocamento do potencial de pico (E_p) com o pH, foi possível obter informações eletroquímicas inerentes ao composto e escolher o pH de trabalho otimizado. Partindo do pH otimizado, escolheu-se diferentes tampões ajustados para esse pH e avaliou-se, usando os mesmos critérios anteriores, o eletrólito de suporte que apresentava, como resposta, maior intensidade de corrente elétrica. Escolhido o valor de pH e o eletrólito de suporte otimizado, foram avaliados os parâmetros voltamétricos que influenciam o sinal eletroquímico obtido por VOQ, tais como frequência de aplicação de pulsos de potencial (f), amplitude dos pulsos de potencial (a) e incremento de potencial (ΔE_s), obtendo informações de diagnóstico do processo eletroquímico e ajudando na escolha dos parâmetros da VOQ que promovem uma maior sensibilidade e seletividade analítica do DIM.

Após a escolha das condições otimizadas de pH, eletrólito de suporte e parâmetros da VOQ, foram construídas curvas analíticas a partir da correlação entre corrente de pico e concentração do DIM ([DIM]). Foram realizados, também, estudos de reprodutibilidade, repetibilidade, interferência do Mancozebe (MZB) e recuperação em eletrólito de suporte, o qual foi conduzido pelo método de adição de padrão.

III. 3.1 Determinação de Dimetomorfe em uva *in natura* e vinho tinto

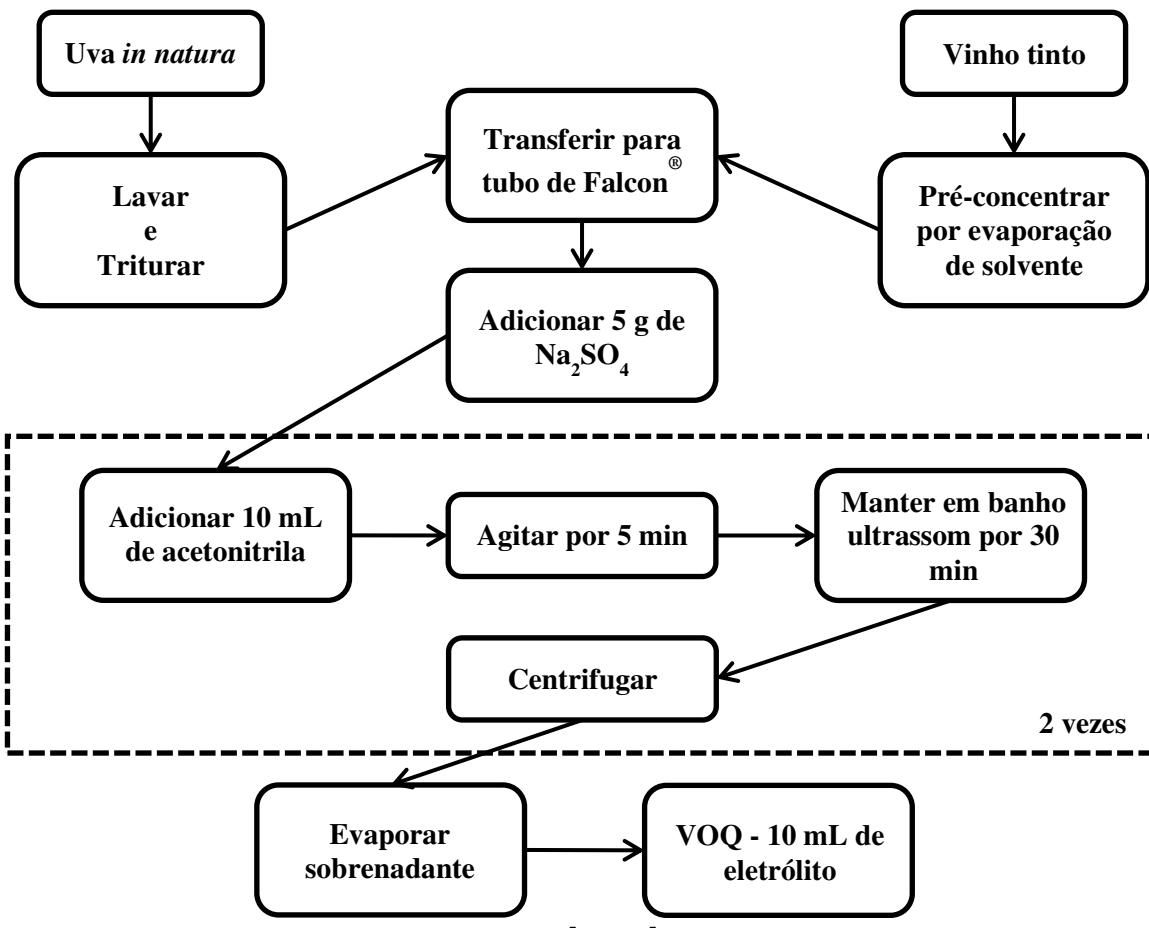
A partir da adaptação de alguns métodos QuEChERS [10,11], a amostra de uva *in natura* da espécie *Vitis vinifera L.* (20,0 g) foi lavada, Triturada, pesada e adicionada em um tubo de Falcon®. Em seguida, foram adicionados 5 g de sulfato de sódio e 10 mL de acetonitrila, sendo a amostra vigorosamente agitada durante 5 minutos. Após esse procedimento, a amostra foi mantida em banho ultrassônico (frequência 42 kHz) durante 30 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante em um balão de fundo redondo. O procedimento a partir da adição da acetonitrila foi repetido. No final, a

acetonitrila foi evaporada a 60 °C e baixa pressão com o auxílio de um rotoevaporador. Para análise voltamétrica, foram adicionados 10 mL de tampão BR pH 3 ao balão e, após agitação, essa solução foi transferida para a célula eletroquímica.

A amostra de vinho (100,0 g – 92,8 mL) foi concentrada por evaporação de solvente, a 60 °C e baixa pressão, até ser atingida a massa de aproximadamente 10 g. Após esse procedimento, 10 g dessa amostra concentrada foram transferidos para um tubo de Falcon®, seguindo todas as demais etapas descritas no preparo da amostra de uva. O Fluxograma do preparo das amostras pode ser conferido na Figura 3.

Partindo das condições voltamétricas e experimentais otimizadas, por VOQ foram analisadas amostras naturais, a fim de se observar se as mesmas já estavam contaminadas com DIM, analisando a existência de um possível processo eletroquímico atribuível ao composto. Constatando-se que a concentração de DIM presente nas amostras estava abaixo do limite de detecção do procedimento, posteriormente, as mesmas amostras foram artificialmente contaminadas com uma concentração conhecida de DIM e, procedendo-se todas as etapas de preparo de amostra anteriormente citadas, foi feito o estudo de recuperação pelo método da adição de padrões. Ambas as amostras foram obtidas em um comércio de Fortaleza-CE.

Figura 3 - Fluxograma do preparo das amostras de uva *in natura* e vinho tinto.



III.4 Estudo mecanístico

A proposição mecanística para eletrooxidação do DIM foi realizada com o auxílio de cálculos computacionais de orbitais de fronteira e cargas de Mülliken e pelo método da eletrólise exaustiva, a potencial constante, seguido da análise dos produtos da reação por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por impacto de elétrons (CG/EM).

III. 4.1 Estudo químico-computacional

Primeiramente, procedeu-se a geometrização das moléculas dos isômeros do DIM, tentando simular a conformação das moléculas de menor energia no ambiente químico do sistema em estudo. A seguir, com base na conformação mais estável das moléculas, foi realizado o cálculo dos orbitais de fronteira; nesse caso, foi dado ênfase ao orbital ocupado de mais alta energia (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital* - HOMO). E, posteriormente, foi realizada a determinação das cargas de Mülliken dos átomos. Foi utilizado o programa químico-quântico DMOL3, empregando o método da aproximação de gradiente generalizado.

III.4.2 Eletrólise exaustiva de DIM a potencial constante seguida de análises cromatográficas

A eletrólise exaustiva foi realizada empregando o mesmo sistema eletroquímico descrito anteriormente e em três superfícies eletródicas distintas, sendo elas: EDDB, ECV e ADE de $Ti/Ti_{0,7}Ru_{0,3}O_2$. Um estudo prévio da eletroatividade do DIM nessas superfícies foi realizado por meio da técnica de VC, para constatar em qual potencial de eletrodo ocorre a oxidação do DIM sobre cada substrato eletródico, potencial esse que será aplicado nos experimentos eletrolíticos.

A solução utilizada nas eletrólises foi obtida pela dissolução de 1 mL da solução estoque de DIM 5 g L⁻¹ em 10 mL da solução de ácido perclórico/perclorato de sódio. A eletrólise sobre a superfície de EDDB foi conduzida durante 5 horas. Já para os eletrodos de maior área, as eletrólises foram realizadas durante 3 horas.

No final das eletrólises, as soluções eletrolíticas foram colocadas em tubos tipo Falcon®, isolados da luz com papel alumínio, para posterior análise cromatográfica.

Partindo de uma adaptação do método proposto por Hengel e Shibamoto [27], os ensaios cromatográficos foram realizados no cromatógrafo Shimadzu modelo GCMS-QP2010. Para a separação foi utilizada uma coluna capilar com 30 m de comprimento DB1-MS J&W *Scientific* (100% metilpolisiloxano, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme). A operação instrumental e processamento dos dados foram realizados por meio do *software* Labsolution (GCMSsolution, versão 2.30). Todas as separações cromatográficas foram realizadas pela injeção de 1 μL da amostra no cromatógrafo operando com *Split ratio* de 27,0. O gás hélio (gás carreador) teve o seu fluxo mantido a uma taxa constante de 1,7 mL min^{-1} . O programa de aquecimento do forno foi iniciado a 100 °C e a temperatura foi elevada a uma taxa de 30 °C min^{-1} até 250 °C e, depois, a 15 °C min^{-1} com um patamar a 290 °C durante 6,6 min. O detector EM foi interfaciado ao CG a uma temperatura de 300 °C, o qual foi autossincronizado usando perflurotributilamina (PFTBA, padrão de calibração). A ionização molecular foi alcançada pelo método de impacto de elétrons (IE), usando uma corrente de emissão de 70 eV.

Partindo da molécula do DIM e baseando-se nos dados dos espectros de massa obtidos, realizou-se a identificação dos produtos da eletrólise para cada substrato eletródico, propondo mecanismos químicos e eletroquímicos de produção dos mesmos.

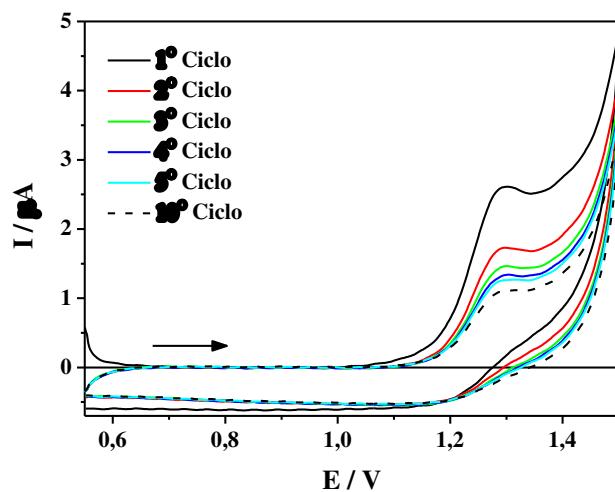
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Voltametria Cíclica

IV.1.1 Avaliação da eletroatividade, caráter adsortivo e mecanismo de transporte de massa do DIM

A técnica de voltametria cíclica (VC) foi empregada como técnica exploratória para avaliar a eletroatividade do DIM, ou seja, se ele pode ser oxidado ou reduzido na superfície do eletrodo de trabalho. Para avaliar o comportamento eletroquímico da molécula de DIM sobre a superfície do EDDB foi realizado um experimento na faixa de -0,90 a 1,60 V com velocidade de 50 mV s^{-1} , observando-se apenas um processo em torno de 1,29 V (E vs. Ag/AgCl/Cl⁻[KCl sat.]). Restringindo o intervalo de potencial para a faixa de 0,55 a 1,55 V, realizou-se varreduras de potencial por dez ciclos consecutivos, a fim de observar o caráter adsortivo da molécula. Os resultados desse estudo podem ser observados na Figura 4.

Figura 4 - Voltamogramas cíclicos de DIM $3,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

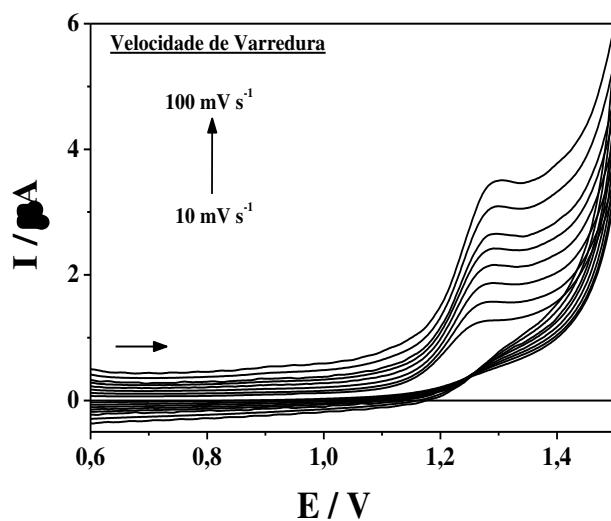


A partir dos resultados obtidos, pode-se perceber um decréscimo na corrente de pico (I_p) com o avanço dos ciclos de varredura de potencial, havendo uma redução de aproximadamente 40% na corrente pico do primeiro para o segundo ciclo. Esse comportamento pode ser associado à adsorção do produto da reação na superfície eletródica, diminuindo, assim, a área ativa do eletrodo e impossibilitando posterior oxidação de moléculas do DIM. Observando o comportamento voltamétrico, também, já se pode inferir

que o processo eletroquímico de oxidação do DIM não é reversível, pois não apresenta processo eletroquímico na varredura reversa de potencial bem definido, como o apresentado na varredura direta.

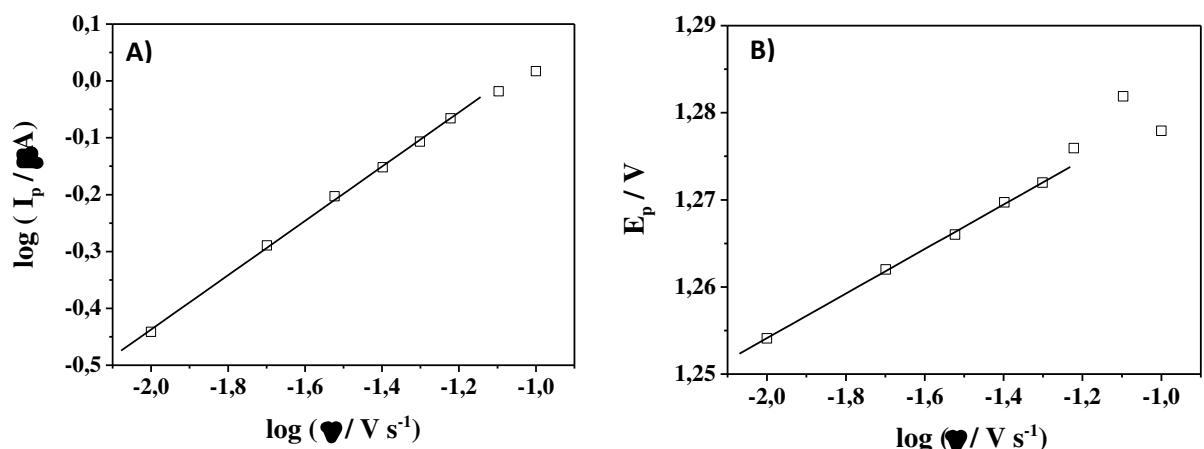
Para avaliar o mecanismo de transporte de massa da molécula procedeu-se à avaliação da influência da velocidade de varredura de potencial (v) no comportamento eletroquímico do DIM. Os perfis voltamétricos resultantes podem ser vistos na Figura 5.

Figura 5 - Voltamogramas cíclicos para $\text{DIM } 3,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3 em diferentes velocidades de varredura.



Partindo das informações obtidas nesse estudo, pode-se estabelecer a dependência da corrente e do potencial de pico com v , com os resultados estando ilustrados na Figura 6.

Figura 6 - Dependência do A) logaritmo da corrente de pico e do B) potencial de pico com o logaritmo da velocidade de varredura de potencial para a oxidação do $\text{DIM } 3,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em meio de tampão BR pH 3.



A relação entre logaritmo da corrente de pico e o logaritmo da velocidade de varredura apresentou comportamento linear, com coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,9995, apresentando equação:

$$\log(I_p / \mu A) = 0,5183(\pm 0,0352) + 0,4778(\pm 0,0045) \log(v / V s^{-1}) \quad (1)$$

Com base nos critérios de diagnóstico da VC, quando $\log(I_p)$ vs. $\log(v)$ apresenta relação linear com coeficiente angular próximo de 0,5, o processo é controlado por difusão [28]. Assim, conclui-se que o DIM tem processo eletroquímico controlado por transporte de massa.

A dependência do potencial de pico com o logaritmo da velocidade de varredura apresentou comportamento linear, para o domínio de v de 10 a 50 $mV s^{-1}$, $r^2 = 0,9996$, apresentando equação:

$$E_p(V) = 1,303(\pm 0,2432) + 0,0356(\pm 0,00143) \log(v / V s^{-1}) \quad (2)$$

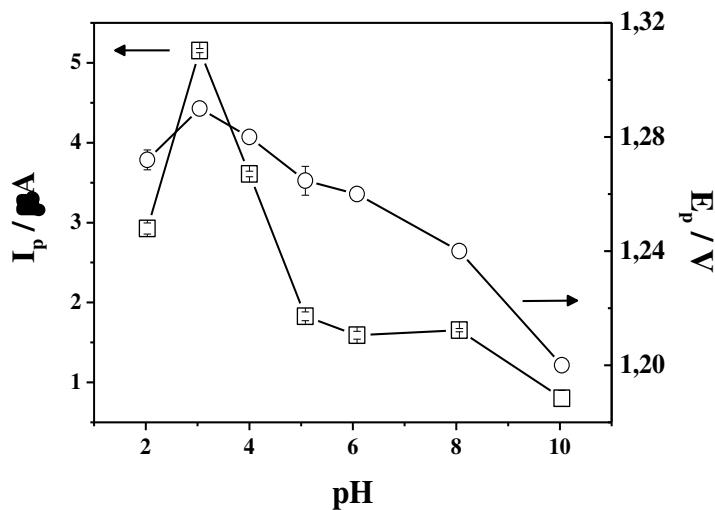
Observa-se que o E_p apresentou deslocamento para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, o que ratifica o comportamento de sistemas que não são reversíveis [28].

IV.2 Voltametria de Onda Quadrada

IV.2.1 Efeito do pH do meio

O comportamento eletroquímico de moléculas orgânicas pode ser afetado pelo pH do eletrólito de suporte, afetando a corrente e o potencial de pico do processo redox. Por esse motivo, a avaliação do efeito do pH é de relevante importância. Esse efeito na reação de oxidação eletroquímica do DIM foi estudado em triplicata na faixa de pH de 2 a 10 em tampão BR, utilizando a técnica de VOQ no intervalo de 0,55 V a 1,55 V, com frequência de aplicação de pulsos de potencial (f) de $100 s^{-1}$, amplitude dos pulsos de potencial (a) de 50mV e incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV. O comportamento da corrente e do potencial de pico como o pH pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 - Comportamento das correntes e dos potenciais de pico para $\text{DIM } 3,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em função do pH, em meio de tampão BR, empregando $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

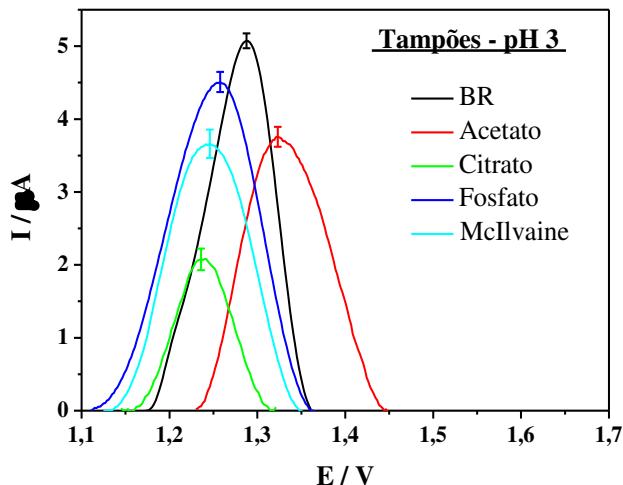


Não se constata comportamento linear da I_p nem do E_p com o pH. Os valores mais intensos de I_p foram observados em pH 3, diminuindo gradativamente com o seu aumento. Observa-se que os valores de E_p são pouco influenciados pela variação do pH (menos que 20 mV por unidade de pH) havendo apenas pequeno deslocamento para valores mais negativos com a diminuição da concentração hidrogeniônica, evidenciando que a protonação da molécula do DIM não é a etapa determinante do mecanismo de oxidação [28]. Deste modo, o pH 3 foi selecionado como condição otimizada nos experimentos subsequentes, já que apresentou maior intensidade de sinal.

IV.2.2 Efeito do eletrólito de suporte

Como a característica do eletrólito de suporte afeta diretamente o coeficiente de atividade e o número de transporte da espécie eletroativa, a espessura da dupla camada elétrica, a viscosidade e condutividade da solução e a cinética dos processos eletródicos [29], é necessário avaliar o efeito desse parâmetro na resposta eletroquímica do sistema em estudo. Partindo do pH otimizado, pH 3, foram realizadas análises em uma solução de $\text{DIM } 3,44 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando a técnica de VOQ com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ em diferentes soluções tampão em pH 3. O comportamento eletroquímico que se obteve pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 - Comportamento eletroquímico de $\text{DIM } 3,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB em função do eletrólito de suporte, em pH 3, empregando VOQ com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Avaliando o comportamento eletroquímico do DIM em função do eletrólito de suporte, pode-se concluir que em tampão BR o processo eletroquímico apresenta maior I_p e menor largura de meia altura ($\Delta E_{p/2}$), implicando em maior sensibilidade e seletividade, respectivamente, quando comparado com o comportamento em tampão acetato, citrato, fosfato e McIlvaine. Com base nisso, escolheu-se o tampão BR com pH 3 como eletrólito de suporte otimizado, já que, dentre os estudados, ele promove uma maior intensidade do sinal eletroquímico e seletividade para o DIM. Nos experimentos que seguem, esse tampão será utilizado como eletrólito de suporte.

IV.2.3. Estudo dos parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada

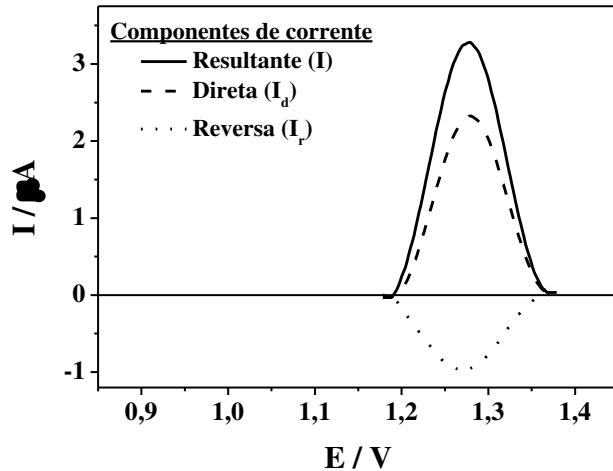
No processo de desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica empregando a técnica de VOQ, deve-se realizar, inicialmente, o estudo dos seus parâmetros (componentes de corrente, f , a e ΔE_s) a fim de se obter as condições otimizadas da técnica, ou seja, o conjunto de valores dos parâmetros que promove sinal analítico da corrente de pico com maior intensidade e perfis voltamétricos bem definidos. Com base nesses parâmetros, também é possível determinar o grau de reversibilidade do processo e números de elétrons e prótons envolvidos na etapa determinante de transferência de carga.

IV.2.3.1 Estudo das componentes de corrente

O sinal eletroquímico obtido pela técnica de VOQ é composto por três componentes de corrente, direta (I_d), a reversa (I_r) e a resultante (I). A última é o resultado da diferença entre I_d e I_r , a qual é geralmente utilizada nos estudos eletroanalíticos. O elevado ganho dessa técnica é a minimização da corrente residual (corrente capacitiva) e o incremento da corrente faradaica, já que a corrente resultante, em geral, é mais intensa que as componentes direta e reversa. A avaliação dessas componentes serve de auxílio para caracterizar o processo eletroquímico estudado como reversível, *quasi-reversível* e irreversível. Para os processos eletroquímicos reversíveis, as componentes de I_d e de I_r apresentam intensidades similares. Já para os totalmente irreversíveis, a componente I_r é praticamente nula [15,28,30].

Com a utilização dos parâmetros otimizados, o perfil das componentes de corrente da VOQ na eletrooxidação do DIM na superfície do EDDB pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 - Componentes de corrente do voltamograma de onda quadrada de $DIM 2,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 3, sobre EDDB, com $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$.

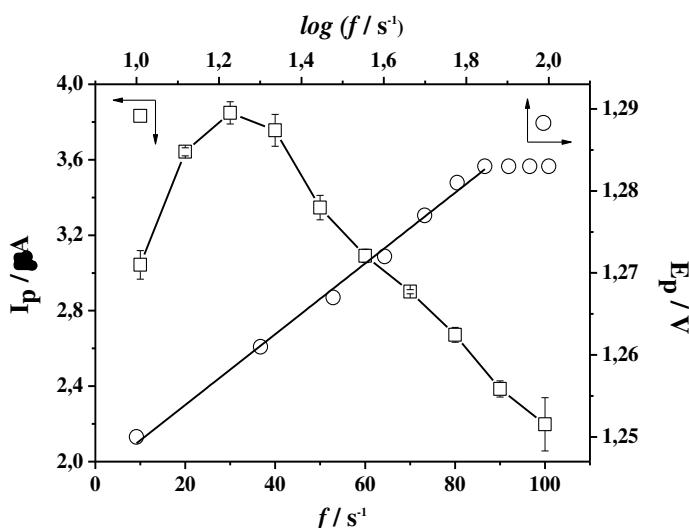


Observando o perfil das componentes de corrente da VOQ mostrado na Figura 9, pode-se perceber que o comportamento desse processo eletroquímico, nas condições estudadas, é característico de sistemas *quasi-reversíveis*, já que a componente I_r não é nula, mas apresenta intensidade 50% menor que a da componente I_d , aproximadamente.

IV.2.3.2 Estudo da frequência de aplicação dos pulsos de potencial

Em geral, o aumento de f promove o aumento da intensidade da corrente de pico, sendo um dos artifícios utilizados para se obter um incremento na razão sinal / concentração de espécies eletroativas [28,30]. Para tal estudo, a amplitude dos pulsos de potencial e o incremento de potencial foram mantidos constantes, e a frequência foi variada, em triplicata, no intervalo de 10 a 100 s^{-1} , já que a partir de 100 s^{-1} há distorção do perfil voltamétrico. A Figura 10 apresenta o comportamento da I_p e do E_p com a variação da frequência.

Figura 10 - Comportamento do potencial de pico versus o logaritmo da frequência (○) e da corrente de pico versus frequência (□), para a eletrooxidação de $DIM 2,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB, em meio de tampão BR pH 3, empregando $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



Analizando o comportamento de I_p com a frequência, pode-se perceber a presença de um máximo em 30 s^{-1} , podendo-se estabelecer esse valor de frequência como otimizada. Observa-se que, com o aumento da frequência, o valor do potencial de pico é deslocado para valores mais positivos, atingindo um patamar em 70 s^{-1} . Existe um comportamento linear do E_p com o $\log f$, com $r^2 = 0,9982$, cuja equação é:

$$E_p / \text{V} = 1,21 (\pm 0,002) + 0,0395 (\pm 0,00123) \log [f / \text{s}^{-1}] \quad (3)$$

Para sistemas irreversíveis, um comportamento linear de E_p com o $\log f$ pode ser correlacionado ao número de elétrons e ao coeficiente de transferência de carga pela relação:

$$\frac{\partial E_p}{\partial \log f} = \frac{0,059V}{\alpha n} \quad (4)$$

em que α é o coeficiente de transferência de carga e n o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação, a 25°C [28,30].

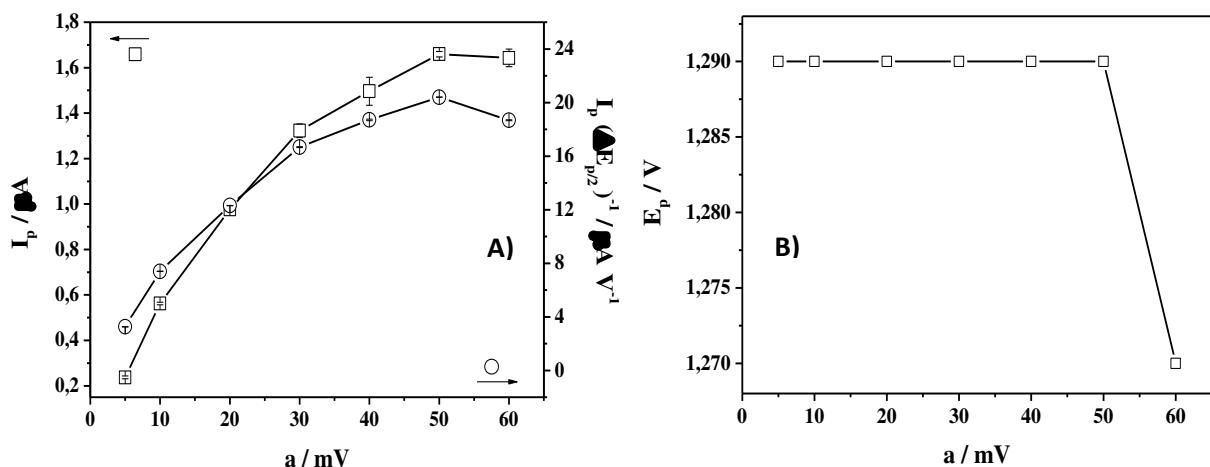
Aplicando grosseiramente o valor do coeficiente angular da equação 3 na equação 4 (já que o processo do DIM não é irreversível, sim *quasi-reversível*), chega-se ao valor de $\alpha n = 1,49$, o que pode ser associado a um coeficiente de transferência de carga igual a 0,74 e dois elétrons ($n = 2$) envolvidos na oxidação do DIM. Esse valor de número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação, mesmo que aproximado de um sistema irreversível, será útil para direcionar a proposta mecanística.

IV.2.3.3 Estudo da amplitude dos pulsos de potencial

Avaliando a relação entre a razão $I_p / \Delta E_{p/2}$ e a amplitude (a), pode-se escolher o valor otimizado desse parâmetro, que implique em melhor sensibilidade e resolução analítica [30]. No presente estudo foi empregada uma variação de amplitude na faixa de 5 a 60 mV, já que a partir de 60 mV há distorção do perfil voltamétrico. Os outros parâmetros voltamétricos foram mantidos constantes, $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

A Figura 11 ilustra o comportamento de I_p , $I_p / \Delta E_{p/2}$ e E_p em função da amplitude do pulso de potencial.

Figura 11 - A) Dependência da corrente de pico (\square) e da razão entre corrente de pico e largura de meia altura (\circ) e **B)** do potencial de pico com a amplitude de pulso para $\text{DIM } 2,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre EDDB, em meio de tampão BR pH 3, empregando $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



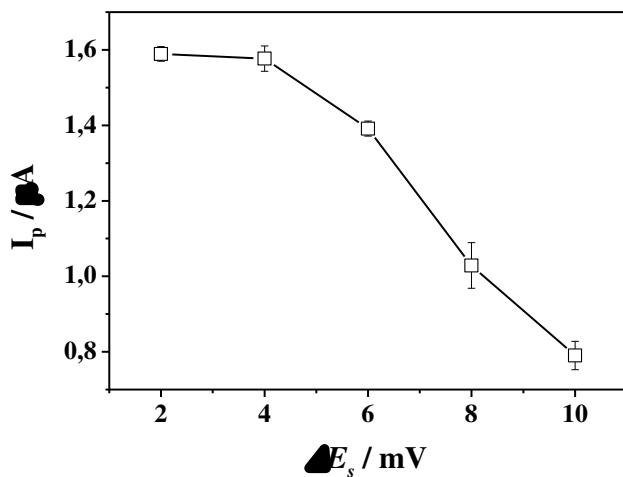
Na Figura 11A, observou-se um comportamento não linear de I_p e da razão $I_p / \Delta E_{p/2}$ com a frequência, apresentando máximo em 50 mV, sendo esse o valor escolhido para a

amplitude otimizada. Pela Figura 11B, constatou-se, também, que o E_p não apresenta dependência com a amplitude, permanecendo quase constante até 50 mV. A assimetria do valor do E_p para $a = 60$ mV, em relação aos perfis obtidos para menores amplitudes, pode advir do aumento da distorção do perfil voltamétrico que se inicia nessa região e se agrava com o aumento da amplitude.

IV.2.3.4 Estudo do incremento de potencial

O incremento de potencial juntamente com a frequência fornecem a velocidade de varredura na VOQ. A velocidade é dada pelo produto da frequência pelo incremento ($v = f \Delta E_s$). A intensidade da corrente de pico é proporcional à velocidade de varredura de potencial, o aumento no ΔE_s pode contribuir positivamente para a sensibilidade do método. Esse estudo foi realizado no intervalo de 2 a 10 mV, com os resultados obtidos podendo ser visualizados na Figura 12.

Figura 12 - Relação entre corrente de pico e incremento de potencial obtida a partir dos voltamogramas de onda quadrada de $\text{DIM } 2,09 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $a = 50 \text{ mV}$.



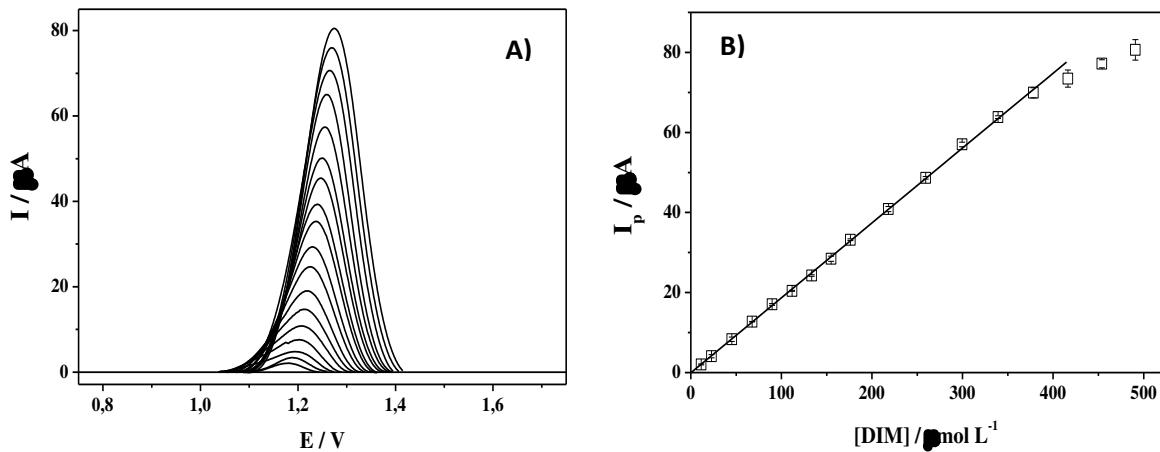
Na Figura 12 pode-se observar que os incrementos de 2 mV e 4 mV apresentam maiores intensidades de corrente de pico, implicando em maior sensibilidade analítica. Como no incremento de potencial de 4 mV existe uma maior variação na corrente de pico (erro estatístico), escolheu-se o incremento de 2 mV como o valor otimizado, já que também é o incremento padrão para experimentos de VOQ.

Com base nos estudos dos parâmetros da VOQ, pode-se constatar que os valores otimizados são: $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. A velocidade de varredura de potencial, obtido a partir desses parâmetros, é de 60 mV s^{-1} o que está de acordo como a velocidade limite em que o processo eletroquímico ocorre sob controle difusional, determinado anteriormente por VC. A falta de critérios de diagnóstico eletroquímicos para avaliação da quantidade de elétrons e prótons envolvidos no processo oxidativo *quasi-reversível* do DIM, aliada à presença de vários sítios de possível oxidação na molécula, impossibilitou a proposição mecanística baseada apenas nos estudos eletroquímicos, sendo necessária a utilização de técnicas auxiliares para essa proposta.

IV.3 Construção da curva analítica

Utilizando-se das melhores condições experimentais de pH, eletrólito de suporte e parâmetros da VOQ, foram construídas curvas analíticas, em triplicata, a partir da correlação entre corrente de pico e concentração do DIM ([DIM]). A linearidade entre corrente de pico e [DIM] se estendeu de $4,57 \times 10^{-6}$ a $4,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os perfis voltamétricos podem ser vistos na Figura 13A.

Figura 13 - A) Voltamogramas de onda quadrada e **B)** curva analítica com as barras de erro ($n=3$) para DIM em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com concentrações variando de $4,57 \times 10^{-6}$ a $4,91 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os parâmetros da VOQ utilizados foram: $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.



A equação da reta da curva de calibração é dada por:

$$I_p / \text{A} = -1,11 \times 10^{-7} (\pm 6,90 \times 10^{-8}) + 0,19 (\pm 7,21 \times 10^{-4}) [\text{DIM} / \text{mol L}^{-1}] \quad (5)$$

Essa equação foi obtida pelo método dos mínimos quadrados [31], cujo coeficiente de correlação linear foi de 0,9998 e os valores dos coeficientes linear e angular são dados pela média das triplicatas, com confiança de 95%.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) podem ser calculados a partir das curvas analíticas. As relações matemáticas empregadas para o cálculo do LD e LQ podem ser vistas a seguir [31–34]:

$$LQ = \frac{10xS_b}{b} = \frac{10xLD}{3} \quad (6) \text{ e } (7)$$

em que S_b é o desvio padrão da média de dez medidas do branco, tomadas no potencial equivalente àquele do pico de oxidação do DIM e b é a inclinação da curva analítica média.

Para avaliar a precisão da metodologia eletroanalítica em desenvolvimento, foram realizados ensaios de repetibilidade, envolvendo dez medidas em um mesmo dia, e de reprodutibilidade, envolvendo cinco medidas em dias diferentes, com soluções de DIM $3,34 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Uma forma de estimar a precisão do procedimento é utilizando o desvio padrão relativo (DPR) dos valores das correntes de pico. A Tabela 2 apresenta as figuras analíticas de mérito obtidas pela metodologia proposta e pelo procedimento descrito.

Tabela 2 - Figuras de mérito para a determinação de DIM sobre EDDB empregando Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) em meio de tampão BR pH 3.

Parâmetro	Valor
Região linear	$4,57 \times 10^{-6}$ a $3,78 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (1,77 a 146,66 mg L ⁻¹)
Equação da curva (n = 3)	$I_p / A = -1,11 \times 10^{-7} (\pm 6,90 \times 10^{-8}) + 0,188 (\pm 7,21 \times 10^{-4})$ [DIM / mol L ⁻¹]
r^2	0,9997
S_b	0,0195 μ A
LD (mol L ⁻¹)	$3,11 \times 10^{-7}$ (0,121 mg L ⁻¹)
LQ (mol L ⁻¹)	$1,04 \times 10^{-6}$ (0,403 mg L ⁻¹)
DPR (repetibilidade)	0,13% (n = 10)
DPR (reprodutibilidade)	0,92% (n = 5)

Os valores de LD = $3,11 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,121 mg L⁻¹) e LQ = $1,04 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,403 mg L⁻¹) foram comparáveis ao obtidos por outros autores empregando espectrofluorimetria (LQ = 12,4 mg L⁻¹) [35], CG-EM (LQ = 0,1 mg L⁻¹) [27]. A repetibilidade apresentou DPR = 0,13% (n = 10) e a reprodutibilidade DPR = 0,92% (n = 5). Esses dados comprovam que o método proposto pode ser convenientemente aplicado na análise desse fungicida em

diferentes amostras de matriz complexa, tais como alimentos naturais e processados, já que trata-se de uma metodologia mais rápida, que demanda menor capacitação técnica, de menor custo por análise, além de ser simples e eficiente.

Como o intercepto da equação da curva analítica apresentou um valor diferente de zero, é necessário determinar, pelo teste de significância, se o valor de intercepto é estatisticamente zero e, assim, atribuindo essa diferença a erros aleatórios (ou randômicos). A equação do teste de significância pode ser vista a seguir [31]:

$$t = (\bar{x} - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (8)$$

sendo \bar{x} a média das amostras, μ o valor considerado como verdadeiro, s o desvio padrão da média e n o número de determinações.

O valor de t calculado foi comparado com t crítico para um nível de 95% de confiança. O valor de t calculado foi de 2,79, sendo esse valor menor que o valor de t crítico, que é de 4,30 [31], indicando que não houve diferença estatística entre o valor médio do intercepto e o valor zero, a um nível de confiança de 95%.

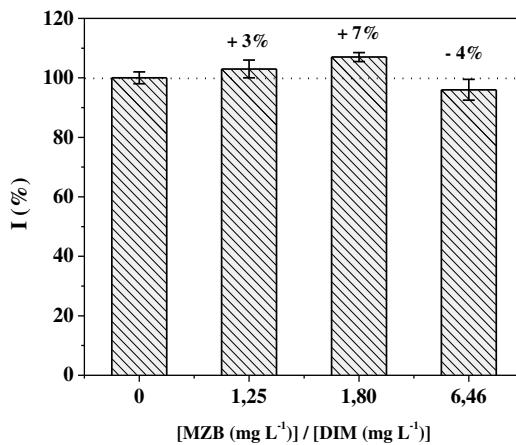
IV. 4 Estudo de interferente

O Mancozebe (MZB) é um dos componentes mais comum em coformulações de DIM, existem relatos de sua persistência em diversas culturas nas quais foi aplicado, incluindo alimentos processados provenientes dessas (como sucos, óleos e vinhos) [36]. No Brasil, o MZB pode ser utilizado em aplicação foliar em todas as culturas permitidas para o DIM, assim como nas culturas de banana, café, manga e em muitas outras [37]. Devido a essas características, o MZB é um potencial interferente na determinação eletroanalítica do DIM. Primeiramente, avaliou-se o caráter eletroativo do MZB sob as mesma condições de estudo realizado para o DIM, descrito no item IV.1.1, constatando-se que, nessa condições, o MZB não era eletroativo. Posteriormente, a interferência foi estudada a partir da análise da variação na resposta eletroquímica do DIM, a uma concentração de $3,33 \text{ mg L}^{-1}$ ($8,58 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), mediante a adição de MZB nas concentrações de 4,16; 5,99 e $21,84 \text{ mg L}^{-1}$. A concentração de $21,84 \text{ mg L}^{-1}$ refere-se a uma suspensão de MZB, afim de avaliar a possibilidade de determinação de DIM nas formulações comerciais. A resposta percentual de interferência (I_p)

$$\frac{[DIM + MZB]}{[DIM]} / I_p [DIM]$$

pode ser vista no histograma mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Relação percentual do sinal de corrente, I (%), para o DIM na ausência e na presença do interferente, MZB, em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 30\text{ s}^{-1}$, $a = 50\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$.



Como pode ser visto na Figura 14, o MZB exerce pouca influência na resposta eletroquímica do DIM, não apresentando processo eletroquímico na região daquele observado para o DIM nem competindo pelos sítios ativos da superfície de trabalho, já que o sinal de corrente relativa à presença do MZB em relação à ausência é menor que |10%|, indicando que o método é seletivo para determinação de DIM na presença de MZB.

IV.5 Estudos de recuperação de DIM em eletrólito de suporte

A avaliação da eficiência da metodologia proposta foi realizada pelo teste de recuperação em eletrólito de suporte, empregando o método da adição de padrão. O valor da recuperação foi calculado por meio da utilização da equação 9, já a exatidão do método pode ser relacionado estatisticamente ao parâmetro %BIAS, o qual pode ser calculado a partir da equação 10 [31,33,34]:

$$\%R = \frac{[DIM]_{encontrada}}{[DIM]_{adicionada}} \times 100 \quad (9)$$

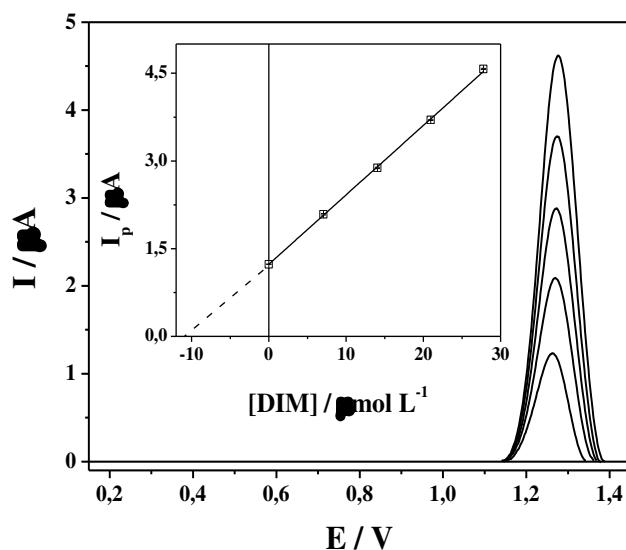
$$\%BIAS = \frac{(\bar{X} - X_0)}{X_0} \times 100 \quad (10)$$

em que \bar{X} é o valor médio das concentrações recuperadas e X_0 é o valor de concentração adicionada.

Os estudos de recuperação foram realizados em tampão BR pH 3, com adição de DIM $10,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, sendo a curva de recuperação obtida pela consecutiva adição de padrões resultando em concentrações de $7,07 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $27,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

A Figura 15 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a curva de recuperação para DIM em eletrólito de suporte.

Figura 15 - A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos no estudo de recuperação de DIM em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 30$ s⁻¹, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. **Inserção:** Relação entre corrente de pico e concentração de DIM para curva de recuperação.



A equação da reta da curva de recuperação, obtida pelo método dos mínimos quadrados [31] e cujo coeficiente de correlação linear foi de 0,9998, é dada por:

$$I_p / A = 1,23 \times 10^{-6} (\pm 4,80 \times 10^{-9}) + 0,13 (\pm 4,0 \times 10^{-4}) [\text{DIM} / \text{mol L}^{-1}] \quad (11)$$

Os valores dos coeficientes linear e angular são dados pela média das triplicatas, com confiança de 95%. Com base nos dados obtidos em cada replicata, podem-se obter os valores de recuperação em eletrólito de suporte, os quais estão organizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de recuperação para DIM sobre EDDB em tampão BR pH 3.

Replicata	[DIM] _{adicionada} mol L ⁻¹	[DIM] _{encontrada} mol L ⁻¹	Recuperação %
1		$10,31 \times 10^{-6}$	97,52
2	$10,57 \times 10^{-6}$	$10,19 \times 10^{-6}$	96,45
3		$10,33 \times 10^{-6}$	97,78

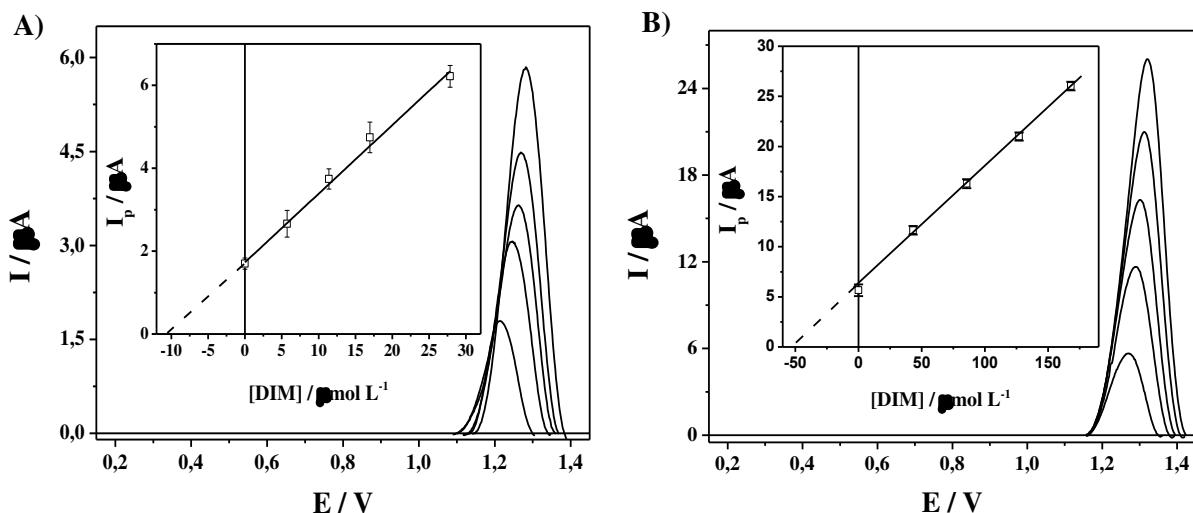
A recuperação encontrada para a metodologia proposta foi de $97,25 \pm 0,70\%$, com confiança de 95% e BIAS de 2,74 %. Pode-se constatar que as espécies iônicas presentes na solução de tampão BR não interferem na exatidão e na precisão da metodologia, já que os percentuais de recuperação obtidos estão próximos a 100%. Esse valor de recuperação está dentro da faixa aceitável para metodologias analíticas, de 70% a 120% [32–34].

IV.6 Determinação de Dimetomorfe em uva *in natura* e vinho tinto

A massa média de uva *in natura* utilizada foi de 21,0 g e a pré-concentração das amostras de vinho tinto resultaram em uma massa média de 10,8 g, sendo apenas 10,0 g (proporcionais a 92,6 g da amostra original, não concentrada) adicionadas ao tubo de Falcon®. Constatando-se que o teor de DIM nas amostras naturais estava abaixo do limite de detecção do procedimento, as matrizes iniciais foram contaminadas com 1,92 mg ($4,95 \times 10^{-6}$ mol) de DIM por kilograma da matriz, já que o LMR para esse pesticida em uva é de 2 mg kg^{-1} [24].

Após extração, a quantidade de analito nos experimentos com vinho foi, aproximadamente, 5 (cinco) vezes maior que na uva, devido a diferença na massa utilizada das amostras. Na Figura 16, podem ser observados os voltamogramas de onda quadrada e as curvas de recuperação para DIM nas amostras analisadas.

Figura 16 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos no estudo de recuperação de DIM em amostras de (A) uva *in natura* e (B) vinho tinto em meio de tampão BR pH 3 sobre EDDB com $f = 30 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Inserção: Relação entre corrente de pico e concentração de DIM para as curvas de recuperação.



As equações das curvas de recuperação, médias de triplicatas, para a uva *in natura* e vinho tinto, as quais foram obtidas pelo mesmo procedimento já descrito anteriormente e

cujos coeficientes de correlação linear foram de 0,9993 e 0,9996, são representadas, respectivamente, por:

$$I_p / A = 1,73 \times 10^{-6} (\pm 5,58 \times 10^{-8}) + 0,17 (\pm 0,010) [\text{DIM} / \text{mol L}^{-1}] \quad (12)$$

$$I_p / A = 6,14 \times 10^{-6} (\pm 3,00 \times 10^{-7}) + 0,12 (\pm 0,003) [\text{DIM} / \text{mol L}^{-1}] \quad (13)$$

Tabela 4 - Resultados de recuperação para DIM em uva *in natura* e vinho tinto em meio de tampão BR pH 3 como eletrólito de suporte.

Parâmetro	Uva	Vinho
[DIM] _{adicionada} / mg kg ⁻¹	1,92	
Recuperação (%)	101,0	105,1
DPR (%)	4,86	4,35
BIAS (%)	1,08	5,18

As recuperações encontradas para as amostras de uva *in natura* e vinho tinto foram de $101,0 \pm 12,1\%$ e $105,1 \pm 10,8\%$ com confiança de 95%, respectivamente, e BIAS < 6%, podendo-se concluir que a metodologia proposta pode ser aplicada na determinação de DIM nas matrizes analisadas, servido como método de controle de qualidade, já que as recuperações estão na faixa aceitável para metodologias analíticas, de 70% a 120% [32–34], e as recuperações estão abaixo do LMR. Devido à ausência de LMR de DIM em vinhos, considerou-se o LMR preconizado para uva como alvo para ambas as amostras.

IV. 7 Estudo mecanístico

Nos estudos apresentados, pode-se concluir que os parâmetros eletroquímicos não são conclusivos para uma proposição mecanística. Além disso, a presença de diversos sítios na molécula passíveis de oxidação e o potencial de oxidação experimental ser suficientemente alto dificultam ao extremo a elucidação desse mecanismo, sendo necessária a utilização de técnicas auxiliares. Com base nisso, foram empregados estudos químico-computacionais e a técnica da eletrólise exaustiva a potencial constante seguida de análises cromatográficas para elucidação do mecanismo eletrooxidativo do DIM.

IV.7.1 Estudo químico-computacional

Alguns estudos teóricos e experimentais mostram a eficiência dos cálculos computacionais no entendimento de mecanismos eletroquímicos de alguns compostos orgânicos [38–40]. Baseado nisso, utilizando o programa DMOL³, procedeu-se à geometrização da molécula do DIM (como o pH de estudo foi 3 e o pKa do DIM é 1,3 [19], o DIM estava na forma neutra), o cálculo dos *HOMO* e das cargas de Mulliken dos átomos. A distribuição dos *HOMO* e as cargas de Mulliken podem ser vistas nas Figuras 17A e 17B e na Tabela 5.

Figura 17 - Distribuição dos orbitais ocupados de mais alta energia da molécula de DIM. A) Isômero E B) isômero Z. Carbono (esfera cinza), hidrogênio (esfera branca), oxigênio (esfera vermelha), nitrogênio (esfera azul), cloro (esfera verde) e nuvem eletrônica do *HOMO* (azul e amarela). As setas apontam as regiões de predominância do *HOMO*; região da dupla ligação não aromática (vermelha), região do anel aromático trissubstituído (preta) e região da metoxila (verde).

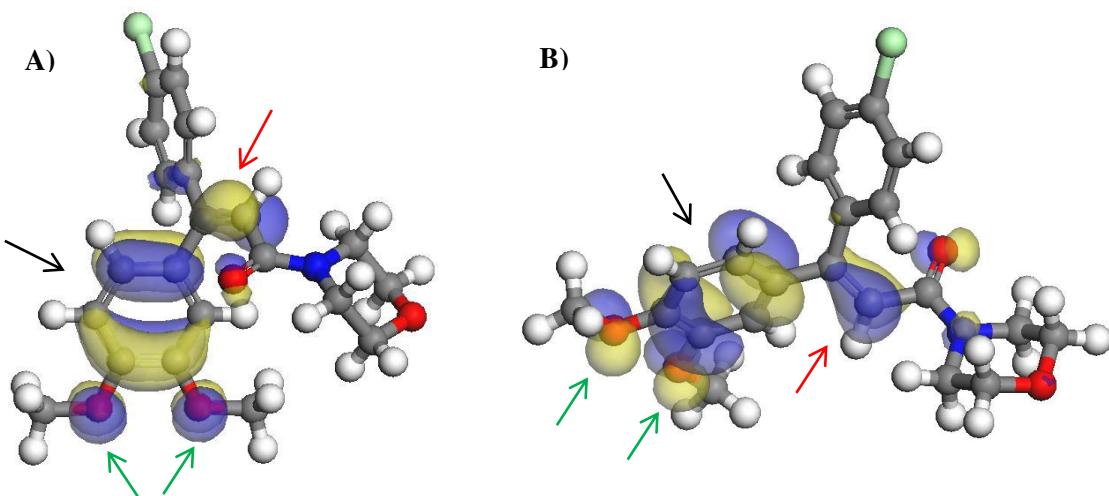


Tabela 5 - Cargas de Mulliken dos átomos dos isômeros E e Z do DIM com numeração referente à Figura 1.

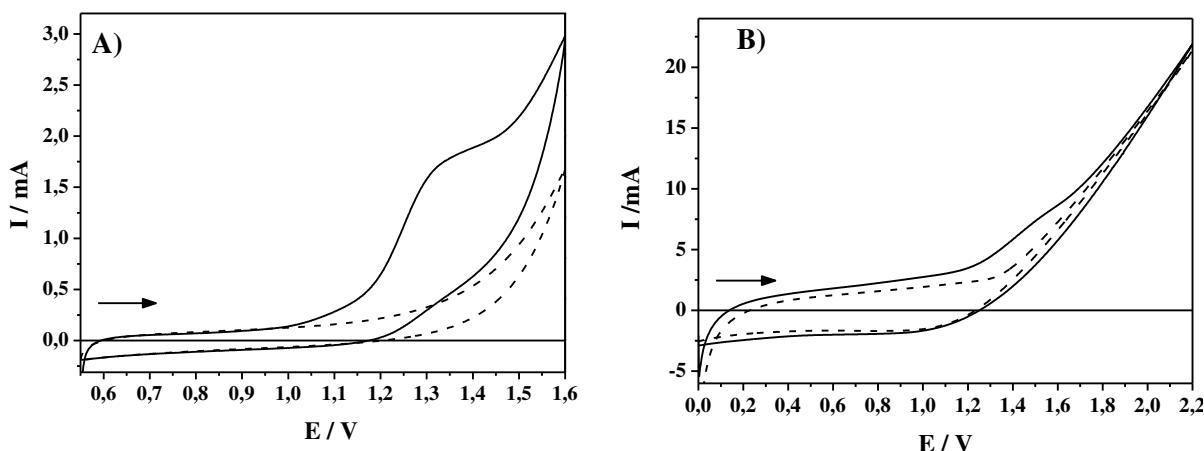
Átomo	Cargas de Mulliken (E/Z)	Átomo	Cargas de Mulliken (E/Z)	Átomo	Cargas de Mulliken (E/Z)
C (1)	0,099/ 0,102	C (8)	-0,235 / -0,237	C (15)	-0,221 / -0,221
C (2)	-0,376/ -0,376	C (9)	-0,248 / -0,248	C (16)	-0,198 / -0,196
C (3)	0,480/ 0,480	C (10)	-0,356 / -0,349	C (17)	0,100 / 0,099
C (4)	0,075/ 0,075	C (11)	0,323 / 0,317	C (18)	-0,199 / -0,196
C (5)	0,088/ 0,086	C (12)	-0,255 / -0,256	C (19)	-0,224 / -0,228
C (6)	-0,099/ -0,105	C (13)	0,310 / 0,308	C (20)	-0,313 / -0,337
C (7)	-0,099 / -0,118	C (14)	-0,293 / -0,293	C (21)	-0,309 / -0,309

Observando a Figura 17, que apresenta a distribuição dos orbitais ocupados de mais alta energia, orbitais que vão ceder elétrons na oxidação da molécula, pode-se perceber que estão distribuídos mais predominantemente no anel aromático trissubstituído (setas pretas), nas metoxilas (setas verdes) e na dupla ligação não aromática (setas vermelhas), em ambas as estruturas isoméricas, sendo esses os possíveis sítios onde se iniciará a oxidação da molécula de DIM. Com base nas cargas de Mülliken (Tabela 5), pode-se concluir que o sítio mais provável de oxidação é a dupla ligação, já que um dos carbonos (C-2) possui carga de Mülliken mais negativa.

IV.7.2 Eletrólise exaustiva de DIM a potencial constante seguida de análises cromatográficas

Como já mencionado, além do EDDB, foram utilizados ECV e ADE de $Ti/Ti_{0,7}Ru_{0,3}O_2$ para a realização das eletrólises exaustivas a potencial constante do DIM, afim de, a partir da identificação dos produtos das eletrólise por CG/EM, fazer proposições mecanísticas. ECV e ADE serão utilizados para estudar o efeito do substrato eletródico nos mecanismos eletrooxidativos do DIM nas condições estudadas. Foi utilizado o $HClO_4/NaClO_4$ pH 3, como eletrólito de suporte, devido a sua inércia a formação de espécies oxidantes, evitando que o DIM seja oxidado indiretamente. Antes de realizar as eletrólises exaustivas, foi necessário estudar a eletroatividade do DIM nessas novas superfícies, com a finalidade de identificar em qual potencial de eletrodo ocorre a oxidação do DIM. Os perfis voltamétricos do DIM, obtidos pela técnica de VC e utilizando como eletrodo de trabalho ECV e ADE, podem ser vistos na Figura 18.

Figura 18 - Voltamogramas cíclico para DIM em meio de tampão BR pH 3 com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} sobre A) ECV e B) ADE. Linhas tracejadas para o branco e cheias para $[DIM] = 1,16 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$.



Observando o perfil dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 18, pode-se constatar que a oxidação eletroquímica do DIM sobre a superfície do ECV ocorre em torno de 1,28 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻(KCl sat.), similar ao observado anteriormente para o EDDB na Figura 4. O que já era esperado, já que são estruturas alotrópicas de carbono, ou seja, têm constituição química similar. Já sobre a superfície do ADE, esse processo acontece em torno de 1,45 V. O deslocamento do potencial de oxidação do DIM para maiores valores, em relação aos eletrodos estudados, pode ser relacionado à menor condutividade do eletrodo recoberto por óxidos, o que dificulta a transferência de carga entre a espécie eletroativa e a superfície eletródica. Observa-se, também, que a corrente residual no ADE é quase 10 vezes maior que no ECV, mesmo eles possuindo área geométrica similar. Associa-se esse fenômeno a elevada rugosidade do ADE frente ao ECV, implicando em maior área ativa e aumento da corrente capacitiva.

Nos procedimentos eletrolíticos realizados com EDDB e ECV foi aplicado o potencial de 1,28 V durante 5 e 3 horas, respectivamente. Para a eletrólise sobre o ADE foi aplicado o potencial de 1,45 V durante 3 horas. Durante esses períodos, os sistemas foram mantidos em constante agitação e desaeração pelo borbulhamento de nitrogênio.

Após as eletrólises, observou-se a presença de um composto de cor amarela adsorvido na superfície da célula eletroquímica, o qual foi dissolvido em acetonitrila e analisado separadamente. Para cada eletrólise foi realizada uma análise cromatográfica do branco (DIM + eletrólito de suporte), do composto insolúvel e da solução aquosa. A identificação dos compostos separados cromatograficamente foi realizada com base na fragmentação oxidativa da molécula de DIM e observando o pico do íon molecular, bem como suas respectivas fragmentações nos espectros de massa. A análise dos espectros possibilitou, também, a identificação de quais picos cromatográficos que eram provenientes da eletrooxidação não seletiva do DIM, de impurezas do reagente e do eletrólito, além de derivados de siloxano provenientes da coluna, observados nos cromatogramas como picos de menor intensidade.

Na Figura 19 estão apresentados os cromatogramas, obtidos pela técnica de CG/EM, a partir das eletrólises sobre ECV, ADE e EDDB.

Na Tabela 6 estão organizados os compostos identificados pelas informações extraídas dos espectros de massa, bem como os respectivos valores de tempo de retenção e do íon molecular. Os espectros de massa e os mecanismos de fragmentação podem ser vistos no APÊNDICE I.

Figura 19 - Cromatogramas obtidos por CG/EM para os estudos de eletrólise exaustiva do DIM sobre as superfícies de A) ECV, B) ADE e C) EDDB.

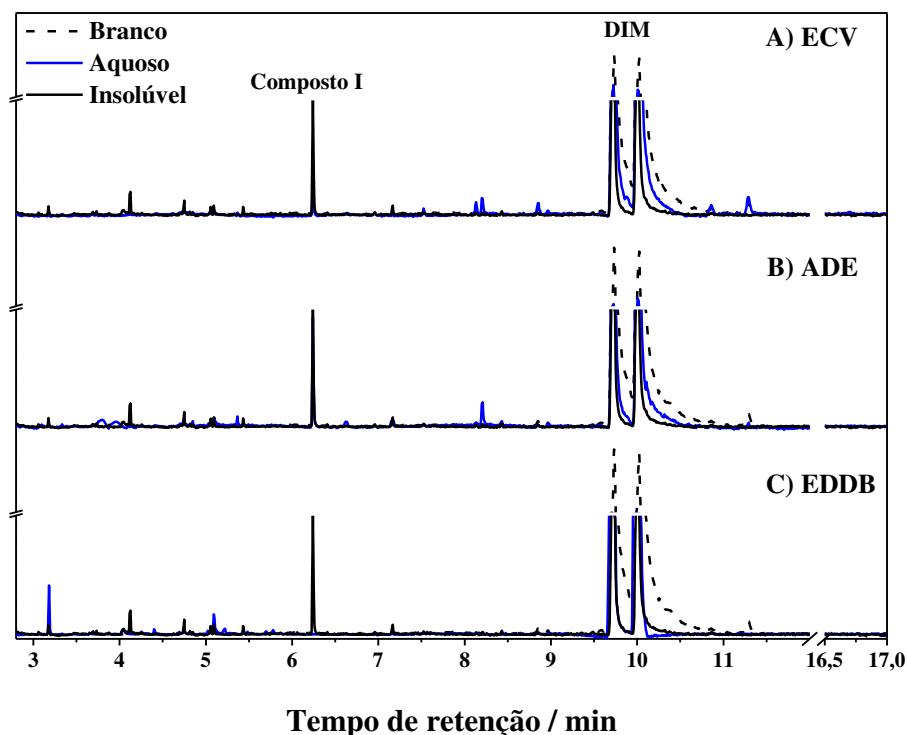
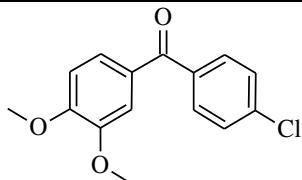
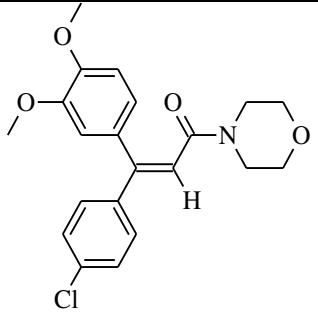
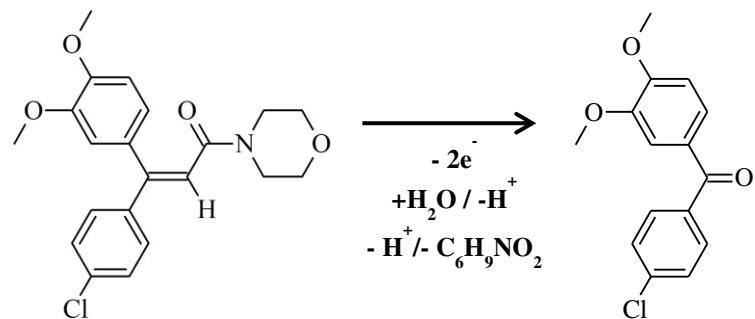


Tabela 6 - Identificação dos compostos observados nos cromatogramas da Figura 19 seguido dos tempos de retenção e do valor do íon molecular

Estrutura	Tempo de retenção (min.)	Pico do íon molecular (m/z)
 I (4-chlorophenyl)(3,4-dimethoxyphenyl)metanona	6,24	276
 DIM	Z - 9,72 E - 10,01	387

Com base no composto identificado como o produto majoritário da eletrólise do DIM (pico I) sobre as diferentes superfícies e levando em consideração o possível sítio de oxidação determinado pelos cálculos químico-computacionais, a estimativa do número de elétrons envolvidos, determinada por VOQ, está de acordo com o observado por outros pesquisadores, os quais reportaram clivagens eletroquímicas de duplas ligações olefínicas em potências bastante positivos e envolvendo a retirada de dois elétrons [41–44], similar ao observado nesse estudo. Não foi identificada a presença do fragmento morfolínico nos estudos cromatográficos, possivelmente, ele tenha permanecido diluído na fase aquosa, por se tratar de um fragmento polar, ficando a baixo do limite de detecção. Assim, a proposição mecanística resumida pode ser conferida na Figura 20. O mecanismo de reação mais detalhado está disposto no APÊNDICE II.

Figura 20 - Esquema da reação da eletrooxidação do Dimetomorfe.



Com base no exposto, pode-se verificar que a oxidação do DIM em diferentes superfícies ocorre de forma similar, inferindo que a natureza do substrato não interfere no mecanismo global dessa reação.

V. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e discussões realizadas, pode-se concluir que o processo eletroquímico do DIM sobre EDDB é controlado por difusão e apresenta comportamento *quasi-reversível*. As otimizações experimentais, instrumentais e os ensaios realizados resultaram na validação da metodologia eletroanalítica para determinação e quantificação desse pesticida utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, apresentando faixa linear de $4,57 \times 10^{-6}$ a $3,78 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (1,77 a 146,66 mg L⁻¹), limite de detecção de $3,11 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (0,121 mg L⁻¹), limite de quantificação de $1,04 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,403 mg L⁻¹), repetibilidade de 0,13% (n = 10) e reproduzibilidade de 0,92% (n = 5). Os estudos de recuperação em eletrólito de suporte indicaram que as espécies iônicas presentes na solução de tampão BR não interferem na exatidão e na precisão da metodologia, apresentando recuperação de $97,25 \pm 0,70$ %, com confiança de 95%, e BIAS de 2,74 %. O estudo da interferência do MZB na determinação do DIM mostrou que esse composto exerce pouca influência na seletividade do método, apresentando percentual de interferência menor que 10%.

A aplicação da metodologia proposta na determinação do DIM em uva *in natura* e em vinho tinto se mostrou eficiente, apresentando percentual de recuperação de $101,0 \pm 12,1$ % e $105,1 \pm 10,8$ % com confiança de 95%, respectivamente, e BIAS menor que 6%.

As informações eletroquímicas, químico-computacionais e os dados obtidos por CG/EM levaram à conclusão que a eletrooxidação do DIM nos substratos eletródicos estudados ocorre de forma similar, inferindo que a natureza do substrato não interfere no mecanismo global dessa reação. A oxidação eletroquímica do DIM tem como produto majoritário, resultado da transferência de dois elétrons seguida de etapas químicas, o (4-clorofenil)-(3,4-dimetoxifenil)metanona.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

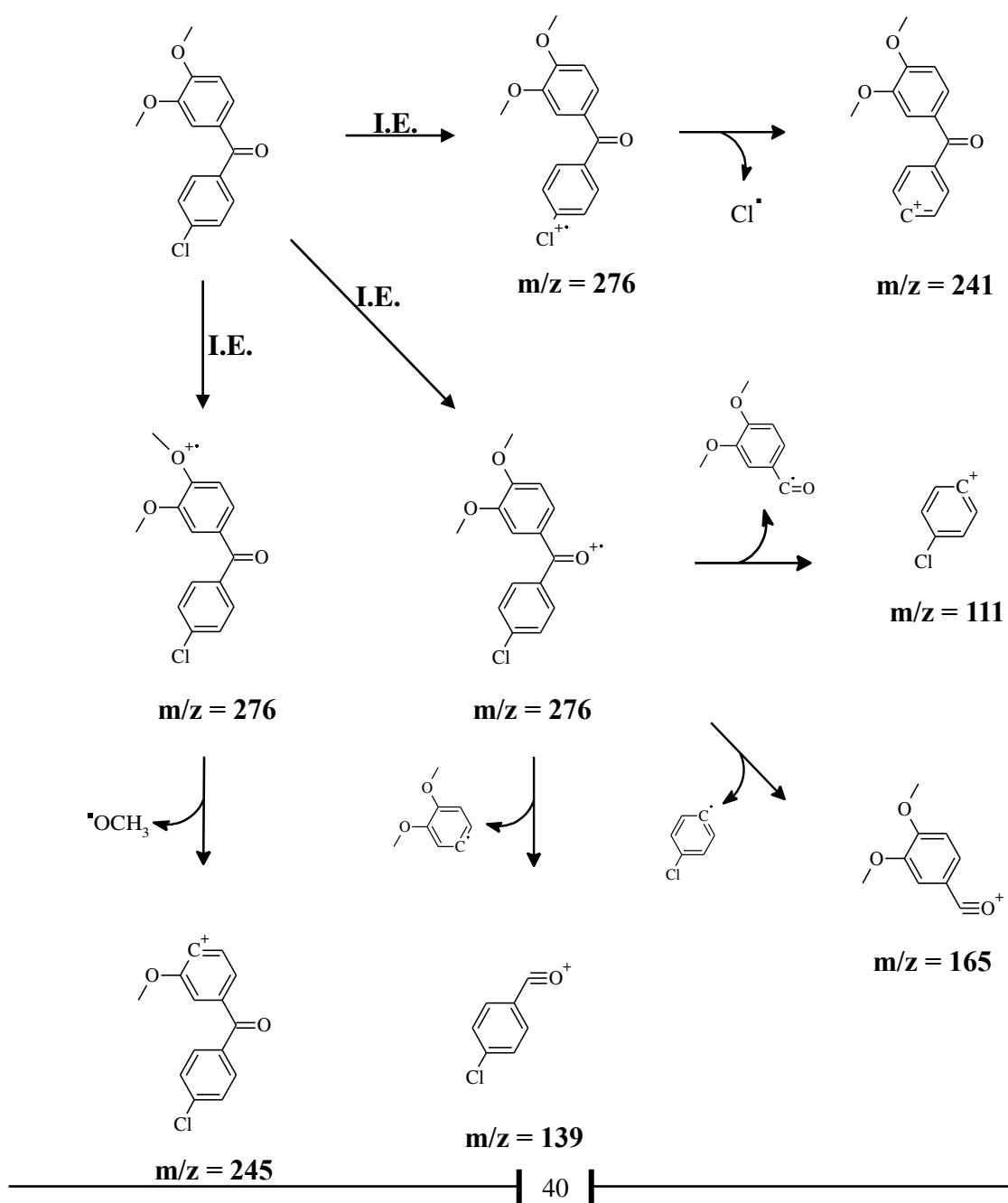
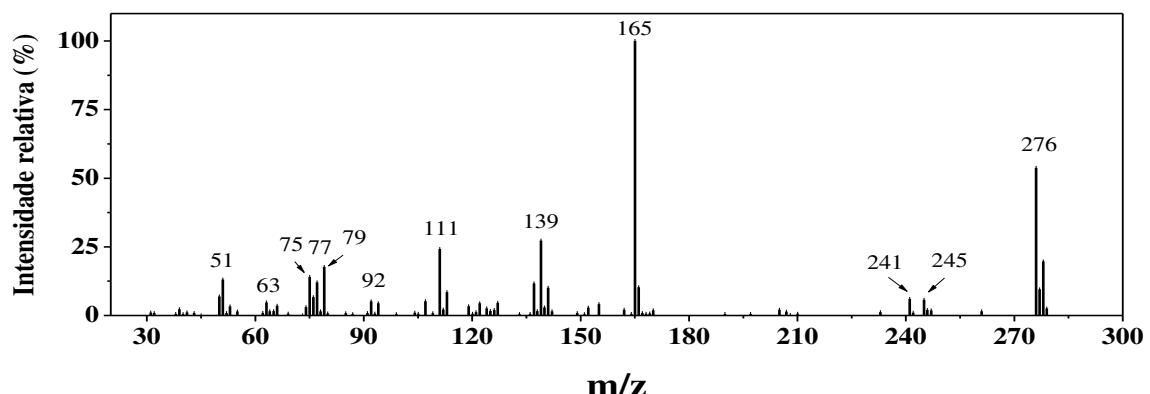
- [1]. STEPHENSON, G.R. *et al.*(eds.). Glossary of terms relating to pesticides. **Pure Applied Chemistry**, Vol. 78, No. 11, 2075-2154, 2006.
- [2]. CARSON, Rachel. **Silent spring**. 40th Anniversary ed., New York: Houghton Mifflin Company, 2002.
- [3]. BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópolis: Vozes, 1986.
- [4]. GALLI, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, Vol. 29, No. 1, 105-112, 2006.
- [5]. DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S. Study of the electrochemical behavior and sensitive detection of pesticides using microelectrodes allied to square-wave voltammetry. **Electroanalysis**, Vol. 18, No. 9, 862-872, 2006.
- [6]. LEVINE, Marvin J. **Pesticides: a toxic time bomb in our midst**. Westport: Greenwood Publishing Group, 2007.
- [7]. BRUCHET, A. *et al.* A broad spectrum analytical scheme for the screening of endocrine disruptors(EDs), pharmaceuticals and personal care products in wastewaters and natural waters. **Water Science Technology**, Vol. 46, 97-104, 2002.
- [8]. SINDAG, **Venda de defensivos bate recorde no Brasil, 17/01/2011**. Disponível em <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2143>. Acesso em: 09/10/2011.
- [9]. PRETTY, J.(Ed.). **The pesticide detox towards a more sustainable agriculture**. London: Earthscan, 2005.
- [10]. PRESTES, O. D. QuEChERS - um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, Vol. 32, No. 6, 1620-1634, 2009.
- [11]. ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, Vol. 1015, 163-184, 2003.
- [12]. FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 30, No. 6, 2011.
- [13]. PATNAIK, P. **Handbook of environmental analysis: chemical pollutants in air, water, soil, and solid wastes**. 2nd ed. New York: CRC Press, 2010.
- [14]. MEYERS, R. A. (ed.). **Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentations**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.
- [15]. WANG, J. **Analytical electrochemical**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

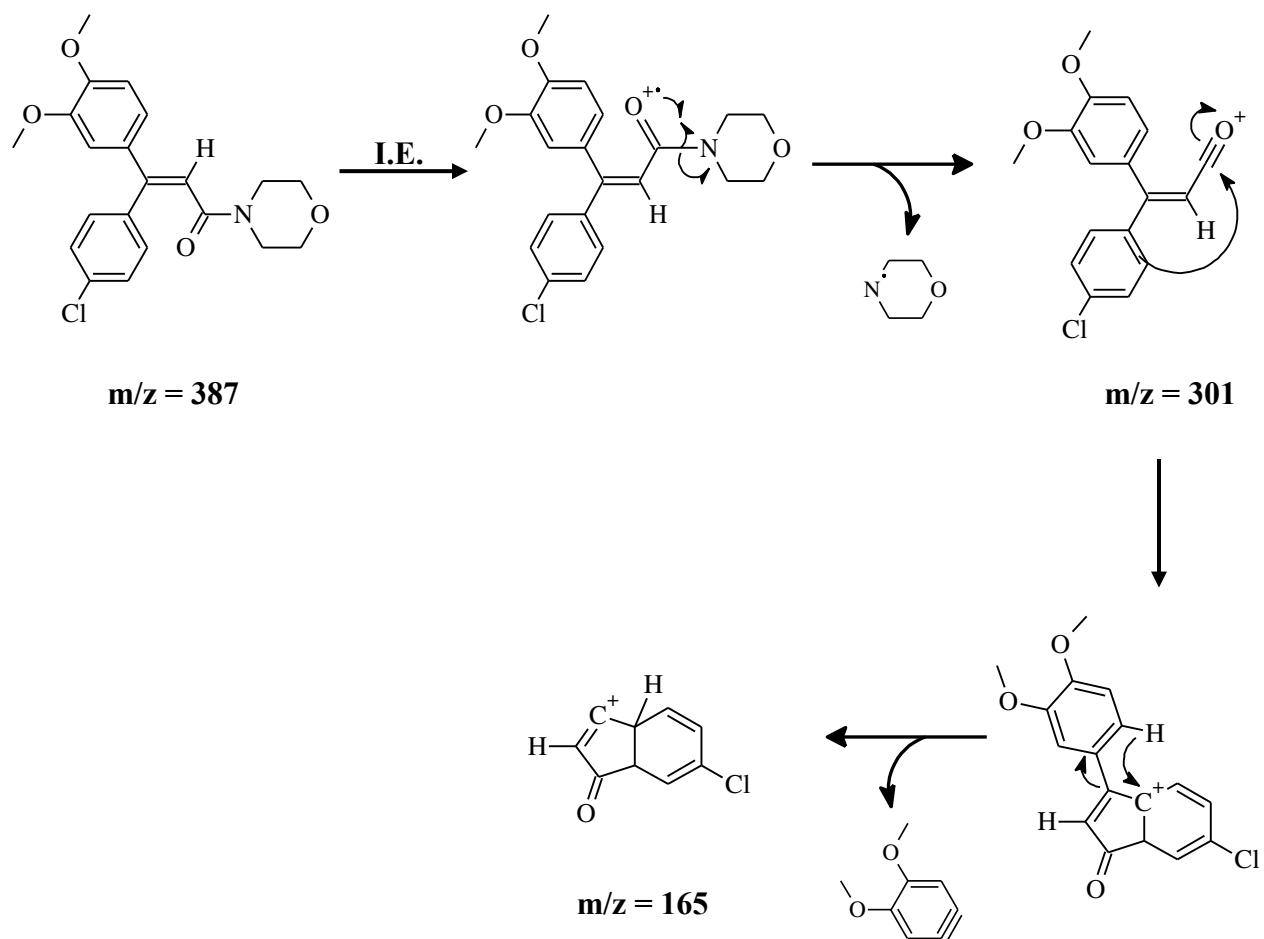
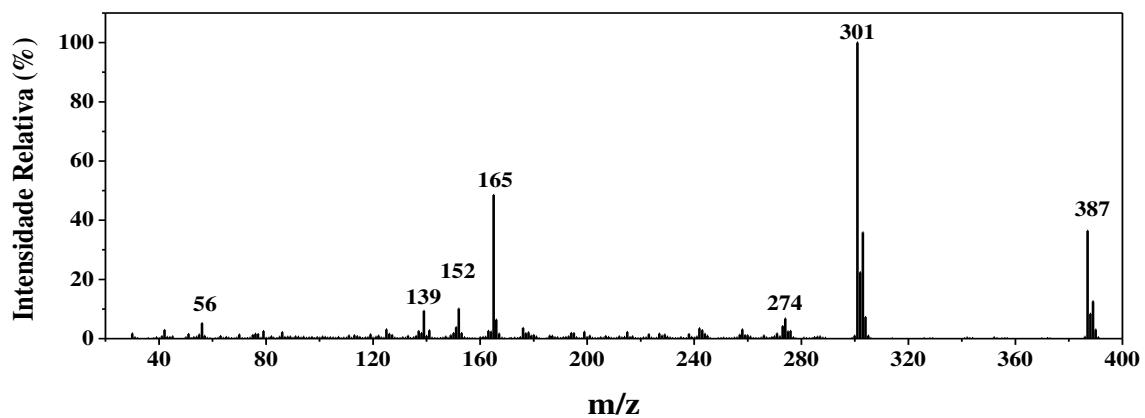
- [16]. SIMÕES, F. R. *et al.* Direct electroanalytical determination of methylparathionin solution extracted from soil. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, Vol. 89, No. 2, 95-104, 2009.
- [17]. PLESKOV, Yu. V. Electrochemistry of diamond: a review. **Russian Journal of Electrochemistry**, Vol. 38, No. 12, 1275-1291, 2002.
- [18]. KRAFT, Alexander. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, Vol. 2, 355-385, 2007.
- [19]. FOUND AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Dimethomorph (225). Disponível em:<http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation07/Dimethomorph.pdf> Acesso em: 25/10/2011.
- [20]. LIANG, H. *et al.* Dissipation and residue of dimethomorph in pepper and soil under field conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Vol. 74, 1331-1335, 2011.
- [21]. MAYER-HELM, B. *et al.* Method development for the determination of selected pesticides on tobacco by high-performance liquid chromatography - electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. **Talanta**, Vol. 74, 1184-1190, 2008.
- [22]. ČUŠ, F. *et al.* Pesticide residues in grapes and during vinification process. **Food Control**, Vol. 21, 1512-1518, 2010.
- [23]. CALZA, P.; MASSOLINO, C.; PELIZZETTI, E. Photo-induced transformation of hexaconazole and dimethomorph over TiO₂ suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Vol. 200, 356-363, 2008.
- [24]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta Pública nº 23, de 4 de junho de 2008**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25/10/2011.
- [25]. BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A. CXCVIII. Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of Chemical Society**, 1456-1462, 1931..
- [26]. ELVING, P. J.; MARKOWITZ, J. M.; ROSENTHAL, I. Preparation of buffer systems of constant ionic strength. **Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 7, 1179-1180, 1956.
- [27]. HENGEL, M. J.; SHIBAMOTO, T.; Gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of dimethomorph fungicide in dried hops, **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 48, 5824-5828, 2011.
- [28]. COMPTON, R. G.; BANKS, C. E. **Understanding voltammetry**. London: World Scientific, 2007
- [29]. AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, Vol. 27, No. 5, 813-817, 2004.
- [30]. MIRČESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIĆ, Š.; LOVRIĆ, M. **Square-wave voltammetry: theory and application**. Berlin: Springer, 2007.

- [31]. MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 15th ed. London: Pearson Prentice Hall, 2005.
- [32]. VAN DER VOET, H.; VANRHIJN, H.; VAN DER WIEL, H. J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Analytical Chimica Acta**, Vol. 391, 159-171, 1999.
- [33]. PRICHARD, E.; BARWICK, V. **Quality Assurance in Analytical Chemistry**. New York: Wiley, 2007.
- [34]. LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 3^a ed., Campinas: Editora Átomo, 1998.
- [35]. CHEN, D. *et al.* Studies on the supramolecular Interaction between dimethomorph and disulfide linked β -cyclodextrin dimer by spectrofluorimetry and its analytical application, **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 59, 4424-4428, 2011.
- [36]. FOUND AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Mancozebe (50)**. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation93/mancoz.pdf> Acesso em: 06/03/2012.
- [37]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico M 02 - Mancozebe**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 06/03/2012.
- [38]. TOLEDO, R. A. *et al.* Estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico Amitriptilina. **Química Nova**, Vol. 28, No. 3, 456-461, 2005.
- [39]. OLIVEIRA, T.M.B.F. *et al.* Direct electrochemical analysis of Dexamethasone endocrine disruptor in raw natural waters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 23, 110-119, 2012.
- [40]. GIL, E. S. *et al.* Cyclic voltammetry and computational chemistry studies on the evaluation of the redox behavior of parabens and other analogues. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 23, 565-572, 2012.
- [41]. LUND, H.; HAMMERICH, O. (eds.). **Organic electrochemistry**. 4th ed., New York: Marcel Dekker, 2001.
- [42]. CHRISTENSENAND, P.A.; HAMNETT, A. **Techniques and mechanisms in electrochemistry**. 1st ed., London: Blackie Academic & Professional, 1994.
- [43]. BA, U.; SCHA, H.J. Cleavage of olefinic double bonds by mediated anodic oxidation, **Electrochimica Acta**, Vol. 48, 489-495, 2003.
- [44]. BÄUMER, U.-S.; SCHÄFER, H.J. Cleavage of alkenes by anodic oxidation. **Journal of Applied Electrochemistry**, Vol. 35, 1283-1292, 2005.

APÊNDICE I

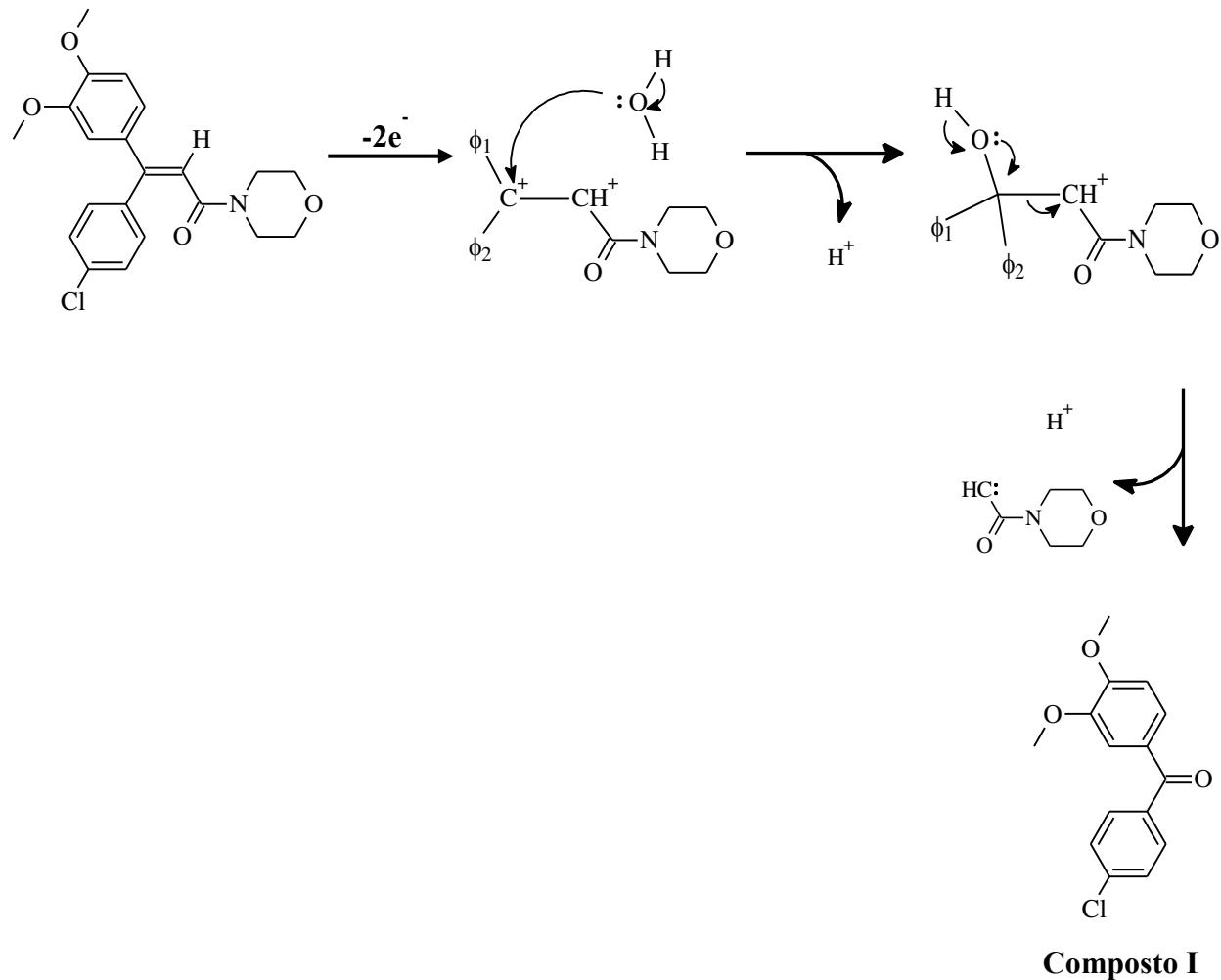
Espectros de massa dos compostos





APÊNDICE II

Proposição mecanística da eletrooxidação do DIM*:



*Mecanismo válido para ambos os isômeros do DIM.