

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Fernanda da Silva Nogueira

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
FUNGICIDAS DA CLASSE DAS ESTROBILURINAS USANDO CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO SIMULTÂNEA  
ULTRAVIOLETA E ELETROQUÍMICA**

Juiz de Fora

2016

Fernanda da Silva Nogueira

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
FUNGICIDAS DA CLASSE DAS ESTROBILURINAS USANDO CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO SIMULTÂNEA  
ULTRAVIOLETA E ELETROQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, área de concentração Química Analítica, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Juiz de Fora

2016

*Dedico este trabalho ao meu verdadeiro pai  
Geraldo (in memoriam) e minha mãe Eliana,  
com todo meu amor e gratidão, por toda  
dedicação e apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, por me abençoar sempre e me fazer forte para alcançar meus objetivos.

À minha mãe Eliana, por ser em muitos momentos pai e mãe, pelo apoio incondicional e por todos os sacrifícios que fez em nome da minha formação pessoal e acadêmica.

Aos meus avós Moyzes e Waldemira por trazerem alegria e doçura a minha vida e pelas infinitas orações que me protegem dia após dia.

À minha irmã e melhor amiga Eliene, por ser tão especial, fazendo dos últimos anos em Juiz de Fora os melhores, e por sempre estar ao meu lado compartilhando não só vitórias como essa, mas também os momentos de angústia e dificuldade.

Aos meus orientadores e amigos Renato e Dora, por terem confiado a mim este desafio e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Aos queridos amigos Ana, Marcela, Raiane e Linus, por me acompanharem a mais de sete anos, entre muitas aulas, trabalhos, provas, risos e lágrimas, oferecendo-me sempre apoio e amizade. Vocês são mais que amigos, são família!

Às amigas Josi e Isabela Gatti, pelas boas conversas e risadas que sempre trouxeram leveza para minha vida nos momentos necessários.

Aos amigos do grupo Baccan: Aparecida, Ângela, Thalles, Náira, Pâmella, Antônio e Paola, por me ensinarem os primeiros passos na Química Analítica e por ainda sermos um grupo (de amigos) apesar das paredes que nos separam.

Aos amigos do grupo NUPIS: Gustavo, Fausto, Roberto, Mellina, Marcos, Daniel, Guilherme, Lucas, Bruno, Taimara, Natália, Rafaela e Yara, por serem minha diversão garantida no almoço, nas músicas e coreografias durante um dia de trabalho e no nosso tradicional café da tarde. Agradeço por toda paciência nesses cinco anos de convívio e, principalmente, por sempre estarem prontos a me ajudar.

Aos professores Denise e Marcone pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Ao Prof. Ricardo Aucélio (PUC-RJ) e Rafael Dornellas, por me concederem os padrões das estrobilurinas e por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

As estrobilurinas sintéticas são fungicidas produzidos e comercializados no mundo todo, estando entre os mais vendidos por sua eficiência contra diferentes fungos. Por razões de segurança de saúde pública, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) classifica as estrobilurinas sintéticas como produtos altamente ou medianamente tóxicos. Por isso, a legislação tem sido cada vez mais restritiva com relação aos agrotóxicos de modo geral, incluindo as estrobilurinas. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método analítico para determinação de sete estrobilurinas por HPLC com detecção simultânea ultravioleta (UV) e eletroquímica/amperométrica (DE), além da sua aplicação na análise de amostras de feijão. O detector eletroquímico foi acoplado de modo “*homemade*” ao HPLC. O método de separação para as sete estrobilurinas por HPLC empregando coluna de fase reversa C 18 foi otimizado a partir do estudo de parâmetros como a composição da fase móvel e modo de eluição, avaliando-se, entre outros, a resolução e simetria dos picos. Para a detecção UV foi selecionado adequadamente o comprimento de onda, enquanto na detecção amperométrica o potencial de eletrólise, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) como eletrodo de trabalho. A detecção UV foi realizada em 200 nm e a amperométrica aplicando-se um potencial de 1,9 V. Foi otimizado um método de extração para as estrobilurinas, o qual foi adequado, seletivo e eficiente na remoção de interferentes. Na avaliação da exatidão do método obteve-se valores de recuperações para as estrobilurinas entre 61,6 % a 98,8 % com desvios padrões menores que 10,0 %. Os limites de detecção do método foram  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$  para todas as estrobilurinas, e os limites de quantificação variaram de 0,06 a  $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ , obtidos por detecção UV e DE. Os métodos de detecção UV e DE também foram comparados estatisticamente, o que mostrou não haver diferenças significativas entre os resultados reportados por estes em um nível de 95 % de confiança. Foram analisadas sete amostras de feijão de diferentes tipos e procedência, todavia não foram detectadas nenhuma das estrobilurinas estudadas neste trabalho.

Palavras chaves: Estrobilurinas. Feijão. HPLC. Amperometria. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).

## ABSTRACT

Synthetic strobilurins fungicides are produced and marketed all over the world, being among the best selling ones due to their efficiency against several fungi. For public health security reasons, ANVISA (National Health Surveillance Agency) classifies synthetic strobilurins as highly or moderately toxic. Therefore, legislation has been increasingly stricter regarding pesticides in general, including strobilurins. This study aimed to develop an analytical method for the determination of seven strobilurins using HPLC with simultaneous ultraviolet (UV) and electrochemical/amperometric (DE) detections, in addition to its application for the analysis of bean samples. The electrochemical detector was coupled to the HPLC in a homemade way. The separation method for the seven strobilurins by HPLC employing C18 reversed phase column was optimized from the study of such parameters as the composition of the mobile phase and the elution mode, evaluating, among others, peak resolution and symmetry. For UV detection the wavelength was suitably selected, while for the amperometric detection the potential electrolysis was chosen, using a boron-doped diamond electrode (DDB) as the working electrode. UV detection was performed at 200 nm and amperometric detection at 1.9 V. An extraction method was optimized for the strobilurins, which was adequate, selective and efficient in removing interfering substances. In the accuracy evaluation of the method, the recovery values obtained for strobilurins were between 61.6% and 98.8%, with standard deviations lower than 10.0%. The detection limits of the method were 0.02 mg kg<sup>-1</sup> for all the strobilurins, and the quantification limits ranged from 0.06 to 0.07 mg kg<sup>-1</sup>, obtained by UV and DE detection. UV and DE detection methods were statistically compared, which showed no significant differences between the results reported by them at a 95% confidence level. Seven samples of bean of different types and origins were analyzed, but none of the strobilurins studied in this work were detected.

**Keywords:** Strobilurins. Beans. HPLC. Amperometry. Boron doped diamond electrode (DDB).

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura das estrobilurinas naturais A e B. ....19
- Figura 2:** (A) Célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho de DDB (ET), eletrodo de referência Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> (ER) e agulha de aço inox como eletrodo auxiliar (EA); (B) Célula eletroquímica instalada na gaiola de Faraday; (C) Arranjo instrumental para o acoplamento das técnicas. ....34
- Figura 3:** Amostras de feijão trituradas. A) Fradinho 1; B) Fradinho 2; C) Branco; D) Preto; E) Carioca 1; F) Carioca 2; G) Verde.....41
- Figura 4:** Fluxograma de preparo da amostra de feijão.....43
- Figura 5:** Voltamogramas cíclicos das estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. (A) Azoxistrobina; (B) Cresoxim-metílico; (C) Dimoxistrobina; (D) Fluoxastrobina; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Eletrólito: ACN/H<sub>2</sub>O pH 5,5 (60:40 v/v) (verde); ACN/Tampão BR pH 2,0 (60:40 v/v) (preto); ACN/Tampão Fosfato pH 3,0 (60:40 v/v) (vermelho); ACN/Tampão BR pH 4,0 (60:40 v/v) (azul) . Condições: faixa de varredura de 0,0 a 1,8 V; velocidade de varredura  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ , ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA.....46
- Figura 6:** Voltamogramas cíclicos da piraclostrobina na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Eletrólito: ACN/Tampão BR pH 4,0 (60:40 v/v) (preto); ACN/Tampão Fosfato pH 4,0 (60:40 v/v) (vermelho); NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> adicionado nas fase aquosa. Condições: apresentadas na Figura 5.....47
- Figura 7:** Voltamogramas hidrodinâmicos para as estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Eletrólito: ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (60:40 v/v) e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> adicionado na fase aquosa. Condições: faixa de varredura de 1,1 a 1,9 V, ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA.....48
- Figura 8:** Gráficos da corrente de pico para  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> das estrobilurinas em função da (a) velocidade de varredura e da (b) raiz quadrada da velocidade de varredura. Eletrólito: ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (60:40 v/v) e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> adicionado na fase aquosa. Condições: faixa de varredura de 1,0 a 2,0 V, ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA. ....50

**Figura 9:** Voltamogramas cíclicos das estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. (A) Azoxistrobina; (B) Cresoxim-metílico; (C) Dimoxistrobina; (D) Fluoxastrobina; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: similar a Figura 8 e utilizando ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> (preto) ou ER de Ag/AgCl<sub>(LiCl saturado em etanol)</sub> (vermelho). .....52

**Figura 10:** Cromatograma do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: eluição isocrática com ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> (60:40 v/v), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 200 nm. ....54

**Figura 11:** Cromatograma do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: eluição isocrática com ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> (50:50 v/v), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 200 nm. ....55

**Figura 12:** Cromatograma do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: eluição isocrática com MeOH/solução de ácido fosfórico pH 4,0 e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> (a) 75:25 v/v e (b) 70:30 v/v, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 200 nm. ....56

**Figura 13:** a) Gradiente de fase móvel para eluição das estrobilurinas. b) Cromatograma do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6 .....59

**Figura 14:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Dimoxistrobina; (B) Cresoxim-metílico; (C) Picoxistrobina; (D) Piraclostrobina; (E) Possivelmente Trifloxistrobina. Condições: similar a Figura 13, utilizando ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA. Pulsos de potenciais aplicados: 1,4 a 2,0 V / 200 ms (indicados na figura).....62

**Figura 15:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Dimoxistrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Fluxo:

(a)  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e (b) fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições: similar a Figura 14. Pulsos de potenciais aplicados:  $1,8 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (preto) e  $1,9 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (vermelho).....63

**Figura 16:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix*  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Cresoxim-metílico; (D) Piraclostrobina; (E) Trifloxistrobina. Condições: apresentadas na Figura 15 e fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . .....64

**Figura 17:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix*  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Dimoxistrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: apresentadas na Figura 16 e utilizando uma alça de amostragem de  $50 \mu\text{L}$ . .....65

**Figura 18:** Amperograma do padrão *mix*  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Dimoxistrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: similar a Figura 17 e detecção em  $1,9 \text{ V}$  (potencial constante). .....66

**Figura 19:** Otimização do solvente de eluição das estrobilurinas na coluna de *clean up* contendo  $0,5 \text{ g}$  de sílica. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Solventes: (a) acetato de etila; (b) éter etílico; (c) mistura acetato de etila/éter etílico (1:1 v/v). .....69

**Figura 20:** Porcentagem das estrobilurinas eluídas no n-hexano residual ( $10,0 \text{ mL}$ ) percolado pela coluna de *clean up*. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. ....71

**Figura 21:** Cromatogramas do branco (preto), amostra (vermelho) e amostra fortificada para  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  de cada analito (azul). (A\*) Confirmar identificação de Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E\*) Confirmar identificação de Picoxistrobina (inserção na figura); (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6. ....73

**Figura 22:** Curvas analíticas para as estrobilurinas detectadas por DE. ....77

**Figura 23:** Curvas analíticas para as estrobilurinas detectadas por UV. ....78

<b>Figura 25:</b> Cromatogramas: a) branco (vermelho) e branco fortificado (azul); b) amostra (vermelho) e amostra fortificada para 10,0 mg L <sup>-1</sup> de cada analito (azul). (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) PS (Fluoxastrobina); (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6. e detecção por DE em 1,9 V.....	84
<b>Figura 26:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Fradinho 1. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	90
<b>Figura 27:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Fradinho 2. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	91
<b>Figura 28:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Branco. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	91
<b>Figura 29:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Preto. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	92
<b>Figura 30:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Carioca 1. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	92
<b>Figura 31:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Carioca 2. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	93
<b>Figura 32:</b> Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Verde. (PS) Padrão <i>Surrogate</i> . Condições descritas no item 3.6. ....	93
<b>Figura 33:</b> Testes de co-cromatografia para amostra Carioca 1. a) Ampliação na região de eluição da Azoxistrobina, onde “1” refere-se à amostra e “2” à amostra dopada com azoxistrobina (10,0 mg L <sup>-1</sup> ); b) Ampliação na região de eluição da Picoxistrobina, onde o “1” refere-se à amostra e “2” e “3” à amostra dopada sucessivamente com picoxistrobina (10,0 mg L <sup>-1</sup> ). Condições: descritas no item 3.6 com detecção UV. ....	96

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Estrobilurinas sintéticas utilizadas como fungicidas e valores de IDA. ....	21
<b>Tabela 2:</b> Propriedades físicas das estrobilurinas sintéticas.....	22
<b>Tabela 3:</b> Limites máximos de resíduos (LMR) e emprego das estrobilurinas em culturas de feijão no Brasil. ....	24
<b>Tabela 4:</b> Amostras de feijão selecionadas. ....	40
<b>Tabela 5:</b> Potenciais de pico obtidos para as estrobilurinas utilizando como eletrodos de referência $Ag/AgCl_{(sat)}$ e $Ag/AgCl_{(LiCl \text{ saturado em etanol})}$ . ....	53
<b>Tabela 6:</b> Testes para proporção dos solventes na fase móvel de mistura ternária. ....	57
<b>Tabela 7:</b> Fatores de assimetria ( $A_s$ ) para os picos das sete estrobilurinas.....	60
<b>Tabela 8:</b> Recuperação das estrobilurinas utilizando diferentes massas de sílica. ....	69
<b>Tabela 9:</b> Recuperações das estrobilurinas na amostra de feijão Carioca 1 incluindo e não incluindo o PS.....	75
<b>Tabela 10:</b> Equações das retas e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos para as estrobilurinas detectadas por DE e UV.....	76
<b>Tabela 11:</b> Valores de $F_{calculado}$ para as curvas analíticas por DE e UV. ....	79
<b>Tabela 12:</b> Limites de detecção e quantificação para as estrobilurinas detectadas por DE e UV. ....	80
<b>Tabela 13:</b> Valores de recuperação das estrobilurinas detectadas por UV. ....	85
<b>Tabela 14:</b> Valores de recuperação das estrobilurinas detectadas por DE. ....	85
<b>Tabela 15:</b> Precisão intermediária para as estrobilurinas detectadas por UV e DE..	88

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIA	Análise por injeção em batelada
CVD	Deposição química a partir da fase vapor
DAD	Detector de arranjo de diodos
DDB	Diamante dopado com boro
DE	Detecção eletroquímica
DPR	Desvio padrão relativo
EA	Eletrodo Auxiliar
ECD	Detector por captura de elétrons
EPA	Agência Americana de Proteção Ambiental
ER	Eletrodo de Referência
ET	Eletrodo de trabalho
FIA	Análise por injeção em fluxo
GC	Cromatografia a gás
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
$I_p$	Corrente de pico
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia Eletrocinética Capilar Micelar
MeOH	Metanol
$MQ_{ep}$	Média quadrática do erro puro
$MQ_{faj}$	Média quadrática da falta de ajuste
MS	Espectrometria de massas
MWD	Múltiplos comprimentos de onda
NPD	Detector de nitrogênio-fósforo
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PS	Padrão <i>surrogate</i>
$R_s$	Resolução

SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
SWV	Voltametria de onda quadrada
UV	Ultravioleta
v	Velocidade de varredura
Vis	Visível

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1. Contextualização do trabalho</b> .....	17
<b>1.2. As estrobilurinas</b> .....	18
<b>1.3. As amostras de leguminosas</b> .....	22
<b>1.4. Métodos analíticos empregados para determinação de estrobilurinas</b> ...	24
<b>1.5. O acoplamento “homemade” da técnica de separação por HPLC e a detecção eletroquímica</b> .....	28
1.5.1. Amperometria .....	29
1.5.2. O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) .....	30
<b>2. OBJETIVO</b> .....	32
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	32
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	33
<b>3.1. Materiais e reagentes</b> .....	33
<b>3.2. Instrumentação</b> .....	33
<b>3.3. Procedimento para ativação do eletrodo de DDB</b> .....	35
<b>3.4. Testes preliminares</b> .....	35
<b>3.5. Determinação da área ativa do eletrodo de DDB, investigação do transporte de massa e avaliação do comportamento do eletrodo de referência em meio orgânico</b> .....	36
<b>3.6. Condições de separação e detecção das estrobilurinas por UV e DE</b> .....	37
<b>3.7. Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação</b> .....	37
<b>3.8. Aquisição das amostras</b> .....	39
<b>3.9. Preparo de amostra</b> .....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	44

<b>4.1. Testes preliminares</b> .....	44
<b>4.2. Determinação da área ativa do eletrodo de DDB, investigação do transporte de massa e avaliação do comportamento do eletrodo de referência em meio orgânico</b> .....	49
<b>4.3. Otimização da condição de separação</b> .....	53
<b>4.4. Otimização da detecção eletroquímica</b> .....	60
<b>4.5. Otimização do preparo de amostra</b> .....	66
4.5.1. Descrição geral do método de preparo de amostra.....	66
4.5.2. Purificação dos extratos por cromatografia de adsorção em coluna aberta (Clean up).....	68
4.5.3. Avaliação do preparo da amostra.....	72
<b>4.6. Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação</b> .....	75
<b>4.7. Avaliação do método: exatidão, precisão e comparação dos detectores UV e DE</b> .....	81
<b>4.8. Análise das amostras</b> .....	89
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	99
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	101
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Contextualização do trabalho

O advento dos agrotóxicos no cenário mundial e seu crescente uso até os dias atuais estão relacionados à demanda de quantidade e qualidade de produtos agrícolas para garantir mais saúde e qualidade de vida à população mundial (FAO, 1999). O Brasil, que tem bases econômicas fortemente ligadas ao setor agrícola, é considerado atualmente o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, seguido pelos Estados Unidos (CARNEIRO *et al.*, 2012 e PELAEZ *et al.*, 2012). Nos últimos dez anos, o crescimento do mercado brasileiro de agrotóxicos foi de 190 %, contra 93 % do mercado mundial (CRUZ, 2014).

Embora sejam inegáveis as contribuições do uso de agrotóxicos para melhorias na produtividade agrícola, estas substâncias são potencialmente tóxicas para os seres humanos. Muitos trabalhos apontam consequências patológicas para o homem devido à exposição e contaminação por agrotóxicos, como câncer em geral, distúrbios neurológicos, mutações genéticas, problemas respiratórios crônicos, entre outros. Além disso, a atividade agrícola é considerada como uma das que apresentam maior periculosidade ao trabalhador sendo responsável por altas taxas de intoxicação e até mesmo letalidade (SIQUEIRA e KRUSE, 2008).

Diante disso, a manutenção de boas práticas no uso de agrotóxicos é essencial para a saúde dos trabalhadores do setor e consumidores de produtos agrícolas. Assim, surgiram-se no mundo todo órgãos regulatórios de agrotóxicos e legislações a respeito cada vez mais bem estabelecidas. No Brasil, a regulação de agrotóxicos é compartilhada pelos Ministérios da Agricultura, da Saúde e do Meio Ambiente, sendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o órgão responsável pela avaliação, monitoramento e classificação toxicológica dos agrotóxicos (CRUZ, 2014).

Neste sentido, visando avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos de origem vegetal, a ANVISA criou em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Neste programa, são analisados alimentos disponíveis no mercado varejista a fim de verificar se apresentam agrotóxicos autorizados em níveis de resíduos dentro dos limites

Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos na legislação nacional vigente (BRASIL, 2003a). Segundo análise realizada pelo PARA, em amostras de alimentos coletadas por todo Brasil, cerca de um terço dos alimentos estão contaminados por agrotóxicos, apresentando ingredientes ativos não autorizados para aquele cultivo e/ou autorizados acima do LMR (BRASIL, 2013).

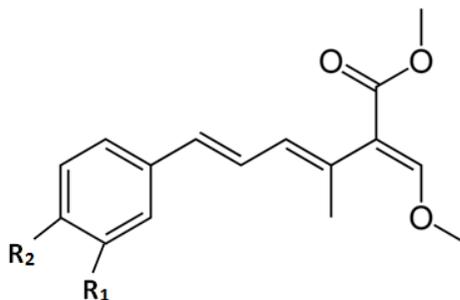
Portanto, é de suma importância o desenvolvimento de métodos adequados e sensíveis para monitoração dos resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas, assim como, uma constante avaliação da conformidade com a legislação dos produtos alimentícios de origem agrícola que chegam ao consumidor.

## 1.2. As estrobilurinas

Segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental – EPA (Environmental Protection Agency) dos Estados Unidos, agrotóxicos são quaisquer substâncias ou mistura de substâncias destinadas a atenuar, prevenir, destruir ou repelir qualquer tipo de praga (EPA, 2003). Estes podem ser classificados com relação ao tipo de praga alvo (algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, acaricidas, molucidas, nematocidas, ovicidas, entre outros) e de acordo com sua estrutura química, levando em conta o grupo funcional com atividade biológica (SILVA, 2009).

As estrobilurinas são fungicidas extraídas naturalmente de cogumelos, cujo nome é inspirado no gênero *Strobilurus*. A estrobilurina A foi a primeira da classe isolada a partir de culturas de líquidos de cogumelos *Strobilurus tenacellus* (ANKE *et al.*, 1977). Em 1978 foram elucidadas as estruturas das estrobilurinas A e B (Figura 1) e a partir de então, muitas outras foram identificadas em diversos fungos. A característica comum entre as estrobilurinas naturais é a presença do grupo metil(E)-3-metoxi-2-(5-fenilpenta-2,4-dienil) acrilato em suas estruturas, diferenciando-se apenas nos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> no anel aromático, conforme exemplificado na Figura 1 (BALBA, 2007).

**Figura 1:** Estrutura das estrobilurinas naturais A e B.



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

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

Fonte: Adaptado de BALBA, 2007.

A atividade fungicida das estrobilurinas consiste na inibição da respiração mitocondrial por ligação ao chamado citocromo B, localizado no interior da membrana mitocondrial dos fungos (ABREU *et al.*, 2005). Este modo de ação é mais eficiente sobre os esporos, que são os primeiros estágios de vida dos fungos na planta infectada. Por isso, as estrobilurinas são usadas como fungicidas protetores ou preventivos, ou seja, são mais eficazes antes da infecção e iniciação do ciclo da doença nas plantas (BALBA, 2007).

A identificação das estruturas químicas e modo de ação das estrobilurinas naturais possibilitaram o desenvolvimento das estrobilurinas sintéticas. As estrobilurinas sintéticas são uma classe de fungicida relativamente nova, sendo a azoxistrobina a primeira a ser anunciada em 1992, e somente comercializada a partir de 1996. Na sequência, outras estrobilurinas foram desenvolvidas com sucesso para uso comercial como, por exemplo, cresoxim-metílico em 1992, trifloxistrobina em 1998, picoxistrobina e piraclostrobina em 2000, fluoxastrobina e dimoxistrobina em 2003 (BALBA, 2007; BARTLETT *et al.*, 2002; HOWELL *et al.*, 2014).

As estrobilurinas sintéticas são produzidas e comercializadas no mundo todo, estando entre os fungicidas mais vendidos por sua eficiência contra fungos (LIU *et al.*, 2013). Elas são mais estáveis comparadas às naturais, possuem alta atividade fungicida, alta seletividade e baixas taxas de dosagem nas plantações (LIANG *et al.*, 2013). Além disso, são ambientalmente mais seguras, uma vez que são derivadas estruturalmente das estrobilurinas naturais e sofrem facilmente degradação no ambiente, principalmente fotodegradação (SOUZA *et al.*, 2009).

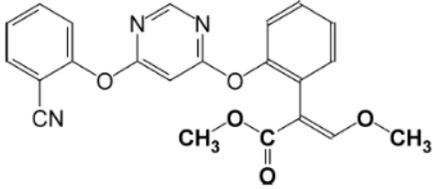
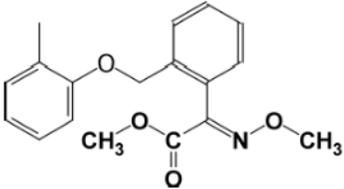
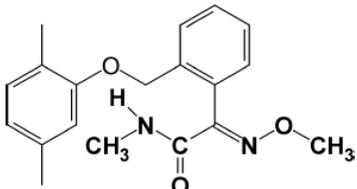
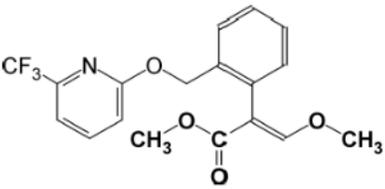
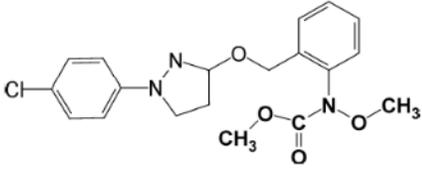
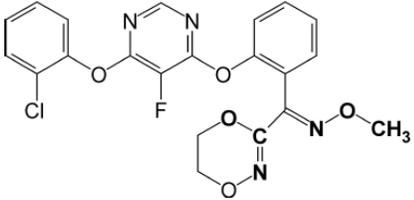
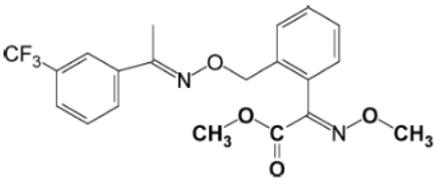
Nesse contexto, em um trabalho recente foi avaliada a degradação térmica e fotoquímica por exposição à radiação UV de três estrobilurinas amplamente usadas, a cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobina. Soluções dessas estrobilurinas foram colocadas em um reator fotoquímico contendo duas lâmpadas de vapor de mercúrio e expostas a radiação UV de 5 a 90 minutos. Os resultados mostraram degradação completa de cresoxim-metílico e picoxistrobina em 80 e 30 minutos, respectivamente. Já para a piraclostrobina, sua concentração foi reduzida a 9,6 % da concentração inicial em 90 minutos de exposição. Com relação à degradação térmica verificou-se que sob as condições testadas, 60 °C por 120 minutos, não houve degradação relevante das estrobilurinas (DORNELLAS, 2014a).

Embora não se tenha um estudo concreto, alguns pesquisadores apontam que diversos metabólitos das estrobilurinas são solúveis em água e têm uma elevada mobilidade entre solo, ar e água. As estrobilurinas foram classificadas como altamente tóxicas para os organismos aquáticos expostos a concentrações relevantes, durante a pulverização de áreas, ou indiretamente, através da lixiviação do solo. Contudo, estas foram consideradas de baixa toxicidade aguda e crônica para os seres humanos, aves e mamíferos (LIU *et al.*, 2013).

Entretanto, no âmbito de segurança para a saúde humana, a ANVISA classifica algumas das estrobilurinas sintéticas mais difundidas no mundo e no Brasil como produtos altamente ou medianamente tóxicos e estabelece para estes valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA) por peso corpóreo (p.c.). Tais valores são definidos durante o processo de avaliação de risco desses produtos e indicam a dose para a qual as estrobilurinas não causam intoxicação em humanos (BRASIL, 1992). Na Tabela 1 são apresentadas as estruturas moleculares dessas estrobilurinas e valores de IDA. Até o momento a ANVISA não divulgou nenhum valor de IDA para fluoxastrobina.

As estrobilurinas possuem alta solubilidade em solventes orgânicos, principalmente de polaridade intermediária, como acetato de etila, acetonitrila, acetona, éter etílico, entre outros. Tais solventes são normalmente selecionados como solventes de extração e preparação de amostras para disponibilização destas substâncias (RAINA-FULTON, 2015). Contudo, as estrobilurinas possuem baixa solubilidade em água como pode ser observado na Tabela 2 em que são apresentadas algumas propriedades físicas das estrobilurinas sintéticas.

**Tabela 1:** Estrobilurinas sintéticas utilizadas como fungicidas e valores de IDA.

Nome	IDA* (mg Kg <sup>-1</sup> p.c.)	Fórmula estrutural
Azoxistrobina	0,020	
Cresoxim-metílico	0,400	
Dimoxistrobina	0,003	
Picoxistrobina	0,043	
Piraclostrobina	0,040	
Fluoxastrobina	ND	
Trifloxistrobina	0,030	

\*Ingestão Diária Aceitável por peso corpóreo (p.c.); ND = não disponível;

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b; BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b; BRASIL, 2011; BRASIL, 2015.

**Tabela 2:** Propriedades físicas das estrobilurinas sintéticas.

<b>Estrobilurina</b>	<b>Solubilidade em água (mg L<sup>-1</sup> a 20 °C)</b>	<b>Pressão de vapor (mPa a 20 °C)</b>	<b>Ponto de Fusão (°C)</b>	<b>Massa molar (g mol<sup>-1</sup>)</b>
Azoxistrobina	6,0	1,1 x 10 <sup>-7</sup>	115	403,4
Cresoxim-metílico	2,0	2,3 x 10 <sup>-3</sup>	99	313,3
Dimoxistrobina	4,3	6,0 x 10 <sup>-6</sup>	ND	326,4
Picoxistrobina	3,1	5,5 x 10 <sup>-3</sup>	75	367,3
Piraclostrobina	1,9	2,6 x 10 <sup>-5</sup>	64	387,8
Fluoxastrobina	2,3	5,6 x 10 <sup>-7</sup>	108	458,8
Trifloxistrobina	0,6*	3,4 x 10 <sup>-3*</sup>	73	408,4

\*a 25 °C; ND= não disponível

Fonte: BARTLETT *et al.*, 2002; KLITTICH e RAY, 2013; RAINA-FULTON, 2015.

### 1.3. As amostras de leguminosas

O feijão tem destaque no cenário agrícola nacional, tanto pela extensão da área de cultivo quanto pelo valor da produção. Esta leguminosa, típica na culinária do país, é uma importante fonte alimentar de proteínas e ferro (MONTANARI *et al.*, 2010). Além do papel nutricional, o consumo de feijão tem outros benefícios para a saúde humana, tais como redução do risco de câncer de cólon e de doenças cardíacas, devido à redução do colesterol total e LDL e regulação dos níveis de glicose e insulina no sangue (PROLLA *et al.*, 2010).

A produção mundial de feijão está concentrada principalmente em seis países segundo indicadores de 2013. Ficando atrás do Mianmar e Índia, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, seguido da China, México e Estados Unidos. Contudo, apenas um pequeno percentual desta produção é destinado à exportação, uma vez que os países produtores também são grandes consumidores e as diferenças de hábitos alimentares dificultam a aceitação do produto em âmbito internacional (CONAB, 2015).

A alimentação da população brasileira, baseada na tradicional combinação de arroz e feijão, faz com que esta leguminosa seja amplamente produzida e

consumida no país. Em 2012 no Brasil, a estimativa de consumo médio de feijão *per capita* foi de 14,9 kg/ano (SEAB, 2014). Segundo dados do IBGE, em 2015 a produção de feijão no Brasil alcançou 3,1 milhões de toneladas do produto, sendo os principais estados produtores neste período o Paraná, Bahia e Minas Gerais (IBGE, 2015).

O feijão é cultivado no Brasil por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção, com ciclos de cultivo variando de 65 a 100 dias. Uma vez que esta leguminosa apresenta ampla adaptação climática, sua produção é possível durante todo o ano, nas diferentes épocas e safras (EMBRAPA, 2003 e SEAB, 2014). O cultivo é realizado em três safras distintas, a primeira (safra das águas) com plantio nos meses de agosto a novembro, a segunda (safra da seca) com plantio de dezembro a março e a terceira (safra de inverno) com plantio de abril a julho (WANDER, 2007).

Os tipos de feijão produzidos e consumidos no Brasil podem ser classificados em dois grupos principais de acordo com a espécie, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.). Além disso, eles podem ser categorizados quanto à coloração do tegumento (película) entre os tipos, branco, preto, cores e misturados. Com relação ao feijão comum, o tipo preto é mais popular nos estados da região Sul e Sudeste, enquanto o tipo carioca (cores) é aceito em todo Brasil, representando 53% da área plantada. Já o feijão caupi é mais comum nas regiões Norte e Nordeste, sendo alguns dos representantes mais conhecidos desse grupo o feijão de corda, verde (vagens) e fradinho. (COSTA e KNABBEN, 2012; EMBRAPA, 2003; FILHO *et al.*, 2011).

O feijoeiro, devido ao fato de ser cultivado durante todo ano, geralmente é exposto a muitos fatores desfavoráveis como, por exemplo, diversas doenças que além de diminuir a produtividade, depreciam a qualidade do produto. As doenças podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, e muitas vezes são necessárias medidas de controle, como a aplicação de fungicida, bactericidas ou outros defensores agrícolas, visando a erradicação de patógenos e proteção da planta (BARBOSA e GONZAGA, 2012).

Os fungicidas da classe das estrobilurinas são amplamente utilizados em culturas de frutas, vegetais, cereais e leguminosas, abrangendo o feijão. Geralmente, um único tipo de estrobilurina é utilizada em determinada plantação,

sendo escolhida de acordo com a eficiência contra a praga específica cuja cultura está sofrendo infecção (BARTLETT *et al.*, 2002).

Contudo, mesmo sendo necessário o uso das estrobilurinas para garantir a eficiência da produção, vale advertir que a contaminação de alimentos de origem agrícola com tais substâncias e também outros agrotóxicos, podem acarretar altos riscos a saúde do consumidor.

Neste sentido, a ANVISA estabelece para as estrobilurinas na cultura de feijão, com exceção da fluoxastrobina, o modo de aplicação, o limite máximo de resíduos (LMR) e o intervalo de segurança antifúngico, que é o tempo que deve ser resguardado entre a última aplicação do agrotóxico e a colheita, conforme apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Limites máximos de resíduos (LMR) e emprego das estrobilurinas em culturas de feijão no Brasil.

Estrobilurina	Modalidade de		Intervalo de
	Emprego	LMR (mg Kg <sup>-1</sup> )	
	(aplicação)		(dias)
Azoxistrobina	Foliar	0,10	7
Cresoxim-metílico	Foliar	0,05	14
Dimoxistrobina	Foliar	0,05	14
Picoxistrobina	Foliar	0,01	7
Piraclostrobina	Foliar	0,10	14
Piraclostrobina	Sementes	0,10	ND
Trifloxistrobina	Foliar	0,20	15

ND= não disponível

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b; BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b; BRASIL, 2011; BRASIL, 2015.

#### 1.4. Métodos analíticos empregados para determinação de estrobilurinas

Os principais métodos descritos na literatura para determinação de estrobilurinas em diversas matrizes envolvem técnicas de separação. As técnicas

mais empregadas são cromatografia a gás (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com diferentes modos de detecção. Contudo, alguns trabalhos utilizando a cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC) e técnicas eletroquímicas também são reportados. A seguir são indicados alguns exemplos mais relevantes.

Em 2001 foi reportado um método para determinação de azoxistrobina, cresoxim-metílico e trifloxistrobina em amostras de trigo, maçã e uvas por GC com detectores de nitrogênio-fósforo (NPD), de espectrometria de massa (MS) e por captura de elétrons (ECD). Foi utilizado acetato de etila e ciclo-hexano para extração dos analitos da matriz e um processo de purificação das amostras por cromatografia de permeação em gel. Para os três detectores as recuperações médias das estrobilurinas variaram de 70 a 114 % e os valores de limites de detecção (LD) entre 0,004 mg kg<sup>-1</sup> e 0,014 mg kg<sup>-1</sup> (CHRISTENSEN e GRANBY, 2001).

No ano de 2009 foi descrito um método para determinação de sete estrobilurinas (azoxistrobina, metominostrobin, cresoxim-metílico, trifloxistrobina, picoxistrobina, dimoxistrobina e piraclostrobina) em alimentos para bebê utilizando GC/MS. Neste estudo foi proposto um pré-tratamento da amostra usando microextração em fase sólida (SPEM) com imersão direta da fase extratora (fibra de polidimetilsiloxisano-divinilbenzeno) no cromatógrafo a gás para dessorção térmica dos analitos. As recuperações para as estrobilurinas variaram de 96 a 109 % e os limites de detecção de 0,01 a 0,04 µg kg<sup>-1</sup> (VIÑAS *et al.*, 2009).

Um estudo publicado em 2011 relatou a produção de colunas de imunoafinidade, avaliando três anticorpos diferentes para extração em fase sólida e concentração de resíduos de piraclostrobina de amostras de suco de frutas. As análises dos extratos das amostras e determinação dos teores de piraclostrobina foram realizadas por HPLC com coluna de fase reversa C18 e eluição no modo isocrático com acetonitrila/água (80:20 % v/v). A detecção absorciométrica em 276 nm foi realizada utilizando sistema de arranjo de diodos (DAD). Obteve-se um fator de pré-concentração de 50 vezes para a piraclostrobina usando a coluna de imunoafinidade e limite de detecção de 0,01 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, as recuperações deste analito nas amostras fortificadas variaram de 92,5 a 104,0 % (ESTEVE-TURRILLAS *et al.*, 2011).

Um trabalho utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC) foi reportado para a determinação de picoxistrobina e piraclostrobina em amostras fortificadas de urina. Para eliminação de interferentes as amostras foram submetidas a um processo de purificação dos extratos usando um cartucho de extração em fase sólida (SPE) contendo C18. Foi empregado também um método de pré-concentração *on-line*, possibilitando a obtenção de limites de quantificação instrumental de  $32 \mu\text{g L}^{-1}$  para picoxistrobina e  $21 \mu\text{g L}^{-1}$  para piraclostrobina. As recuperações médias destes fungicidas nas amostras de urina fortificadas foram 109 % e 75 %, para picoxistrobina e piraclostrobina, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2009).

Com relação à determinação de estrobilurinas em feijão, poucos trabalhos foram encontrados na literatura. Dentre os mais relevante pode-se citar um estudo publicado em 2014 para avaliação da persistência de cresoxim-metílico e outros pesticidas em amostras de feijão verde submetidas a processos domésticos simples, como lavagem e aquecimento (cozimento). O preparo da amostra foi baseado no método de extração QuEChERS, um método já proposto na literatura para extração de multirresíduos de pesticidas, e as análises realizadas por GC-ECD. As recuperações para cresoxim-metílico, avaliadas através do branco de extração fortificado, variaram de 60 a 104 %, e os resultados mostraram que processos de lavagem e aquecimento das amostras podem eliminar de 38 a 57 % dos resíduos desta estrobilurina. Conclui-se que tais processos domésticos simples podem minimizar o risco de contaminação por ingestão desses pesticidas (AGUILERA *et al.*, 2014).

Outro trabalho também abordou a determinação de uma estrobilurina, a azoxistrobina, em feijão verde e ervilhas. Para extração do analito nas amostras foi empregada acetonitrila com adição de sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio para induzir a separação e o particionamento entre as fases, e um processo de purificação da matriz foi realizado utilizando carvão neutro ativado. As análises foram realizadas por HPLC utilizando uma coluna Kinetex Bifenil, eluição isocrática com acetonitrila/solução de ácido acético 0,4 % (50:50 % v/v) e detecção espectrofotométrica no UV (255 nm). As análises também foram realizadas por GC/MS para confirmação dos resultados. As recuperações para azoxistrobina nas amostras variaram de 83,7 a 107,9 % e o limite de quantificação foi de  $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$  (ABDELRAHEEM *et al.*, 2015).

Pode-se ainda destacar, um trabalho publicado em 2010, sendo o primeiro a utilizar uma técnica eletroanalítica para determinação de estrobilurinas. Neste, foram otimizadas condições para determinação simultânea de azoxistrobina e dimoxistrobina em amostras de batata, uva e suco de uva. Os analitos foram extraídos em fase sólida (SPE) utilizando um cartucho de C18 para eliminação dos interferentes e pré-concentração das estrobilurinas de interesse, e analisados por voltametria de onda-quadrada acoplada a voltametria de redissolução adsortiva empregando um eletrodo de mercúrio de gota pendente. Os picos de redissolução para azoxistrobina e dimoxistrobina apresentaram máximos, respectivamente, em torno de -928 mV e -650 mV. Foram obtidas recuperações das estrobilurinas entre 72 e 102 % e limites de quantificação variaram de 13,5 a 45  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a azoxistrobina e de 27,2 a 119  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a dimoxistrobina nas diferentes amostras (PACHECO *et al.*, 2010).

O primeiro estudo utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) foi reportado para determinação de cresoxim-metílico em amostras de suco de uva. A estrobilurina também foi extraída por SPE em um cartucho de C18, e as análises foram realizadas por voltametria de onda quadrada (SWV). As medições foram feitas através da varredura de 1000 a 1750 mV, obtendo-se um pico anódico para cresoxim-metílico em 1420 mV. Baseado nos resultados experimentais foi proposto duas possibilidades de mecanismo de oxidação desta estrobilurina que justificam a oxidação irreversível promovida pela perda de dois elétrons. As recuperações obtidas para cresoxim-metílico nas amostras variaram de 91,6 a 105,3 % e o limite de quantificação foi 0,27  $\text{mg L}^{-1}$  (DORNELLAS *et al.*, 2013).

Na sequência este mesmo autor e colaboradores publicaram alguns trabalhos utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de outras estrobilurina por SWV como, por exemplo, piraclostrobina e dimoxistrobina em amostras de águas naturais e suco de uva (DORNELLAS *et al.*, 2014b e 2014c). Além disso, reportou a comparação entre voltametria de onda quadrada (SWV) e análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica por múltiplos pulsos, também empregando o eletrodo de DDB, para determinação de picoxistrobina em amostras de águas naturais. O método desenvolvido por SWV se mostrou mais sensível (limite de quantificação de 0,25  $\text{mg L}^{-1}$ ) em comparação ao método BIA-amperométrico (limite de quantificação de 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Entretanto, o

método BIA-amperométrico apresentou maior faixa linear e melhor frequência analítica (108 medições por hora) (DORNELLAS *et al.*, 2015).

O uso de técnicas eletroanalíticas para determinação das estrobilurinas, embora ainda recente e em desenvolvimento, tem mostrado potencialidade. Tais técnicas ainda permitem acoplamento com outras, de forma a agregar vantagens de ambas. Uma possibilidade, por exemplo, é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica (DE) utilizando o eletrodo de DDB, que mostrou-se eficiente para detecção das estrobilurinas, conforme reportado na literatura, e substitui os eletrodos de mercúrio, cujo uso tem sido desmotivado devido a sua toxicidade. Além disso, não foram encontrados na literatura trabalhos para a avaliação simultânea das sete principais estrobilurinas com detecção eletroquímica em amostras de feijão.

### **1.5. O acoplamento “homemade” da técnica de separação por HPLC e a detecção eletroquímica**

Todos os métodos anteriormente citados apresentaram resultados satisfatórios na determinação de estrobilurinas em diversas matrizes. Contudo, por razões de segurança alimentar, a legislação tem sido cada vez mais restritiva com relação aos agrotóxicos de modo geral, incluindo as estrobilurinas. Neste sentido, é relevante o desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais eficientes, confiáveis, sensíveis e baratos para monitoração dos resíduos de estrobilurinas em produtos agrícolas.

Desta forma, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) combinada à detecção eletroquímica (DE) se mostra uma alternativa eficiente para determinação das estrobilurinas. A principal vantagem de utilização do HPLC é a possibilidade de eliminação dos interferentes, o que agrega sensibilidade e seletividade ao método. Além disso, utilizando a própria bomba do HPLC é criado um sistema automatizado de análise em fluxo, que garante rapidez, simplicidade, repetibilidade nas análises, baixo consumo de reagentes e possibilidade de associação com vários detectores (MIRANDA *et al.*, 2002). O acoplamento “*homemade*” ainda possibilita a inclusão de

mais um detector à técnica sem a necessidade de aquisição de novos equipamentos com elevado custo.

### 1.5.1. Amperometria

A amperometria é a técnica mais adequada para detecção eletroquímica em um sistema gerado pelo acoplamento com o HPLC. Nesta técnica aplica-se uma diferença de potencial constante durante toda a análise, na qual a espécie eletroativa sofre um processo redox gerando uma corrente faradaica, que por sua vez é proporcional à concentração do analito presente na solução (SANTOS, *et al.*, 2011).

A amperometria destaca-se por apresentar alta sensibilidade em relação às técnicas voltamétricas baseadas na varredura de potencial, principalmente pela menor interferência da corrente capacitiva, que neste caso tende a um valor baixo e constante devido à aplicação de um potencial fixo (QUINTINO, 2003). Isto geralmente conduz a menores limites de detecção e quantificação, que é ideal para análises de fungicidas traços como as estrobilurinas.

Esta técnica é amplamente associada a medições em regime de fluxo, como a técnica de cromatografia líquida e abordagens de análise por injeção em fluxo (FIA) ou batelada (BIA) (ALMEIDA *et al.*, 2015). Neste caso, é obtido um sinal transiente na forma de um pico de corrente, atribuído ao processo faradaico de interesse, registrado em um gráfico de corrente *versus* tempo de análise (amperograma).

Análises amperométricas em sistemas em fluxo proporcionam vantagens como redução de custos, maior simplicidade e frequência analítica. Contudo, uma limitação da técnica de amperometria é a seletividade, quando necessária a determinação simultânea de diferentes compostos eletroativos. Além de maior interferência de outras espécies, principalmente quando a análise é realizada em potenciais extremos. (SANTOS *et al.*, 2009). Neste sentido, justifica-se mais uma vez o acoplamento com o HPLC para determinação simultânea das estrobilurinas, uma vez que a separação dos analitos previamente a detecção amperométrica

garante a seletividade do método em relação aos analitos, além de eliminação de outras substâncias interferentes.

#### 1.5.2. O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB)

O diamante é um material com propriedades atraentes para diversas aplicações, como dureza, alta resistividade elétrica e elevada condutividade térmica. Devido a sua excelente estabilidade química se tornou um material de interesse na área de eletroquímica, contudo, por ser um isolante foi considerado a princípio inaplicável como material para fabricação de eletrodos. No entanto, graças ao desenvolvimento de tecnologias adequadas foi possível à fabricação de filmes finos de diamante a partir da fase gasosa, sob determinadas condições de temperatura e pressão capazes de promover o crescimento de diamante policristalino sobre substratos. Durante o processo, são incluídos agentes dopantes ao filme de diamante para conferir propriedades condutoras, necessária para aplicações em eletroquímica (PLESKOV, 2002).

Dentre as metodologias de obtenção de filmes de diamantes, a mais difundida é a técnica de deposição química a partir da fase vapor, do inglês “chemical vapour deposition” (CVD). Durante a CVD um plasma é criado usando filamentos aquecidos (~2000 °C) ou microondas. Uma fonte de carbono, geralmente metano, hidrogênio (H<sub>2</sub>) e o agente dopante, em fase gasosa, são introduzidos na câmara de CVD onde ocorre o crescimento do filme no substrato escolhido (Si, Nb, Mb, Ti, Ta, W, etc.). Para fabricação de filmes de diamante dopado com boro, normalmente são utilizados como agentes dopantes o diborano ou trimetil-boro (MACPHERSON, 2015).

Quando dopado com boro, o diamante apresenta propriedades eletrônicas de semicondutor ou semimetais, dependendo do nível de dopagem. Se o boro for incluído em baixas concentrações ( $10^{18}$  a  $10^{20}$  cm<sup>-3</sup>), o comportamento do filme de diamante será de um semicondutor do tipo p. Neste caso os átomos de boro são inseridos na estrutura cristalina durante o crescimento do filme de diamante, substituindo átomos de carbono. Os átomos de boro funcionam como aceitadores de elétrons contribuindo para formação de lacunas na estrutura cristalina, que permitem

a passagem de carga. Já quando o boro é adicionado em grandes concentrações ( $>10^{20} \text{ cm}^{-3}$ ) o diamante se comporta como um semimetal apresentando baixa resistência (GRANGER *et al.*, 1999; HUPERT *et al.*, 2003).

O eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) tem se destacado em diversas aplicações, como na determinação de metais, de moléculas orgânicas de interesse biológico e também de agrotóxicos (SELVA e PAIXÃO, 2016; WEI *et al.*, 2014; XU *et al.*, 1997; ZHAO *et al.*, 2006). O eletrodo de DDB possui algumas características únicas como, por exemplo, ampla janela de potencial em meios aquosos e não aquosos, estendendo-se normalmente de -1,35 a +2,3 V, contudo podendo chegar até 3 V em determinadas condições. Isto permite várias aplicações importantes não possibilitadas por outros eletrodos (PLESKOV, 2002).

Além disso, o eletrodo de DDB apresenta baixa corrente capacitiva levando a uma boa relação sinal-ruído, menor sensibilidade ao oxigênio dissolvido, resistência à corrosão e baixa suscetibilidade de envenenamento do eletrodo, sendo assim de vida útil prolongada (DRAGOE *et al.*, 2006; LUONG *et al.*, 2009). Desta maneira, apresenta alta estabilidade, alta sensibilidade e baixos limites de detecção, sendo estas as principais motivações para sua utilização como eletrodo de trabalho para determinação eletroquímica de resíduos de estrobilurinas em alimentos.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método para quantificação dos teores residuais de fungicidas da classe das estrobilurinas em amostras de feijão utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção simultânea eletroquímica (DE) e espectrofotométrica no UV.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar um método de análise para a determinação das setes estrobilurinas selecionadas (azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção simultânea eletroquímica (DE) e espectrofotométrica no UV;
- Otimizar o acoplamento “*homemade*” do detector eletroquímico ao HPLC, ajustando as condições instrumentais para detecção das estrobilurinas por amperometria, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro como eletrodo de trabalho;
- Comparar o método de detecção amperométrico com a detecção espectrofotométrica no UV;
- Otimizar um método de tratamento das amostras de feijão para extração das estrobilurinas e posterior análise;
- Quantificar os teores residuais de estrobilurinas nas amostras de feijão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1. Materiais e reagentes

Os solventes acetonitrila (ACN) da marca Sharlau, metanol (MeOH) da marca J.T.Backer, ácido fosfórico e acetato de etila da marca Tedia e n-hexano da marca Dinâmica foram de grau HPLC. Etanol e éter etílico foram de grau analítico da marca Vetec. Os padrões de azoxistrobina, cresoxim-metílico, dimoxistrobina, fluoxastrobina, picoxistrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina foram da marca Riedel-de-Haen, todos com 99,0 % m/m de pureza. Os padrões das estrobilurinas foram dissolvidos individualmente em ACN para a obtenção de soluções padrão estoque  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

Para o tratamento das amostras, ainda foram utilizados sílica 70-230 mesh e sulfato de sódio anidro da marca Vetec, NaCl com 99,0 % m/m de pureza da marca Vetec e lã de vidro. Para remoção de umidade e impurezas voláteis, a sílica e sulfato de sódio foram previamente levadas em estufa a 120°C por 2 horas e a lã de vidro em mufla a 250 °C também por 2 horas.

No preparo de soluções foram utilizados ácido sulfúrico grau analítico da marca Impex e ácido clorídrico grau analítico da marca Vetec e como eletrólito suporte foi utilizado o  $\text{NaClO}_4$  com 90,0 % m/m de pureza da marca Spectrum. Para as demais soluções foi utilizada água deionizada ultrapura (Milli-Q - Quantum Ex). Para filtrar as soluções de injeção foram utilizados filtros com membrana de PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade da marca Agilent.

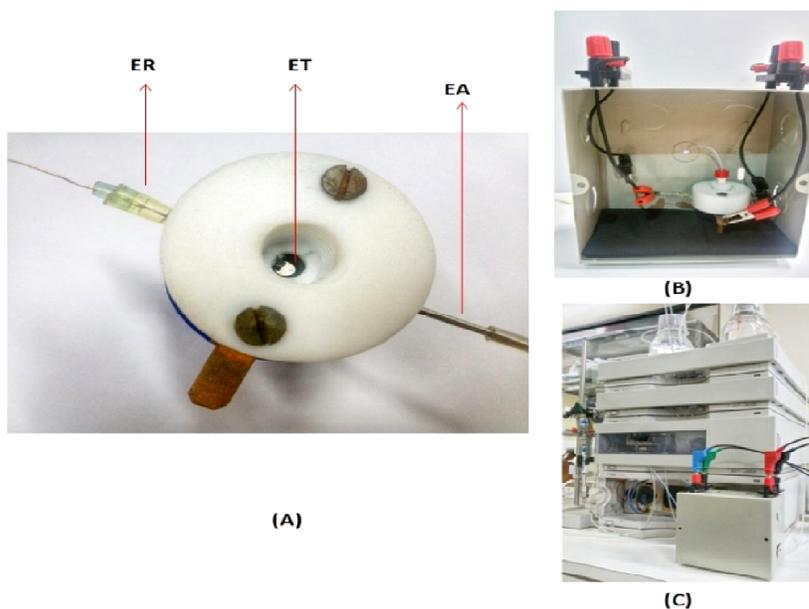
#### 3.2. Instrumentação

O método cromatográfico para quantificação das estrobilurinas foi desenvolvido em um HPLC Agilent 1100 serie com injetor manual e alças de amostragem de 20 e 50  $\mu\text{L}$  (válvula Rheodyne), sistema desgaseificador, bomba quaternária, detector UV-Vis de múltiplos comprimentos de onda (MWD) e software Agilent Chemstation LC Systems. Foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase

reversa C 18 Inertsil ODS-3 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm de diâmetro de partícula), com coluna de guarda Inertsil ODS.

Para a realização de todas as medidas eletroquímicas, um potenciostato µAutolab Type III (EcoChemie, Utrecht, Holanda) interfaceado a um microcomputador e software GPES 4.9 foram usados. Uma célula eletroquímica de teflon construída no laboratório e já reportada pelo grupo (HONÓRIO *et al.*, 2014) foi adaptada para o trabalho, possuindo volume interno de 100 µL. Esta célula *wall-jet*, mostrada na Figura 2-A, com um eletrodo de trabalho (ET) de diamante dopado com boro (DDB), um eletrodo de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> também construído no laboratório como eletrodo de referência (ER) (PEDROTTI *et al.*, 1996) e uma agulha de aço inox como eletrodo auxiliar (EA) foram usados para as análises quantitativas. Vale ressaltar que os ER e EA auxiliar foram posicionados com um ângulo de aproximadamente 10° em relação ao plano da célula para evitar vazamento. A célula eletroquímica foi instalada em uma gaiola de Faraday, também construída no laboratório, conforme mostrado na Figura 2-B, para a minimização do ruído eletrônico.

**Figura 2:** (A) Célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho de DDB (ET), eletrodo de referência Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> (ER) e agulha de aço inox como eletrodo auxiliar (EA); (B) Célula eletroquímica instalada na gaiola de Faraday; (C) Arranjo instrumental para o acoplamento das técnicas.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para o tratamento das amostras foi utilizado um banho ultrassônico da marca Unique UltraSonic Cleaner, modelo USC 2800 (25 kHz e 120 W), rotavapor Fisatom (70 W), vortex Phoenix, modelo AP-56 (130 W) e pHmetro com eletrodo de membrana de vidro para medidas de pH da marca Digimed.

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

Para a realização dos experimentos o eletrodo de DDB foi submetido diariamente a um processo de limpeza e ativação. A etapa de limpeza consistiu na imersão do eletrodo em uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e aplicação de uma corrente de  $+0,01 \text{ A}$  por  $1000 \text{ s}$ . Em seguida, foi utilizada uma ativação catódica em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $3,0 \text{ mol L}^{-1}$  por um curto período de tempo, apenas  $340 \text{ s}$  sob um potencial de  $-2,3 \text{ V}$  (AZEVEDO, 2014).

### **3.4. Testes preliminares**

Para a avaliação do comportamento eletroquímico das estrobilurinas com eletrodo de DDB, foram obtidos voltamogramas cíclicos em meio de ACN, com proporção fixada em  $60 \% \text{ v/v}$ . Como porção aquosa ( $40\%$  restante) foram testados água deionizada pH  $5,5$ , tampão Britton-Robinson (tampão BR) pH  $2,0$  e pH  $4,0$  e tampão fosfato pH  $3,0$  e pH  $4,0$ . O potencial aplicado foi variado de  $0,0$  a  $1,8 \text{ V}$  e a velocidade de varredura de  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ . A concentração das soluções individuais das estrobilurinas na célula eletroquímica foi de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , cuja concentração em  $\text{mg L}^{-1}$  variam de  $31,3$  a  $45,9$ . Após os testes iniciais optou-se por expressar as concentrações das estrobilurinas em  $\text{mg L}^{-1}$  por ser mais conveniente para posterior apresentação dos resultados nas amostras.

Os voltamogramas hidrodinâmicos das soluções individuais das estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de ACN/Solução  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH  $4,0$  ( $60:40 \text{ v/v}$ ), foram obtidos por amperometria de múltiplos pulsos numa faixa de potencial

entre 1,1 a 1,9 V. O eletrólito suporte utilizado nestes testes preliminares foi o  $\text{NaClO}_4$  em uma concentração de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 3.5. Determinação da área ativa do eletrodo de DDB, investigação do transporte de massa e avaliação do comportamento do eletrodo de referência em meio orgânico

A área ativa do eletrodo de DDB foi determinada utilizando uma solução de ferricianeto de potássio na concentração (C) de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ , em meio de KCl  $0,1 \times 10^{-3} \text{ mol cm}^{-3}$ , cujo coeficiente de difusão (D) é  $6,39 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Voltamogramas cíclicos foram obtidos para as seguintes velocidades de varredura: 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,10  $\text{V s}^{-1}$ . Para esse sistema o número de elétrons envolvidos na reação redox (n) é igual a 1. Para o cálculo da área ativa com base na equação 1, foi construído um gráfico da corrente de pico ( $I_p$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) e determinado o coeficiente angular, sendo este utilizado para determinar a área ativa (A) do eletrodo em  $\text{cm}^2$ .

$$I_p = [(2,686 \times 10^5)n^{3/2}ACD] v^{1/2} \quad \text{Equação (1)}$$

A investigação do transporte de massa para as estrobilurinas foi realizado utilizando soluções individuais destas, na concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de ACN/Solução  $\text{H}_3\text{PO}_4$  pH 4,0 (60:40 v/v) e  $\text{NaClO}_4$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Voltamogramas cíclicos foram obtidos para velocidades de varredura entre 0,01 e 0,5  $\text{V s}^{-1}$ . Gráficos da corrente de pico ( $I_p$ ) em função da velocidade de varredura (v) e da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) foram construídos para interpretação dos resultados.

Para avaliação do comportamento do eletrodo de referência em meio não aquoso foram obtidos voltamogramas cíclicos para as sete estrobilurinas, utilizando soluções individuais conforme descrito anteriormente. A fim de comparação, foram utilizados para obtenção dos voltamogramas cíclicos o eletrodo de referência  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ , cuja solução de preenchimento do eletrodo é uma solução saturada de

KCl, e o eletrodo de referência indicado para meios orgânicos Ag/AgCl<sub>(LiCl saturado em etanol)</sub>, cuja solução de preenchimento é uma solução saturada de LiCl em etanol.

### 3.6. Condições de separação e detecção das estrobilurinas por UV e DE

O método cromatográfico desenvolvido para a separação das estrobilurinas utilizou como fase móvel ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0, em modo de eluição por gradiente, cuja porcentagem de ACN variou de 48 a 53 % de 0 a 25 minutos, e de 53 a 60 % de 25 a 35 minutos, com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O tempo total para a eluição dos analitos foi de 43 minutos e o comprimento de onda selecionado foi de 200 nm para detecção das estrobilurinas por UV, onde se observou o máximo de absorção das mesmas.

O acoplamento de uma célula eletroquímica como detector ao HPLC foi “*homemade*”. A célula foi inserida ao canal de descarte do HPLC logo após o detector MWD-UV. Desta forma, as estrobilurinas foram primeiramente detectadas por UV e em seguida conduzidas pelo fluxo para a célula eletroquímica para oxidação na superfície do eletrodo de DDB em um potencial de 1,9 V. As detecções são praticamente simultâneas, visto a pequena distância entre os detectores ligados por um canal de cerca de 15 cm de comprimento, proporcionando tempos de retenção que diferem em aproximadamente 20 segundos de um detector para o outro. O eletrólito suporte utilizado foi o NaClO<sub>4</sub> adicionado apenas na porção aquosa da fase móvel na concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup>, de modo que sofreu diluição durante as análises devido à mistura com a acetonitrila, tendo sua concentração variando de 26 a 20 mmol L<sup>-1</sup> durante a corrida.

### 3.7. Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação

As curvas analíticas para determinação das estrobilurinas abrangeu os níveis de concentração de 0,0; 5,0; 7,0; 10,0; 12,0; 15,0 mg L<sup>-1</sup> preparados a partir das soluções padrão estoque 1,0x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> e diluídos em ACN/solução de ácido

fosfórico pH 4,0 (48:52 v/v). O padrão *surrogate* (PS - Fluoxastrobina) foi adicionado em todos os níveis da curva analítica de cada estrobilurina na concentração de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Todas as soluções foram filtradas em filtro com membrana de PTFE 0,45 µm de porosidade antes das injeções.

As concentrações dos analitos nas amostras foram calculadas pela curva analítica obtida pela razão entre a área do analito e a área do padrão *surrogate* e pela razão da concentração do analito e a concentração do *surrogate*, em cada nível. A equação 2 mostra como a concentração dos analitos é determinada pela curva.

$$\frac{(A)_{analito}}{(A)_{PS}} = a \left( \frac{C_{analito}}{C_{PS}} \right) + b \quad \text{Equação (2)}$$

Sendo:

A = área do pico

a = coeficiente angular da reta

b = coeficiente linear da reta

C = concentração

As curvas obtidas com triplicada de cada nível de concentração foram utilizadas para a avaliação da linearidade e dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). A linearidade foi avaliada através da análise de variância ANOVA a fim de verificar falta de ajuste no modelo linear. Para isto, foi calculado o valor de  $F_{calculado}$ , conforme equação 3, com auxílio do *software* Excel para o tratamento dos dados.

$$F_{calculado} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo  $MQ_{faj}$  a média quadrática da falta de ajuste e  $MQ_{ep}$  a média quadrática do erro puro, cujos valores de graus de liberdade foram, respectivamente, 4 e 10.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações 4 e 5:

$$LD = \frac{3 \times S_b}{a} \quad \text{Equação (4)}$$

$$LQ = \frac{10 \times S_b}{a} \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo,  $S_b$  o desvio padrão do coeficiente linear e  $a$  o coeficiente angular da reta obtida para a curva analítica a partir da regressão linear. Para os limites de detecção e quantificação do método, apresentados em  $\text{mg kg}^{-1}$ , foram levados em consideração fatores de diluição e massa da amostra estabelecidos na etapa de preparo destas, a fim de expressar o nível de detectabilidade e quantificação das estrobilurinas na amostra real, o feijão.

### 3.8. Aquisição das amostras

As amostras de feijão foram adquiridas entre os anos de 2015 e 2016 no comércio local da cidade de Juiz de Fora em Minas Gerais (MG), com exceção da amostra de feijão verde que foi adquirida na feira livre de Salvador, Bahia.

Foram selecionadas amostras da espécie de feijão comum e feijão caupi, variando entre os tipos mais acessíveis no mercado varejista. As amostras possuem origens variadas, adquirida de empresas empacotadoras e distribuidoras populares no ramo e situadas em diversas regiões do país. A Tabela 4 apresenta as amostras estudadas neste trabalho denominadas conforme o tipo de feijão e seguidas de um número, para os casos de amostras do mesmo tipo, porém de marcas diferentes. Também são informadas na Tabela 4 a espécie de feijão da qual pertence cada amostra e a localização das empresas empacotadoras/distribuidoras.

Vale ressaltar, que a localização da empresa não indica necessariamente a localização dos cultivares de feijão. Tais empresas recebem seus feijões de diversos produtores distribuídos em diferentes regiões do país de acordo com a safra e o período do ano. A amostra de feijão verde é a única amostra não processada, sendo obtida de pequenos produtores da região de Salvador. Para nenhuma das marcas/empresas foi possível obter informações sobre a utilização

de agrotóxicos, especialmente as estrobilurinas, em seus produtos durante o cultivo.

**Tabela 4:** Amostras de feijão selecionadas.

<b>Amostras</b>	<b>Espécie de feijão</b>	<b>Localização da empresa empacotadora</b>
Fradinho 1	Caupi	Juiz de Fora - MG
Fradinho 2	Caupi	São Paulo - SP
Carioca 1	Comum	Juiz de Fora - MG
Carioca 2	Comum	Ervália - MG
Preto	Comum	Cajuri – MG
Branco	Comum	Cajuri – MG
Verde (não processado)	Caupi	Salvador - BA

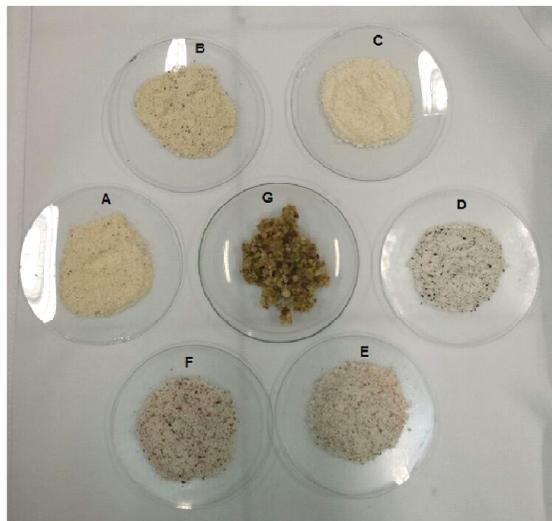
Fonte: Elaborada pela autora.

### **3.9. Preparo de amostra**

O método de extração e purificação da amostra foi adaptado ABREU *et al.* (2005) e FAO (2009). Nas condições otimizadas e adotadas para o tratamento das amostras constam as etapas de homogeneização, extração, *clean up* e concentração da amostra para análise.

Para homogeneização e redução do tamanho de partícula, as amostras de feijão foram trituradas em um processador de alimentos comercial. Na Figura 3 são ilustradas as amostras trituradas, podendo-se observar a obtenção de um pó relativamente fino para as amostras de feijão seco. As amostras de feijão Verde, por apresentar maior teor de água formou uma espécie de pasta, com partículas um pouco maiores.

**Figura 3:** Amostras de feijão trituradas. A) Fradinho 1; B) Fradinho 2; C) Branco; D) Preto; E) Carioca 1; F) Carioca 2; G) Verde.



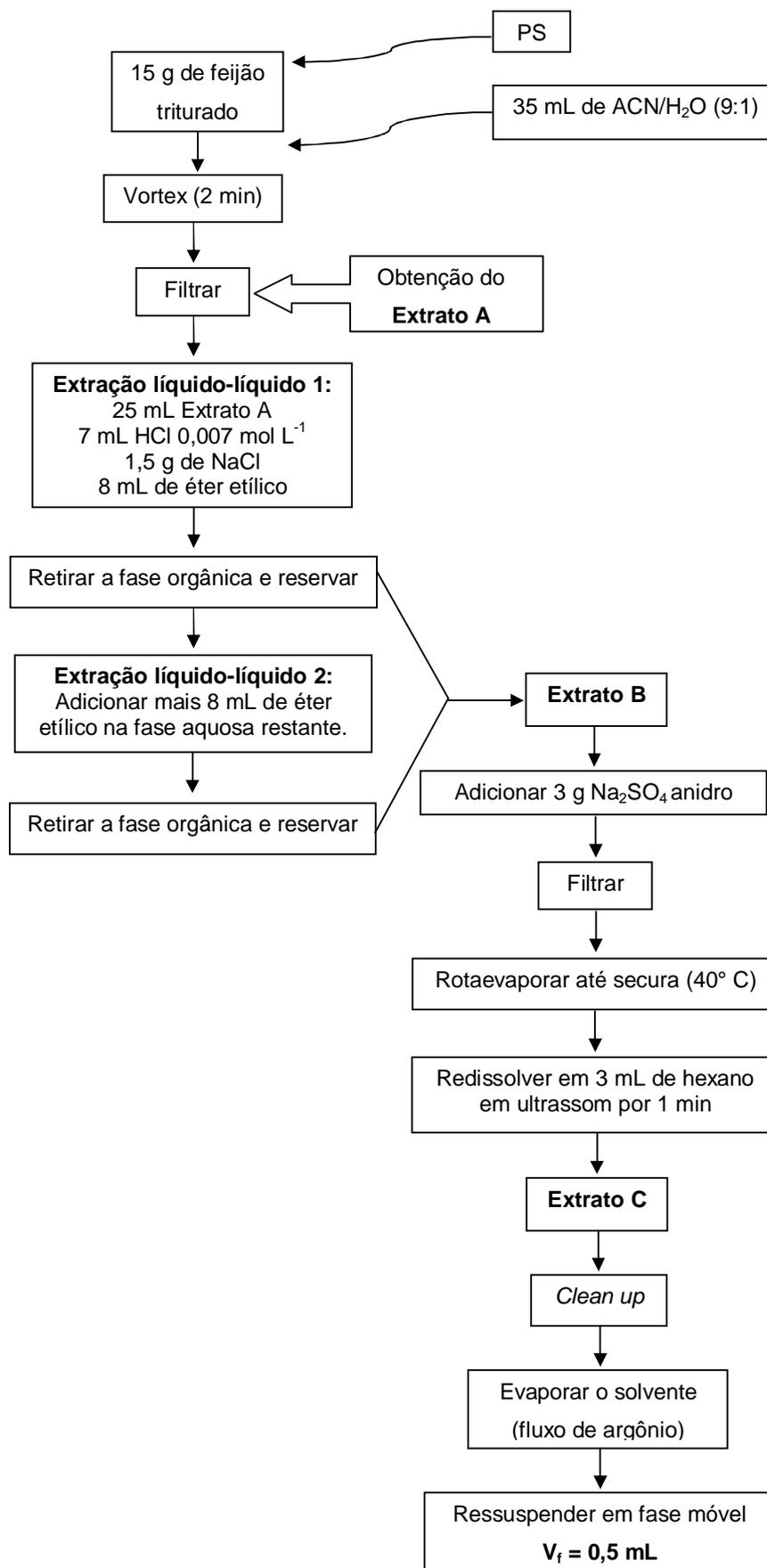
Fonte: Elaborada pela autora.

O processo de extração seguiu o procedimento apresentado no fluxograma da Figura 4. Em todas as amostras e brancos de extração foi adicionado o padrão *surrogate* (PS), logo após a pesagem do feijão triturado, para a obtenção de uma concentração final de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o preparo das amostras fortificadas foram adicionados padrões das estrobilurinas, também para uma concentração final de cada analito de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Cada etapa do processo será abordada no item 4.5. Vale ressaltar ainda, que as extrações “líquido-líquido 1 e 2” foram realizadas em funil de separação e, para a filtração dos extratos A e B, foram utilizadas seringas de polietileno de 60,0 mL recheadas com uma pequena camada de lã de vidro.

A purificação dos extratos foi realizada por cromatografia de adsorção em coluna aberta (*clean up*). A coluna de *clean up* consistiu em uma seringa de polietileno de 5,0 mL, que inicialmente foi recheada com uma pequena camada de lã de vidro (1,0 cm). Sobre esta foram adicionados 1,0 g de sílica e uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro (1,0 cm) para remover água residual do extrato e fixar a superfície superior do leito da coluna.

A coluna foi condicionada previamente ao tratamento da amostra, percolando por ela 2,5 mL de etanol e em seguida 10,0 mL de hexano. Para eluição das estrobilurinas retidas na coluna, foram utilizados 5,0 mL de acetato de etila. Como

reservatório do eluente, foi preenchida uma bureta com acetato de etila e posicionada acima da coluna de *clean up* para manter o fluxo contínuo do solvente no momento de eluição das estrobilurinas da coluna. A solução utilizada para ressuspensão final dos extratos das amostras para injeção foi a própria fase móvel, consistindo em ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (48:52 v/v). Todas as soluções foram filtradas em filtro de membrana PTFE 0,45 µm antes das injeções.

**Figura 4:** Fluxograma de preparo da amostra de feijão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Testes preliminares

O acoplamento das técnicas requer condições adequadas para a separação dos analitos por HPLC e detecção simultânea por UV e eletroquímica. Neste sentido, a fase móvel é um importante parâmetro a ser avaliado para separação dos compostos por cromatografia líquida, e também, nessa situação de acoplamento, representa o meio no qual as estrobilurinas serão detectadas eletroquimicamente. Por isso, inicialmente fez-se alguns estudos para verificar a viabilidade da detecção eletroquímica para as sete estrobilurinas selecionadas em meios que, posteriormente, poderiam ser utilizados como fase móvel para separação cromatográfica das mesmas.

A literatura reporta algumas misturas de solventes adequadas para a eluição das estrobilurinas, geralmente utilizando acetonitrila ou metanol com soluções aquosas ácidas ou tampões. Adaptando-se de DORNELLAS *et al.* (2013) e CAMPILLO *et al.*, (2010) foi escolhida acetonitrila como solvente orgânico, com proporção fixada em 60% v/v, para os testes preliminares. A fim de avaliar o comportamento eletroquímico das estrobilurinas, bem como a influência do pH na detecção das mesmas com eletrodo de DDB, os voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 5 foram obtidos utilizando as condições experimentais descritas no item 3.4.

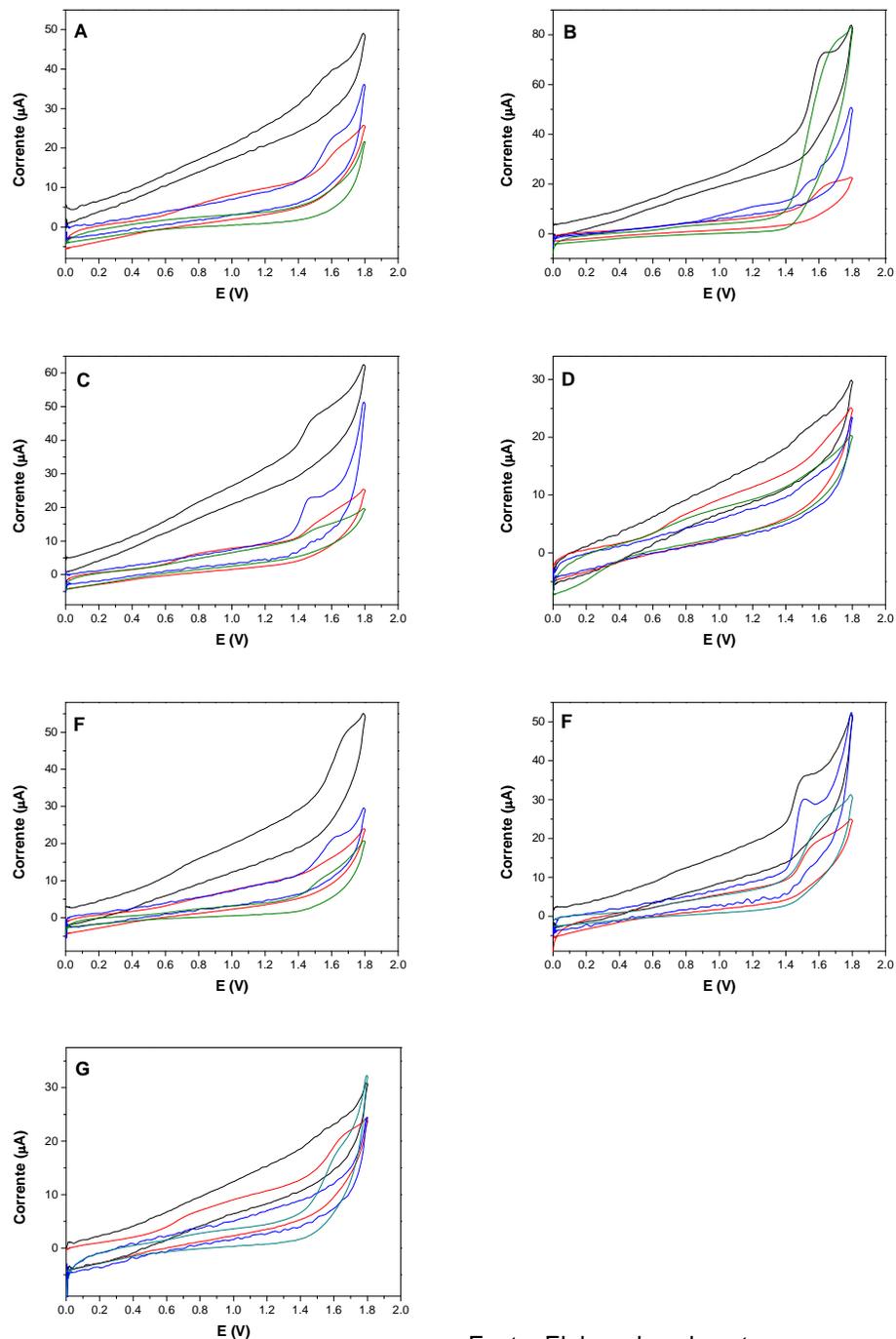
A análise dos voltamogramas cíclicos permitiu observar pelo menos um pico de oxidação para cinco das estrobilurinas em pH 4,0 e determinar os potenciais de pico ( $E_p$ ) para as mesmas (azoxistrobina  $E_p= 1,6V$ ; cresoxim-metílico  $E_{p1}= 1,5 V$  e  $E_{p2}= 1,6V$ ; dimoxistrobina  $E_p= 1,5 V$ ; picoxistrobina  $E_p= 1,6 V$ ; piraclostrobinina  $E_p= 1,5 V$ ). Já a trifloxistrobina apresentou uma corrente de pico pouco sensível ( $E_p=1,6 V$ ) em pH 3,0. Também para a fluoxastrobina observou-se baixa sensibilidade, o que dificultou a identificação de sinais de corrente consideráveis em todos dos valores de pH avaliados. Nas condições experimentais avaliadas não foram observados picos de redução das estrobilurinas nas varreduras de potencial no sentido catódico.

No voltamograma cíclico apresentado na Figura 5-B, em pH 4,0, pode-se observar dois picos de oxidação para cresoxim-metílico, já identificados acima. Este

comportamento foi descrito por DORNELLAS (2014a), apontando dois picos de oxidação para as estrobilurina analisadas por voltametria de onda quadrada. O autor ainda propôs um mecanismo de oxidação para cresoxim-metílico, baseado na oxidação de grupos aromáticos presentes na estrutura das estrobilurinas, já que estas não possuem grupos químicos facilmente oxidáveis, o que justifica a necessidade de um potencial elevado para promover a reação. Tal mecanismo proposto aponta para a oxidação irreversível, promovida pela perda de dois elétrons.

Contudo, conforme os voltamogramas apresentados na Figura 5, não foi possível verificar o segundo pico de oxidação para as demais estrobilurinas, nas condições experimentais utilizadas. Possivelmente, nestas condições a técnica de voltametria cíclica não foi sensível o suficiente para distinção de dois picos de oxidação das estrobilurinas.

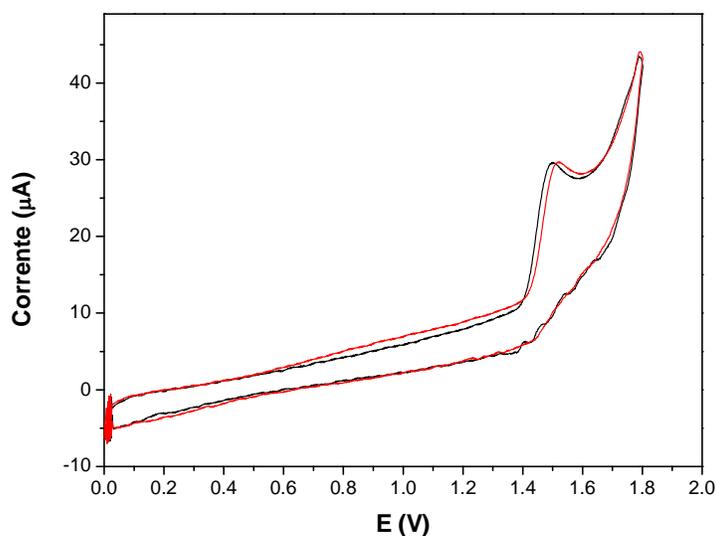
**Figura 5:** Voltamogramas cíclicos das estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. (A) Azoxistrobina; (B) Cresoxim-metílico; (C) Dimoxistrobina; (D) Fluoxastrobina; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Eletrólito: ACN/H<sub>2</sub>O pH 5,5 (60:40 v/v) (verde); ACN/Tampão BR pH 2,0 (60:40 v/v) (preto); ACN/Tampão Fosfato pH 3,0 (60:40 v/v) (vermelho); ACN/Tampão BR pH 4,0 (60:40 v/v) (azul) . Condições: faixa de varredura de 0,0 a 1,8 V; velocidade de varredura  $0,1 \text{ V s}^{-1}$ , ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Como o pH 4,0 se mostrou mais adequado, frente aos outros valores de pH do meio avaliados, este foi escolhido para os testes seguintes. Comparou-se os tampões BR e fosfato neste pH a fim de verificar se a composição do tampão poderia influenciar no sinal eletroquímico das estrobilurinas. Os resultados mostraram que para todas as estrobilurinas analisadas não houve diferença significativa no potencial de pico nos diferentes tampões. A caráter de exemplo, são mostrados na Figura 6 os voltamogramas cíclicos para a piraclastrobina utilizando-se o tampão BR,  $E_p = 1,62$  V, e tampão fosfato,  $E_p = 1,67$  V.

**Figura 6:** Voltamogramas cíclicos da piraclastrobina na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Eletrólito: ACN/Tampão BR pH 4,0 (60:40 v/v) (preto); ACN/Tampão Fosfato pH 4,0 (60:40 v/v) (vermelho); NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> adicionado nas fase aquosa. Condições: apresentadas na Figura 5.

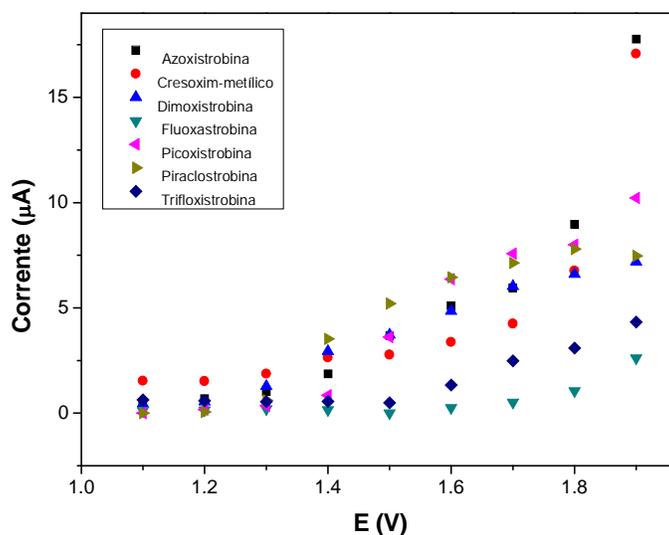


Fonte: Elaborada pela autora.

Como a resposta analítica para as estrobilurinas foi semelhante para os tampões optou-se a princípio por utilizar o tampão fosfato. Entretanto, o risco de precipitação de sais na coluna de separação, nos canais e conexões do cromatógrafo é maior com o uso de tampões na constituição de fase móvel, principalmente em eluições por gradiente (COLLINS *et al.*, 2006). Portanto, considerando-se o acoplamento posterior ao cromatógrafo, optou-se por substituir o tampão fosfato pH 4,0 por solução de ácido fosfórico pH 4,0.

Para a confirmação da viabilidade do uso da solução de ácido fosfórico pH 4,0 na composição da fase móvel, foram obtidos os voltamogramas hidrodinâmicos conforme descrito no item 3.4 e apresentados na Figura 7. Pode-se notar que a fluoxastrobina e trifloxistrobina apresentam uma corrente de oxidação mais sensível a partir de 1,9 V, potencial este que não tinha sido avaliado nos teste de voltametria cíclica. Para demais estrobilurinas, foi confirmado o comportamento já observado, sendo obtidos sinais mais sensíveis de oxidação a partir de 1,5 V.

**Figura 7:** Voltamogramas hidrodinâmicos para as estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Eletrólito: ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (60:40 v/v) e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> adicionado na fase aquosa. Condições: faixa de varredura de 1,1 a 1,9 V, ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Desta forma, estes testes preliminares permitiram verificar a viabilidade da detecção eletroquímica das estrobilurinas selecionadas, mostrando potencialidade no uso do eletrodo de DDB para tal. Devido a pouca disponibilidade de padrão das estrobilurinas, foram analisadas soluções com concentração baixa dos analitos, o que não é adequado para técnica de voltametria cíclica. Contudo, os estudos permitiram principalmente identificar os potenciais nos quais podem ser observados sinais de oxidação das estrobilurinas, e ainda verificar o pH mais adequado para detecção destas. As condições aqui estabelecidas foram usadas como norteador para os testes posteriores, conforme será apresentado adiante.

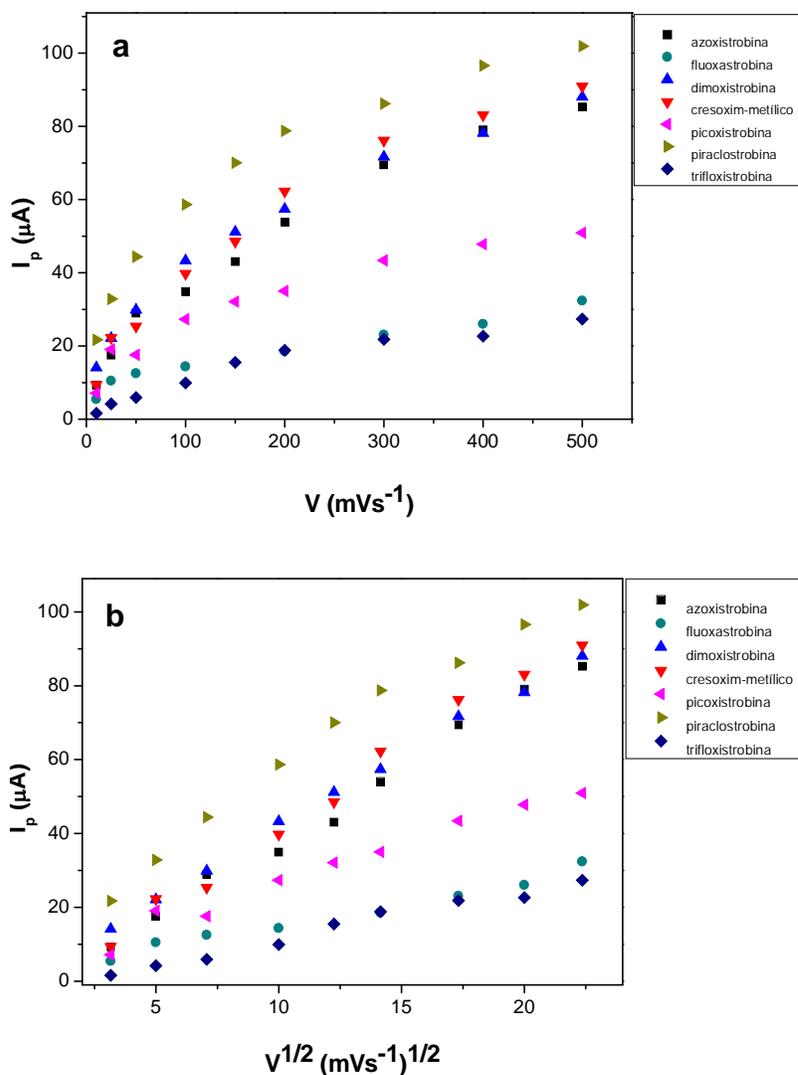
#### **4.2. Determinação da área ativa do eletrodo de DDB, investigação do transporte de massa e avaliação do comportamento do eletrodo de referência em meio orgânico**

A área ativa de um eletrodo é composta por regiões eletroativas, que são as regiões que promovem a transferência eletrônica na superfície do eletrodo, sendo geralmente diferente da área geométrica. Essa diferença entre área ativa e geométrica no caso do eletrodo de DDB pode se dar pela deposição não uniforme do filme de DDB no substrato no processo de fabricação do eletrodo ou pela remoção do filme por atritos mecânicos, inerentes ao uso e manipulação do eletrodo rotineiramente.

A área geométrica do eletrodo de DDB utilizado foi determinada pela área exposta na célula eletroquímica, sendo  $0,196 \text{ cm}^2$ . Já a área ativa do eletrodo foi determinada conforme descrito no item 3.5. O coeficiente angular obtido a partir do gráfico da corrente de pico ( $I_p$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) foi  $1,045 \times 10^{-4}$ . De posse deste valor e aplicando a equação 1, a área ativa obtida foi  $0,154 \text{ cm}^2$ .

A natureza do transporte de massa do processo de oxidação das estrobilurinas utilizando o eletrodo de DDB foi avaliada a partir da investigação do efeito da velocidade de varredura. A relação linear entre corrente de pico ( $I_p$ ) e raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) sugere que o processo é controlado por difusão. Quando o processo é adsorptivo essa relação não é linear (DORNELLAS, 2014a *apud* GOSSER, 1993). Pode-se observar na Figura 8-a curvas com perfil parabólico para a corrente de pico ( $I_p$ ) em função da velocidade de varredura ( $v$ ), enquanto na Figura 8-b observa-se que a corrente de pico se relaciona linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) entre 0,976 e 0,996, indicando um processo difusional para todas as estrobilurinas estudadas.

**Figura 8:** Gráficos da corrente de pico para  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  das estrobilurinas em função da (a) velocidade de varredura e da (b) raiz quadrada da velocidade de varredura. Eletrólito: ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (60:40 v/v) e  $\text{NaClO}_4$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  adicionado na fase aquosa. Condições: faixa de varredura de 1,0 a 2,0 V, ET de DDB, ER de  $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  e agulha aço inox como EA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Também foi avaliado o comportamento do eletrodo de referência, em meio não aquoso, considerando que as investigações até este momento foram realizadas em meios contendo 60% de ACN. Um solvente orgânico se faz necessário na composição da fase móvel, sendo um dos fatores que influenciam a seletividade e,

consequentemente, separação dos analitos por cromatografia líquida (SNYDER *et al.*, 1997). Além disso, no caso das estrobilurinas, o solvente orgânico ainda auxilia na solubilização destes analitos no meio, devido suas baixas solubilidades em água.

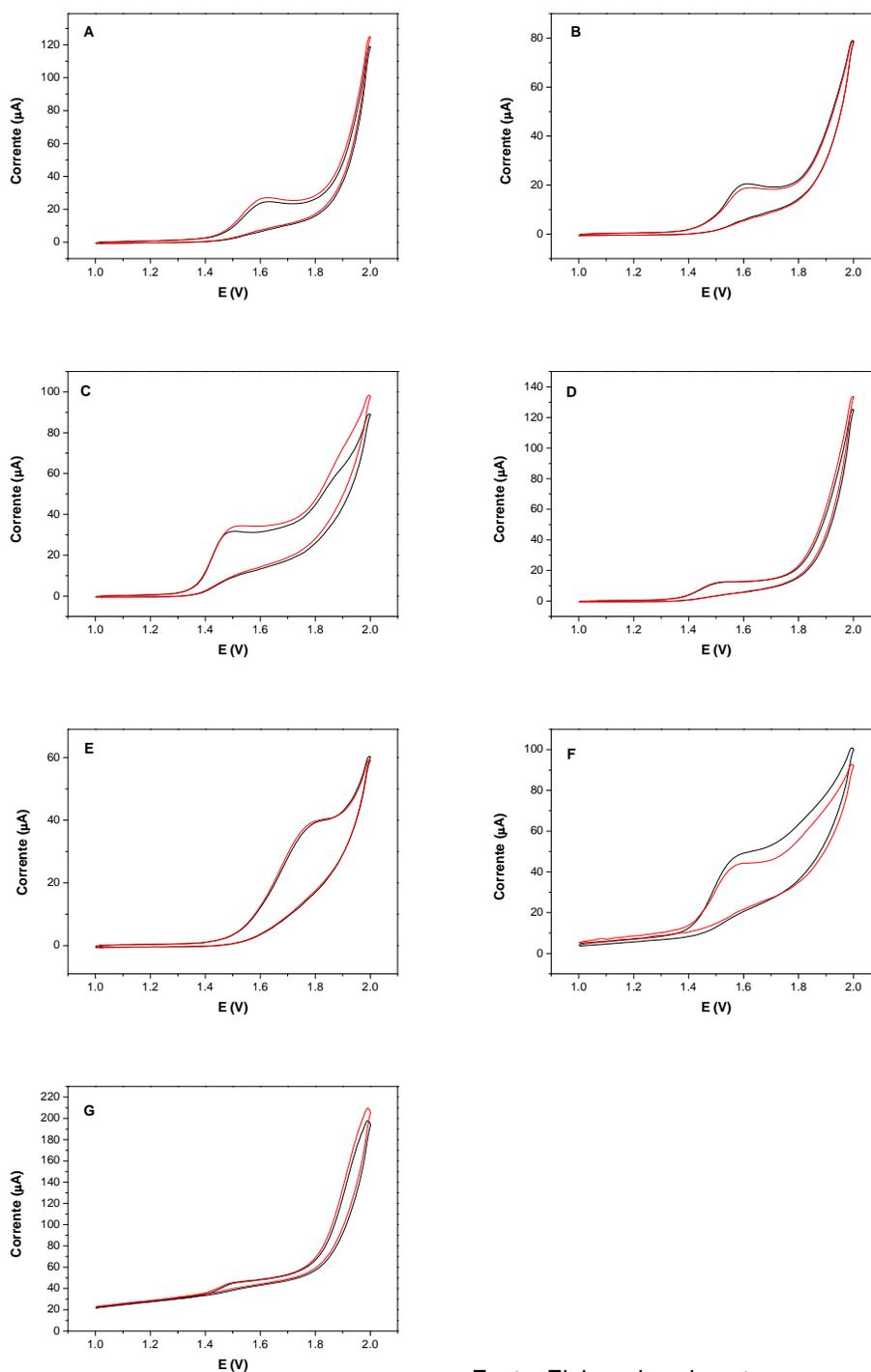
Portanto, para realizar a avaliação do eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ , foram obtidos voltamogramas cíclicos para as sete estrobilurinas, em meio contendo 60% de ACN, utilizando este eletrodo e comparados com os voltamogramas cíclicos obtidos utilizando um eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{LiCl saturado em etanol})}$ , construído no laboratório, conforme descrito no item 3.5. e apresentados na Figura 9.

Existem, relativamente, poucos eletrodos de referência construídos para sistemas não aquosos. O eletrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{LiCl saturado em etanol})}$  é utilizado em titulações potenciométricas em meio orgânico e já são conhecidos sistemas baseados na utilização de sais de lítio na solução de preenchimento de eletrodos de referência para adequar o comportamento destes em meios não aquosos (PANSU *et al.*, 2001).

Entretanto, eletrodo  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ , em certas circunstâncias, pode ser utilizado em meios não aquosos desde que o eletrólito seja solúvel no solvente orgânico utilizado (ZOSKI, 2007). O perclorato de sódio, utilizado neste trabalho, já é reportado na literatura como um eletrólito adequado para medidas eletroquímicas em meio orgânico (PEREZ-ALONSO *et al.*, 2000).

Como pode ser observado na Figura 9 e na Tabela 5, para todas as estrobilurinas analisadas não houve diferença significativa no potencial de pico utilizando os diferentes eletrodos de referência. Portanto, o eletrodo de referência de  $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$  foi selecionado para a continuidade do trabalho, por ser um eletrodo regularmente usado devido à sua simplicidade e baixo custo de aquisição ou fabricação.

**Figura 9:** Voltamogramas cíclicos das estrobilurinas na concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. (A) Azoxistrobina; (B) Cresoxim-metílico; (C) Dimoxistrobina; (D) Fluoxastrobina; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: similar a Figura 8 e utilizando ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> (preto) ou ER de Ag/AgCl<sub>(LiCl saturado em etanol)</sub> (vermelho).



Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 5:** Potenciais de pico obtidos para as estrobilurinas utilizando como eletrodos de referência Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e Ag/AgCl<sub>(LiCl saturado em etanol)</sub>.

Analito	E (V) vs	
	Ag/AgCl <sub>(sat)</sub>	Ag/AgCl <sub>(LiCl saturado em etanol)</sub>
Azoxistrobina	1,601	1,598
Dimoxistrobina	1,476	1,488
Fluoxastrobina	1,508	1,501
Cresoxim-metílico	1,593	1,593
Picoxistrobina	1,757	1,754
Piraclostrobina	1,554	1,559
Trifloxistrobina	1,496	1,491

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.3. Otimização da condição de separação

Um parâmetro importante em cromatografia é a resolução ( $R_s$ ), que permite avaliar a separação de dois componentes consecutivos. Maiores valores de resolução indicam melhor separação, sendo  $R_s = 1,25$  suficientes para determinações quantitativas, enquanto que  $R_s > 1,5$  indicam uma separação completa. A resolução pode ser calculada pela equação 6:

$$R_s = 1,18 (t_{r(j)} - t_{r(i)}) / (w_{h(j)} + w_{h(i)}) \quad \text{Equação (6)}$$

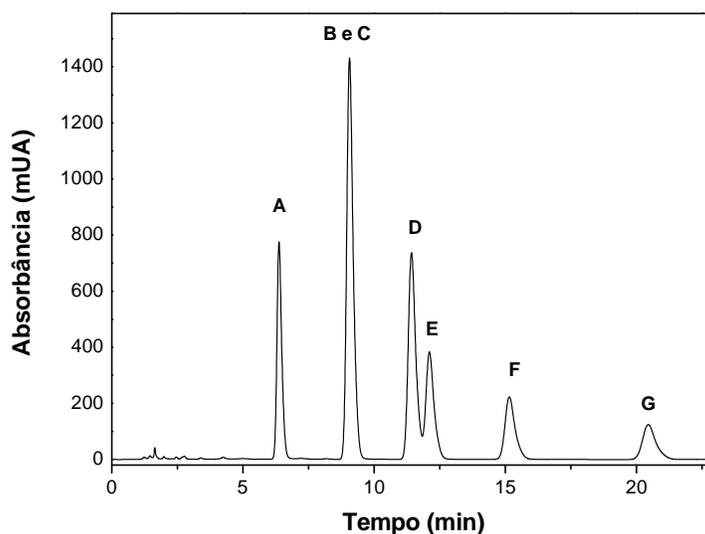
onde  $t_{r(j)} > t_{r(i)}$  são os tempos de retenção dos componentes consecutivos, cujas larguras de meia altura são  $w_{h(j)}$  e  $w_{h(i)}$  (COLLINS *et al.*, 2006).

Tomando a fase móvel estabelecida como satisfatória na detecção eletroquímica nos testes preliminares, fez-se o primeiro teste para avaliar a separação das estrobilurinas por HPLC. Vale ressaltar, que a identificação da ordem de eluição foi feita a partir da análise individual dos padrões das estrobilurinas injetados no cromatógrafo nesta condição inicial. Além disso, o comprimento de onda de 200 nm foi selecionado para monitoração dos analitos dentre cinco

comprimentos estudados (200, 207, 210, 220, e 272 nm), no qual este se mostrou o comprimento de maior absorbância para as estrobilurinas.

Na Figura 10 é apresentado o cromatograma de um padrão *mix* (solução mistura de padrões das sete estrobilurinas) na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito, onde a fase móvel utilizada foi ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (60:40 v/v). Avaliando apenas os pares de componentes consecutivos, cuja separação é crítica, observou-se coeluição total de dimoxistrobina e fluoxastrobina e coeluição parcial de cresoxim-metilico e picoxistrobina. Para estes últimos a resolução obtida foi de 1,14.

**Figura 10:** Cromatograma do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metilico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: eluição isocrática com ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> (60:40 v/v), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 200 nm.

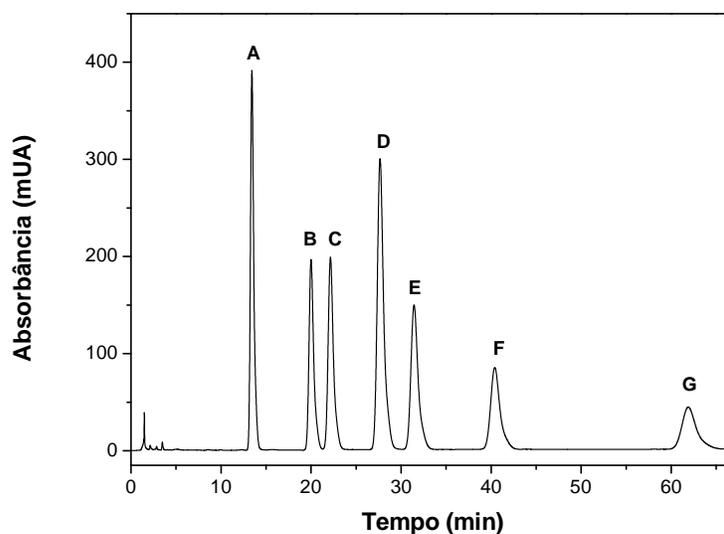


Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de se obter a melhor proporção de ACN para separação das estrobilurinas fez-se um gradiente exploratório do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, variando-se linearmente a proporção de ACN na fase móvel entre 0 a 100 % em 60 minutos. A análise do gradiente exploratório permitiu verificar que a separação dos compostos iniciava quando a porcentagem de acetonitrila encontrava-se em torno de 50 %.

Então, foi realizada a análise do padrão  $mix$   $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , com fase móvel ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (50:50 v/v) e eluição isocrática. O cromatograma obtido para essa condição de análise está apresentado na Figura 11, e avaliando-se novamente os pares de componentes consecutivos onde a separação é crítica, tem-se  $R_s = 2,15$  para dimoxistrobina e fluoxastrobina e  $R_s = 2,45$  para cresoxim-metílico e picoxistrobina.

**Figura 11:** Cromatograma do padrão  $mix$   $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: eluição isocrática com ACN/solução de ácido fosfórico pH 4,0 e  $\text{NaClO}_4$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  (50:50 v/v), fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção em 200 nm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Embora o perfil do cromatograma e as resoluções obtidas indiquem separação total das sete estrobilurinas nesta condição, o tempo de análise foi relativamente grande, sendo 66 minutos. Por isso, com o objetivo de diminuir o tempo de análise elevou-se a porcentagem de ACN para 55 %, em eluição isocrática. Contudo outra vez, houve coeluição parcial de dimoxistrobina e fluoxastrobina.

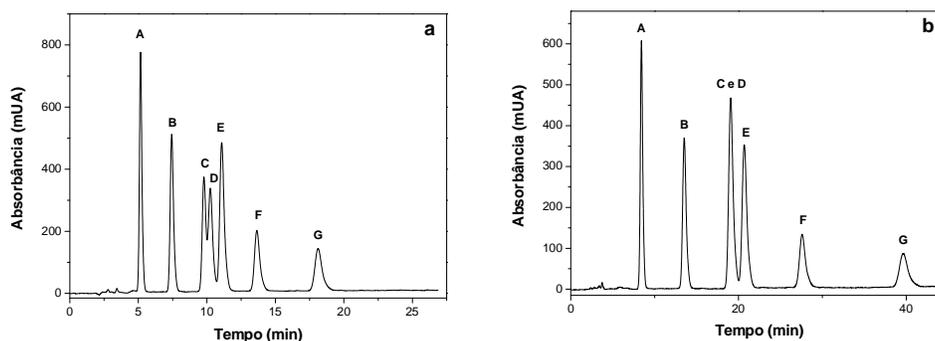
Desta forma, optou-se por substituir a acetonitrila por outro solvente orgânico com menor polaridade, o metanol (MeOH), para alterar a seletividade da fase móvel.

Como acetonitrila e metanol possuem forças eluentes próximas, esta troca de solvente pode promover pequenos ajustes de seletividade e, conseqüentemente, separação dos analitos. Contudo, não implica em alterações na ordem de eluição dos analitos. De maneira geral, comparando-se com a acetonitrila e metanol, apenas solventes com alta força eluente, e em certas proporções, poderiam causar alterações na ordem de eluição, como por exemplo, o Tetrahidrofurano (SNYDER *et al.*,1997).

Fez-se então, um gradiente exploratório do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, variando-se linearmente a proporção de metanol na fase móvel entre 0 a 100 % em 60 minutos. A análise do gradiente exploratório permitiu estimar que em 75 % de metanol iniciava a separação dos compostos. O cromatograma obtido para a análise do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, com fase móvel MeOH/solução de ácido fosfórico pH 4,0 (75:25 v/v) e eluição isocrática encontra-se na Figura 12-a. Observa-se que nesta condição, houve coeluição parcial de três componentes consecutivos, fluoxastrobina, cresoxim-metílico e picoxistrobina.

Por isso, diminuiu-se a porcentagem de MeOH para 70 %, porém não houve separação completa dos sete analitos, observando-se coeluição total de fluoxastrobina e cresoxim-metílico, conforme mostrado no cromatograma da Figura 12-b.

**Figura 12:** Cromatograma do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: eluição isocrática com MeOH/solução de ácido fosfórico pH 4,0 e NaClO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup> (a) 75:25 v/v e (b) 70:30 v/v, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 200 nm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Ainda, para ajustar a seletividade da fase móvel propôs-se a utilização de uma mistura ternária contendo ACN, MeOH e solução de ácido fosfórico pH 4,0. Partindo-se das melhores condições, com eluição isocrática, de cada solvente orgânico é possível estimar, uma porcentagem para cada solvente na mistura ternária adequada para a separação (SNYDER *et al.*, 1997). A partir dos cálculos para a mistura ternária fez-se cinco experimentos para ajuste da fase móvel conforme descrito na Tabela 6.

**Tabela 6:** Testes para proporção dos solventes na fase móvel de mistura ternária.

Teste	% ACN	% MeOH	% Sol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 4,0
1	25	35	40
2	23	32	45
3	20	40	40
4	30	30	40
5	40	20	40

Fonte: Elaborada pela autora.

O teste 1, com proporções obtidas a partir dos cálculos da mistura ternária, gerou um cromatograma com separação satisfatória dos analitos, porém o tempo de análise foi de 75 minutos. O teste 2 consistiu em aumentar a porcentagem de solução aquosa, diminuindo proporcionalmente a porcentagem de cada solvente orgânico, no qual obteve-se um cromatograma com coeluição parcial de dimoxistrobina e fluoxastrobina.

No teste 3, retornou-se a porcentagem inicial de solução aquosa e diminuiu-se a porcentagem de ACN, que é o solvente orgânico com maior força eluente. Nesta condição obteve-se separação satisfatória para os analitos, contudo com um tempo de análise de 80 minutos. Nos testes 4 e 5, aumentou-se a porcentagem de ACN mantendo a porcentagem de fase aquosa inicial, o que resultou em cromatogramas com coeluição parcial e total, respectivamente, da dimoxistrobina e fluoxastrobina.

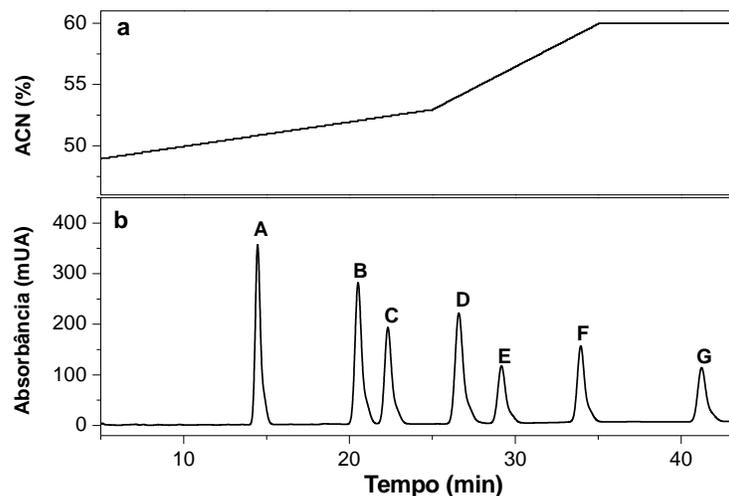
A partir destes testes, concluiu-se que a inclusão de MeOH na fase móvel não trouxe melhorias significativas para a separação dos compostos, além de maiores tempos de análise comparado à melhor condição utilizando ACN/solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Figura 11). Além disso, com o aumento da porcentagem de ACN verificou-se

coeluição da dimoxistrobina e fluoxastrobina, o par de componentes em que a separação é mais crítica. Porém, a eluição dos componentes mais retidos foi mais rápida, resultando assim em menor tempo de análise, comportamento este também já observado nos testes utilizando apenas ACN.

Estes resultados indicaram que a utilização apenas de ACN como solvente orgânico na fase móvel é suficiente para a separação dos analitos, porém para obtenção de um tempo de análise viável se mostrou necessário a implementação do modo de eluição por gradiente. Na eluição por gradiente, a proporção entre os solventes constituintes da fase móvel varia durante a análise, aumentando a força de eluição, e geralmente conduzindo a melhor simetria dos picos, resolução e tempo de análise (COLLINS *et al.*, 2006).

Desta forma, foram realizados vários testes para a escolha de um gradiente adequado à separação das sete estrobilurinas. Nestes testes, a porcentagem de ACN foi variada entre 45 % e 70 %, sendo testados diversos tempos em que se iniciava a elevação da porcentagem ACN, bem como a taxa de elevação da mesma. A melhor condição obtida e, portanto selecionada para análise das estrobilurinas está apresentada na Figura 13, juntamente com o cromatograma do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> obtido nesta condição.

**Figura 13:** a) Gradiente de fase móvel para eluição das estrobilurinas. b) Cromatograma do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6



Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar um gradiente segmentado, onde no primeiro segmento, que se inicia com 48% de ACN, tem-se uma taxa de elevação de ACN de 0,2 % min<sup>-1</sup>, para a separação eficaz dos pares dimoxistrobina/fluoxastrobina e cresoxim-metílico/picoxistrobina, enquanto no segundo segmento, que se inicia com 53% de ACN e atinge o máximo de 60 % de ACN, a taxa de elevação de ACN é 0,7 % min<sup>-1</sup>, para a eluição em menor tempo dos componentes mais retidos.

A taxa de elevação no segundo segmento foi a mais elevada possível, levando-se em consideração que variações abruptas na porcentagem de ACN geraram perturbações significativas na linha base (corrente de fundo) da detecção eletroquímica por amperometria, o que dificultava a identificação dos picos bem como a integração destes para obtenção das áreas e quantificação dos analitos.

Levou-se em consideração para a escolha dessa condição, o tempo viável de análise de 43 minutos, comparado ao modo isocrático, cujo tempo total de análise foi de 66 minutos. Além disso, obteve-se uma resolução satisfatória para os componentes dimoxistrobina e fluoxastrobina,  $R_s = 2,2$ , e cresoxim-metílico e picoxistrobina,  $R_s = 2,7$ .

Outro parâmetro importante é o fator de assimetria ( $A_s$ ) dos picos, cujos valores próximos a 1 indicam boa performance da coluna. Contudo, para amostras em geral e sistemas complexos de separação, valores de  $A_s < 1,5$  são indicados pela literatura como adequados (SNYDER *et al.*, 1997). Pode-se observar na Tabela 7, para a condição de separação estabelecida, que os valores de simetria dos picos para as estrobilurinas foram aceitáveis.

**Tabela 7:** Fatores de assimetria ( $A_s$ ) para os picos das sete estrobilurinas.

Analito	Tempo de retenção (min)	$A_s$
Azoxistrobina	14,08	0,78
Dimoxistrobina	20,20	0,73
Fluoxastrobina	21,85	0,74
Cresoxim-metílico	26,04	0,75
Picoxistrobina	28,58	0,78
Piraclostrobina	33,30	0,79
Trifloxistrobina	40,47	0,76

Fonte: Elaborada pela autora.

Desta maneira, verificou-se que esta condição se mostrou adequada para a separação da estrobilurinas, obtendo-se boa resolução dos picos e parâmetros de separação satisfatórios. O tempo de análise, que embora seja relativamente grande, é adequado para a separação de sete componentes levando-se em consideração suas semelhanças estruturais e comportamentos físicos e químicos. De posse da condição de separação estabelecida foi possível adequar as condições de detecção eletroquímica, visando o acoplamento “*homemade*” eficiente das técnicas.

#### 4.4. Otimização da detecção eletroquímica

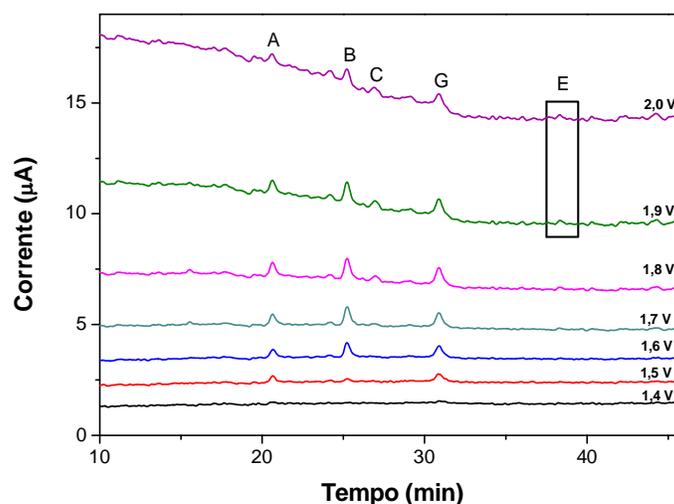
As estrobilurinas, após separação na coluna e detecção no UV, são conduzidas para a superfície do eletrodo de DDB onde são oxidadas, obtendo-se um sinal transiente na forma de pico, característico de análise em fluxo.

Durante o desenvolvimento da condição de separação, a detecção eletroquímica foi acompanhada com intuito de verificar a resposta eletroquímica em diferentes condições com relação a variações ou mudança do solvente, fluxo de fase móvel e até mesmo a viabilidade da detecção das estrobilurinas em um sistema em fluxo, como o gerado pelo acoplamento das técnicas. Por exemplo, as condições em que se usava metanol na constituição da fase móvel, além de não serem adequadas para a separação das estrobilurinas, também causaram muita instabilidade na corrente de fundo, provavelmente devido à oxidação do metanol (CHANG *et al.*, 2006), o que dificultava a detecção eletroquímica dos analitos, sendo este mais um motivo para não se utilizar este solvente na fase móvel.

Para confirmação dos potenciais de trabalho, os primeiros teste foram feitos utilizando amperometria por múltiplos pulsos, onde é possível monitorar mais de um potencial simultaneamente. Na Figura 14 encontra-se um amperograma, obtido na condição de separação estabelecida, onde foi monitorado potenciais de 1,4 a 2,0 V. Evidencia-se quatro sinais a partir de 1,8 V, sendo eles referentes à dimoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina e piraclostrobin.

Outro sinal, com uma corrente de pico pouco sensível, foi observado em aproximadamente 37 minutos nos potenciais de 1,9 e 2,0 V (destaque na Figura 14). Supõe-se ser a trifloxistrobina, que nos testes preliminares apresentou sinal de oxidação mais evidente a partir de 1,9 V. Contudo foi difícil confirmar a identificação deste pico visto o pequeno sinal de corrente obtido e as flutuações da corrente de fundo. Essa instabilidade da corrente de fundo, a partir de 1,9 V e muito evidente em 2,0 V, deve-se ao fato de que nestes potenciais tão elevados, a própria acetonitrila presente na fase móvel pode estar sofrendo oxidação (DORNELLAS, 2014a). Por isso, para os estudos posteriores escolheu-se o potencial de 1,8 V, onde a maioria das estrobilurinas podem ser oxidadas e seus sinais observados, e o potencial 1,9 V, que apresentou menor variação da corrente de fundo comparado a 2,0 V, para a investigação da oxidação das demais estrobilurinas que necessitam de um potencial maior para oxidar.

**Figura 14:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Dimoxistrobina; (B) Cresoxim-metilico; (C) Picoxistrobina; (D) Piraclostrobina; (E) Possivelmente Trifloxistrobina. Condições: similar a Figura 13, utilizando ET de DDB, ER de Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> e agulha aço inox como EA. Pulsos de potenciais aplicados: 1,4 a 2,0 V / 200 ms (indicados na figura).

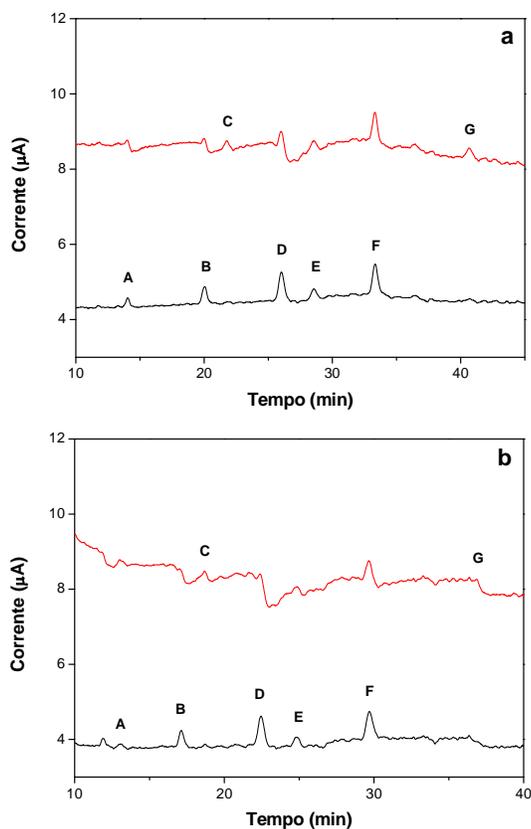


Fonte: Elaborada pela autora.

Após a seleção dos potenciais, verificou-se a influência do fluxo da fase móvel na detecção eletroquímica das estrobilurinas. A Figura 15 apresenta os amperogramas obtidos com eluição a um fluxo de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ . Com relação à separação, o cromatograma obtido a um fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  foi semelhante à condição já otimizada com o fluxo  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , contudo com redução do tempo de análise de 3 minutos.

Com relação à detecção eletroquímica, ao se trabalhar com os dois potenciais a identificação das sete estrobilurinas foi possível. Pode-se observar flutuações na corrente de fundo em ambos potenciais na Figura 15-b, porém mais acentuada em  $1,9 \text{ V}$ . Embora vazões menores normalmente influenciem mais a dispersão do analito e conseqüentemente o perfil do sinal obtido, além de maior tempo de análise, verificou-se também que com fluxo  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  as perturbações na corrente de fundo foram mais significativas. Por essa razão, foi escolhido como fluxo ideal  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

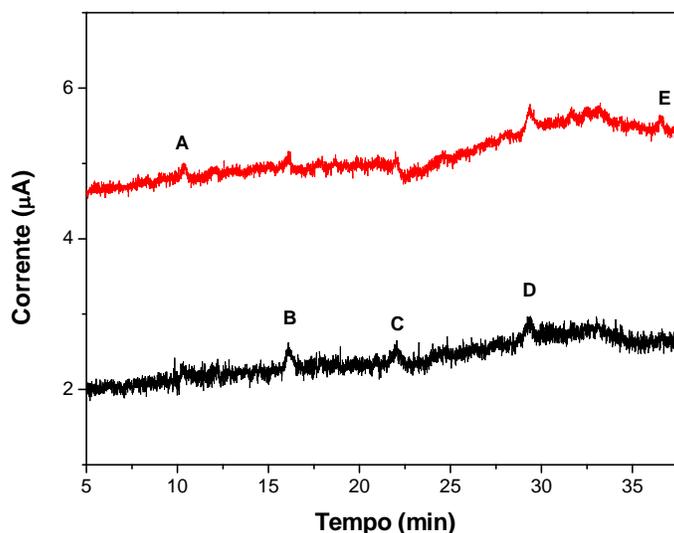
**Figura 15:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Dimoxistrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Fluxo: (a)  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e (b) fluxo de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ . Condições: similar a Figura 14. Pulsos de potenciais aplicados:  $1,8 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (preto) e  $1,9 \text{ V} / 200 \text{ ms}$  (vermelho).



Fonte: Elaborada pela autora.

Até esta etapa, utilizou-se nos testes um padrão *mix*  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, cuja concentração das estrobilurinas em mg L<sup>-1</sup> são relativamente altas, variando de 31,3 a 45,9. Considerando-se que possivelmente os níveis de concentração dos analitos nas amostras (se presentes) seriam relativamente baixos, diminuiu-se a concentração do padrão *mix* para  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , para estabelecer níveis adequados para construção das curvas analíticas. Verificou-se no amperograma obtido nesta condição, e apresentado na Figura 16, que ao diminuir a concentração dos analitos houve uma perda significativa dos sinais, dificultando a distinção dos mesmos do ruído instrumental.

**Figura 16:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Cresoxim-metílico; (D) Piraclostrobina; (E) Trifloxistrobina. Condições: apresentadas na Figura 15 e fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborada pela autora.

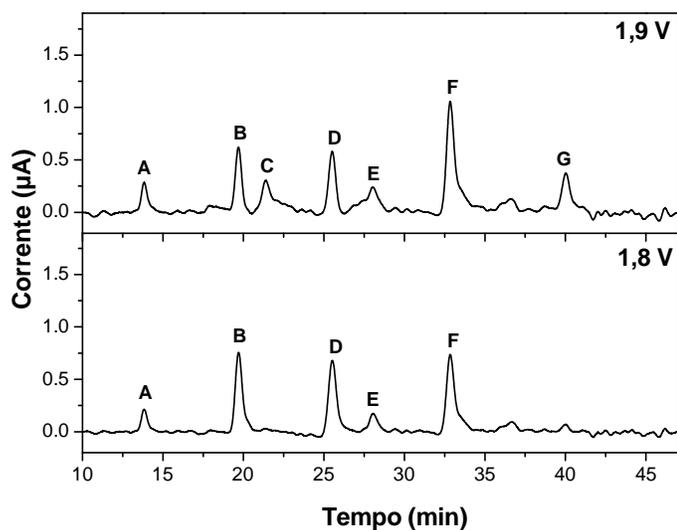
Para contornar este problema foram realizadas duas modificações no sistema: alteração da alça de amostragem (injeção) e instalação da célula eletroquímica em uma gaiola de Faraday para a minimização do ruído.

Com respeito à alça de amostragem, vinha sendo utilizada uma alça de 20 µL conectada a coluna de separação no cromatógrafo. Optou-se por trocar a alça de amostragem para 50 µL, disponível no laboratório, visto que a quantidade de amostra injetada tem influencia direta na sensibilidade do método de detecção. Uma vez que maiores quantidades de amostra sofrem menos efeito de dispersão, e consequente diluição, durante a análise. Para detecções eletroquímicas utilizando análises por injeção em fluxo é usual alterações na quantidade de amostra injetada na superfície do eletrodo como uma maneira simples e rápida de ajustar o sinal obtido à faixa de resposta linear da técnica usada (ROCHA *et al.*, 2000).

Desta forma, a Figura 17 apresenta o amperograma da análise do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup>, utilizando uma alça de amostragem de 50 µL conectada a coluna de separação no cromatógrafo e com a célula inserida na gaiola de Faraday (conforme Figura 2-B). Observa-se uma minimização significativa do ruído instrumental, além

da obtenção de sinais satisfatórios para as sete estrobilurinas em 1,9 V, sem perturbações significativas da corrente de fundo.

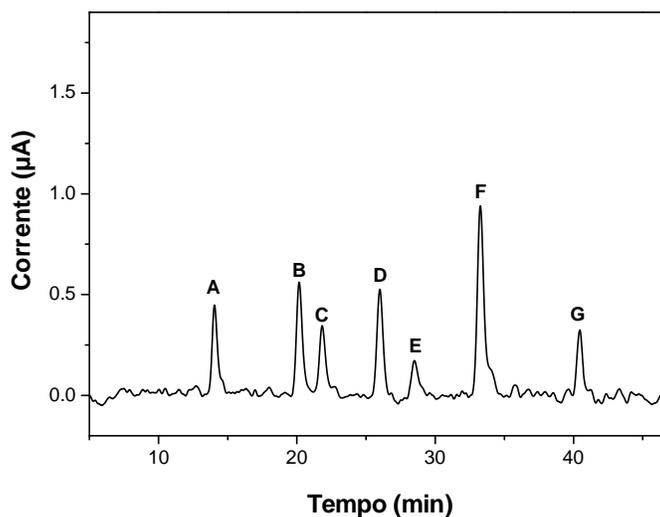
**Figura 17:** Amperograma de múltiplos pulsos do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Dimoxistrobina; (D) Cresoximetílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: apresentadas na Figura 16 e utilizando uma alça de amostragem de 50 µL.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir desses resultados, optou-se então em trabalhar apenas em 1,9 V, visto que foi possível detectar satisfatoriamente todas as estrobilurinas neste potencial. Além disso, a utilização apenas de um potencial traz maior estabilização da corrente de fundo, isto porque não é necessário alternar os pulsos em potências diferentes. A Figura 18 traz um amperograma do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> nas condições otimizadas para a detecção eletroquímica.

**Figura 18:** Amperograma do padrão *mix* 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito. (A) Azoxistrobina; (B) Fluoxastrobina; (C) Dimoxistrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: similar a Figura 17 e detecção em 1,9 V (potencial constante).



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.5. Otimização do preparo de amostra

##### 4.5.1. Descrição geral do método de preparo de amostra

O método de extração e purificação da amostra foi adaptado de ABREU *et al.* (2005) e FAO (2009). A Figura 4, mostrada no item 3.9, apresenta o fluxograma de preparo de amostra, após adequações aos materiais disponíveis no laboratório e modificações para viabilidade de execução prática do método.

Para homogeneização e redução do tamanho de partícula, as amostras de feijão foram trituradas em um processador de alimentos comercial, garantindo assim maior representatividade na amostragem. Em seguida, foi adicionada à massa selecionada de amostra triturada uma mistura de ACN/H<sub>2</sub>O (9:1). Esta mistura é responsável pela extração inicial dos analitos da matriz, e o extrato obtido após a filtração foi chamado de Extrato A.

Uma alíquota do Extrato A foi tomada para extração líquido-líquido, cujo objetivo foi separar os analitos de possíveis interferentes coextraídos da matriz e recuperá-los na fase orgânica. O solvente orgânico escolhido para esta extração foi o éter etílico que, além de imiscível em água, também é adequado por sua volatilidade, o que permite sua remoção e concentração dos analitos após a extração.

A extração líquido-líquido é um processo de equilíbrio de partição dos analitos nas fases, e por isso, quantidades significativas dos analitos podem permanecer em ambas as fases. Para aumentar a eficiência de extração dos analitos na fase orgânica foi adicionado no meio de extração NaCl e solução diluída de HCl, além de realizar duas extrações sucessivas com o éter etílico. Com a acidificação do meio de extração, a ionização dos analitos é suprimida, aumentando assim a solubilidade destes na fase orgânica. A adição de NaCl é um processo designado *salting out*, baseado na diminuição da solubilidade dos analitos na fase aquosa devido ao aumento da força iônica pela adição do sal, forçando assim a migração destes para a fase orgânica. (SNYDER,1997 e FIORINI *et al.*, 2015).

Posteriormente, no Extrato B, constituído da fase orgânica recolhida da extração líquido-líquido, foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção de água residual (THEODORE e SAI, 2001). Após filtração, este extrato foi rotaevaporado para eliminação de éter etílico. A eliminação deste solvente é necessária antes da introdução do extrato da amostra na coluna de *clean up*, devido sua maior força para eluição das estrobilurinas, impedindo que estas fiquem retidas na coluna. Para esta aplicação, chamada carregamento da coluna, a amostra deve ser dissolvida em um solvente com menor força de eluição dos analitos, para permitir a retenção do analito no adsorvente utilizado na coluna de *clean up* e ao mesmo tempo eluir apenas os compostos de não interesse. Para recheiar a coluna de *clean up* foi utilizado sílica e, portanto, o n-hexano se mostrou um solvente adequado para o carregamento da coluna devido sua baixa polaridade (SNYDER,1997). A etapa de *clean up* e a inclusão do padrão *surrogate* no método serão discutidas na sequência.

#### 4.5.2. Purificação dos extratos por cromatografia de adsorção em coluna aberta (*Clean up*)

Conforme pode ser observado no fluxograma da Figura 4, o *clean up* é a etapa final na preparação das amostras, muito importante para eliminação dos interferentes, e precede a etapa de pré-concentração dos analitos para injeção no HPLC. Por isso, primeiramente otimizou-se a purificação dos extratos por cromatografia de adsorção em coluna aberta, para garantir boa recuperação dos analitos nesta etapa. Quatro parâmetros foram estudados: solvente de eluição, volume do eluato, massa de sílica e a quantidade de n-hexano para ressuspensão do extrato a ser purificado. As análises nesses estudos foram feitas utilizando apenas a detecção no UV.

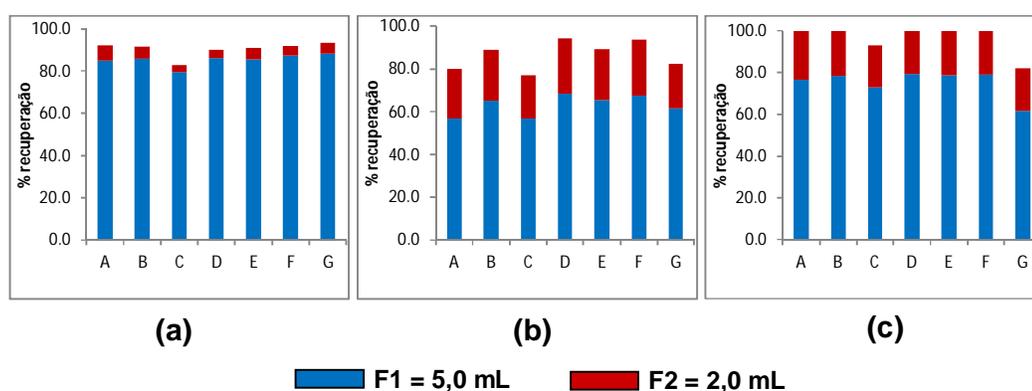
Para verificar qual solvente e qual volume deste solvente (ou mistura) seriam mais adequados para eluição das estrobilurinas adsorvidas na sílica, fez-se um teste de calibração da coluna de *clean up*. Desta forma, adicionou-se diretamente na coluna, contendo 0,5 g de sílica, padrões das estrobilurinas para obter uma massa igual a 0,02 mg de cada, o que equivaleria a uma concentração final na solução de injeção de 40,0 mg L<sup>-1</sup>.

O teste consistiu em eluir na coluna e coletar frações de 1,0 em 1,0 mL até recolher-se 6,0 mL do solvente percolado pela coluna. Os solventes testados, em colunas diferentes, foram acetato de etila e éter etílico. Para avaliação destes parâmetros foram comparados os valores de porcentagem de recuperação dos padrões adicionados de cada analito. Os resultados mostraram que, para ambos solventes, um volume de 5,0 mL era suficiente para eluição dos analitos.

Para confirmação desses resultados e escolha do solvente, repetiu-se o teste recolhendo-se duas frações consecutivas, uma de 5,0 mL (F1) e outra de 2,0 mL (F2) para cada solvente (acetato de etila e éter etílico) e para uma mistura deles na proporção de 1:1. Os resultados estão apresentados na Figura 19, no qual pode se observar que utilizando o acetato de etila houve boa recuperação dos analitos, principalmente em F1 com recuperações entre 80 a 88 %. Já quando utilizado éter etílico ou a mistura de solventes, embora as recuperações totais tenham sido satisfatórias também, elas foram menores em F1, sendo 57 a 68 % para o éter etílico e 62 a 79 % quando usada a mistura de solventes. Portanto, como o acetato

de etila apresentou maior poder eluente, e conseqüentemente menor volume para eluição, foi escolhido para eluição das estrobilurinas na coluna de *clean up*.

**Figura 19:** Otimização do solvente de eluição das estrobilurinas na coluna de *clean up* contendo 0,5 g de sílica. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Solventes: (a) acetato de etila; (b) éter etílico; (c) mistura acetato de etila/éter etílico (1:1 v/v).



Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, avaliou-se a massa adequada de sílica, entre 0,5, 1,0 e 1,5 g, para a adsorção das estrobilurinas. Nestes testes adicionou-se diretamente na coluna padrões das estrobilurinas para obter uma massa igual 0,005 mg de cada, o que equivaleria a uma concentração final na solução de injeção de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. A Tabela 8 apresenta a faixa de valores de recuperação das estrobilurinas nas frações F1 e F2, utilizando acetato de etila como eluente, para as diferentes massas de sílica testadas para recheiar a coluna de *clean up*.

**Tabela 8:** Recuperação das estrobilurinas utilizando diferentes massas de sílica.

Fração/massa	Faixa de recuperação (%)			
	sílica	m = 0,5 g	m = 1,0 g	m = 1,5 g
F1 (5,0 mL)		85,6 – 90,8	102,3 – 107,6	86,2 – 94,7
F2 (2,0 mL)		6,5 – 11,7	2,6 – 5,5	15,8 – 21,0
Total		92,1 – 100,7	104,9 – 110,9	103,9 – 111,8

Fonte: Elaborada pela autora.

De maneira geral, a recuperação total foi boa nos três experimentos, levando-se em consideração que em cromatografia em coluna aberta é comum o efeito de difusão, ou seja, dispersão das bandas dos analitos, o que justifica o recolhimento dos mesmos em diversas frações do eluente (COLLINS, 2006). Contudo, verifica-se que para a massa de 1,0 g as recuperações foram mais satisfatórias para a fração F1 do que para as demais massas testadas.

Considerando-se que o diâmetro da coluna foi igual em todos os testes, determinado pelo diâmetro da seringa (1,0 cm), o comprimento da coluna está relacionado com a massa de sílica usada para compor o recheio. Como as colunas são fixadas na vertical, a eluição se processa por ação da gravidade, e por isso a vazão da fase móvel vai depender significativamente do comprimento do recheio na coluna. Uma hipótese é que para a massa de 0,5 g, tem-se a coluna de menor comprimento, e o eluente percola mais rapidamente pela coluna, sendo assim pode não haver tempo suficiente para transferência do analito da fase estacionária adsorvente (sílica) para a fase móvel (acetato de etila), o que justifica a necessidade de percolar uma quantidade maior de solvente (para esta vazão) nesta coluna para eluir completamente as estrobilurinas.

Já para massa 1,5 g supõe-se que, por ser a coluna de maior comprimento, a retenção das estrobilurinas na coluna também é maior, sendo mais difícil eluí-las totalmente na primeira fração. Observando-se então, recuperações significativas das estrobilurinas na fração F2.

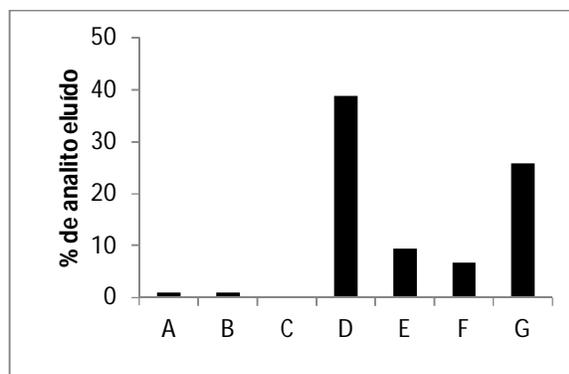
Desta forma, a massa de 1,0 g pareceu ser a mais adequada para eluição das estrobilurinas nesse nível de concentração. Utilizando-se esta massa de sílica, a vazão da fase móvel por ação da gravidade foi satisfatória e, dada a força eluente do solvente, foi possível eluir as estrobilurinas na primeira fração de 5,0 mL.

Por último, observando o fluxograma da Figura 4, a etapa que antecede ao *clean up* é a solubilização em n-hexano do extrato rotaevaporado, e obtenção do Extrato C, que é percolado na coluna de *clean up* (carregamento da coluna). A quantidade de n-hexano deveria ser suficiente para solubilizar as estrobilurinas do extrato, porém não poderia ser grande o suficiente para arrastar as estrobilurinas da coluna de *clean up* quando o extrato fosse adicionado a ela.

Em um teste preliminar, usou-se para carregamento da coluna 10,0 mL de n-hexano, no qual foi solubilizada uma massa igual 0,005 mg de cada estrobilurinas, o que equivaleria a uma concentração final na solução de injeção de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Este

volume foi percolado em uma coluna de *clean up*, recolhido, evaporado e ressuspenso em 0,5 mL de fase móvel para análise. A Figura 20 mostra os resultados da análise deste n-hexano residual, onde verificou-se que este solvente, nesta quantidade, foi capaz de eluir porções significativas de alguns dos analitos, chegando a 39 % do total adicionado.

**Figura 20:** Porcentagem das estrobilurinas eluídas no n-hexano residual (10,0 mL) percolado pela coluna de *clean up*. (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para otimizar o volume de n-hexano, fez-se dois experimentos utilizando 3,0 e 5,0 mL. Nestes testes, volumes de padrões das estrobilurinas para obter uma massa igual 0,005 mg de cada, o que equivaleria a uma concentração final na solução de injeção de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, foram solubilizados com os volumes de n-hexano. Estas soluções foram percoladas pela coluna de *clean up*, recolheu-se o n-hexano residual para análise e eluiu-se a coluna com 5,0 mL de acetato de etila.

Os resultados das análises mostraram que não houve recuperação significativa das estrobilurinas em nenhum dos volumes de n-hexano residual. Além disso, as recuperações das estrobilurinas eluídas em seguida com acetato de etila foram satisfatórias, sendo 91 a 104 % para a coluna anteriormente percolada com 3,0 mL de hexano e 84 a 109 % para a coluna anteriormente percolada com 5,0 mL. Estes resultados indicaram que, para esses volumes testados, o n-hexano residual não influenciou as etapas seguintes do *clean up*, bem como as recuperações das estrobilurinas no processo. Por isso, escolheu-se o volume de 3,0 mL de hexano

para a solubilização das estrobilurinas e obtenção do Extrato C no preparo de amostra.

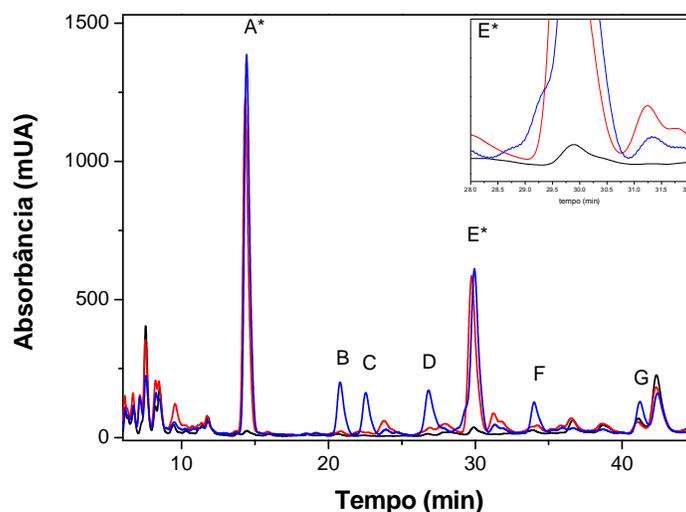
#### 4.5.3. Avaliação do preparo da amostra

Como anteriormente citado, o método de extração e purificação da amostra foi adaptado de trabalhos reportados na literatura para determinação das estrobilurinas. As modificações feitas, além da viabilidade de execução do método, também levaram em consideração os baixos limites residuais destes fungicidas permitidos pela legislação. Neste sentido, as principais alterações foram feitas para maior pré-concentração da amostra e quantificação das estrobilurinas nestes níveis.

Em um teste preliminar, uma amostra de feijão do tipo Carioca denominada “Carioca 1” foi submetida ao processo de preparo, após toda otimização da etapa de *clean up*. Para a avaliação deste procedimento, foram preparadas duplicatas da amostra e da amostra fortificada para uma concentração final das estrobilurinas de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ , além do branco e branco fortificado preparados nas mesmas condições. Na Figura 21 é apresentada, a caráter de exemplo, a sobreposição dos cromatogramas de uma réplica do branco, amostra e amostra fortificada. Neste momento, as análises foram realizadas utilizando apenas a detecção no UV.

Com relação à análise das amostras por HPLC, após os 43 minutos e eluição das sete estrobilurinas, elevou-se a porcentagem de ACN para 100 % para a eluição de outras substâncias possivelmente coextraídas e retidas na coluna. Este procedimento foi feito para garantir a limpeza da coluna antes da próxima injeção e evitar a eluição destas substâncias durante análises posteriores.

**Figura 21:** Cromatogramas do branco (preto), amostra (vermelho) e amostra fortificada para 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito (azul). (A\*) Confirmar identificação de Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) Fluoxastrobina; (D) Cresoxim-metilico; (E\*) Confirmar identificação de Picoxistrobina (inserção na figura); (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6.



Fonte: Elaborada pela autora.

Observando-se os cromatogramas da Figura 21, verifica-se que a amostra apresenta dois picos eluídos em aproximadamente 14 e 29 minutos, que aparentemente poderiam referir-se à azoxistrobina e picoxistrobina, respectivamente. Para a picoxistrobina foi possível observar um “ombro” na base do pico na amostra fortificada (inserção na Figura 21), o que pode indicar coeluição com outra substância presente nesta amostra. Para a azoxistrobina não foi possível, apenas analisando o perfil dos picos na amostra e amostra fortificada, concluir sua presença na matriz, necessitando também de uma confirmação. Por isso, uma análise mais cuidadosa desta amostra (Carioca 1) será apresentada na seção 4.8, utilizando co-cromatografia, que é uma forma de avaliar a presença de um composto na amostra desconhecida.

No entanto, este teste permitiu avaliar o processo de preparo da amostra, calculando-se as porcentagens de recuperação das estrobilurinas na amostra fortificada e branco fortificado. Vale ressaltar, que as quantificações foram realizadas

a partir de uma curva analítica (calibração externa) para cada um dos analitos. O intervalo de recuperação para a amostra fortificada foi de 35 a 85%, e para o branco fortificado de 38 a 81%. Estas recuperações não foram satisfatórias, evidenciando a necessidade de adequação no preparo da amostra.

Visto que o procedimento de preparo das amostras envolve muitas etapas, essas baixas recuperações podem estar relacionadas a perdas dos analitos durante a manipulação da amostra, e que torna-se mais crítico devido ao baixo nível de concentração. Para contornar este problema uma possibilidade é o uso de um padrão *surrogate*. O padrão *surrogate* deve ter comportamento químico e físico representativo da substância de interesse. Este é adicionado à amostra e submetido a todas as etapas envolvidas no preparo. Então, se determina a recuperação do padrão *surrogate*, fazendo uma “correção de recuperação” para as substâncias de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Entretanto, neste momento, não havia disponibilidade de um composto adequado para utilização como padrão *surrogate*. Além disso, a inclusão de um novo componente poderia acarretar alterações significativas no método de análise já estabelecido, como por exemplo, coeluição do padrão *surrogate* com algum dos analitos ou dificuldade de detecção deste por UV e DE.

Neste sentido, para um teste preliminar, foi tomada uma das estrobilurinas como padrão *surrogate*, a fluoxastrobina, cuja escolha se deu por ser um dos analitos que não foram detectados na amostra (Carioca 1) no primeiro teste. Além disso, é a única das estrobilurinas estudadas que ainda não foi incluída na Relação de Monografias dos Ingredientes Ativos de Agrotóxicos, Domissanitários e Preservantes de Madeira da ANVISA, onde são apresentadas informações toxicológicas e LMR destas substâncias. Por isso, espera ser a estrobilurina menos usada pelos agricultores no Brasil e, portanto ter a menor possibilidade de estar presente nas amostras de feijão selecionadas.

Então, a amostra Carioca 1 foi submetida novamente ao procedimento de preparo usando a fluoxastrobina como padrão *surrogate* (PS). O PS foi adicionado numa concentração fixa de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  no branco de extração, amostra e amostra fortificada. Além disso, o PS foi adicionado neste mesmo nível de concentração em todos os níveis da curva analítica, que continham concentrações variáveis das demais estrobilurinas. As estrobilurinas foram quantificadas utilizando tanto a curva analítica não incluindo o PS (calibração externa) quanto à curva analítica incluindo o

PS, com propósito de comparação. A Tabela 9 mostra as porcentagens de recuperação das estrobilurinas nesse teste.

**Tabela 9:** Recuperações das estrobilurinas na amostra de feijão Carioca 1 incluindo e não incluindo o PS.

Analito	Recuperação (%)	
	incluindo PS	não incluindo PS
Azoxistrobina	108,2	101,7
Dimoxistrobina	97,1	77,5
Cresoxim-metílico	96,6	81,5
Picoxistrobina	NA	NA
Piraclostrobina	56,2	42,1
Trifloxistrobina	55,2	35,2

NA= não avaliado

Fonte: Elaborada pela autora.

Os cálculos para quantificação das estrobilurinas usando o PS estão apresentados no item 3.7. Não foi possível avaliar a picoxistrobina devido a dificuldades na integração do pico, indicando a coeluição com outro composto na matriz.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostraram potencialidade no uso do padrão *surrogate* para melhorias nas recuperações das estrobilurinas, em alguns casos um aumento de cerca de 20% de recuperação, e assim possibilitando uma avaliação mais adequada da exatidão do método. Diante disso, optou-se pela inclusão do padrão *surrogate* no método e a avaliação da curva analítica incluindo o PS, bem como o estudo de adição e recuperação de analito para as estrobilurinas, que serão abordados adiante.

#### **4.6. Curvas analíticas e limites de detecção e quantificação**

As curvas analíticas para quantificação das estrobilurinas nas etapas iniciais de desenvolvimento do método não incluíam o padrão *surrogate* (calibração externa)

conforme descrito no item 3.7. Contudo, após avaliação do preparo de amostra verificou-se a necessidade de inclusão de um padrão *surrogate* (PS) no método. Conforme discutido anteriormente, a fluoxastrobina foi adotada como PS e, portanto, o método desenvolvido avalia as seis outras estrobilurinas. Os cálculos para quantificação das estrobilurinas usando o PS também estão apresentados no item 3.7.

Para avaliação da linearidade e determinação dos limites de detecção e quantificação foram obtidas curvas analíticas para as seis estrobilurinas com triplicata em cada nível, mostradas nas Figuras 22 e 23, cujas equações das retas estão apresentadas na Tabela 10.

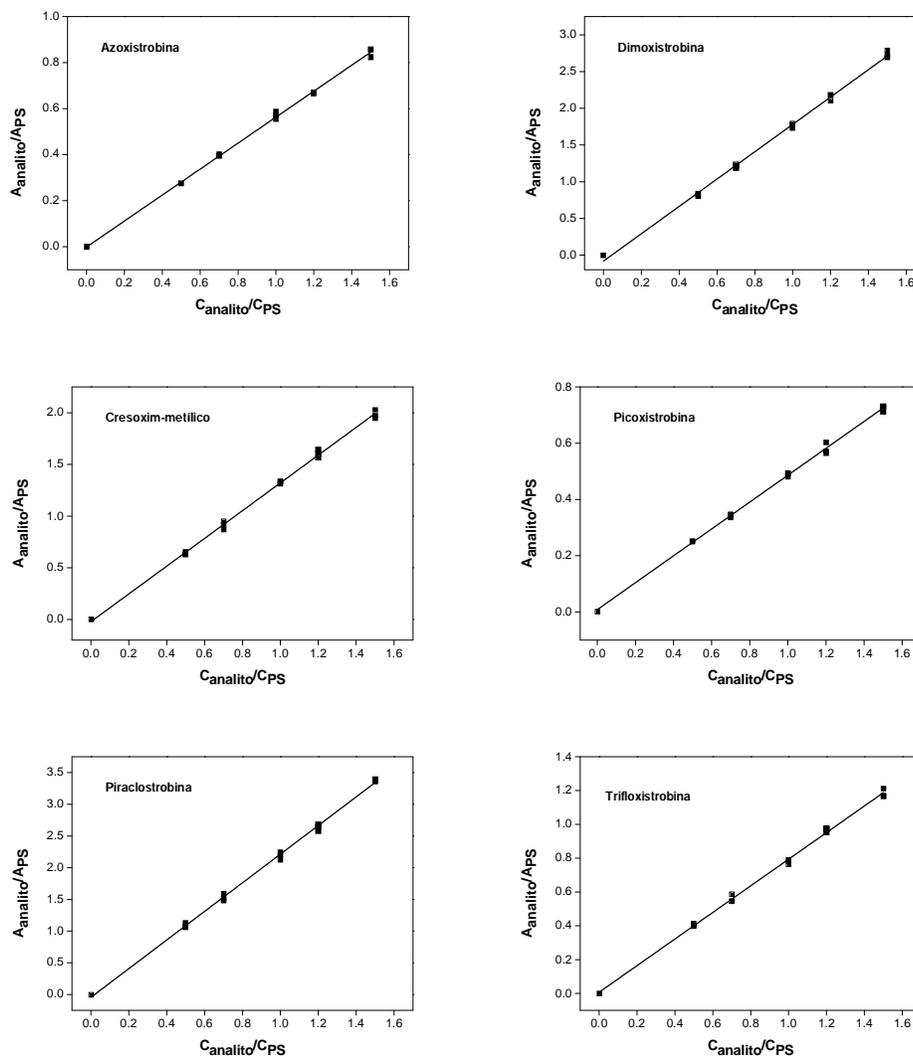
**Tabela 10:** Equações das retas e coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) obtidos para as estrobilurinas detectadas por DE e UV.

Analito	DE		UV	
	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Equação da reta	R <sup>2</sup>
Azoxistrobina	$y = 0,564 x - 0,001$	0,9979	$y = 0,739x + 0,012$	0,9977
Dimoxistrobina	$y = 1,863 x - 0,082$	0,9975	$y = 1,172 x + 0,015$	0,9976
Cresoxim-metílico	$y = 1,343x - 0,021$	0,9974	$y = 0,730 x + 0,009$	0,9975
Picoxistrobina	$y = 0,478x + 0,009$	0,9979	$y = 0,398 x + 0,003$	0,9980
Piraclostrobina	$y = 2,257x - 0,043$	0,9976	$y = 0,504x + 0,008$	0,9979
Trifloxistrobina	$y = 0,787 x + 0,007$	0,9972	$y = 0,426 x + 0,004$	0,9973

$y =$  área do pico do analito/área do pico do PS;  $x =$  concentração do analito/concentração do PS

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 22:** Curvas analíticas para as estrobilurinas detectadas por DE.



$A_{\text{analito}}$  = área do pico do analito

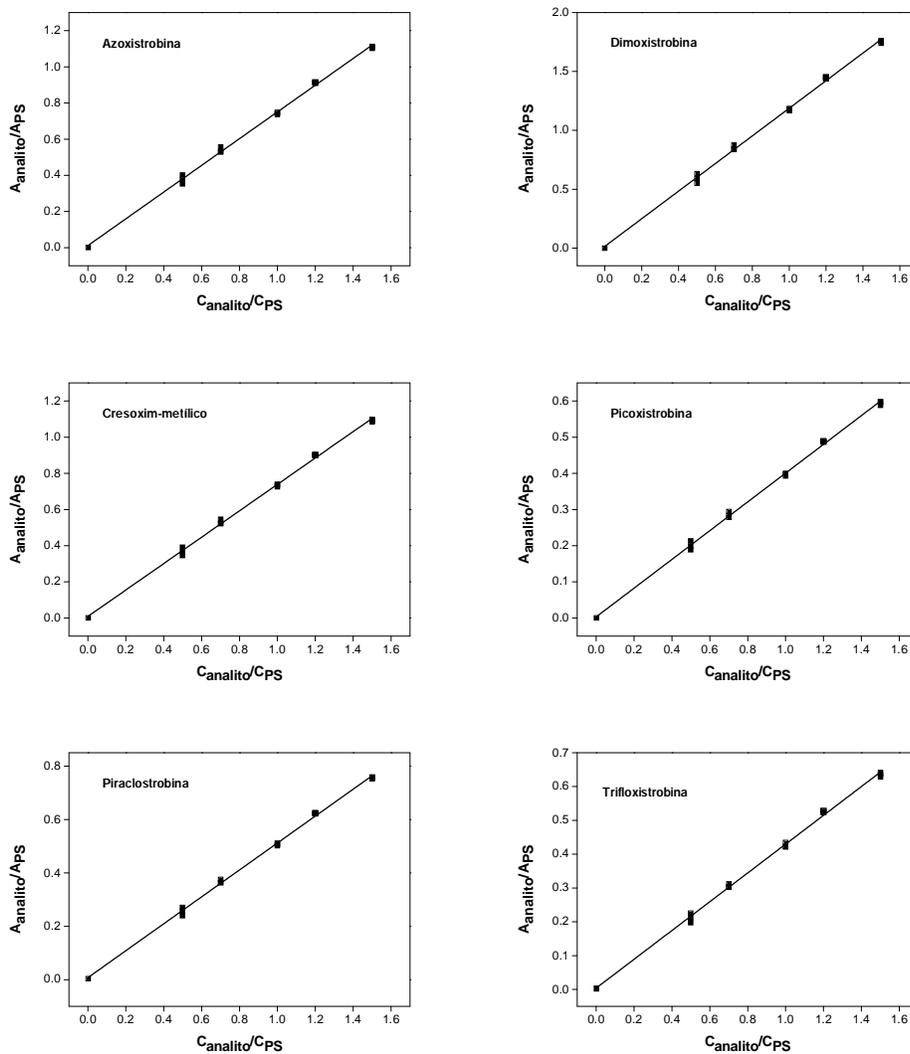
$A_{\text{PS}}$  = área do pico do PS

$C_{\text{analito}}$  = concentração do analito ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$C_{\text{PS}}$  = concentração do PS ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ )

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 23:** Curvas analíticas para as estrobilurinas detectadas por UV.



$A_{\text{analito}}$  = área do pico do analito

$A_{\text{PS}}$  = área do pico do PS

$C_{\text{analito}}$  = concentração do analito ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$C_{\text{PS}}$  = concentração do PS ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ )

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode-se observar que os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das curvas foram próximos a 1, indicando um grau satisfatório de correlação dos dados. No entanto, para avaliação da linearidade do modelo foi realizada a análise de variância ANOVA para todas as curvas obtidas para verificar falta de ajuste. Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram obtidos pela equação 3, apresentada no item 3.7. Os valores de média quadrática de falta de ajuste ( $MQ_{\text{faj}}$ ) e média quadrática de erro puro ( $MQ_{\text{ep}}$ ), foram determinados para as seis estrobilurinas, cujos graus de liberdade definidos foram, respectivamente, 4 e 10. Os valores de  $F_{\text{calculado}}$  para as curvas por DE e UV estão mostrados na Tabela 11, na qual se observa que estes valores foram menores que o  $F_{\text{crítico}}$ , cujo valor é 3,48, a um nível de confiança de 95 % e nos graus de liberdade avaliados, indicando que não há falta de ajuste no modelo.

**Tabela 11:** Valores de  $F_{\text{calculado}}$  para as curvas analíticas por DE e UV.

Analito	DE	UV
	F calculado	F calculado
Azoxistrobina	1,13	2,73
Dimoxistrobina	2,25	2,69
Cresoxim-metílico	0,52	2,98
Picoxistrobina	0,31	1,82
Piraclostrobina	1,08	3,04
Trifloxistrobina	1,27	3,19
<b>F crítico</b>	<b>3,48</b>	<b>3,48</b>

Fonte: Elaborada pela autora

A partir dos resultados da regressão, determinaram-se os limites de detecção e quantificação instrumental e do método, conforme descrito também no item 3.7, e apresentados na Tabela 12.

Vale ressaltar, que os valores apresentados na Tabela 12 para os limites de detecção e quantificação do método levaram em consideração os fatores de diluição e massa de amostra (15 g), ou seja, estão baseados no preparo de amostra. O intuito de apresentá-los é dimensionar os níveis de detecção e quantificação na amostra real, por peso do produto, sendo eles significativamente baixos, como característico para análises de resíduos.

**Tabela 12:** Limites de detecção e quantificação para as estrobilurinas detectadas por DE e UV.

Analito	DE				UV			
	Instrumental		Método		Instrumental		Método	
	(mg L <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )		(mg L <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Azoxistrobina	0,37	1,24	0,02	0,06	0,39	1,30	0,02	0,06
Dimoxistrobina	0,41	1,36	0,02	0,06	0,40	1,33	0,02	0,06
Cresoxim-metílico	0,42	1,39	0,02	0,06	0,40	1,35	0,02	0,06
Picoxistrobina	0,38	1,27	0,02	0,06	0,36	1,21	0,02	0,06
Piraclostrobina	0,39	1,32	0,02	0,06	0,37	1,23	0,02	0,06
Trifloxistrobina	0,43	1,43	0,02	0,07	0,42	1,40	0,02	0,07

LD= limite de detecção; LQ= limite de quantificação

Fonte: Elaborada pela autora.

Uma comparação estatística dos métodos de detecção será abordada no item 4.7. Contudo, observa-se que os limites obtidos para a detecção UV e DE são semelhantes, o que indica que os métodos de detecção são comparáveis em termos de sensibilidade. Comparando-se tais valores com os LMR apresentados na Tabela 3, observa-se que apenas a picoxistrobina ainda não pode ser detectada no nível permitido pela legislação, enquanto as demais estrobilurinas podem ser detectadas e/ou quantificadas por DE e UV.

Vale ressaltar que, até o momento, poucos trabalhos utilizando técnicas eletroanalíticas para detecção das estrobilurinas foram publicados na literatura e nenhum deles reporta a detecção simultânea das sete estrobilurinas avaliadas neste trabalho. Além disso, embora a determinação das estrobilurinas por métodos cromatográficos esteja bem estabelecida, poucos trabalhos também avaliaram estes analitos na matriz selecionada, o feijão, que se mostrou bastante complexa.

Desta forma, este trabalho é um estudo inicial, permitindo uma maior compreensão deste sistema químico e possibilitando estudos posteriores. Por exemplo, poderiam ser avaliadas alterações no preparo de amostra como, por exemplo, maior pré-concentração da amostra, no intuito de obter limites mais adequados para a picoxistrobina. Outra possibilidade seriam estudos de modificação da superfície do eletrodo de DDB, visando aumentar a sensibilidade da detecção

eletroquímica, podendo assim, estabelecer limites de detecção e quantificação mais baixos para todas as estrobilurinas.

#### **4.7. Avaliação do método: exatidão, precisão e comparação dos detectores UV e DE**

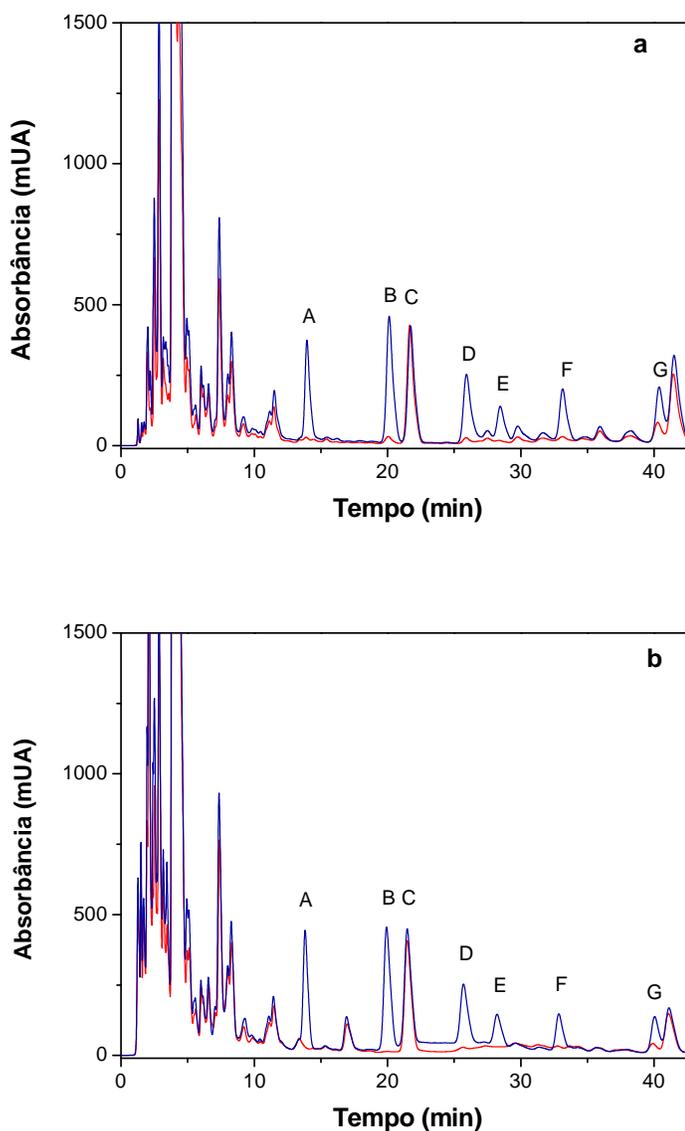
Os primeiros testes submetendo uma amostra de feijão a todas as etapas do método foram realizados utilizando a amostra Carioca 1, na qual se identificaram componentes eluindo na região de eluição dos analitos, dificultando a identificação e quantificação dos mesmos. No entanto, para uma avaliação adequada de algumas figuras de mérito do método, normalmente são utilizadas as chamadas matrizes em branco, que em muitos casos podem se tratar da matriz estudada isenta dos analitos (MURPHY, 2013 e SNYDER, 1997). Por isso, a partir de uma análise prévia, foi selecionada uma amostra de feijão do tipo fradinho denominada “Fradinho 1”, na qual não foram identificadas as estrobilurinas.

Para avaliar a exatidão da metodologia proposta foram realizados estudos de adição e recuperação de analito. Nestes ensaios, foram preparadas cinco réplicas da amostra e amostra fortificada, além de triplicatas do branco e branco fortificado. O nível de fortificação para todas as estrobilurinas e de adição do PS foi de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, o que equivale a 0,47 mg Kg<sup>-1</sup> em 15 g de feijão. Foram analisados por HPLC e os analitos detectados por UV e DE, para determinação dos valores de recuperação das estrobilurinas. A Figura 24 mostra a sobreposição dos cromatogramas de uma réplica do branco e branco fortificado (Figura 24-a) e, também, de uma réplica da amostra e amostra fortificada (Figura 24-b) detectados por UV. O mesmo está apresentado na Figura 25 para detecção por DE.

Notam-se nas figuras a eluição de muitos compostos pouco retidos na coluna nos primeiros 12 minutos de corrida. Estes compostos são, possivelmente, oriundos do processo de tratamento da amostra como, por exemplo, resíduos de solventes e impurezas dos materiais utilizados, e podem ser observados tanto nos brancos quanto nas amostras. Contudo, para as amostras, nesta região também podem ser eluídos compostos pouco retidos na coluna e coextraídos da matriz juntamente com os analitos.

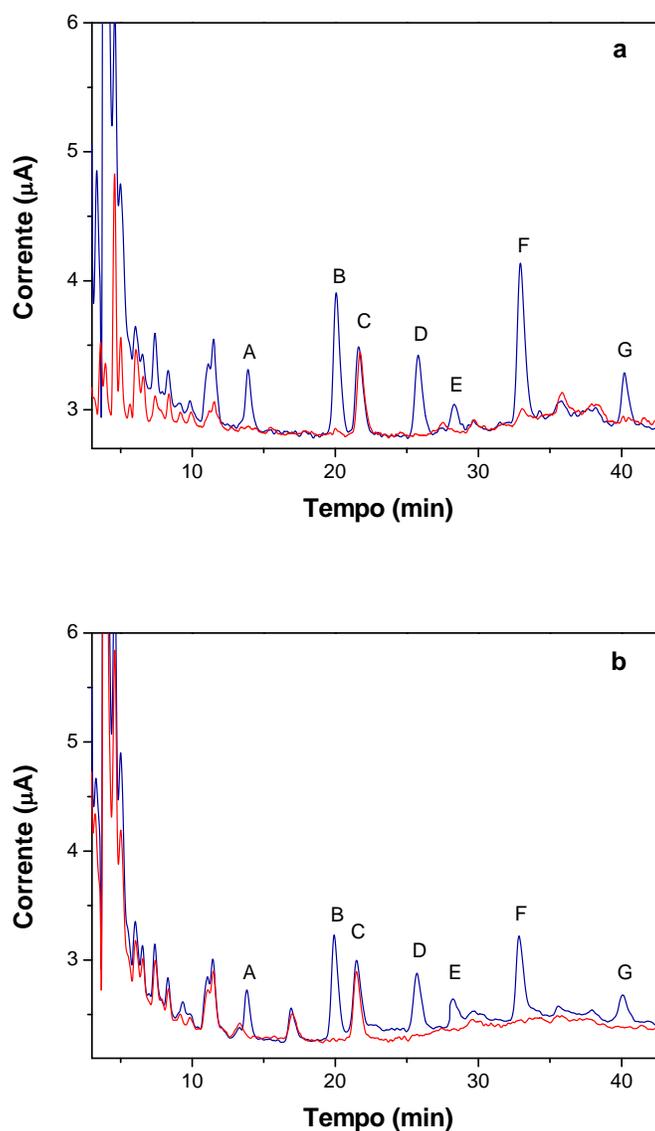
Também foi verificado, nos brancos e amostras, um pico eluído em aproximadamente 41,5 minutos, parcialmente coeluído com a trifloxistrobina. Entretanto, a resolução calculada entre esses dois picos foi de 1,26, sendo o mínimo indicado para determinações quantitativas o valor de 1,25 (COLLINS *et al.*, 2006). Portanto foi possível quantificar a trifloxistrobina sem a necessidade de alteração no gradiente de eluição da fase móvel já estabelecido.

**Figura 24:** Cromatogramas: a) branco (vermelho) e branco fortificado (azul); b) amostra (vermelho) e amostra fortificada para 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito (azul). (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) PS (Fluoxastrobina); (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6. e detecção por UV em 200 nm.



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 25:** Cromatogramas: a) branco (vermelho) e branco fortificado (azul); b) amostra (vermelho) e amostra fortificada para 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada analito (azul). (A) Azoxistrobina; (B) Dimoxistrobina; (C) PS (Fluoxastrobina); (D) Cresoxim-metílico; (E) Picoxistrobina; (F) Piraclostrobina; (G) Trifloxistrobina. Condições: descrito no item 3.6. e detecção por DE em 1,9 V.



Fonte: Elaborada pela autora.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os valores médios de recuperação obtidos para cada uma das estrobilurinas nos brancos fortificados e nas amostras fortificadas, nos detectores UV e DE, respectivamente, juntamente com os desvios padrões relativos (DPR) percentuais para esses conjuntos de medidas.

**Tabela 13:** Valores de recuperação das estrobilurinas detectadas por UV.

Analito	Recuperação (%)		Recuperação (%)	
	Branco Fortificado (n=3)	DPR (%)	Amostra Fortificado (n=5)	DPR (%)
Azoxistrobina	87,4	4,0	98,8	0,6
Dimoxistrobina	88,3	2,4	82,5	3,6
Cresoxim-metílico	88,4	6,1	76,9	2,2
Picoxistrobina	77,8	8,7	80,6	7,9
Piraclostrobina	87,4	2,2	63,1	6,3
Trifloxistrobina	86,6	1,5	61,6	4,6

Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 14:** Valores de recuperação das estrobilurinas detectadas por DE.

Analito	Recuperação (%)		Recuperação (%)	
	Branco Fortificado (n=3)	DPR (%)	Amostra Fortificado (n=5)	DPR (%)
Azoxistrobina	83,4	3,1	95,2	3,9
Dimoxistrobina	87,1	1,7	80,9	2,3
Cresoxim-metílico	80,7	7,9	78,2	8,9
Picoxistrobina	76,7	2,6	80,4	7,1
Piraclostrobina	85,4	5,3	63,4	9,5
Trifloxistrobina	85,9	6,9	62,3	5,1

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se nos resultados apresentados, uma similaridade significativa entre as recuperações obtidas para as estrobilurinas por ambos os detectores. Para os brancos fortificados obteve-se uma faixa de recuperação de 76,7 a 88,4%, enquanto para as amostras a variação foi de 61,6 a 98,8%. O padrão *surrogate* foi quantificado a partir de uma curva analítica externa, sendo seus valores médios de

recuperação de 92,3 % e DPR de 5,9%, para detecção por UV, e de 89,7 % e DPR de 8,8 %, para detecção por DE.

Os valores aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, contudo dependendo da complexidade analítica e da amostra, este intervalo pode ser de 50 a 120% (RIBANI *et al.*, 2004).

No caso das estrobilurinas, tem sido encontrado na literatura valores de recuperação bastante variados para diversas matrizes, em níveis de fortificação semelhantes ao utilizado neste trabalho. Por exemplo, para determinação de cinco estrobilurinas em amostras de milho por GC-MS foi obtida uma faixa de recuperação de 59 a 94% (CUNHA e FERNANDES, 2011). Outro trabalho apresentou uma faixa de recuperação de 53 a 164% para três estrobilurinas em amostras de vinho e uva analisados por HPLC-DAD (ABREU *et al.*, 2005). E ainda, um trabalho publicado para a matriz estudada, o feijão (especificamente o feijão verde), no qual foi determinada uma estrobilurina (cresoxim-metilico) entre outros pesticidas por GC-ECD, reportaram-se valores de recuperação entre 60 e 104 % (AGUILERA *et al.*, 2014).

Portanto, os valores de recuperação obtidos neste trabalho estão condizentes com o intervalo aceitável para amostras complexas e metodologias analíticas laboriosas e, também, de acordo com valores de recuperação já reportados na literatura para as estrobilurinas. Contudo, possivelmente, valores mais adequados de recuperação para as estrobilurinas, principalmente para a piraclostrobina e trifloxistrobina, podem ser obtidos em estudos futuros, com a adequação do padrão *surrogate* utilizado na metodologia.

Conforme discutido anteriormente, a fluoxastrobina se mostrou adequada neste primeiro momento para utilização como padrão *surrogate*, a fim de evitar a inclusão de um novo composto no método. Além dos fatores já apresentados, outra razão para a escolha da fluoxastrobina é o fato desta eluir na região central de eluição das estrobilurinas no método estabelecido. Isto implica que esta estrobilurina possui características intermediárias às outras e por isso, pode atender como padrão *surrogate* tanto para as estrobilurinas eluídas no início do cromatograma quanto para as eluídas no final.

Entretanto, embora as estrobilurinas possuam propriedades químicas e físicas semelhantes, existem pequenas diferenças estruturais dentro da classe que conferem a elas comportamentos diferentes, ou seja, não constituem uma série

homóloga de compostos. Essas diferenças influenciam principalmente a extração dos analitos da amostra e separações cromatográficas, o que pode explicar as recuperações mais baixas obtidas para as duas últimas estrobilurinas eluídas, a piraclostrobinina e trifloxistrobinina.

Portanto, o uso de mais de um composto como padrão *surrogate* pode minimizar as contribuições dessas diferenças existentes entre um conjunto de analitos em um estudo de recuperação. Isto é, no contexto do trabalho, um composto com características mais próximas à piraclostrobinina e trifloxistrobinina poderia ser incluído para avaliar mais adequadamente as recuperações destas, aprimorando assim a exatidão do método.

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade e precisão intermediária, conforme indicações da ANVISA e IUPAC. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas da mesma amostra, em réplicas independentes, sob as mesmas condições. Já a precisão intermediária se refere à precisão avaliada para uma amostra, em que uma ou mais das seguintes condições podem ser variadas: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (BRASIL, 2003b e THOMPSON *et al.*, 2002).

A precisão pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) e os resultados do estudo de recuperação também podem ser utilizados para este fim. Os valores de DPR para as réplicas do branco fortificado e amostras fortificadas, detectadas por UV e DE, também estão apresentados nas Tabelas 13 e 14, variando de 0,6 a 9,5 %.

Já para a precisão intermediária, foram avaliadas réplicas da amostra fortificada de Fradinho 1 em três dias diferentes, por ambos os detectores. Os resultados de recuperação média para as estrobilurinas neste estudo estão apresentados na Tabela 15, onde podem ser observados também seus respectivos DPR que variaram de 0,3 a 7,1 %.

**Tabela 15:** Precisão intermediária para as estrobilurinas detectadas por UV e DE.

Analito	Recuperação (%)	DPR (%)	Recuperação (%)	DPR (%)
	DE (n=3)		UV (n=3)	
Azoxistrobina	95,1	0,3	98,3	1,3
Dimoxistrobina	81,9	4,5	89,5	7,1
Cresoxim-metílico	77,4	2,1	80,4	3,9
Picoxistrobina	79,3	3,9	81,2	0,7
Piraclostrobina	66,2	3,8	66,0	4,3
Trifloxistrobina	64,6	3,1	66,1	6,3

Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo a ANVISA são aceitos DPR de 15% e, dependendo da complexidade da amostra, de até 20 % (BRASIL, 2012). Contudo, o Ministério da Agricultura estabelece como critério de aceitação da precisão de um método o valor de DPR derivado da equação de Horwitz (BRASIL, 2014). O valor de Horwitz é obtido pela equação 7, em que o DPR é o desvio padrão relativo previsto para a faixa de concentração (C) avaliada e expressa em g/g (MILLER *et al.*, 2010).

$$\text{DPR} = 2^{(1-0,5\log(C))} \quad \text{Equação (7)}$$

Para o nível de fortificação das estrobilurinas no estudo de adição e recuperação de analito, o valor de DPR aceito a partir da equação de Horwitz é 18 %. Portanto, os DPR obtidos para as estrobilurinas estão de acordo com os critérios de aceitabilidade indicados pelos órgãos competentes, confirmando assim, a precisão satisfatória do método desenvolvido.

Por fim, para uma comparação estatística dos métodos de detecção UV e DE, foi utilizado um teste t pareado, baseado no desvio padrão da diferença nas médias (SKOOG, 2006). O teste t foi aplicado para as mesmas cinco réplicas da amostra fortificada Fradinho 1, apresentadas no estudo de adição e recuperação de analito. Cada réplica foi primeiramente detectada por UV e na sequência por DE, gerando assim cinco pares de dados para cada analito.

Os valores de t calculados para cada uma das estrobilurinas comparadas nos dois métodos de detecção variaram, em valores absolutos, de 0,07 a 2,09.

Comparando-se estes valores com o valor de  $t_{\text{crítico}}$ , igual a 2,78 para o nível de confiança de 95% e 4 graus de liberdade, verifica-se que não existem diferenças significativas entre as médias das medidas, indicando que os dois métodos de detecção fornecem resultados semelhantes.

Desta forma, constatou-se que os métodos de detecção UV e DE são comparáveis em termos de sensibilidade, exatidão e precisão. Sendo assim, o acoplamento “*homemade*” do detector eletroquímico ao cromatógrafo, se mostrou uma alternativa viável e satisfatória para detecção das estrobilurinas. Além disso, outra vantagem é a possibilidade de confirmação dos resultados numa mesma análise, que é interessante em determinações de resíduos de agrotóxicos.

#### **4.8. Análise das amostras**

Após terem sido estabelecidas as condições analíticas para a realização das análises e avaliado o desempenho do método, foi possível aplicá-lo para algumas amostras de diferentes tipos de feijão. As amostras incluíram uma marca de feijão branco, uma marca de feijão preto, duas marcas de feijão fradinho, duas marcas de feijão carioca e um feijão verde (não processado). A aquisição e descrição das amostras estão apresentadas no item 3.8.

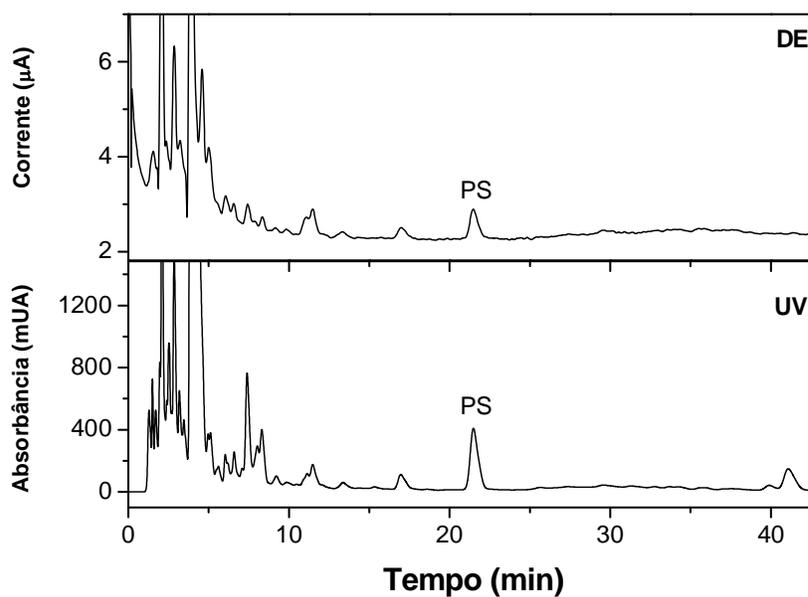
Primeiramente, todas as embalagens e os *sites* das empresas empacotadoras destes produtos, com exceção do feijão verde, foram consultados a fim de verificar se haviam informações sobre o tipo de agrotóxicos, incluindo possivelmente as estrobilurinas, utilizados no cultivo dos feijões. O intuito era coletar informações sobre características específicas de cada amostra, visto que estas possuíam diferentes procedências. Contudo, segundo os órgãos regulamentadores, não é obrigatório o repasse dessas informações ao consumidor, sendo assim, não foi possível obtê-las.

As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata, e o PS foi adicionado tanto nas amostras quanto nos brancos de extração em uma concentração final de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  para a quantificação dos teores das estrobilurinas, se presentes. As Figuras de 26 a 32 apresentam os cromatogramas (detecção UV

em 200 nm) e amperogramas (detecção DE em 1,9 V) para uma réplica de cada amostra.

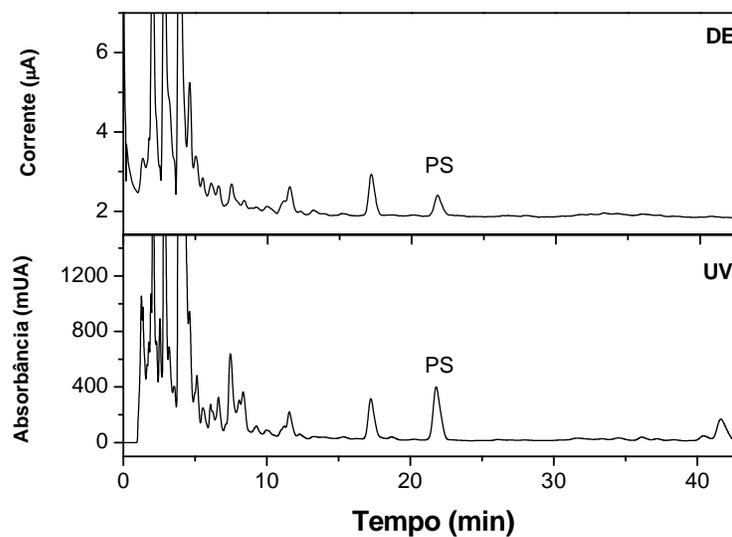
Vale ressaltar novamente, que os compostos pouco retidos na coluna e eluídos em até aproximadamente 10 minutos de corrida, presentes em todas as amostras, podem ser remanescentes do processo de tratamento da amostra e/ou coextraídos da matriz juntamente com os analitos.

**Figura 26:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Fradinho 1. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



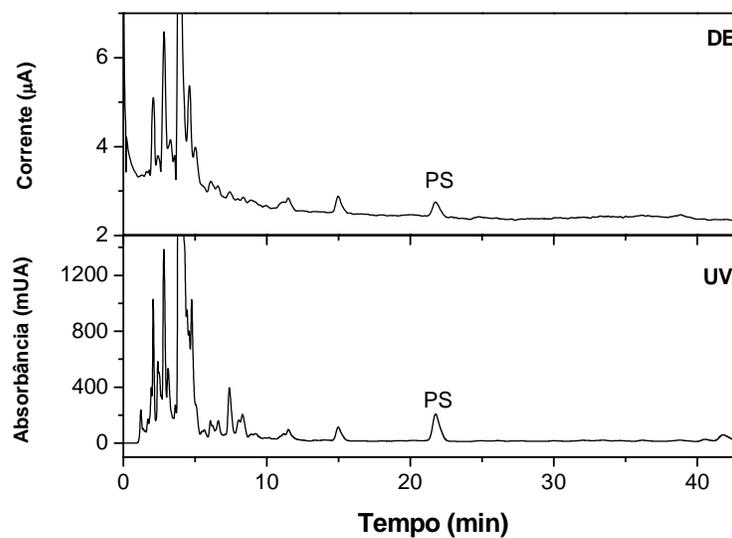
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 27:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Fradinho 2. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



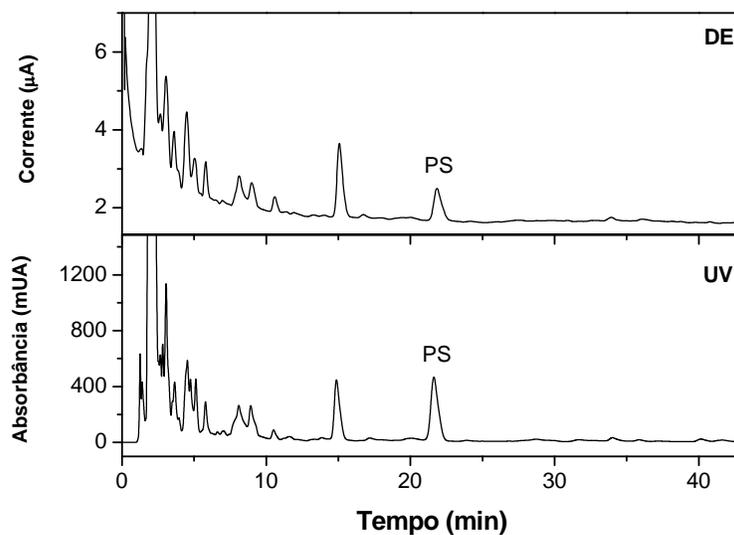
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 28:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Branco. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



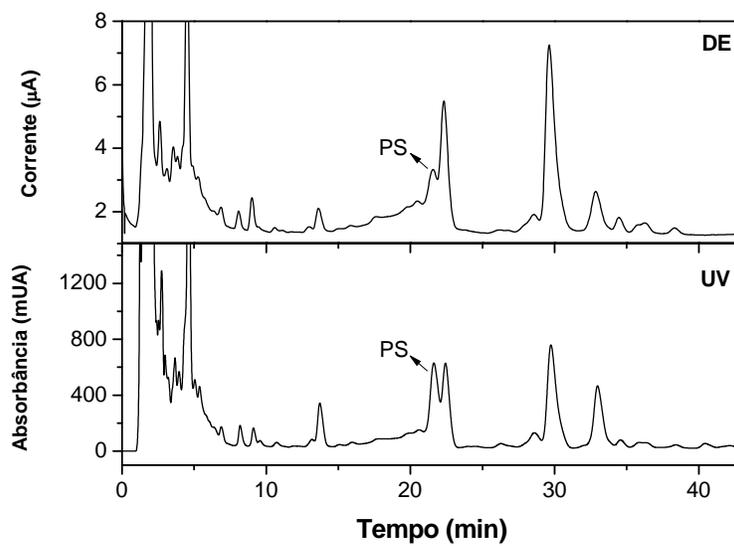
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 29:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Preto. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



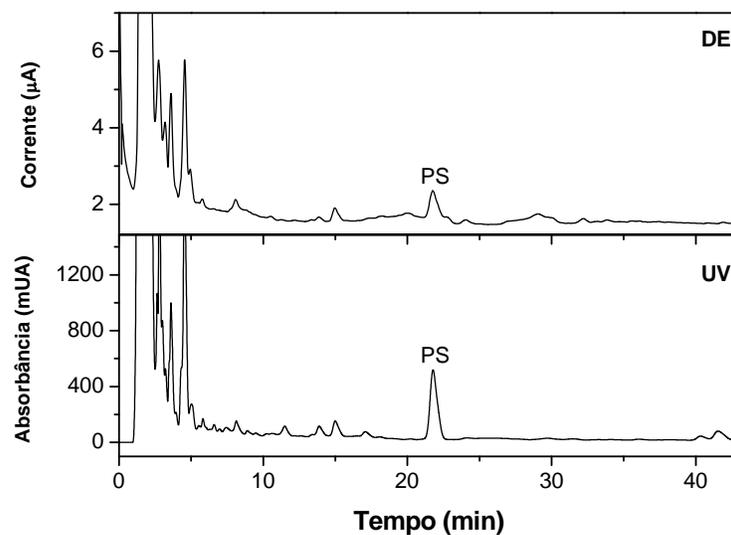
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 30:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Carioca 1. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



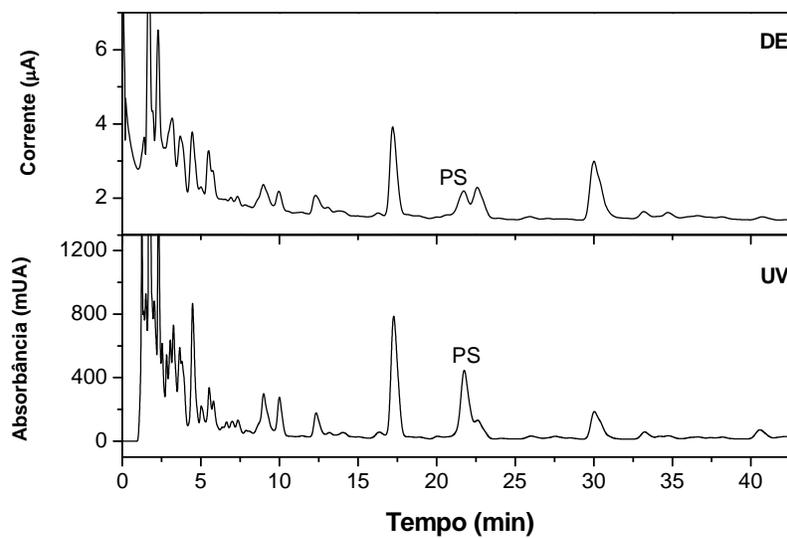
Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 31:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Carioca 2. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 32:** Cromatograma (UV) e amperograma (DE) para a amostra Feijão Verde. (PS) Padrão *Surrogate*. Condições descritas no item 3.6.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 26 e 27, observa-se grande semelhança dos cromatogramas e amperogramas obtidos para as amostras de feijão do tipo fradinho. Verificou-se um pico em aproximadamente 17 minutos, nestas duas amostras, e embora não se possa afirmar ser o mesmo composto, pareceu ser uma característica comum deste tipo de feijão, independente da procedência. Vale destacar que o feijão Fradinho 1 foi o mesmo utilizado no estudo de adição e recuperação de analito, selecionado para estes ensaios por ser uma das amostras na qual não haviam sido identificados os analitos. De semelhante modo, não há indícios de picos referentes às estrobilurinas na amostra de feijão Fradinho 2.

Para as amostras de feijão Branco e Preto, exibidos respectivamente nas Figuras 28 e 29, observa-se cromatogramas e amperogramas “limpos” na região de interesse, isto é, com boa resolução e poucos compostos eluídos na região de eluição das estrobilurinas. Isto, que também foi notado para outras amostras, indica que o processo de extração e purificação das amostras tem sido seletivo e eficiente na remoção de muitos interferentes. Novamente, para estas amostras, não foram detectados picos referente aos analitos.

Já para as amostras de feijão do tipo carioca, mostradas nas Figuras 30 e 31, nota-se uma diferença significativa no perfil dos cromatogramas e amperogramas. Para a amostra Carioca 2, observaram-se poucos compostos eluídos na região de eluição das estrobilurinas. Entretanto, um composto apresentou um pico relativamente pequeno, comparado ao PS, próximo à região de eluição da azoxistrobina, em 13,8 minutos. A partir de uma avaliação cuidadosa do cromatograma, sobreposição de cromatograma dos padrões e análise do perfil do pico constatou-se não ser a azoxistrobina.

A amostra Carioca 1, anteriormente abordada no item 4.5.3 em uma primeira avaliação do método de preparo de amostra, se mostrou bastante peculiar. A análise inicial dessa amostra havia indicado a presença de dois picos eluídos em aproximadamente 14 e 29 minutos, podendo se referir a azoxistrobina e picoxistrobina (vide Figura 21). Entretanto, já inicialmente, verificou-se a necessidade de uma investigação mais profunda visto que aparentemente se tratavam de compostos interferentes coeluído com estes analitos.

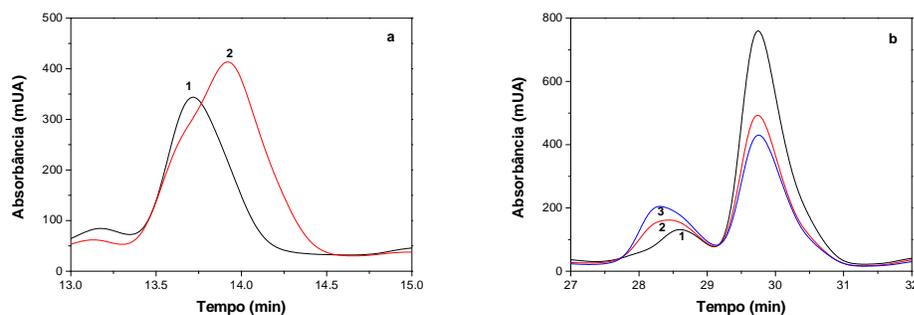
Todavia, após está avaliação prévia, esta amostra ficou estocada por aproximadamente 6 meses, enquanto outras etapas do trabalho estavam sendo desenvolvidas. Constatou-se em outra avaliação desta amostra, utilizando apenas a

detecção UV, um perfil diferente do observado inicialmente, com outros compostos eluídos na região de eluição das estrobilurinas, incluindo um parcialmente coeluído com o PS. Ainda, foi possível identificar o pico eluído em aproximadamente 14 minutos. Além disso, o pico do composto que poderia se referir a picoxistrobina, em aproximadamente 29 minutos, apresentou-se deslocado para a esquerda no cromatograma e com um pequeno pico parcialmente coeluído ao seu lado direito.

Essas diferenças podem estar relacionadas ao tempo de estocagem deste produto, levando em consideração que processos de degradação e decomposição da amostra podem ter acontecido mesmo este sendo estocado em local fresco e abrigado da luz. Vale destacar que para todas as outras amostras o preparo e a análise não excederam um mês após suas aquisições.

Para averiguar se algum desses picos poderiam indicar a presença da picoxistrobina e azoxistrobina na amostra Carioca 1, foram realizados testes de co-cromatografia, mostrados na Figura 33 apenas para detecção UV. A co-cromatografia consiste em adicionar certa quantidade de padrão do composto a ser identificado exatamente antes da injeção, garantindo que o composto de interesse esteja presente. A análise dessa amostra dopada e comparação com a amostra sem dopagem permite avaliar se houve aumento na área do pico que se deseja confirmar. Essa dopagem da amostra, e análise em seguida, pode ser feita quantas vezes forem necessárias até que seja possível identificar adequadamente o tempo de retenção investigado e constatar se existe coeluição com outra substância (OJEU, 2002).

**Figura 33:** Testes de co-cromatografia para amostra Carioca 1. a) Ampliação na região de eluição da Azoxistrobina, onde “1” refere-se à amostra e “2” à amostra dopada com azoxistrobina ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ); b) Ampliação na região de eluição da Picoxistrobina, onde o “1” refere-se à amostra e “2” e “3” à amostra dopada sucessivamente com picoxistrobina ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Condições: descritas no item 3.6 com detecção UV.



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 33-a apresenta os cromatogramas para o teste de co-cromatografia para a azoxistrobina, com ampliação na região próxima aos 14 minutos de corrida. O cromatograma indicado como 1 trata-se da amostra sem dopagem, enquanto o cromatograma indicado como 2 refere-se à amostra dopada com azoxistrobina ( $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Após a dopagem, verificou-se um deslocamento do máximo de absorvância do pico para o tempo exato 14,0 minutos, referente ao tempo de retenção da azoxistrobina. Ao mesmo tempo, permitiu observar ao lado direito deste pico um “ombro” coincidente, em termos de tempo de retenção, com o composto encontrado inicialmente na amostra em 13,7 minutos. Portanto, a comparação destes cromatogramas confirmou a presença de outro composto eluindo com tempo de retenção significativamente próximo ao tempo de eluição da azoxistrobina, contudo não se tratando desta estrobilurina.

A Figura 33-b, ampliada na região próxima aos 29 minutos, apresenta os cromatogramas para o teste de co-cromatografia para a picoxistrobina. O cromatograma indicado como 1 trata-se da amostra sem dopagem, enquanto os cromatogramas indicados como 2 e 3 referem-se à amostra dopada com picoxistrobina ( $10,0$  e  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Observa-se que à medida que a amostra era

dopada com o padrão de picoxistrobina, o pico eluído em 30 minutos diminuía em termos da absorbância, devido à diluição.

O outro pico eluído em 28,6 minutos teve sua área aumentada com a dopagem, contudo com deslocamento do máximo de absorbância para o tempo de retenção de 28,3 minutos e um perfil alargado dos picos. Isto permitiu concluir que o pico 1 no cromatograma não teve sua área aumentada nos picos 2 e 3 devido a um aumento da concentração, mas sim devido à sobreposição de picos pela adição do padrão da picoxistrobina. Este efeito causado pela dopagem da amostra confirmou que o pico eluído em 28,6 minutos não se tratava da picoxistrobina.

Nota-se ainda na amostra Carioca 1, a eluição de um composto parcialmente coeluído com o padrão *surrogate* (PS). O mesmo pode ser observado na Figura 32 para a amostra de feijão Verde. Para uma quantificação correta do PS nessas amostras seria necessário modificar o gradiente de eluição da fase móvel nesta região de eluição e adequar a separação desses compostos. Contudo, julgou-se não ser necessário tal esforço, visto que nestas amostras não foram detectados picos referentes as estrobilurinas para justificar a utilização do PS na quantificação das mesmas.

É relevante apontar que, para as amostras analisadas, a recuperação do PS variou de 70,5 a 98,6 % por detecção UV, e de 71,5 a 97,1% por detecção DE, mantendo-se dentro dos valores estabelecidos para a exatidão do método. Entretanto, para esta avaliação da faixa de recuperação do PS nas amostras, não foram considerados seu valores nas amostras de feijão Carioca 1 e Verde, devido a dificuldades de integração do PS conforme discutido anteriormente, a fim de evitar erros grosseiros.

Portanto, os resultados mostraram não haver indícios das estrobilurinas nessas amostras segundo os níveis de detecção do método. Com exceção da picoxistrobina, para qual ainda não foi possível obter um limite de detecção de acordo com o LMR indicado pela legislação, pode-se admitir que as amostras avaliadas neste trabalho estão em conformidade com a legislação, sendo adequadas para o consumo seguro dessas leguminosas.

Como já relatado neste trabalho, a literatura aponta que as estrobilurinas são ambientalmente mais seguras, sendo pouco persistentes no ambiente, devido sua fácil fotodegradação (SOUZA *et al.*, 2009). Contudo, como não se sabe o contexto de utilização das estrobilurinas no cultivo destes feijões, é difícil afirmar que estas

não foram detectadas nas amostras por, possivelmente, já terem sido degradadas antes do produto chegar ao mercado varejista.

Entretanto, a avaliação desses diferentes tipos de feijão e, conseqüentemente, diferentes características das amostras, mostraram robustez do método de preparo e análise desenvolvido para essa matriz. Além disso, mais uma vez os resultados corroboram para o fato de que o detector eletroquímico é uma opção interessante para determinação dos teores residuais das estrobilurinas. Nestas análises, além de se mostrar igualmente adequado, comparado ao detector UV, permitiu a confirmação dos resultados, sem a necessidade de uma análise extra e posterior.

## 5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para determinação de estrobilurinas por HPLC com detecção simultânea UV e DE se mostrou promissor. Foi realizado um acoplamento “*homemade*” das técnicas, onde as estrobilurinas foram primeiramente separadas na coluna cromatográfica e detectadas por UV, em 200 nm, e sequencialmente conduzidas para a célula eletroquímica para serem oxidadas na superfície do eletrodo de DDB.

O método otimizado mostrou viabilidade da utilização do eletrodo de DDB e as sete estrobilurinas estudadas puderam ser detectadas por amperometria, utilizando potencial de 1,9 V. Neste sentido justifica-se o acoplamento das técnicas, visto que a separação dos analitos se fazia necessária para possibilitar a detecção eletroquímica simultânea dos analitos em um único potencial.

Para a aplicação do método de análise e determinação das estrobilurinas, foi desenvolvido um método de preparo de amostras de feijão. Poucos trabalhos têm sido reportados na literatura para extração das estrobilurinas nesta matriz, sendo necessário adaptar métodos desenvolvidos para outras matrizes. O método de extração mostrou-se adequado para extração das estrobilurinas, seletivo e eficiente na remoção de muitos interferentes. Contudo, visto as muitas etapas no processo de preparo, perdas significativas dos analitos colaboraram inicialmente para baixas recuperações dos mesmos, em alguns casos de apenas 35 %.

Para contornar este problema, foi implementado o uso do padrão *surrogate* (PS). A fluoxastrobina foi selecionada para utilização como PS no método, visto suas características intermediárias entre todas as estrobilurinas estudadas, sendo assim adequada para a avaliação e quantificação dos analitos sem a necessidade de inclusão de um novo composto ao método.

Feitos os ajustes necessários para a inclusão do PS, foi realizado o estudo de adição e recuperação de analito, obtendo-se valores entre 61,6 % a 98,8 %, aceitáveis para análises de resíduos de pesticidas em amostras e metodologias complexas, além disso, também estando de acordo com as recuperações das estrobilurinas reportadas na literatura. A precisão do método foi avaliada através de estudos de repetitividade e precisão intermediária, nos quais os DPR foram menores

que 10 %, estando dentro dos critérios de aceitabilidade indicados na literatura para avaliação de métodos analíticos.

Observou-se que os limites de detecção e quantificação das estrobilurinas obtidos por detecção UV e DE foram semelhantes e significativamente baixos, como característico para análises de resíduos. Os métodos de detecção UV e DE também foram comparados estatisticamente, o que mostrou não haver diferenças significativas entre os resultados reportados por estes.

Com relação às amostras de feijão, não foram detectados resíduos das estrobilurinas. Como relatado na literatura as estrobilurinas são facilmente degradadas no ambiente, principalmente quando expostas à radiação ultravioleta, como as emitidas por raios solares. Esta pode ser uma das razões pelas quais as estrobilurinas não foram detectadas nas amostras. Contudo, não se sabe sobre a utilização de tais substâncias no período de cultivo das amostras selecionadas neste trabalho. Então, para a sustentação desta hipótese outros estudos devem ser feitos como, por exemplo, a seleção de amostras cuja utilização das estrobilurinas no cultivo seja confirmada diretamente com produtores.

Desta forma, conclui-se que o acoplamento “*homemade*” do detector eletroquímico ao cromatógrafo, se mostrou uma alternativa bastante viável e satisfatória para detecção das estrobilurinas, sendo os métodos de detecção UV e DE comparáveis em termos de sensibilidade, exatidão e precisão. Isto possibilita confirmação dos resultados numa mesma análise, que é interessante em determinações de resíduos de agrotóxicos, sem a necessidade de aquisição de outros equipamentos de alto custo e processamento de amostras para análises posteriores e em diferentes técnicas.

Além do mais, este trabalho é um estudo inicial, que permitiu uma maior compreensão deste sistema químico, da complexidade das amostras e mostrou potencialidade do uso das técnicas eletroquímicas para determinação simultânea das sete estrobilurinas, possibilitando assim estudos posteriores.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Aprimorar a metodologia de preparo de amostras, avaliando a utilização de solventes mais eficientes para extração das estrobilurinas e a minimização de etapas de manipulação das amostras.
- Avaliar a inclusão de outras substâncias mais adequadas para utilização como *padrão surrogate*.
- Aplicar o método desenvolvido neste trabalho para determinação de estrobilurinas em outras amostras de alimentos, principalmente, outras leguminosas.
- Avaliar a utilização de eletrodos modificados para agregar maior sensibilidade ao método e reduzir os níveis de detecção das estrobilurinas.
- Avaliar o efeito de processos domésticos, como lavagem e aquecimento (sob pressão) de amostras alimentícias, sobre a eliminação e/ou degradação das estrobilurinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHEEM, E. M. H.; HASSAN, S. M.; ARIEF, M. M. H.; MOHAMMAD, S. G. Validation of quantitative method for azoxystrobin residues in green beans and peas. **Food Chemistry**, v. 182, p. 246-250, 2015.

ABREU, S.; CORREIA, M.; HERBERT, P.; SANTOS, L.; ALVES, A. Screening of grapes and wine for azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin fungicides by HPLC with diode array detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 6, p. 549–556, 2005.

AGUILERA, A.; VALVERDE, A.; CAMACHO, F.; BOULAUD, M.; GARCÍA-FUENTES, L. Household processing factors of acrinathrin, fipronil, kresoxim-methyl and pyridaben residues in green beans. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 146-152, 2014.

ALMEIDA, J. M. S.; DORNELLAS, R. M.; SILVA, A. R.; AUCÉLIO, R. Q. Abordagens Eletroanalíticas para a Determinação de Agrotóxicos da Classe das Estrobilurinas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 5, p. 1709-1727, 2015.

ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G. The strobilurins - New antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 30, n.10, p. 806-810, 1977.

AZEVEDO, G. C. **Determinação amperométrica de peróxido de hidrogênio em amostras de mel e gel para clareamento dentário usando eletrodo de diamante dopado com boro**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2004.

BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health Part. B**, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, v. 42, n. 4, p. 441-451, 2007.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira : 2012-2014**, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 247 p.

BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Divisão de Ensaios Químicos, Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial DEQ/CGAL, novembro, 2014. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/laboratorios/publicacoes/manuais-e-guias>> Acesso em 02 de junho de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC Nº 119 de 19 de maio de 2003**. D.O.U. 22 de maio de 2003. 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 3.367 de 07 de agosto de 2009**. D.O.U. 10 de agosto de 2009. 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 4.313 de 29 de setembro de 2009**. D.O.U. 01 de outubro de 2009. 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 446 de 10 de fevereiro de 2010**. D.O.U. 11 de fevereiro de 2010. 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. **Resolução RE nº 227 de 20 de janeiro de 2011**. 21 de janeiro de 2011, p. 63. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 4.481 de 30 de setembro de 2010**. D.O.U. 04 de outubro de 2010. 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 3.082 de 09 de novembro de 2015**. D.O.U. 10 de novembro de 2015, p. 34. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. D.O.U. 02 de junho de 2003. 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA: Relatório de Atividades de 2011 e 2012**. Brasília, 29 de outubro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012**. D.O.U. 22 de maio de 2012. 2012.

BRASIL. **Portaria SVS/MS nº 3, de 16 de janeiro de 1992**. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. D.O.U. de 04 de fevereiro de 1992.

CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; AGUINAGA, N.; FÉREZ, G.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of strobilurin fungicides in fruit samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 27, p. 4529-4534, 2010.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C.; **Dossiê ABRASCO- Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98 p.

CHANG, C. C.; CHEN, L. C.; LIU, S. J.; CHANG, H. C. Investigation of electro-oxidation of methanol and benzyl alcohol at boron-doped diamond electrode: Evidence for the mechanism for fouling film formation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 39, p. 19426-19432, 2006.

CHRISTENSEN, H. B.; GRANBY, K. Method validation for strobilurin fungicides in cereals and fruit. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 10, p. 866-874, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP: Ed. Unicamp, 2006, 453 p.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectivas para a agropecuária: volume 3 - Safra 2015/2016**. Brasília: CONAB, 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 17 de maio de 2016.

COSTA, J. S.; KNABBEN, C. C. **Manual de classificação do feijão: Instrução Normativa nº 12, de 28 de março de 2008**. Brasília, DF: Embrapa, 2012, 25 p. Disponível em: <[http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/manualilustrado\\_06.pdf](http://www.cnpaf.embrapa.br/transferecia/informacoestecnicas/publicacoesonline/manualilustrado_06.pdf)> Acesso em 17 de março de 2016.

CRUZ, G. V. **O quadro de contaminação de frutas, legumes e verduras (FLVs) com resíduos de agrotóxicos no Brasil e as oportunidades emergentes**. 2014. 135 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Programa de Pós- Graduação em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Multipesticide residue analysis in maize combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 43, p. 7748–7757, 2011.

DORNELLAS, R. M. **Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para determinação de fungicidas da classe das estrobilurinas utilizando eletrodos de filme de bismuto e de diamante dopado com boro**. 2014. 209 f. Tese (Doutorado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014a.

DORNELLAS, R. M.; FRANCHINI, R. A. A.; SILVA, A. R.; MATOS, R. C.; AUCÉLIO, R. Q. Determination of the fungicide kresoxim-methyl in grape juices using square-wave voltammetry and a boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 708, p. 46-53, 2013.

DORNELLAS, R. M.; MUNOZ, R. A. A.; AUCÉLIO, R. Q. Electrochemical determination of picoxystrobin on boron-doped diamond electrode: Square-wave voltammetry *versus* BIA-multiple pulse amperometry. **Microchemical Journal**, v. 123, p. 1-8, 2015.

DORNELLAS, R. M.; NOGUEIRA, D. B.; AUCÉLIO, R. Q. The boron-doped diamond electrode voltammetric method for ultra-trace determination of the fungicide

pyraclostrobin and evaluation of its photodegradation and thermal degradation. **Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p. 944-950, 2014b.

DORNELLAS, R. M.; TORMIN, T. F.; RICHTER, E. M.; AUCÉLIO, R. Q.; MUÑOZ, R. A. A. Electrochemical Oxidation of the Fungicide Dimoxystrobin and Its Amperometric Determination by Batch-Injection Analysis. **Analytical Letters**, v. 47, n. 3, p. 492-503, 2014c.

DRAGOE, D.; SPĂȚARU, N.; KAWASAKI, R.; MANIVANNAN, A.; SPĂȚARU, T. TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Detection of trace levels of Pb<sup>2+</sup> in tap water at boron-doped diamond electrodes with anodic stripping voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 12, p. 2437-2441, 2006.

EMBRAPA. **Cultivo do Feijoeiro Comum**. Embrapa Arroz e Feijão, Sistema de Produção, v. 2, p. 5-45, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>> Acesso em 6 de abril de 2016.

EPA. US Environmental Protection Agency. **Pesticides**, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/treatart.htm>> Acesso em 21 de novembro de 2014.

ESTEVE-TURRILLASA, F. A.; MERCADER, J. V.; AGULLÓ, C.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ABAD-FUENTES, A. Development of immunoaffinity columns for pyraclostrobin extraction from fruit juices and analysis by liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4902-4909, 2011.

FAO. Food Agriculture Organization. **Organic Agriculture: what is organic agriculture?** 1999. Disponível em: <<http://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq1/en/>> Acesso em 21 de novembro de 2014.

FAO. Food Agriculture Organization. **Pesticide residues in food 2008. Evaluations. Part I: Residues. Azoxystrobin**. 2009, 202 p. Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMP\\_R/Evaluation08/Azoxystrobin.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMP_R/Evaluation08/Azoxystrobin.pdf)> Acesso em 27 de janeiro de 2015.

FILHO, F. R. F.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. R.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 2011. 84 p. Disponível em:

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/84470/1/feijao-caupi.pdf>>

Acesso em 6 de abril de 2016.

FIORINI, D.; PACETTI, D.; GABBIANELLI, R.; GABRIELLI, S.; BALLINI, R. A salting out system for improving the efficiency of the headspace solid-phase microextraction of short and medium chain free fatty acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1409, n. 1, p. 282-287, 2015.

GRANGER, M. C.; XU, J. S.; STROJEK, J. W.; SWAIN, G. M. Polycrystalline diamond electrodes: basic properties and applications as amperometric detectors in

flow injection analysis and liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 397, p. 145-161, 1999.

HONÓRIO, G. G.; AZEVEDO, G. C.; MATOS, M. A. C.; OLIVEIRA, M. A. L.; MATOS, R. C. Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 42-48, 2014.

HOWELL, C. C.; SEMPLE, K. T.; BENDING, G. D. Isolation and characterisation of azoxystrobin degrading bacteria from soil. **Chemosphere**, v. 95, p. 370-378, 2014.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, p. 1940-1949, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Rio de Janeiro, v.29, n.12, p.1-88, 2015.

KLITTICH, C. J. R.; RAY, S. L. Effects of physical properties on the translaminal activity of fungicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. 351-359, 2013.

LIANG, L.; LIU, G.; WANG, F.; WANG, W. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography for the determination of strobilurin fungicides in fruit juice samples. **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 62-67, 2013.

LIU, L.; JIANG, C.; WU, Z.; GONG, Y.; WANG, G. Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 297-302, 2013.

LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. **The Analyst**, v. 134, n. 10, p. 1965-1979, 2009.

MACPHERSON, J. V. A practical guide to using boron doped diamond in electrochemical research. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 5, p. 2935-2949, 2015.

MILLER, J. M.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6<sup>a</sup> ed. Harlow: Ed. Pearson, 2010. 278 p.

MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A. P.; GINÉ, M. F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 412-419, 2002.

MONTANARI, R.; CARVALHO, M. P.; ANDREOTTI, M.; DALCHIAVON, F. C.; LOVERA, L. H.; HONORATO, M. A. O. Aspectos da produtividade do feijão

correlacionados com atributos físicos do solo sob elevado nível tecnológico de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1811-1822, 2010.

MURPHY, C. J.; MACNEIL, J. D.; CAPAR, S. G. Best practices for single – laboratory validation of chemical of methods for trace elements in foods. Part I – Background and general considerations. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 1, 2013.

OJEU. Official Journal of the European Union. COMMISSION DECISION of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Union**, v. 45, L 221, p. 8-36, 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2002:221:TOC>> Acesso em 24 de junho de 2016.

PACHECO, F. W.; DOYLE, A.; DUARTE, D. R. A.; FERRAZ, C. S. FARIAS, A. M. P.; AUCÉLIO, R. Q. Square-Wave adsorptive stripping voltammetry for trace determination of dimoxystrobin and azoxystrobin in potatoes and grapes. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 205-210, 2010.

PANSU, M.; GAUTHEYROU, J.; LOYER, L.Y. **Soil Analysis: Sampling, Instrumentation and Quality Control**. Lisse: Ed. CRC Press/Balkema, 2001. 500 p.

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v.8, n. 7, p. 673-675, 1996.

PELAEZ, V. S.; SILVA, L. R.; ARAUJO, E. REGULAÇÃO DE AGROTÓXICOS: uma análise comparativa. In: **Seminário Nacional de História da Ciência e da Tecnologia**, 13, 2012, São Paulo. **Anais do 13º Seminário Nacional de História da Ciência e da Tecnologia**. São Paulo: SBHC, 2012. p.1–15. Disponível em:<[http://www.13snhct.sbhc.org.br/resources/anais/10/1356022660\\_ARQUIVO\\_RegulacaoAgrotoxicosSBHC.pdf](http://www.13snhct.sbhc.org.br/resources/anais/10/1356022660_ARQUIVO_RegulacaoAgrotoxicosSBHC.pdf)> Acesso em 12 de setembro de 2014.

PEREZ-ALONSO, F.J.; AGUI, L.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J.M. Determination of styrene and styrene additives using cylindrical microelectrodes in acetone. **The Analyst**, v. 125, n. 11, p. 2006-2010, 2000.

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275-1291, 2002.

PROLLA, I. R. D.; BARBOSA, R. G.; VEECK, A. P. L.; AUGUSTI, P. R.; SILVA, L. P.; RIBEIRO, N. D.; EMANUELLI, T. Cultivar, harvest year, and storage conditions affecting nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 96-102 , 2010.

QUINTINO, M. S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a Batch Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas**. 2013. 112 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RAINA-FULTON, R. Determination of neonicotinoid insecticides and strobilurin fungicides in particle phase atmospheric samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 5152-5162, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, F. R. P.; MARTELLI, P. B.; REIS, B. F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 119-125, 2000.

SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; ALMEIDA, E. G. N.; EIRAS, S. P. ALBUQUERQUE, Y. D. T.; RICHTER, E. M. Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1249-1255, 2009.

SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L.; Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.

SEAB, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural (DERAL). **Feijão - Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2014.

SELVA, T. M. G.; PAIXÃO, T. R. L. C. Boron-doped diamond as a sensor for the classification of carbamate pesticides using a chemometric approach. **New Journal of Chemistry**, v. 40 p. 2514 -2520, 2016.

SILVA, J. M.; **Desenvolvimento e validação de um método para determinação de agrotóxicos em sedimento por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com micro detector por captura de elétrons**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SIQUEIRA, S. L.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 42, n. 3, p. 584-590, 2008.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo, SP: Ed. Thomson, 2006. 1026 p.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2ª ed. New York: Ed. Joh Wiley & Sons, Inc, 1997. 765 p.

SOUZA, C. F.; CUNHA, A. L. M. C. ; AUCÉLIO, R. Q. Determination of picoxystrobin and pyraclostrobin by mekc with on-line analyte concentration. **Chromatographia**, v. 70, p. 1461-1466, 2009.

THEODORE, S.; SAI, P.S.T.; Esterification of ethanol with sulfuric acid: a kinetic study. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 79, p. 54-64, 2001.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; MARTÍNEZ-CASTILLO, N.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 1, p. 140-146, 2009.

WANDER, A. E. Produção e consumo de feijão no brasil, 1975-2005. **Informações Econômicas**, v. 37, n. 2, p. 7-21, 2007.

WEI, M.; ZENG, G.; LU, Q. Determination of organophosphate pesticides using an acetylcholinesterase-based biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with gold nanoparticles and carbon spheres. **Microchimica Acta**, v. 181, p. 121–127, 2014.

XU, J.; GRANGER, M. C.; CHEN, Q.; STROJEK, J. W.; LISTER, T. E.; SWAIN, G. M. Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. **Analytical Chemistry News & Features**, v. 69, n. 19, p. 591-597, 1997.

ZHAO, G.; QI, Y.; TIAN, Y. Simultaneous and Direct Determination of Tryptophan and Tyrosine at Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 8, p. 830-834, 2006.

ZOSKI, C. G. **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Ed. Elsevier, 2007. 935 p.