UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Estudo voltamétrico e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências –Área de concentração em Química Analítica.

Fabiano Okumura

Orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo

São Carlos/2009

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Milton Toitiro e Tiyoko pelo amor, carinho e apoio nos meus estudos.

Ao meu irmão André e à minha cunhada Lidiene pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos deste doutorado.

À Driele pelo amor, carinho, apoio e companhia em todos nos momentos deste trabalho, principalmente nos mais difíceis. Agradeço por estar ao meu lado nas horas que eu mais precisei.

Ao Edson, Solange, Thais e Cristine pela amizade e incentivo em toda fase final do doutorado.

Agradecimentos

Ao prof. Luiz Henrique Mazo pela orientação, ensinamentos, paciência e oportunidade de desenvolver este trabalho de doutorado;

Aos profs. Sergio e Luis Alberto pelas discussões e sugestões sobre o trabalho desenvolvido com os pesticidas e os métodos eletroanalíticos;

Aos técnicos Marcelo Calegaro e João Tiengo pelo auxílio no laboratório;

Aos amigos do GMEME Murilo, Rafael, Gustavo, Fernando, Diego, Murilo Martinez, Eduardo, Dyovanni, Picon, Vitor, Marcos, Yoshi, Pedro, Pimpão, Barca, Rafael Reis, Soninha, Andressa, Eliana, Raquel, Cláudia Razzino, Kelly, Maria Inês, Milena, Samea, Juliana, Lívia e Poliana pela amizade e conversas no laboratório;

À turma antiga do GMEME Alexandra, Andréa, Claudia Breda, Djenaine, Giancarlo, Hugo, Inês, Josiane, Katlin, Lídia, Marcelina, Mariha, Mauro, Michele, Renata, Robson e Valber pela amizade e ensinamentos no início do doutorado;

Aos amigos do IQSC Eurico, Haruo, Evandro, Adriano, Miriam, Lafom, Maristela, Ana Paula, Willy, Josy, Thiago, Jorge, Lisbeth, Avelardo e Raquel pela amizade e pelas divertidas reuniões nos finais de semana;

Ao Felipe, Gabi, Jaldair, Mariama, Maycon, Rafael pela amizade, companhia nos finais de semana;

Aos amigos do futebol Bruno (Dalgo), Bruno Molero, Cabelo, Eduardo, Ely, Ezequiel, Fabio, Jaca, Luciano, Mario, Mateus, Roberto, TG, Tiago e Wendel pelas partidas de futebol no Multi Sport;

Às secretárias da pós-graduação Silvia e Andréia pelos serviços prestados;

À secretária da biblioteca Eliana pela correção e revisão das referências bibliográficas desta tese;

Ao Ítalo pelo serviço de encadernação e acabamento dos exemplares deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Resumo

O comportamento eletroquímico do inseticida fipronil, 5-amino-[(2,6-dicloro)-4-trifluormetil-fenil]-4-trifluormetil-sulfinil-1H pirazol-3-carbonitrila, foi investigado pelas técnicas de voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, eletrólise a potencial controlado e voltametria de redissolução de onda quadrada utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana. O fipronil apresentou um comportamento de um sistema irreversível com potencial de pico de 0,95 V. O processo de transferência de carga apresentou um controle misto de difusão e adsorção de espécies na superfície do eletrodo. O pH 8,0 foi escolhido para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para determinação do composto. Os estudos por eletrólise a potencial controlado mostraram que a oxidação do inseticida envolve a participação de um elétron. Na voltametria de onda quadrada, o melhor sinal de corrente foi obtido com os valores de freqüência de 100 s^{-1}, amplitude de 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados pelo método da IUPAC e pelo método de extrapolação da curva analítica. A metodologia desenvolvida foi comparada com o método oficial de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta por meio do método de curvas de calibração por meio de adição externa de padrão e foi observada concordância entre os dois métodos no intervalo de concentração estudado. Nos estudos de pré-concentração, as melhores condições encontradas foram um potencial de acumulação de 0,5 V e tempo de acumulação de 120 s. Amostras de águas naturais, formulação veterinária e leite foram analisadas pelos procedimentos propostos.

Abstract

The electrochemical behavior of the insecticide fipronil, 5-amine-[(2,6-dichloro)-4-trifluoromethyl-phenyl]-4-trifluoromethyl-sulfynil-1H pyrazole-3-carbonitrile, was investigated by cyclic voltammetry, square wave voltammetry, controlled potential electrolysis and square wave stripping voltammetry using the graphite-polyurethane composite electrode. The electrochemical behavior of fipronil is a typical irreversible system and a peak potential at 0.95 V was observed. The charge transference process is controlled by diffusion and adsorption of species at electrode surface. The pH value 8.0 was chosen in order to develop an electroanalytical methodology for the determination the compound. Controlled potential electrolysis studies showed that the fipronil oxidation involves the participation of one electron. Square wave voltammetry investigations showed that the best current intensity was obtained using the values of a frequency of 100 s^{-1}, pulse amplitude of 50 mV and scan increment of 2 mV. The limits of detection and quantification were calculated the IUPAC equations and statistics equations. The developed methodology was compared to the official analysis method, high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using the calibration curves method. Both procedures are in agreement with the concentration-studied range. Stripping analysis studies were done in order to determine fipronil traces in natural water. The best conditions found were the accumulation potential of 0.5 V and accumulation time of 120 s. The electroanalytical methodology, based on the square wave voltammetry, was applied for the analysis of natural water samples, a commercial veterinary formulation and milk samples.

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura química do fipronil. 17
Figura 2: Formação dos produtos de degradação do fipronil por: (a) redução, (b) hidrólise, (c) oxidação e (d) fotólise. 19
Figura 3: Célula eletroquímica utilizada nos experimentos onde: 1-) eletrodo de trabalho, 2-) eletrodo de referência e 3-) eletrodo auxiliar. 37
Figura 4: Esquema de uma célula eletroquímica de dois compartimentos. 38
Figura 5: Voltamogramas cíclicos (—) de uma solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0 e (—) de uma solução de fipronil $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}..... 49
Figura 6: Voltamogramas de varredura linear de uma solução de fipronil $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}; valores de pH: (—) 5,0, (—) 6,0, (—) 7,0, (—) 8,0, (—) 9,0 e (—) 10,0. 51
Figura 7: Gráfico de (—) potencial de pico e (—) corrente de pico em função do pH obtido da Figura 6. 52
Figura 8: (A) Voltamogramas cíclicos do fipronil $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Velocidades de varredura: (—) 10, (—) 20, (—) 50, (—) 100, (—) 150, (—) 200 e (—) 250 mV s^{-1}. (B) Gráfico da corrente de pico em função da velocidade de varredura; 54
Figura 9: (A) Cronoamperograma de uma solução de fipronil $3,6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} em solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}, 40% em etanol. Potencial aplicado: 0,7 V. Tempo de aplicação: 3600 s. (B) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil $3,6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento 2 mV, (—) antes da eletrólise e (—) após a eletrólise. 56
Figura 10: Voltamograma de onda quadrada de uma solução de fipronil $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Componentes da corrente: (—) corrente direta, (—) corrente reversa e (—) corrente resultante. 58
Figura 11: Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de fipronil em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Valores de freqüência: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 s^{-1}. 59
Figura 12: Gráfico de corrente de pico em função da freqüência de pulsos aplicada. .. 60
Figura 13: Gráfico de potencial de pico em função do logaritmo da freqüência..... 61
Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, incremento de varredura 2 mV. Valores de amplitude: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 mV. 62
Figura 15: Gráfico de (—) potencial de pico, (—) corrente de pico em função da amplitude de pulsos..... 63
Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV. Valores de incremento de varredura: (—) 2, (—) 4, (—) 6, (—) 8 e (—) 10 mV. 64

Figura 17: Gráfico de (—) potencial de pico, (—) corrente de pico em função do incremento de varredura. 65
Figura 18: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV e incremento de varredura 2 mV. Valores de concentração: (—) 0, (—) 2,5, (—) 5,0, (—) 7,5, (—) 10,0, (—) 12,5, (—) 15,0, (—) 17,5, (—) 20,0, (—) 22,5 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica (r=0,999). 67
Figura 19: Espectros de absorção na região do ultravioleta de soluções de fipronil 1% em etanol em diferentes concentrações: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, (—) 15,0, (—) 20,0 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva de calibração (r=0,999). 70
Figura 20: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil em solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura de 2 mV. Intervalo de concentração: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, (—) 15,0, (—) 20,0 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica para o fipronil (r=0,999). 72
Figura 21: (A) Cromatogramas de uma solução de fipronil em acetonitrila; modo isocrático, fase móvel: acetonitrila-água (70:30). Intervalo de concentrações: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, (—) 15,0, (—) 20,0 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica para o fipronil (r=0,999). 73
Figura 22: Gráfico de correlação entre os valores de correntes (método eletroanalítico) e as alturas das áreas (método cromatográfico). 74
Figura 23: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma amostra de água de córrego fortificada com fipronil em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Valores de concentração do padrão adicionado: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, e (—) 15,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Gráfico de adição de padrão (r=0,999)..... 76
Figura 24: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma formulação veterinária contendo fipronil em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude de 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Valores de concentração do padrão adicionado: (—) 0, (—)5,0, (—) 10,0, e (—) 15,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Gráfico de adição de padrão (r=0,999). 77
Figura 25: Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de uma solução de fipronil 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Tempo de acumulação:120 s. Potenciais de acumulação: (—) –1,0 V, (—) 0 V, (—) 0,5 V e (—) circuito-aberto. 78
Figura 26: Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de uma solução de fipronil 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V. Tempos de acumulação: (—) 0, (—) 30, (—) 60, (—) 90, (—) 120 s. 79
Figura 27: (A) Voltamogramas de redissolução do fipronil em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V, tempo de acumulação 120 s. Intervalo de concentração: (—) 0, (—) 0,5, (—) ,1,0, (—) 1,5, (—) 2,0 e (—) 2,5 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica (r=0,999). 80

Figura 28: (A) Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de uma amostra de água contendo fipronil em uma solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V, tempo de redissolução 120 s. (B) Curva de adição de padrão (r=0,999)..... 82
Figura 29: (A) Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de fipronil de uma amostra de leite em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento varredura 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V, tempo de redissolução 120 s. (B) Curva analítica (r=0,999). 84

Lista de tabelas

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do fipronil. 18
Tabela 2: Valores de limites máximos de resíduos para o fipronil estabelecidos pela ANVISA e FAO. 29
Tabela 3: Lista de reagentes utilizados e respectivas procedências 40
Tabela 4: Parâmetros da voltametria de onda quadrada avaliados, intervalos de estudo e valores escolhidos. 66
Tabela 5: Valores de limites de detecção e de quantificação calculados pelos métodos da IUPAC por Extrapolação da Curva Analítica. 68
Tabela 6: Valores de coeficientes linear, angular e de correlação. 75
Tabela 7: Valores de limites de detecção e de quantificação calculados pelos métodos da IUPAC por Extrapolação da Curva Analítica. 81
Tabela 8: Valores de recuperação para a análise de amostras de águas naturais. 83
Tabela 9: Valores de recuperação de fipronil extraído de amostra de leite por diferentes solventes. 84

Lista de abreviaturas

CV – Voltametria Cíclica

Ep – potencial de pico

GPU – eletrodo compósito de grafite-poliuretana

HMDE – Eletrodo de gota pendente de mercúrio

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Ip – corrente de pico

LD – limite de detecção

LQ - limite de quantificação

LSV - Voltametria de Varredura Linear

RSD – Desvio Padrão Relativo

SWV - Voltametria de Onda Quadrada

UV - ultravioleta

Índice

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1. Introdução 14

1.1 Considerações iniciais 14

1.2 Fipronil 17
1.2.1 Características físico-químicas 17
1.2.2 Estudos e produtos de degradação do fipronil 19
1.2.3 Estudos dos enantiômeros do fipronil 22
1.2.4 Uso veterinário do fipronil 24
1.2.5 Estudos toxicológicos 25
1.2.6 Estudos de adsorção 27
1.2.7 Valores de limite máximo de resíduo 28
1.2.8 Determinação do fipronil 29

1.3 Métodos eletroanalíticos e o eletrodo compósito de grafite-poliuretana (GPU) 32
2. Objetivos 36

3. Procedimento Experimental 37

3.1 Células Eletroquímicas 37

3.2 Eletrodos 38
3.2.1 Eletrodo de trabalho 38
3.2.2 Eletrodos de referência e auxiliar 39
3.2.3 Eletrodos para experimentos de eletrólise a potencial controlado 39

3.3 Reagentes 39

3.4 Equipamentos 41

3.5 Metodologia 42

3.5.1 Voltametria cíclica 42
3.5.3 Voltametria de onda quadrada 43
3.5.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta 44
3.5.5 Comparação entre a metodologia eletroanalítica e o método oficial 44
3.5.6 Determinação de fipronil em amostras de água e em formulação veterinária ... 45
3.5.6.1 Análise de amostra de água de córrego 45
3.5.6.2 Análise de amostra de uma formulação veterinária comercial contendo fipronil 46
3.5.7 Voltametria de redissolução de onda quadrada 46
3.5.7 Aplicação da metodologia de pré-concentração para análise de amostras 47
3.5.7.1 Determinação de fipronil em amostras de águas 47
3.5.7.2 Determinação de fipronil em amostras de leite 47
4. Resultados e Discussão 49

4.1 Voltametria cíclica 49

4.2 Eletrólise a potencial controlado 55

4.3 Voltametria de onda quadrada 57
4.3.1 Estudo da variação de freqüência de pulsos 59
4.3.2 Estudo da variação da amplitude de pulsos 62
4.3.3 Estudo da variação de incremento de varredura 64
4.3.4 Curva analítica 66

4.4 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta 70

4.5 Comparação da metodologia eletroanalítica com o método oficial 71

4.6 Determinação de fipronil em amostras 75
4.6.1 Análise de amostra de água de córrego 76
4.6.2 Análise de uma formulação veterinária contendo fipronil 77

4.7 Voltametria de redissolução de onda quadrada 78

4.8 Aplicação da metodologia de pré-concentração para a análise de amostras 82
4.8.1 Análise de amostras de águas 82
4.8.2 Análise de amostra de leite 83
5. Conclusões 86

6. Referências Bibliográficas 89

1. Introdução

1.1 Considerações iniciais

O uso intenso de pesticidas na agricultura tem como principais objetivos a obtenção de um rendimento elevado na produção de alimentos e o controle de pragas prejudiciais às plantações.

Desta forma, a definição de pesticida consiste em uma substância ou mistura de substâncias utilizadas com o objetivo de repelir, inibir, prevenir ou destruir qualquer tipo de peste. O termo peste está relacionado a qualquer forma de vida animal (pragas como insetos, ácaros, fungos, nematóides, bactérias, roedores) ou vegetal (ervas daninhas) indesejável e prejudicial à lavoura, pecuária, seus produtos e outras matérias primas [1,2].

Portanto, os pesticidas podem ser empregados em casas, jardins e na saúde pública para controlar vetores de doenças transmissíveis. Por outro lado, os agentes biológicos são utilizados com o intuito de eliminar e controlar as pragas em plantações. Assim, são também considerados pesticidas [3].

As primeiras substâncias introduzidas na agricultura para combater pragas e/ou doenças foram o enxofre, sais de cobre, arsênio e cianetos. No Brasil, estes produtos foram empregados após a crise de 1929, quando o algodão substituiu parte das culturas de café e com a importância econômica das culturas de milho e cana-de-açúcar.

Em 1940, Paul Miller ganhou o Prêmio Nobel com a descoberta de propriedades inseticidas que o composto sintético dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) apresentava e que o tornava um inseticida promissor. A partir daí houve um crescimento da manufatura e o uso de compostos sintéticos no controle de pragas na agricultura [3].

Nesta época, companhias químicas sintetizaram compostos similares ao DDT: aldrin, dieldrin, hexacloro benzeno (BHC) e foram denominados organoclorados por apresentarem átomos de cloro ligados a moléculas orgânicas. Outros pesticidas pertencentes a diferentes classes químicas, como os organofosforados (azodrin, malation, paration) e carbamatos (carbaril, matacil, temik) foram desenvolvidos e aplicados em campos e florestas.

No entanto, em 1973, o transporte de DDT foi banido nos Estados Unidos pelo fato de apresentar risco à saúde humana. Outras substâncias, como o aldrin e dieldrin, também foram banidas. Os pesticidas utilizados no controle de pragas e ervas daninhas nas culturas, mesmo que empregados de modo correto, podem causar problemas de ordem ecológica e de saúde pública.

Os pesticidas são tóxicos a diversos tipos de animais como insetos, moluscos, peixes, aves, mamíferos, inclusive o homem apresentando um efeito acumulativo e podem desenvolver câncer, doenças neurológicas e até levar a morte.

Os pesticidas apresentam efeitos adversos em agentes polinizadores como abelhas, besouros, pássaros, entre outros agentes. Este fato tem acarretado muitos prejuízos e preocupação aos apicultores que baniram o uso destas substâncias.

A ação dos pesticidas interfere no equilíbrio de ecossistemas terrestres e aquáticos eliminando tanto pragas quanto seus predadores. A extinção de predadores pode ocasionar o retorno de antigas pestes que estavam sob controle. Na ausência de

predadores, as pragas podem se reproduzir rapidamente em um meio com poucos inimigos e conseqüentemente atacam as lavouras trazendo sérios prejuízos às plantações.

Os pesticidas podem contaminar cadeias alimentares desde os produtores até os consumidores provocando o fenômeno da biomagnificação que consiste no aumento da concentração de pesticida nos níveis tróficos da cadeia alimentar, ou seja, todos os seus participantes estão expostos aos pesticidas [3,4].

Os insetos e microorganismos adquirem resistência genética aos pesticidas por seleção natural, tornando-se menos sensíveis à ação destes, que perdem o efeito desejado e precisam ser substituídas por moléculas mais efetivas no controle de pragas.

Pesticidas podem apresentar persistência no meio ambiente e serem carregados por águas pluviais, ventos contaminando rios, lagos, mares, sedimentos, solos e alimentos em pequenas quantidades denominadas resíduos. A presença destes em alimentos se torna um sério problema de saúde pública e inviabilizam sua comercialização tanto no Brasil, como em outros países.

Os pesticidas são classificados de acordo com o seu modo de ação: acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, moluscicidas, nematicidas e rodenticidas [4,5,6].

Os pesticidas, também, são encontrados na composição química de produtos domésticos contra insetos na forma de aerossóis contra baratas e mosquitos. São utilizados em produtos veterinários contra piolhos, pulgas e carrapatos.

1.2 Fipronil

1.2.1 Características físico-químicas

O fipronil, 5-amino-[(2,6-dicloro)-4-trifluormetil-fenil]-4-trifluormetil-sulfinil-1 H-pirazol-3-carbonitrila, é um potente inseticida da classe fenilpirazol [7]. A Figura 1 apresenta a estrutura química do fipronil.

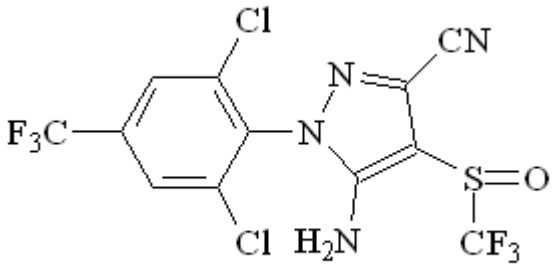

Figura 1: Estrutura química do fipronil.

Esta molécula foi sintetizada em 1987 pela Rhône Poulenc Agro Company na França e registrado na China em 1993 para o controle das pragas das culturas do arroz [8]. O fipronil é conhecido em mais de 70 países e utilizado em mais de 100 diferentes culturas para controle de pestes.

O fipronil é encontrado em formulações comerciais sendo aplicado contra insetos na forma de aerossóis contra baratas e mosquitos e loções veterinárias contra piolhos, pulgas e carrapatos. O fipronil atua de forma específica em insetos bloqueando os canais de cloretos mediados pelos receptores do ácido gama amino butírico (GABA)

e causa paralisia, convulsões e morte dos insetos [9]. A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físico-químicas do fipronil.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do fipronil.

Propriedade	**Características**
Aparência	Sólido branco a 25 °C
Massa molar	437 g/mol
Ponto de fusão	200 °C
Pressão de vapor	370 nPa
Solubilidade em água	2,0 mg/L

Na temperatura ambiente, o fipronil é um sólido branco pouco solúvel em água, característica que lhe confere um caráter hidrofóbico. Assim, o fipronil apresenta alta solubilidade em solventes orgânicos como acetona, acetato de etila, acetonitrila, álcoois, n-hexano, diclorometano [10].

O fipronil apresenta estabilidade química em meio aquoso ácido e neutro [11,12]. Em meio alcalino, o fipronil é suscetível a reação de hidrólise formando uma imina que tautomeriza a amida.

1.2.2 Estudos e produtos de degradação do fipronil

O uso contínuo do inseticida fipronil tem causado o aparecimento de resíduos nos sistemas aquáticos e terrestres. Estudos em solos, vegetações e águas indicam que, sob determinadas condições, o fipronil sofre degradação química formando quatro produtos de degradação [13]. A Figura 2 apresenta as quatro possíveis reações de degradação do fipronil e seus respectivos produtos.

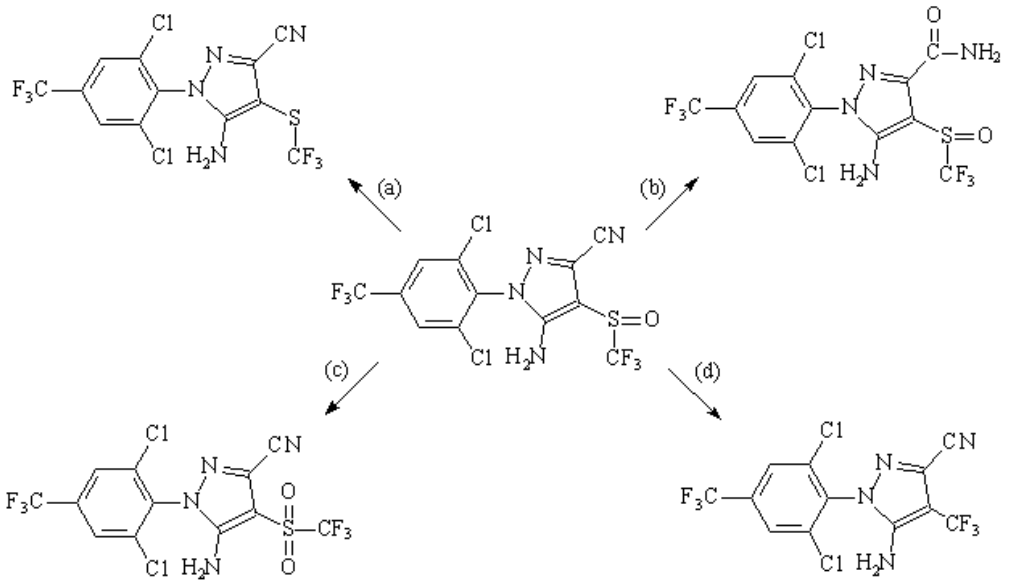

Figura 2: Formação dos produtos de degradação do fipronil por: (a) redução, (b) hidrólise, (c) oxidação e (d) fotólise.

A reação de formação de cada produto de degradação depende das condições do meio e os fatores determinantes são o pH, temperatura, tipo de vegetação, presença

de luz e de microorganismos [8]. Nos processos de degradação, o fipronil apresenta reações de cadeia lateral nas posições 3 e 4 do anel pirazol.

Os produtos de redução, oxidação e fotólise são formados por reações do grupo sulfóxido na posição 4. O sulfeto é formado pela redução do grupo sulfóxido; a sulfona se forma através da oxidação do grupo sulfóxido.

O dessulfinil é um produto de fotólise e apresenta atividade toxicológica maior que o fipronil para invertebrados marinhos [14]. Em produtos comerciais, o fipronil deve ser protegido da luz, devido à rápida conversão a forma dessulfinil.

O produto de hidrólise é gerado a partir da reação na posição 3 do anel pirazol. O grupo nitrila, em meio alcalino, forma uma imina e em seguida tautomeriza a amida. Este produto apresenta uma polaridade maior que o fipronil e é mais solúvel em água. Desta forma, a afinidade pela matéria orgânica é menor quando comparada com o fipronil e conseqüentemente a adsorção em por matéria orgânica é menor [15]. Alguns trabalhos sobre a degradação do fipronil e seus produtos são descritos a seguir.

HUSEN *et al.* estudaram a estabilidade do fipronil em soluções aquosas estocadas em polietileno [16]. As amostras foram preparadas em água em três concentrações e analisadas em quatro condições: na presença e ausência de luz; em frascos de polietileno e vidro. Foi observado que o frasco de polietileno é adequado para a estocagem das soluções de fipronil por 2 semanas evitando a degradação pela luz solar.

SARAN e colaboradores realizaram um estudo de velocidade de degradação dos cupinicidas imidacloprida, fipronil [17]. A velocidade de degradação depende da concentração do cupinicida e das propriedades físico-químicas do solo. A presença de microorganismos acelera a degradação dos cupinicidas.

RAVETON e colaboradores estudaram a degradação do fipronil contido em sementes de girassol em três áreas concêntricas por um período de 6 meses [18]. Foram detectados os produtos sulfeto, sulfona e dessulfinil. Foi observada uma variação da quantidade de fipronil nas três áreas durante o estudo devido à interação com as partículas do solo que foram transportadas pela água. O fipronil é transportado da semente pela água do solo devido à forte adsorção com as partículas do solo que apresentam níveis elevados de matéria orgânica. Em seguida, é transferido do solo para as plantas. Os autores sugerem uma cobertura com maior estabilidade e proteção para evitar a solubilização do inseticida.

PEI *et al.* estudaram a degradação do fipronil em amostras de solos e de folhas da vegetação chinesa *Pakchoi* [8]. O fipronil degrada mais rápido na vegetação do que no solo e forma os produtos sulfeto, sulfona e amida; no solo, dessulfinil e sulfona. A quantidade de resíduo de fipronil nas doses de 24 e 48 g/hm^2 após 47 dias foi menor que a quantidade permitida pelo órgão responsável.

WALSE e colaboradores investigaram a degradação do fipronil em amostras de águas e sedimentos de ambientes estuarinos [19]. Nos sedimentos, foi encontrado o sulfeto. Na água, foram encontrados a sulfona e o dessulfinil que migra para os sedimentos.

AAJOUD *et al.* verificaram que os produtos de degradação sulfeto, sulfona e dessulfinil são mais lipofílicos que o fipronil e a amida é mais hidrofílica [15]. As atividades inseticidas do dessufinil e da amida contra a larva do *Aedes aegypti* foram maiores que a do fipronil. Já as atividades inseticidas do sulfeto e da sulfona foram menores quando comparadas com o inseticida inicial.

Desta forma, o desenvolvimento de um procedimento analítico para determinação do fipronil é muito importante e necessário. Mesmo que empregado de forma adequada, resíduos do inseticida são degradados no meio ambiente formando produtos que apresentam maior potencial toxicológico para os seres vivos.

1.2.3 Estudos dos enantiômeros do fipronil

A estrutura da molécula de fipronil é quira devido à assimetria do grupo sulfóxido e apresenta dois enantiômeros: S-(+) e R-(–) [20,21]. Estudos de propriedades dos enantiômeros em relação à toxicidade, degradação, estabilidade estão descritos a seguir.

LIU *et al.* estudaram a degradação dos enantiômeros do fipronil em repolhos e observou que o enantiômero R-(–) degrada mais rápido que S-(+) [20]. O enantiômero S-(+) apresentou atividade inseticida específica que o torna mais seguro em mamíferos. Os produtos de degradação encontrados foram sulfeto, sulfona e dessulfinil.

TAN *et al*. estudaram a degradação microbiológica da mistura racêmica do fipronil e de seus enatiômeros S-(+) e R-(–) em amostras de solos [21]. Foi observado que em condições aeróbicas, a degradação não foi enantiosseletiva e os produtos de degradação encontrados foram a sulfona e o sulfeto. Em solos irrigados e esterilizados, a degradação foi enantiosseletiva por meio de enzimas e influenciada pelo pH, temperatura, quantidade de água e de matéria orgânica. O sulfeto foi o produto de degradação encontrado.

WILSON *et al.* avaliaram a toxicidade da mistura racêmica do fipronil e dos enatiômeros em micro-crustáceos [22]. O enatiômero S-(+) apresentou maior toxicidade e estabilidade que o enantiômero R-(–).

JONES *et al.* estudaram a transformação enantiosseletiva do fipronil por micro-organismos em suspensões de sedimentos de solos sulfidogênicos e metanogênicos [23]. Foi observada uma transformação enantiosseletiva para o fipronil. Nos solos sulfidogênicos, o enantiomero S-(+) sofreu degradação e os produtos detectados foram o sulfeto e sulfeto-amida. Em solos metanogênicos, o enantiômero R-(–) foi degradado e houve a formação do produto sulfeto. O pH do solo e a presença de microorganismos influenciam na enantiosseletividade da transformação do inseticida.

KONWICK *et al.* avaliaram a bioacumulação, biotransformação do fipronil e de outros pesticidas em trutas [24]. O fipronil foi completamente eliminado por excreção e apresentou biotransformação enantiosseletiva formando a sulfona. Os pesticidas organoclorados se acumularam na gordura dos peixes e apresentaram bio-magnificação.

RAMESH *et al.* verificaram que se o pH do solo for alcalino, há a reação de hidrólise do fipronil com geração do produto amida [11]. Em solos com pH ácido e neutro ocorre o acúmulo de resíduos do inseticida e o aumento da poluição das águas.

BOBÉ *et al*. observaram que o fipronil sofre hidrólise química em meio alcalino e biológica em pH 5,0 [12]. Nos estudos de fotólise, há a formação do dessulfinil e ácido sulfônico. Em solos, foi encontrado o dessulfinil devido a exposição à radiação solar. Quando o fipronil está adsorvido em partículas de solos ricas em matéria orgânicas, não há a formação do produto de fotólise.

O fipronil é considerado uma alternativa a outros tipos de pesticidas como organofosforados, carbamatos, piretróides pelo fato de apresentar baixa toxidez e alta eficácia em pequenas doses no controle de pestes [10,25]. É aplicado no controle de pestes de diversas culturas, como arroz, cana-de-açúcar, milho, soja, trigo, combatendo pragas como besouros, formigas, gafanhotos. O fipronil é tóxico a outras espécies como pássaros, abelhas, peixes, micro-crustáceos.

1.2.4 Uso veterinário do fipronil

No caso do uso doméstico e veterinário, o fipronil pode ser encontrado na forma de repelentes, géis, armadilhas para o combate de baratas, formigas, moscas e mosquitos. Também é encontrado na composição química de produtos veterinários, tais como, aerossóis, loções pós-banho para cães e gatos, para tratamento em rebanhos bovinos no controle de carrapatos, piolhos, pulgas. Está presente na formulação de cupinicidas para a conservação de madeiras. A seguir, estão descritos alguns trabalhos que avaliam a sua eficácia para o controle de pragas em animais.

LIMA e colaboradores avaliaram o efeito profilático e curativo do fipronil na prevenção de infecções após a castração em touros causadas pela mosca da espécie *Cochliomyia hominivorax* [26]. O uso do fipronil apresentou eficiência na prevenção e cura pós-castração dos touros. Houve eliminação das larvas, prevenção da doença e redução da incidência de infestação.

POLLMEIER e colaboradores verificaram a eficácia de três formulações contendo fipronil no controle de piolhos em gatos, os quais foram infestados e tratados

[27]. Foi realizada uma contagem de piolhos sobreviventes e um tratamento estatístico. Este estudo apresentou uma eficácia de 100% para as três formulações no controle de piolhos.

DAVOUST e colaboradores avaliaram a eficácia do fipronil contra carrapatos em cães [28]. Os estudos foram realizados em Dakar e Djibouti na África. Cães tratados com fipronil não apresentaram sintomas de infecção e o tratamento foi bem sucedido com eficácia de 96,4%.

PAYNE *et al.* verificaram a eficiência do fipronil no controle de pulgas e de seus ovos em gatos [29]. Foram observados resultados satisfatórios com percentagem de mortalidade entre 87 a 100%.

DAVEY e colaboradores verificaram a eficiência de uma solução de *Topspot* contendo 1,0% de fipronil para o controle de carrapatos em gados [30]. Foi obtida uma atividade residual do inseticida por 8 semanas, 100% de proteção contra infestação e controle de reprodução dos carrapatos com eficácia de 99,7%.

1.2.5 Estudos toxicológicos

LEGHAIT e colaboradores estudaram a ação toxicológica do fipronil em ratos [31]. Foi verificado que os ratos apresentaram uma variação na taxa de hormônios da tireóide o que favoreceu o surgimento de tumores foliculares.

ROCHE *et al.* observaram um acúmulo de pesticidas nos peixes e camarões do lago Taabo na Costa do Marfim [32]. A cadeia alimentar foi contaminada das algas até os peixes (biomagnificação). A contaminação dos peixes e camarões por pesticidas pode estar relacionada com patologias da população local.

GUPTA *et al.* estudaram a eficácia e a persistência do fipronil em pestes presentes nas frutas *okra* da Índia por meio da cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons [33]. Foram obtidos valores de recuperação entre 83 e 92%. Foi observado que os pesticidas são persistentes por 3 dias e eficazes no controle das pestes.

EL HASSANI *et al.* avaliaram o efeito do fipronil em doses sub-letais no comportamento de abelhas [34]. Foi verificado que a aplicação de fipronil no tórax não influenciou a atividade locomotora. No entanto, a sensibilidade foi afetada pela aplicação da dose de 1,0 ng. A dose de 0,5 ng de fipronil prejudicou a formação de traços de memória. Foi observada mortalidade após 48 horas de aplicação de fipronil.

SCHLENK e colaboradores observaram toxicidade do fipronil na criação camarões da espécie *Procambarus* [35]. A água utilizada na cultura dos camarões era proveniente da irrigação de arroz e continha fipronil. Na análise da água, constatou-se a presença de traços de fipronil e dos produtos sulfeto, sulfona e dessulfinil responsáveis pela taxa de mortalidade de 96,4% dos camarões.

Observando estes estudos toxicológicos, nota-se a importância do monitoramento do inseticida fipronil e reforça a idéia de desenvolver novos procedimentos analíticos alternativos que apresentem rapidez, sensibilidade e baixo custo, um dos objetivos deste trabalho.

1.2.6 Estudos de adsorção

Muitos estudos de adsorção foram realizados para verificar o comportamento do fipronil em solos e sedimentos de diferentes composições. Foi observada uma afinidade do inseticida por solos com elevado teor de matéria orgânica devido ao caráter hidrofóbico do fipronil [7]. A adsorção está relacionada com as propriedades físico-químicas do inseticida e do solo.

BOBÉ *et al.* observaram que a adsorção do fipronil em solos não é afetada nem pela variação de pH [7]. Os fatores que alteraram a adsorção do inseticida nas partículas de solo foram a temperatura, a presença de metanol e a razão da quantidade de solo/água. O metanol dissolveu o fipronil e diminui a adsorção. A temperatura influenciou na adsorção do fipronil, que é um processo endotérmico. A adsorção aumenta com a diminuição da razão solo/água, pois houve a desagregação das partículas de solo e aumento do numero de sítios ativos.

LIN *et al.* estudaram a degradação e a adsorção do fipronil em sedimentos urbanos [36]. Em condições anaeróbicas e na presença de microorganismos o produto de degradação encontrado foi o sulfeto. Já em condições aeróbicas, foram encontrados os produtos sulfeto e sulfona. O fipronil se adsorve nos sedimentos contendo elevada quantidade de matéria orgânica e é transportado em sistemas aquáticos.

MASUTTI e colaboradores estudaram a adsorção do fipronil e do sulfeto em amostras de solos [37]. Os autores consideraram que a cristalinidade do solo seria o fator limitante da adsorção, pois os solos apresentavam quantidades similares de matéria orgânica. Quanto menor a cristalinidade das partículas, maior a adsorção. A presença de

solventes orgânicos altera a solubilidade do fipronil em água e conseqüentemente influi na adsorção do inseticida.

MUKHERJEE estudou a adsorção do fipronil em solos da Índia e observou que o fipronil adsorve em partículas de solos com elevado teor de matéria orgânica [38]. Este fato se deve a interações hidrofóbicas entre o inseticida e o solo. Em baixas concentrações do inseticida a adsorção foi fraca devido à competição com moléculas de água pelos sítios ativos.

Estes estudos de adsorção apresentam propriedades físico-químicas sobre o comportamento do fipronil em água e na presença de materiais de carbono que serão o meio de estudo deste trabalho.

1.2.7 Valores de limite máximo de resíduo

O fipronil tem ação inseticida e acaricida. De acordo com a ANVISA, pertence à classe toxicológica II: altamente tóxica [39]. Os valores de limite máximo de resíduo (LMR) são estabelecidos por agências do governo de cada país, órgãos responsáveis pela preservação do meio ambiente. No Brasil, os valores de LMR são estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) [39]. A FAO (*Food and Agriculture Organization*) é um órgão da ONU e também estabelece valores máximos de limite de resíduos [40]. Alguns valores de LMRs para algumas culturas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de limites máximos de resíduos para o fipronil estabelecidos pela ANVISA e FAO.

Alimento	ANVISA / mg/kg	FAO / mg/kg
Algodão	0,01	-
Arroz	0,01	0,01
Batata	0,05	0,02
Cana-de-açúcar	0,03	-
Cevada	0,01	0,002
Feijão	0,01	-
Milho	0,01	0,01
Soja	0,01	-
Trigo	0,01	0,002

1.2.8 Determinação do fipronil

Na literatura, os procedimentos analíticos para a determinação do fipronil se baseiam nas técnicas cromatográficas que apresentam excelente reprodutibilidade e sensibilidade. Apresentam etapas de preparo de amostras envolvendo extração dos analitos, geralmente de extração em fase sólida, *clean-up* para remoção de interferentes como lipídeos. Diferentes tipos de amostras como águas, solos, amostras de vegetais, pólen, mel, e abelhas foram analisadas com o intuito de determinar o fipronil.

LIU *et al.* utilizaram a micro-extração líquido-líquido com o líquido iônico hexafluor-fosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio para a determinação de fipronil e três inseticidas por cromatografia líquida com detecção de diodos em amostras de águas [41]. Foram obtidos limites de detecção entre 0,53 e 1,28 μg/L e valores de recuperação entre 79 e 110% A utilização de líquidos iônicos em micro-extração líquido-líquido apresentou vantagens como fácil manipulação, simplicidade e evitou o uso de solventes tóxicos e geração de resíduos.

LIU *et al.* desenvolveram uma metodologia analítica para análise dos enatiômeros S-(+) e R-(–) do fipronil e dos produtos de degradação sulfeto, dessulfinil e sulfona em amostras de repolho [20]. Foram obtidos limites de quantificação entre 0,01 e 0,05 mg/kg, valores de recuperação entre 79 e 91%.

JIMÉNEZ *et al.* determinaram fipronil em amostras de mel utilizando a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas [42]. As amostras foram submetidas a dois tipos de extração: líquido-líquido (ELL) em hexano e em fase sólida (EFS) com Florisil. Foram obtidos limites de detecção de 0,1 μg/kg para EFS e 0,3 μg/kg para ELL. Os valores de recuperação ficaram entre 94 e 108%. Foram encontrados os produtos de degradação sulfeto, sulfona e o fipronil-declorinado.

PIRARD e colaboradores desenvolveram e validaram uma metodologia de identificação e quantificação de multi-resíduos do fipronil e de 16 pesticidas em amostras de mel por extração em coluna de terra diatomácea e cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas [43]. Foram encontrados valores de recuperação entre 71 a 90%. O limite de detecção ficou entre 0,0002 a 0,943 ng/g e o limite de quantificação, entre 0,0002 e 1,231 ng/g.

BICHON *et al.* desenvolveram e validaram uma metodologia para a determinação de fipronil e seus metabólitos em amostras de plasma ovino por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas [44]. Foram obtidos limites de detecção de 0,05 a 0,16 pg μL^{-1} e limites de quantificação de 0,28 a 0,73 pg μL^{-1}.

SÁNCHEZ-BRUNETE *et al.* desenvolveram uma metodologia para a determinação de resíduos de fipronil em amostras de mel e pólen por cromatografia gasosa por detecção de espectrometria de massas [45]. Para as amostras de mel foram obtidos valores de recuperação entre 90 e 103%, e o limite de detecção foi de 0,1 μg/kg. Para as amostras de pólen foram obtidos valores de recuperação entre 91 e 103%, e o limite de detecção foi de 0,2 μg/kg.

LIU *et al.* desenvolveram um ensaio imuno-enzimático para a detecção de fipronil em amostras de águas [46]. Foram utilizados anticorpos dos tipos poli-clonal e mono-clonal. As curvas analíticas foram obtidas a partir da velocidade de inibição em função da concentração de fipronil. O método apresentou simplicidade, fácil manuseio, rapidez, sensibilidade, limite de detecção de 0,08 μg/L e valores de recuperação entre 80 e 120%.

HADJMOHAMMADI *et al.* determinaram resíduos de fipronil em água e solos de plantações de arroz do norte do Irã por cromatografia líquida de fase reversa com detecção por ultravioleta [47]. Foram obtidos valores de recuperação de 90% e limite de detecção de 0,1 μg/mL.

KADAR *et al.* desenvolveram e validaram uma metodologia para determinação de fipronil e de seus derivados em amostras de pólen por cromatografia líquida com

detecção por espectrometria de massas [48]. Foram obtidos limites de detecção e de quantificação de 0,05 e 0,10 μg/kg e valores de recuperação entre 74 a 104%.

MORZYCKA utilizou a extração de dispersão de matriz em fase sólida para a determinação de multi-resíduos de fipronil e de 11 pesticidas utilizando cromatografia gasosa com detecção por nitrogênio-fósforo [49]. Foram obtidos valores de recuperação entre 70 e 100% e limite de detecção entre 0,015 e 0,15 μg/g.

VILCHEZ e colaboradores utilizaram a micro-extração em fase sólida para a determinação de traços de fipronil em amostras de água, solo e urina humana utilizando a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas [50]. Foram obtidos limites de detecção e de quantificação de 0,08 e 0,27 ng/mL, respectivamente.

1.3 Métodos eletroanalíticos e o eletrodo compósito de grafite-poliuretana (GPU)

Atualmente, os métodos eletroanalíticos são importantes ferramentas para o entendimento do comportamento redox de substâncias orgânicas encontradas em fármacos, alimentos, formulações comerciais de pesticidas e em outros tipos de amostras. São empregados para a determinação de diversos compostos e suas principais vantagens são rapidez, alta sensibilidade, seletividade, precisão e baixo custo quando comparados com os métodos cromatográficos que são considerados métodos padrões de análise para muitos analitos de importância biológica e ambiental [51,52].

O desenvolvimento de sensores para eletroanálise tem se tornado um importante campo de pesquisa na área da eletroanalítica [53,54]. O eletrodo compósito de grafite e poliuretana (GPU) foi desenvolvido por MENDES a partir da mistura de pó

de grafite e da resina de poliuretana de origem vegetal [55,56]. A composição de 60% de grafite e 40% em poliuretana foi considerada a mais adequada para as determinações eletroanalíticas por voltametria de pulso diferencial e detecção amperométrica acoplada a análise por injeção em fluxo.

Este tipo de material apresenta vantagens como elevada resistência mecânica, excelente razão sinal/ruído, fácil preparação, elevada hidrofobicidade, resistência química a solventes orgânicos e soluções alcalinas [57].

O eletrodo de GPU foi comparado com o eletrodo de carbono vítreo e apresentou maior sensibilidade em estudos de determinação de catecol, hidroquinona e íons cádmio e apresentou maior sensibilidade [55]. Seu caráter hidrofóbico se deve à presença da resina de poliuretana que lhe confere uma elevada afinidade por moléculas orgânicas. A elevada resistência mecânica torna o eletrodo compósito de GPU um sensor promissor para estudos eletroquímicos e eletroanalíticos de diversos analitos.

A seguir, estão descritos alguns trabalhos que utilizam o eletrodo compósito de GPU como sensor amperométrico na determinação de princípios ativos em fármacos e em outros tipos de amostras com excelentes resultados.

SEMAAN e colaboradores estudaram o comportamento eletroquímico do diurético furosemida em meio de tampão acetato utilizando o eletrodo compósito de GPU [58]. Foi observado que não há adsorção de espécies na superfície do eletrodo durante o processo eletródico. Foram aplicadas as técnicas de voltametria de pulso diferencial para análise de amostras e foi obtido um limite de detecção de $1,5 \times 10^{-7}$ mol L^{-1}.

CERVINI *et al*. determinaram atenolol por análise por injeção em fluxo utilizando o eletrodo de GPU como detector amperométrico [59]. Foram obtidos um

limite de detecção de 1,8 × 10^{-7} mol L^{-1} e uma freqüência de 90 determinações por hora. Em outro trabalho, os autores aplicaram a detecção amperométrica na determinação de paracetamol e obteve um limite de detecção de 1,9 × 10^{-7} mol L^{-1} e 180 determinações por hora [60].

TOLEDO e colaboradores determinaram imipramina em amostras de fármacos por voltametria de onda quadrada [61]. Foram obtidos limites de detecção e de quantificação de 4,6 × 10^{-9} e 3,0 × 10^{-7} mol L^{-1}, respectivamente, e valores de recuperação de 97,60% ± 0,90%. TOLEDO *et al.*, também, determinaram ácido indol acético (AIA) e obtiveram limites de detecção e de quantificação de 26,0 μg L^{-1} e 0,2 mg L^{-1}, respectivamente. A metodologia eletroanalítica desenvolvida foi utilizada para a terminação do AIA em amostras de solo com valores de recuperação de 95,10 ± 2,70%. [62].

TEIXEIRA e colaboradores determinaram L-dopa utilizando o compósito de grafite-poliuretana modificado por um filme de VO-Salen como detector amperométrico para análise por injeção em fluxo [63]. Foram obtidos um limite de detecção de 8,0 × 10^{-7} mol L^{-1} e uma freqüência de 90 determinações.

MALAGUTTI e colaboradores determinaram o flavonóide rutina em amostras de chás verde por voltametria de onda quadrada [64]. O limite de detecção obtido foi de 7,1 × 10^{-6} mol L^{-1}.

O único estudo eletroquímico do fipronil foi realizado por AMARAL que utilizou os eletrodos de gota pendente de mercúrio (HMDE) e de carbono vítreo (GC) [65]. O fipronil apresentou um comportamento irreversível em ambos os eletrodos. Foram construídas curvas analíticas e foram encontrados limites de detecção e de quantificação de 5,0 × 10^{-7} e 1,7 × 10^{-6} mol L^{-1}, respectivamente para o HMDE. Para o

eletrodo de carbono vítreo, os valores dos limites de detecção e de quantificação foram $4{,}3 \times 10^{-7}$ e $1{,}4 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}, respectivamente.

Como pôde ser constatado, o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação do fipronil, em diversas matrizes ambientais se restringe à utilização dos métodos cromatográficos. Por outro lado, há um aumento expressivo dos trabalhos relacionados ao desenvolvimento e a aplicação de metodologias eletroanalíticas para a determinação e a quantificação de analitos em várias matrizes. A ausência de estudos eletroquímicos adicionais a respeito do fipronil, a eletroatividade da molécula, a potencialidade de aplicação do eletrodo compósito de grafite-poliuretana, a intensa utilização do fipronil como inseticida e a possibilidade de analisá-lo em diferentes matrizes tornam a abordagem a ser realizada neste trabalho devidamente justificada.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho de doutorado consistiu na investigação do comportamento voltamétrico do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de GPU e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica visando a determinação deste pesticida.

3. Procedimento Experimental

3.1 Células Eletroquímicas

A célula eletroquímica utilizada nos experimentos foi construída com vidro borossilicato com capacidade de 30 mL. Uma tampa de poli-tetrafluoretileno foi confeccionada para posicionar os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. A Figura 3 apresenta uma ilustração da célula eletroquímica.

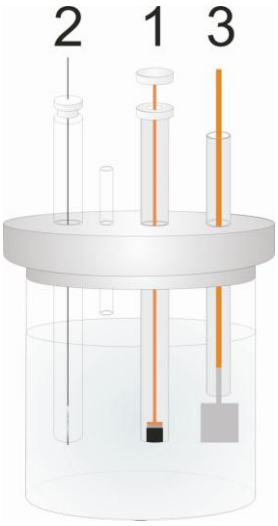

Figura 3: Célula eletroquímica utilizada nos experimentos onde: 1-) eletrodo de trabalho, 2-) eletrodo de referência e 3-) eletrodo auxiliar.

Para os experimentos de eletrólise a potencial controlado, foi utilizada uma célula de dois compartimentos de 25,0 mL, separadas por placas de vidro sinterizado de área de 0,95 cm^2 e espessura de 3,0 mm. A Figura 4 apresenta um esquema de uma célula de dois compartimentos.

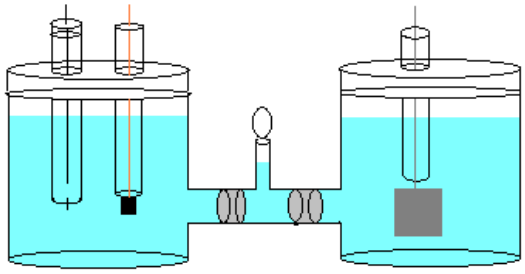

Figura 4: Esquema de uma célula eletroquímica de dois compartimentos.

3.2 Eletrodos

3.2.1 Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo compósito de grafite-poliuretana 70% (m/m). O compósito foi preparado seguindo o procedimento de MENDES [55,56] e os tarugos do compósito foram cedidos gentilmente pelo professor Éder T. G. Cavalheiro do Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Os tarugos apresentaram uma altura de 2,0 cm e diâmetro de 4,0 mm (área geométrica de 0,13 cm^2).

3.2.2 Eletrodos de referência e auxiliar

O eletrodo de referência utilizado foi o eletrodo Ag/AgCl em uma solução de KCl 3,0 mol L^{-1}. Um fio de prata foi anodizado em uma solução de ácido clorídrico 0,3 mol L^{-1} [66]. O fio de prata contendo o filme de cloreto de prata foi colocado em um tubo de vidro contendo uma solução de KCl 3,0 mol L^{-1} e 5,0 mg de nitrato de prata. O eletrodo auxiliar foi um fio de platina colado com uma cola de prata em um fio de cobre e embutido em vidro.

3.2.3 Eletrodos para experimentos de eletrólise a potencial controlado

Para os experimentos de eletrólise a potencial controlado, uma placa de carbono vítreo com dimensão de 7,0 × 6,0 mm, e espessura de 2,0 mm foi usada como eletrodo de trabalho. O eletrodo de referência foi o eletrodo Ag/AgCl em uma solução de KCl 3,0 mol L^{-1}, descrito no item 3.2.2. Uma placa de platina de 2,0 × 1,2 cm foi utilizada como eletrodo auxiliar.

3.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentaram elevado grau de pureza e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Lista de reagentes utilizados e respectivas procedências

Reagente	Procedência
Acetonitrila	Mallinkrodt
Ácido acético	Mallinkrodt
Ácido bórico	Synth
Ácido clorídrico	J. T. Baker
Ácido fosfórico	Mallinkrodt
Álcool etílico	J. T. Baker
Álcool metílico	Synth
Cloreto de potássio	J. T. Baker
Fipronil	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	Mallinkrodt
Nitrato de prata	Merck
Perclorato de sódio	Vetec

As soluções aquosas foram preparadas em água purificada pelo sistema Milli-Q (condutividade 18,1 MΩ cm^{-1}). Uma solução estoque de fipronil de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} foi preparada em álcool etílico. O eletrólito suporte foi uma solução tampão Britton-Robinson (BR) preparada a partir de 0,1 mol L^{-1} em perclorato de sódio e 0,04 mol L^{-1} dos ácidos acético, bórico e fosfórico [67]. Uma solução de NaOH 1,0 mol L^{-1} foi preparada para ajustar os valores de pH das soluções utilizadas no decorrer dos experimentos.

3.4 Equipamentos

Foi utilizado um potenciostato-galvanostato da Autolab (PGSTAT 30 Ecochemie, Netherlands) interfaceado com um computador pelo programa GPES 4.9 para a realização das medidas eletroquímicas.

Um espectrofotômetro da Hitachi modelo U-2010 interfaceado com um computador pelo programa UV Solutions foi utilizado nas medidas de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

Um cromatógafo da Shimadzu modelo 10 A interfaceado como o computador pelo programa CLASS – 10 VP foi utilizado nas medidas cromatográficas. O cromatógrafo continha um detector ultravioleta modelo UV SPD-10 AVP, um forno CTO-10 ASVP e bombas modelo LC-10. A coluna utilizada foi uma coluna C_{18} (STR-ODS-II, 5 μm, 250 mm × 4,6 mm). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:água (70:30). A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto. A detecção do fipronil foi realizada no comprimento de onda de 280 nm. O volume de amostra injetado foi de 10 μL e a temperatura do forno foi de 30°C.

Um medidor de pH da Qualxtrom, modelo 8010 foi utilizado para o ajuste dos valores de pH das soluções.

3.5 Metodologia

3.5.1 Voltametria cíclica

Inicialmente, o eletrodo compósito de GPU foi polido em uma lixa d'água de granulação de 1200 e em seguida em um feltro. Após o polimento da superfície, o eletrodo foi submetido a três ciclos de potenciais entre 0 e –1,0 V com velocidade de varredura de 1 V s^{-1} no eletrólito tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0.

Estudos de voltametria cíclica foram realizadas em uma solução de $5{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de fipronil em solução tampão BR, pH 8,0 com o intuito de observar o seu comportamento eletroquímico do inseticida utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana. A velocidade de varredura aplicada foi de 50 mV s^{-1} e o intervalo de potenciais estudado foi de 0,75 a 1,20 V.

O efeito do pH foi avaliado pela técnica de voltametria de varredura linear com o intuito de avaliar o número de prótons envolvidos no processo eletródico e constatar a melhor resposta de corrente para fins analíticos. A partir do valor de pH escolhido, foi desenvolvida uma metodologia eletroanalítica para a determinação do inseticida. Estudos em diferentes velocidades de varredura também foram realizados para analisar o tipo de controle no transporte de massa.

3.5.2 Eletrólise a potencial controlado

Nos experimentos de eletrólise a potencial controlado, uma placa de carbono vítreo foi utilizada como eletrodo de trabalho. Uma solução de $3{,}6 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} de fipronil em NaOH, 0,1 mol L^{-1}, 40% em etanol. O potencial aplicado foi de 0,7 V e o tempo de aplicação foi de 1 hora (3600 segundos).

3.5.3 Voltametria de onda quadrada

Após a escolha do pH mais adequado para fins analíticos, o composto foi submetido a estudos de voltametria de onda quadrada em uma solução de $1{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de fipronil em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}.

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada, freqüência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s) foram estudados para a otimização do procedimento, obtenção do sinal mais sensível e o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do composto.

Definidos os parâmetros da voltametria de onda quadrada, uma curva analítica foi construída e foram calculados os limites de detecção e de quantificação a partir dos coeficientes da regressão linear.

3.5.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Estudos do fipronil por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta foram realizados em meio de água-etanol. Uma curva de calibração foi construída no intervalo de concentrações de 5,0 a 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. O intervalo do comprimento de onda avaliado foi na região de 200 a 350 nm. O coeficiente de absortividade molar do fipronil foi calculado pela lei de Lambert-Beer.

3.5.5 Comparação entre a metodologia eletroanalítica e o método oficial

A metodologia eletroanalítica desenvolvida com o eletrodo compósito de GPU foi comparada com o método oficial, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV) pelo método estatístico de curvas de calibração.

Curvas analíticas no intervalo de concentrações de 5,0 a 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1} foram construídas pelos dois procedimentos. Para as medidas voltamétricas, a solução padrão de fipronil foi preparada em álcool etílico e esta foi diluída em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0 para a realização das medidas. Já para as medidas de HPLC, as soluções utilizadas foram preparadas em acetonitrila.

Em seguida, um gráfico X-Y foi construído, onde os sinais do método proposto (SWV) foram colocados no eixo y. No eixo x, foram colocados os sinais do método oficial (HPLC). Os coeficientes linear, angular e de correlação foram calculados para verificar a concordância entre os procedimentos.

3.5.6 Determinação de fipronil em amostras de água e em formulação veterinária

A metodologia eletroanalítica desenvolvida com o eletrodo compósito de GPU para a determinação do fipronil foi aplicada para analisar amostras contendo o inseticida. Amostras de água natural e formulação veterinária comercial contendo fipronil foram submetidas a estudos de adição de padrão para avaliar o efeito de matriz.

3.5.6.1 Análise de amostra de água de córrego

Uma amostra de água de um córrego do município de São Carlos/SP foi coletada. A água foi filtrada e estocada em um refrigerador por 24 horas. Em seguida, esta foi tamponada em pH 8,0 com uma solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}. A amostra foi fortificada com 10 μL uma solução estoque de fipronil de $2{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} para resultar em uma concentração de $2{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} do inseticida na amostra de água. Testes de adição e de recuperação foram realizados para verificar o efeito de matriz. Alíquotas de 25 μL de uma solução estoque de fipronil $2{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} foram adicionadas na amostra. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.5.6.2 Análise de amostra de uma formulação veterinária comercial contendo fipronil

A formulação comercial contendo fipronil é utilizada para eliminar pulgas e carrapatos de animais domésticos como cães, gatos e, também de gado. A composição do produto consiste em 0,25 g do fipronil em 100 mL, o que resulta em uma concentração de $5,27 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. Uma alíquota de 50 μL da formulação foi dissolvida em 10 mL de solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Em seguida, método de adição e de recuperação foi utilizado para verificar o efeito de matriz por meio de adições de 25 μL de uma solução estoque de fipronil $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}.

3.5.7 Voltametria de redissolução de onda quadrada

O fipronil foi submetido a estudos de pré-concentração eletroquímica com o intuito de desenvolver um procedimento de análise de traços de fipronil. Os parâmetros da voltametria de redissolução (potencial e tempo de acumulação) foram avaliados para a obtenção da melhor eficiência de deposição do inseticida no eletrodo de trabalho. Uma solução de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} de fipronil em solução BR 0,1 mol L^{-1} e pH 8,0 foi usada nos testes de redissolução.

3.5.7 Aplicação da metodologia de pré-concentração para análise de amostras

O procedimento de pré-concentração baseado na metodologia eletroanalítica desenvolvida com o eletrodo compósito de GPU foi aplicada para a determinação de traços do fipronil em dois tipos de amostras: águas de rios e uma amostra de leite. O método de adição e de recuperação foi utilizado para verificar o efeito de matriz nas amostras analisadas.

3.5.7.1 Determinação de fipronil em amostras de águas

Três amostras de águas foram coletadas de córregos do município de São Carlos/SP. As amostras foram filtradas e estocadas em um refrigerador por 24 horas. Em seguida, 25,0 mL das amostras foram tamponadas em pH 8,0 com uma solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, fortificadas com 25 μL de uma solução estoque de fipronil de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} para resultar em uma concentração de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} do inseticida na amostra de água.

Alíquotas de 25 μL de uma solução estoque de fipronil $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} foram adicionadas em de cada amostra. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.5.7.2 Determinação de fipronil em amostras de leite

Foram adicionadas 1000 μL de uma solução estoque de fipronil $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em 25,0 mL de leite. Uma alíquota de 5,0 mL de leite contaminado foi extraído por

três diferentes solventes: acetona, acetato de etila e metanol. Em seguida, o solvente foi evaporado até a secura e o resíduo foi dissolvido em 10,0 mL de etanol. 1,0 mL desta solução resultante foi adicionada a 9,0 mL de solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} para análise voltamétrica. Adições de 20 μL de uma solução de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de fipronil foram feitas para a realização dos cálculos de recuperação.

4. Resultados e Discussão

4.1 Voltametria cíclica

A Figura 5 apresenta os voltamogramas cíclicos para o eletrodo compósito de GPU, na presença e na ausência de fipronil na concentração de $5{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}. O eletrólito suporte foi uma solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0.

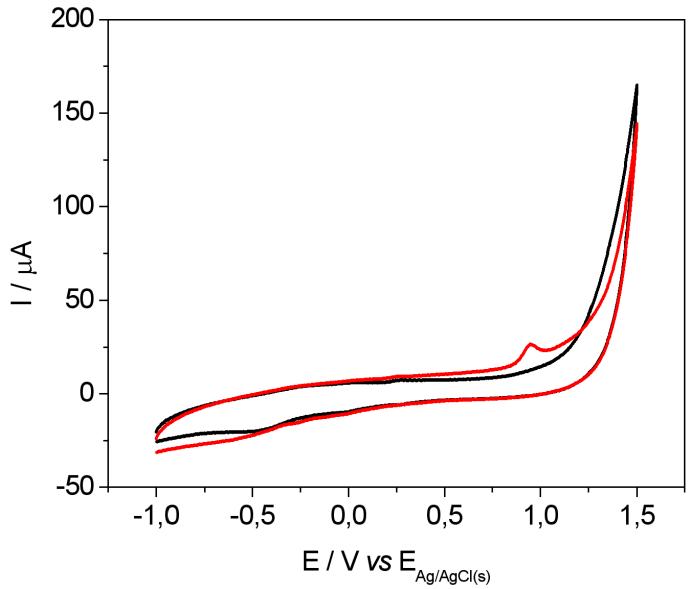

Figura 5: Voltamogramas cíclicos (—) de uma solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0 e (—) de uma solução de fipronil $5{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}.

A partir da Figura 5, pôde-se observar que o fipronil apresenta uma corrente de pico no potencial de 0,95 V (*vs* $E_{Ag/AgCl(s)}$). A ausência de corrente de redução é um

indicativo de que o processo é irreversível [68,69]. AMARAL verificou que o fipronil apresenta um voltamograma característico de um sistema irreversível com um pico de corrente de oxidação no potencial de 0,70 V utilizando o eletrodo de carbono vítreo em NaOH, 0,1 mol L^{-1}, 40% etanol [65].

A molécula do fipronil apresenta diversos grupos funcionais como o anel pirazol, sulfóxido, nitrila e amina que podem ser o sítio responsável pela oxidação da molécula. Há uma interação entre o eletrodo compósito de GPU e o fipronil devido ao caráter hidrofóbico tanto da superfície do eletrodo quanto do inseticida [7,57].

A resina de poliuretana, componente do eletrodo, é hidrofóbica e pouco solúvel em água. Este fato implica que o inseticida fipronil e o eletrodo compósito de grafite-poliuretana apresentam afinidade entre si por serem hidrofóbicos através de ligações ésteres e aromáticas.

Desta forma, a adsorção do inseticida na superfície do eletrodo compósito de GPU é reforçada pela interação entre eletrodo e inseticida. Moléculas orgânicas neutras adsorvem na superfície de eletrodos devido à sua hidrofobicidade em solução aquosa. Quanto menor a solubilidade de uma molécula mais forte é a adsorção [70].

Ao comparar os voltamogramas na ausência e na presença do fipronil, pode se observar em 1,2 V um processo referente à reação de desprendimento de oxigênio, nota-se uma inibição deste processo na presença de fipronil. Este fato é um indicativo de que pode haver a passivação da superfície do eletrodo por adsorção do fipronil ou de um produto de oxidação. Foi observada a ocorrência de processos eletroquímicos nos potencias negativos entre –0,5 e 0,0 V nos voltamogramas do eletrólito suporte e do fipronil referentes à redução de grupos funcionais amida da poliuretana [57].

O efeito do pH foi avaliado na faixa de 5,0 a 10,0 pela técnica de voltametria de varredura linear. A Figura 4 apresenta os voltamogramas de uma solução de fipronil de concentração de 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}.

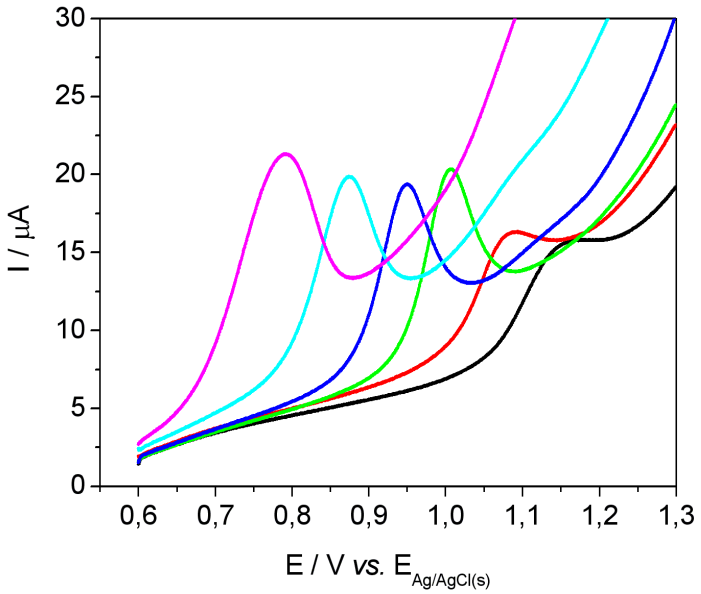

Figura 6: Voltamogramas de varredura linear de uma solução de fipronil 5,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1}; valores de pH: (—) 5,0, (—) 6,0, (—) 7,0, (—) 8,0, (—) 9,0 e (—) 10,0.

Na Figura 6, os voltamogramas do fipronil com valores de pH 5,0 e 6,0 apresentaram perfis assimétricos e próximos da reação de desprendimento de oxigênio o que os torna pouco adequados para fins analíticos. A partir do valor de pH 7,0, os voltamogramas apresentaram picos simétricos e estreitos por sua vez mais adequados para o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para determinação do inseticida.

A Figura 7 apresenta um gráfico construído a partir dos valores de potenciais de pico, corrente de pico e pH.

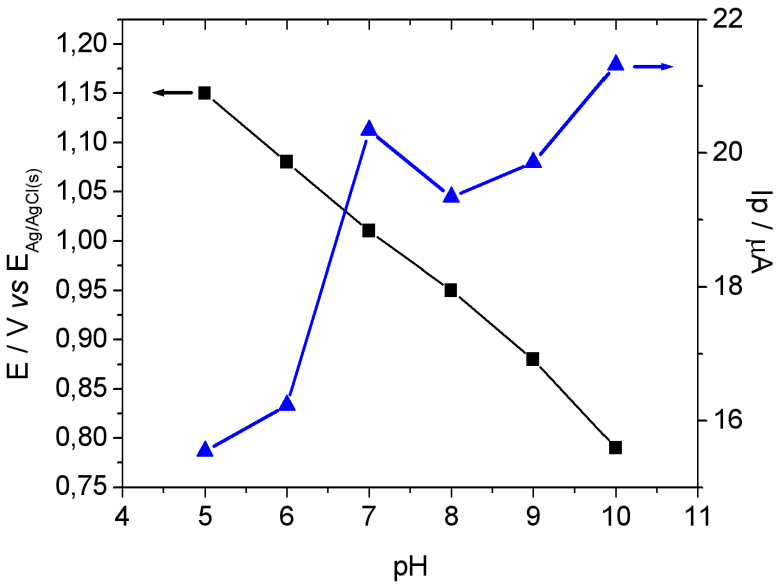

Figura 7: Gráfico de (—) potencial de pico e (—) corrente de pico em função do pH obtido da Figura 6.

Analisando a Figura 7, nota-se que o potencial de pico é influenciado pelo pH, pois o aumento de pH causa o deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos. Foi observada uma relação linear entre o potencial de pico *Ep* e o pH. A equação de reta para o potencial de pico em função do pH foi:

$$E_p = 1{,}51 - 0{,}07 \times pH \qquad (1)$$

o valor do coeficiente angular de 0,07 indica que o potencial de pico varia 70,0 mV por unidade de pH. Este valor está próximo de um sistema que envolve a transferência de um elétron e sugere que o processo de oxidação do fipronil no eletrodo de GPU envolve o mesmo número de elétrons e prótons.

Há um aumento no valor da intensidade da corrente de pico quando o valor de pH aumenta. Nos valores de pH 5,0 e 6,0 os voltamogramas apresentaram picos assimétricos e os valores de intensidade de corrente foram os menores neste estudo. Nos valores de pH de 7,0 a 10,0, foram obtidas correntes de pico entre 19,0 e 21,0 μA. Estes voltamogramas apresentaram picos de oxidação simétricos e estreitos que os tornam adequados para uso em técnicas de pulso como a voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada.

BOBE *et al.* verificaram que o fipronil apresenta estabilidade química no intervalo de pH entre 5,5 e 8,0 [12]. No intervalo de pH de 9,0 a 12,0, o composto sofre hidrólise e forma uma amida. Desta forma, com o intuito de desenvolver uma metodologia eletroanalítica considerando o perfil voltamétrico e estabilidade química, o valor de pH escolhido foi o de 8,0.

Na Figura 8 (A), estão apresentados os voltamogramas cíclicos de uma solução de fipronil de concentração de 5,0 x 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} nos valores de velocidade de varredura na faixa de 10 a 250 mV s^{-1}.

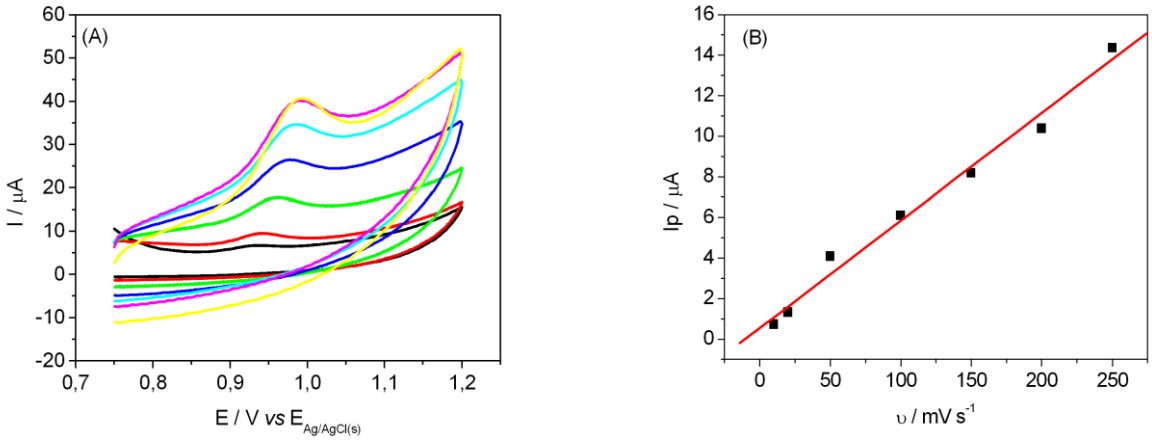

Figura 8: (A) Voltamogramas cíclicos do fipronil 5,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Velocidades de varredura: (—) 10, (—) 20, (—) 50, (—) 100, (—) 150, (—) 200 e (—) 250 mV s^{-1}. (B) Gráfico da corrente de pico em função da velocidade de varredura;

A Figura 8 (B) foi construída a partir dos valores de corrente de pico e das velocidades de varredura. Verifica-se que há uma relação linear entre a corrente de pico, *Ip*, e a velocidade de varredura e isto indica que o processo de transferência de carga apresenta um controle misto de difusão e cinética com adsorção de espécies na superfície do eletrodo [68]. Estudos de adsorção do fipronil em partículas de solos concluíram que o inseticida apresenta afinidade por matéria orgânica [7,13].

Estudos eletroquímicos e eletroanalíticos de pesticidas verificaram a adsorção destas espécies químicas na superfície do eletrodo de trabalho [71,72,73].

Um outro critério da voltametria cíclica consiste na aplicação da equação:

$$\left|E_P - E_{P/2}\right| = \frac{48}{\alpha n} \qquad (2)$$

onde E_p é o potencial de pico, $E_{p/2}$ é o potencial de pico de meia onda, *n* se refere ao número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do fipronil e α é o coeficiente de transferência de carga [68,69]. O valor de nα foi calculado e apresentou o valor de 1,20. O coeficiente de transferência de carga consiste na medida da simetria da barreira de energia de ativação.

Desta forma, os estudos por voltametria cíclica mostraram que o fipronil apresenta o comportamento de um sistema irreversível e controlado por difusão e adsorção. O estudo do efeito do pH sugeriu que o valor 8,0 pode ser utilizado para estudos por voltametria de onda quadrada para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do inseticida.

4.2 Eletrólise a potencial controlado

A Figura 9 (A) apresenta o cronoamperograma do fipronil e a Figura 9 (B), os voltamogramas de onda quadrada registrados antes e depois da eletrólise do fipronil.

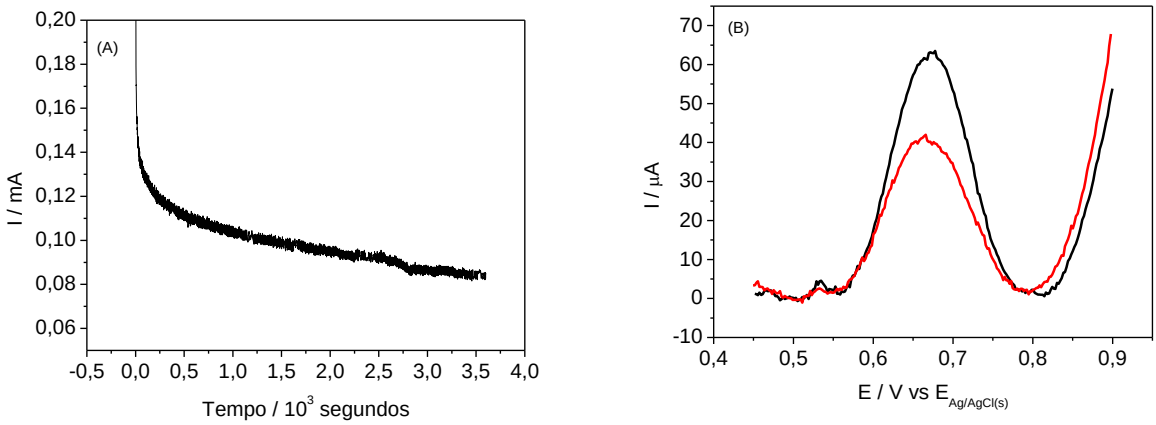

Figura 9: (A) Cronoamperograma de uma solução de fipronil 3,6 × 10^{-4} mol L^{-1} em solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}, 40% em etanol. Potencial aplicado: 0,7 V. Tempo de aplicação: 3600 s. (B) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil 3,6 × 10^{-4} mol L^{-1}. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento 2 mV, (—) antes da eletrólise e (—) após a eletrólise.

Durante o experimento de eletrólise, foi observada uma mudança de coloração da solução de incolor para vermelho devido à formação de um produto de oxidação do inseticida. O valor de carga obtido pela integração da área do cronoamperograma foi de 0,21 C. O valor de n foi calculado utilizando a equação de Faraday:

$$Q = n \cdot \Delta N \cdot F \qquad (3)$$

onde Q é a carga em coulombs, n é o número de elétrons, ΔN é a variação do número de mols durante a eletrólise F a constante de Faraday, 96485 C mol^{-1} [69].

O valor de ΔN foi calculado a partir da diferença entre os números de mols antes e após a eletrólise. Este cálculo foi efetuado por meio das correntes de pico dos voltamogramas de onda quadrada. O valor de ΔN foi de $1,81 \times 10^{-6}$ mols. O valor da carga necessária para oxidar $1,81 \times 10^{-6}$ mols de fipronil foi de 0,21 C.

Aplicando a equação de Faraday, o valor de n foi igual a 1,20 que indica que o processo eletródico de oxidação do fipronil envolve um elétron. A partir do valor de *n*, o valor de α foi calculado e apresentou o valor de 1,20 que implica em um processo lento controlado por adsorção de espécies na superfície do eletrodo de trabalho.

O coeficiente de transferência de carga corresponde a uma fração da energia de ativação de um processo eletródico [68,69]. O valor de α, neste caso, está fora do valor proposto, que se situa entre 0 e 1. Nos experimentos realizados neste trabalho, foi obtido um valor de 1,20. Este desvio se deve à ocorrência de reações acopladas após a etapa eletroquímica com a possibilidade da formação de novos produtos. AAJOUD verificou a ocorrência de reações dos produtos de degradação do fipronil que podem ocorrer após a oxidação eletroquímica do fipronil [15].

4.3 Voltametria de onda quadrada

Os estudos de voltametria de onda quadrada foram realizados em uma solução de fipronil de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em uma solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0 para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do inseticida. Na Figura 10, são apresentadas as componentes de corrente: corrente direta corrente reversa e corrente resultante.

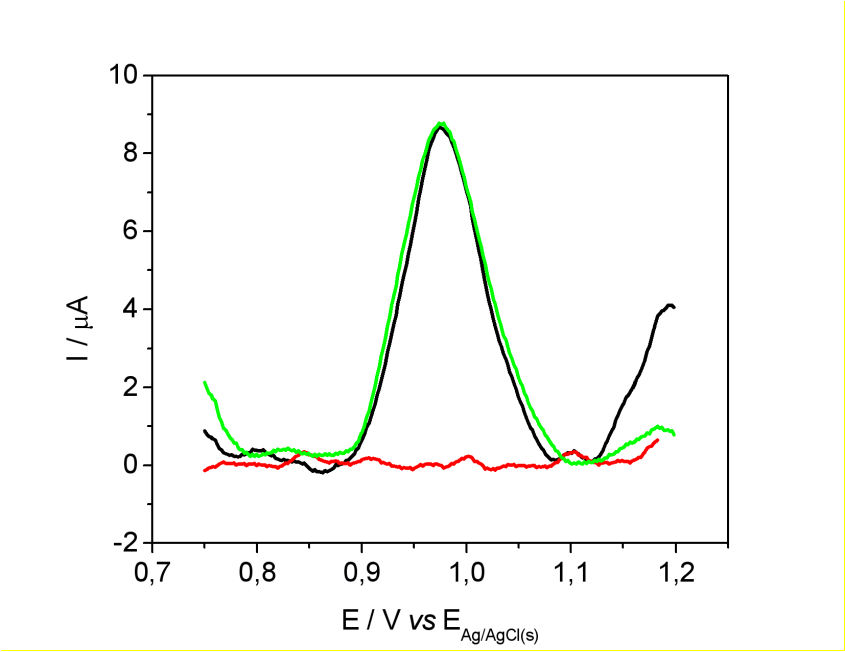

Figura 10: Voltamograma de onda quadrada de uma solução de fipronil 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Componentes da corrente: (—) corrente direta, (—) corrente reversa e (—) corrente resultante.

O valor da corrente resultante na voltametria de onda quadrada é a diferença entre os valores de corrente direta e corrente reversa [74]. Observando a Figura 10, nota-se que a intensidade da corrente resultante apresenta um valor próximo da corrente direta e desta forma o fipronil apresenta comportamento de um sistema irreversível no eletrodo compósito de GPU. A contribuição da corrente reversa é mínima quando comparada com as intensidades das outras correntes.

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada, freqüência de pulso, amplitude de pulso e incremento de varredura foram investigados variando os seus valores em uma determinada faixa de valores com o objetivo de obter valores de corrente de pico

sensíveis e adequados para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do fipronil.

4.3.1 Estudo da variação de freqüência de pulsos

A Figura 11 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo compósito de GPU em uma solução de fipronil 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1}. Os valores de amplitude de pulsos e de incremento de varredura utilizados apresentaram os valores de 50 mV e 2 mV, respectivamente. Os valores de freqüência foram variados entre 10 e 100 s^{-1}.

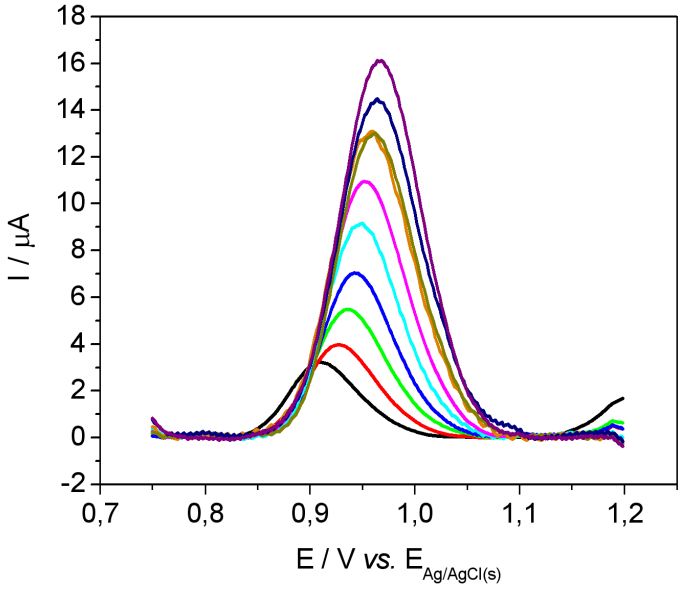

Figura 11: Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1} de fipronil em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Valores de freqüência: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 s^{-1}.

A freqüência é o parâmetro da voltametria de onda quadrada que está relacionado com a intensidade de corrente de pico e assim, com a sensibilidade do método. Além disso, a freqüência está relacionada com a velocidade efetiva da SWV. Observando a Figura 11, nota-se que à medida que o valor de freqüência aumenta, a intensidade de corrente de pico também aumenta. Desta forma, a freqüência de 100 s^{-1} foi escolhida para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica. A partir dos valores de corrente de pico e freqüência de pulsos, um gráfico foi construído e está apresentado na Figura 12.

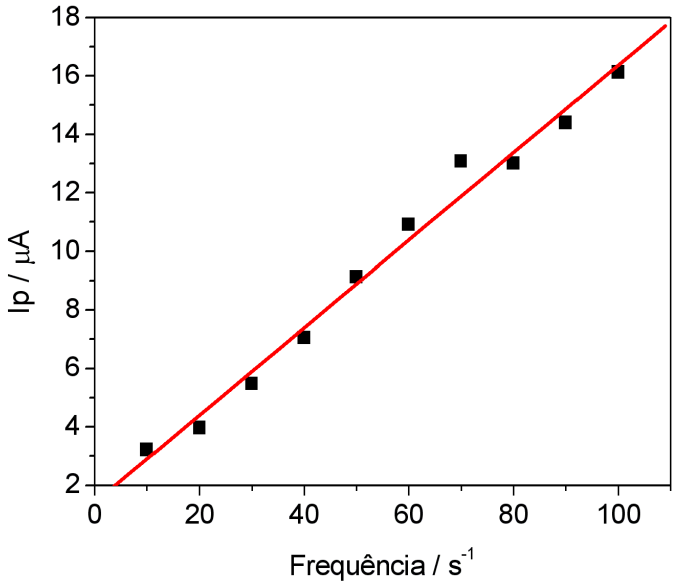

Figura 12: Gráfico de corrente de pico em função da freqüência de pulsos aplicada.

Foi observada uma relação linear entre a freqüência e a corrente de pico (r = 0,999) que é um indicativo de um sistema irreversível com adsorção de reagente e/ou produto na superfície do eletrodo [74].

O número de elétrons envolvidos na reação eletródica pode ser estimado a partir da voltametria de onda quadrada através da relação:

$$\Delta E_P = \frac{59}{\alpha n}\log(f) \qquad (4)$$

onde *Ep* é o potencial de pico, log (*f*) é o logaritmo da freqüência, α é o coeficiente de transferência de elétrons e *n* é o número de elétrons. A Figura 13 apresenta o potencial de pico em função do logaritmo da freqüência.

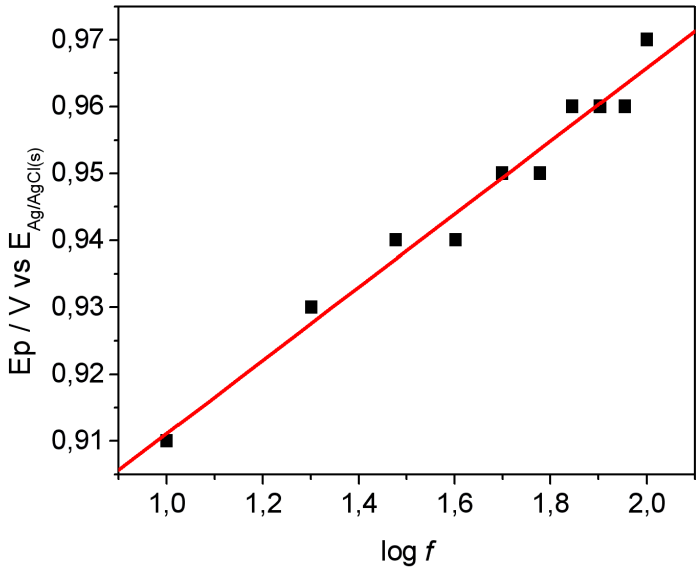

Figura 13: Gráfico de potencial de pico em função do logaritmo da freqüência.

Ao observar a Figura 13, percebe-se que há uma relação linear entre o potencial de pico e o logaritmo da freqüência. O coeficiente angular apresentou o valor de 0,055 V. O valor de *n* calculado pela eletrólise foi 1 e desta forma o valor de α é de 1,07. Este valor está coerente e próximo quando comparado com o valor da voltametria cíclica que foi de 1,20. A oxidação do fipronil na superfície do eletrodo compósito de GPU envolve um elétron com adsorção de espécies [74].

4.3.2 Estudo da variação da amplitude de pulsos

Para os estudos de amplitude, os valores de freqüência e de incremento de varredura foram mantidos e apresentaram os valores de 100 s^{-1} e 2 mV, respectivamente. A variação de amplitude foi realizada no intervalo de 10 a 100 mV. A Figura 14 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo compósito de GPU em uma solução de fipronil $1{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}.

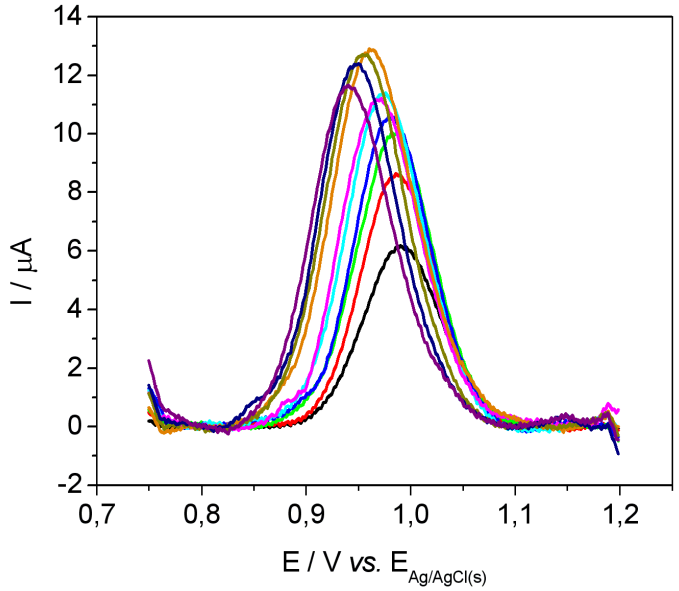

Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil $1{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, incremento de varredura 2 mV. Valores de amplitude: (—) 10, (—) 20, (—) 30, (—) 40, (—) 50, (—) 60, (—) 70, (—) 80, (—) 90 e (—) 100 mV.

A partir dos valores das correntes de pico e potenciais de pico dos voltamogramas da Figura acima, foi construído um gráfico que relaciona os de *Ip* e de *Ep* com a amplitude. Este gráfico está apresentado na Figura 15.

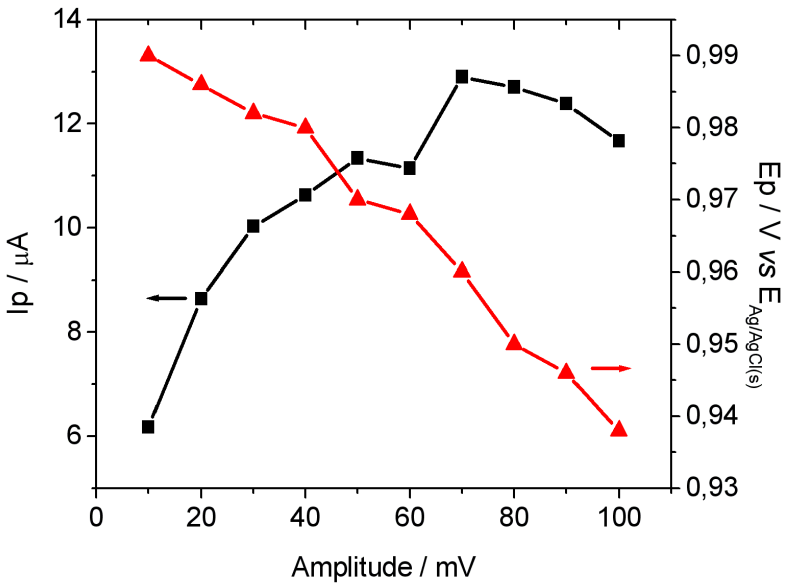

Figura 15: Gráfico de (—) potencial de pico, (—) corrente de pico em função da amplitude de pulsos.

O aumento da amplitude não foi linear com o aumento da corrente de pico no valor de 10 a 50 mV, porém não houve distorção dos voltamogramas. Nesse intervalo de amplitude a não linearidade da corrente de pico com relação à amplitude deve-se à adsorção de espécies na superfície do eletrodo.

A partir do valor de amplitude de 60 mV, há o deslocamento de potencial e alargamento da base do voltamograma que causam a perda de sensibilidade do método. Desta forma, o valor de amplitude escolhido para a metodologia foi o de 50 mV.

4.3.3 Estudo da variação de incremento de varredura

Os valores de incremento de varredura foram investigados no intervalo de 2 a 10 mV. Os valores de freqüência e a amplitude de pulsos foram fixados em 100 s^{-1} e 50 mV, respectivamente. A Figura 16 apresenta os voltamogramas de onda quadrada para a o estudo de variação do incremento de onda.

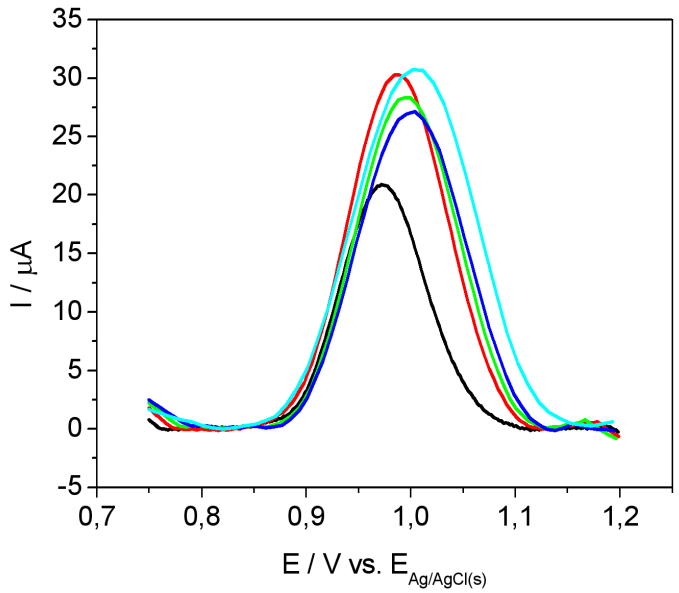

Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV. Valores de incremento de varredura: (—) 2, (—) 4, (—) 6, (—) 8 e (—) 10 mV.

A partir dos valores de *Ip*, *Ep* e de incremento da Figura 16, um gráfico foi construído e está apresentado na Figura 17.

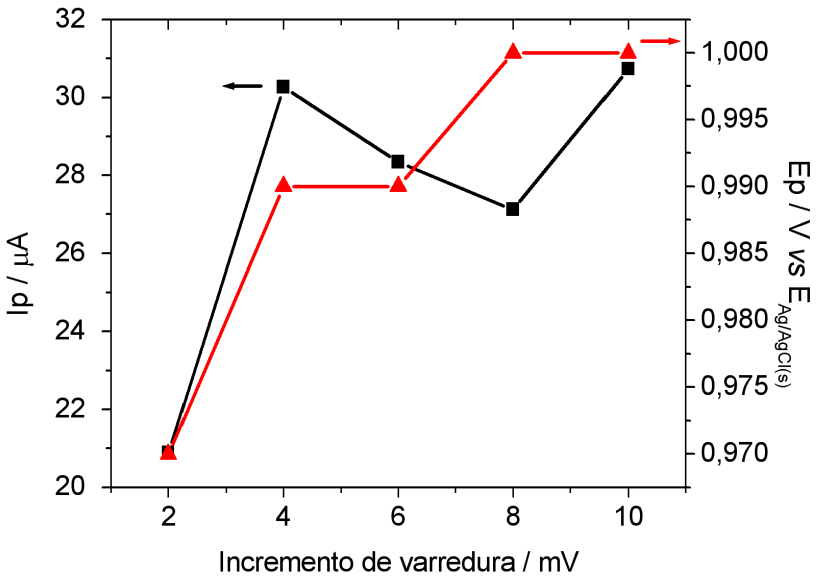

Figura 17: Gráfico de (—) potencial de pico, (—) corrente de pico em função do incremento de varredura.

O produto entre a freqüência e incremento de varredura é a velocidade efetiva da SWV. Na Figura 17, o aumento do valor do incremento de varredura ocasionou um aumento no valor de intensidade de corrente. Entretanto, foi observado um alargamento da base do voltamograma e deslocamento de potencial de pico que tornam o método menos seletivo.

Com o intuito de se obter um método com alta sensibilidade, foi escolhido o valor de incremento de 2 mV. A Tabela 4 apresenta um resumo da otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada: freqüência de pulsos, amplitude de pulsos e incremento de varredura, o intervalo de variação estudado e os valores escolhidos.

Tabela 4: Parâmetros da voltametria de onda quadrada avaliados, intervalos de estudo e valores escolhidos.

Parâmetro	Intervalo de estudo	Valor escolhido
Freqüência	10-100 s^{-1}	100 s^{-1}
Amplitude	10-100 mV	50 mV
Incremento de varredura	2-10 mV	2 mV

4.3.4 Curva analítica

A Figura 18 apresenta uma curva analítica no intervalo de concentração de 2,5 a 25,0 $\times$ 10^{-6} mol L^{-1} construída após a otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.

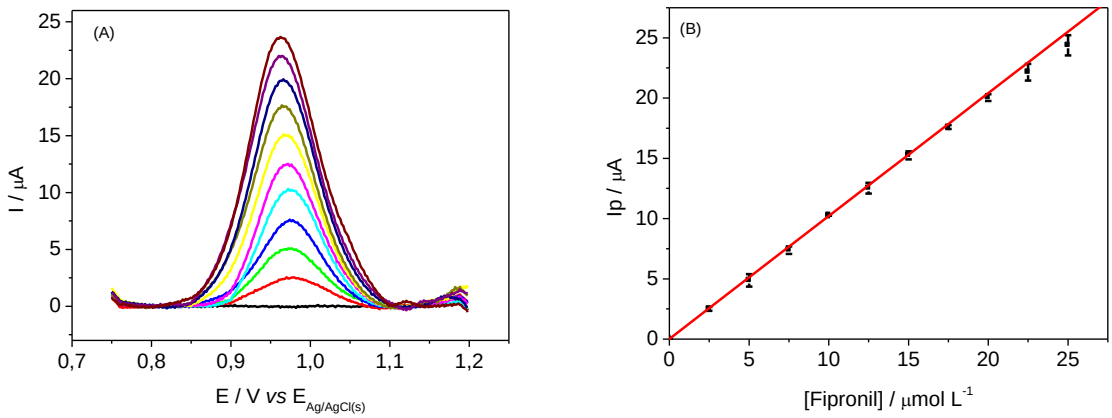

Figura 18: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV e incremento de varredura 2 mV. Valores de concentração: (—) 0, (—) 2,5, (—) 5,0, (—) 7,5, (—) 10,0, (—) 12,5, (—) 15,0, (—) 17,5, (—) 20,0, (—) 22,5 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica (r=0,999).

A curva analítica apresentou a seguinte equação de reta:

$$I_p = (0{,}02 \pm 0{,}01) + (1{,}02 \pm 0{,}01) \times [Fipronil]$$

r = 0,999

n = 3

Foram calculados os limites de detecção e de quantificação pela equação do método da IUPAC e pela extrapolação da curva analítica [75]. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de limites de detecção e de quantificação calculados pelos métodos da IUPAC por Extrapolação da Curva Analítica.

	IUPAC	**Extrapolação**
LD	$(1{,}00\pm0{,}01) \times 10^{-7}$ mol L^{-1}	$(3{,}43\pm2{,}12) \times 10^{-7}$ mol L^{-1}
	43,70 μg L^{-1}	149,89 μg L^{-1}
LQ	$(3{,}34\pm0{,}02) \times 10^{-7}$ mol L^{-1}	$(1{,}14\pm7{,}07) \times 10^{-6}$ mol L^{-1}
	145,96 μg L^{-1}	498,18 μg L^{-1}

A diferença dos valores de limites de detecção e de quantificação entre o procedimento da IUPAC e a extrapolação de reta se deve às equações empregadas [75]. O cálculo dos valores de LD e LQ por meio do método da IUPAC apresentou os valores menores quando comparados pelo método de extrapolação, pois foram obtidos a partir das equações

$$LD = 3 \times \frac{s_B}{b}; \qquad LQ = 10 \times \frac{s_B}{b} \qquad (5)$$

onde s_B é o desvio padrão da media aritmética de 10 medidas do branco (no caso do eletrólito suporte, a solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0) e b é coeficiente angular da curva analítica. Devido ao ruído da linha base, as medidas dos valores de corrente apresentam uma baixa precisão com a ordem de grandeza dos sinais de 10^{-8} μA. O valor de s_B pode ser reduzido se o analista realizar diversas medidas do branco e selecionar os

menores valores. Deste modo, ele irá obter um valor muito pequeno o que levará a uma limite de detecção muito baixo na ordem de nanomols.

O cálculo dos valores de LD e LQ através do método de extrapolação da curva analítica foi obtido pelas equações:

$$LD = 3 \times \frac{s_A}{b} \qquad LQ = 10 \times \frac{s_A}{b} \qquad (6)$$

onde s_A é o erro do coeficiente linear da curva analítica e b é o coeficiente angular. O valor de s_A foi calculado a partir dos parâmetros da curva analítica e permite registrar um sinal analítico significativamente diferente do ruído da linha base e próximo dos pontos iniciais da curva analítica com maior confiabilidade.

A precisão do método eletroanalítico foi avaliada pela repetibilidade e reprodutibilidade [76]. A repetibilidade foi calculada a partir de 5 medidas sucessivas de uma solução de fipronil $1{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} com valor de RSD de 1,47% para n = 5 para o mesmo eletrodo.

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 5 medidas em dias diferentes de uma solução de fipronil $1{,}0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} com valor de RSD de 2,77% para n = 5 para o mesmo eletrodo.

4.4 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Espectros de absorção na região do ultravioleta foram realizados em soluções de fipronil em etanol 1% na faixa de concentrações de 5,0 a 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1} e estão apresentados na Figura 19.

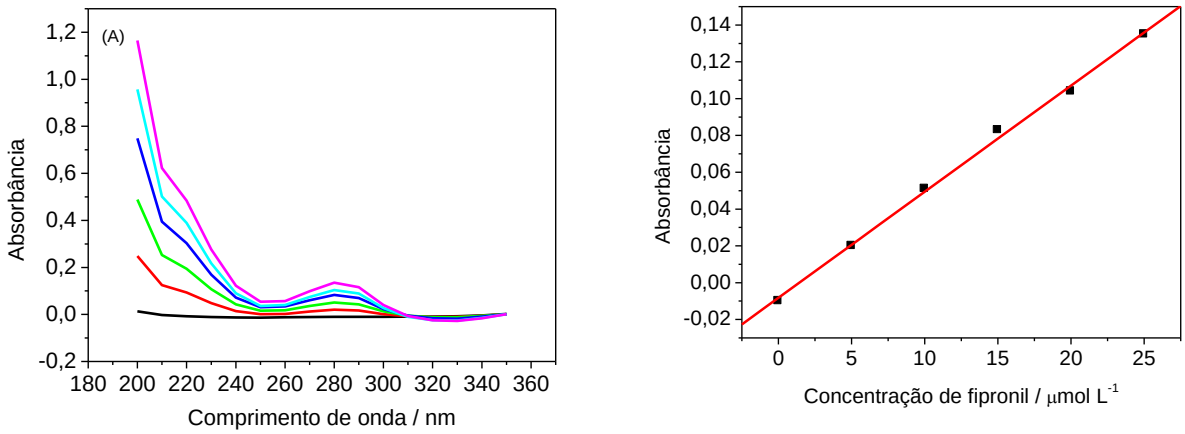

Figura 19: Espectros de absorção na região do ultravioleta de soluções de fipronil 1% em etanol em diferentes concentrações: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, (—) 15,0, (—) 20,0 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva de calibração (r=0,999).

A partir da curva de calibração, foi obtida a seguinte equação de reta:

$$A = (-0{,}01 \pm 0{,}01) + (5765{,}71 \pm 148{,}94) \times [Fipronil]$$

r = 0,999

O fipronil exibiu um pico de absorção no comprimento de onda próximo de 280 nm. Este valor foi referente a uma transição do tipo π - π * do anel aromático em etanol [77,78]. Utilizando a lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \qquad (7)$$

onde *A* é a absorbância que é adimensional, *ε* é o coeficiente de absortividade molar, *b* é o caminho óptico em cm e *c* é a concentração em mol L^{-1}. O coeficiente de absortividade molar foi calculando através do coeficiente angular da curva de calibração e apresentou o valor de $5{,}8 \times 10^{6}$ cm^{2} mol^{-1}. A partir destes resultados, o comprimento de onda de 280 nm foi utilizado para a detecção por ultravioleta do fipronil nas análises cromatográficas.

4.5 Comparação da metodologia eletroanalítica com o método oficial

A metodologia eletroanalítica desenvolvida com o eletrodo compósito de GPU para a determinação do fipronil pela técnica da voltametria de onda quadrada foi comparada com o procedimento padrão (HPLC-UV). A Figura 20 apresenta voltamogramas de onda quadrada do fipronil em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0 no intervalo de concentração de 5,0 a $25{,}0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} e sua respectiva curva analítica.

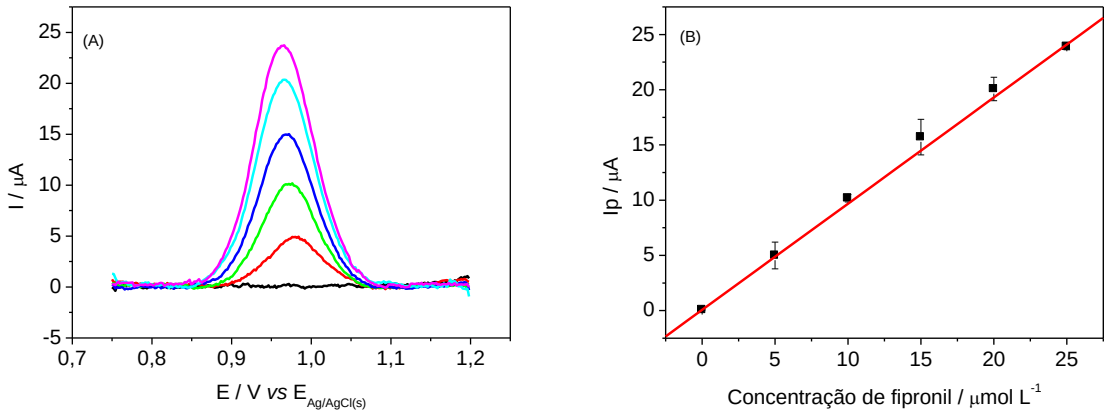

Figura 20: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de fipronil em solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura de 2 mV. Intervalo de concentração: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, (—) 15,0, (—) 20,0 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica para o fipronil (r=0,999).

A Figura 21 apresenta os cromatogramas de soluções de fipronil em acetonitrila no intervalo de 5,0 a 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1} e sua respectiva curva analítica.

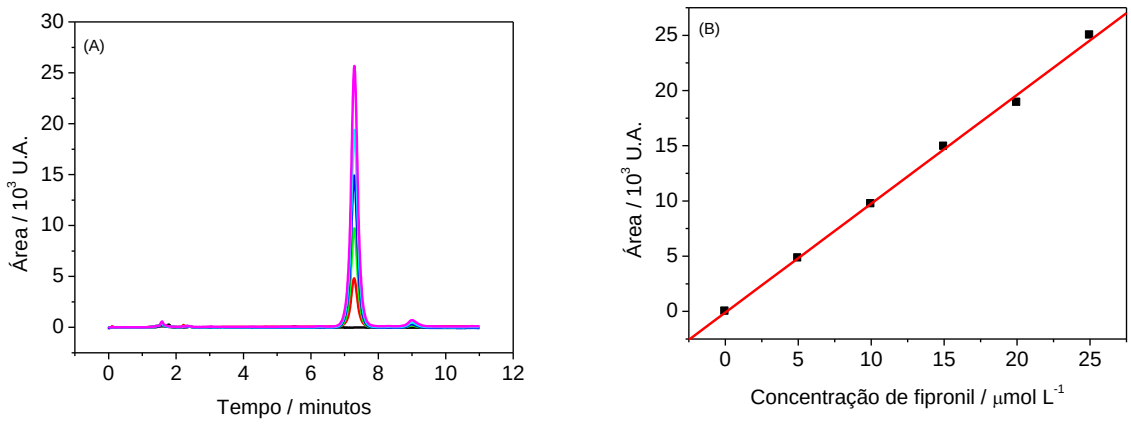

Figura 21: (A) Cromatogramas de uma solução de fipronil em acetonitrila; modo isocrático, fase móvel: acetonitrila-água (70:30). Intervalo de concentrações: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, (—) 15,0, (—) 20,0 e (—) 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica para o fipronil (r=0,999).

A partir das curvas analíticas dos métodos voltamétrico (proposto) e cromatográfico (oficial), uma curva de correlação foi construída, onde os sinais de corrente de pico, em microampéres, (método proposto) foram colocados no eixo y e os sinais de áreas dos cromatogramas, em unidades arbitrárias, (método oficial) são colocados no eixo x. A Figura 22 apresenta a comparação entre os dois métodos.

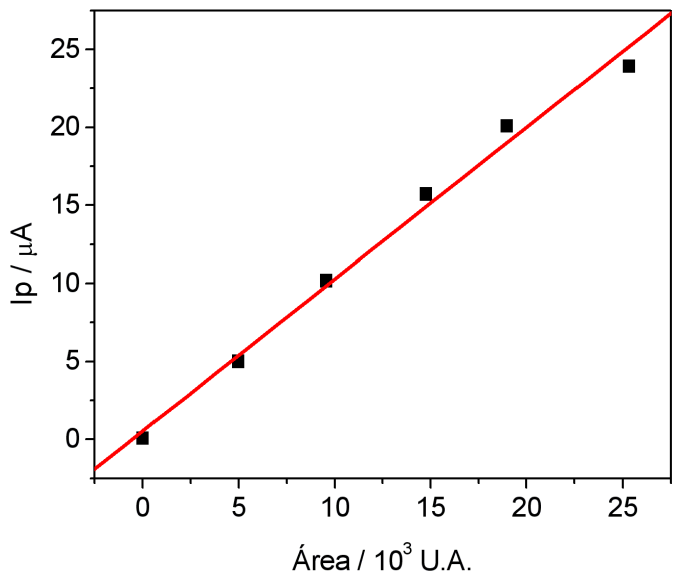

Figura 22: Gráfico de correlação entre os valores de correntes (método eletroanalítico) e as alturas das áreas (método cromatográfico).

$$I_p = (0{,}20 \pm 0{,}01) + (1{,}02 \pm 0{,}01) \times [Fipronil]$$

r = 0,999

Os valores dos coeficientes linear, angular e linear foram calculados e estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de coeficientes linear, angular e de correlação.

Coeficiente	Calculado	Teórico
Linear	0,20	0
Angular	1,02	1,0
Correlação	0,999	1,0

Segundo MILLER, dois métodos analíticos utilizados para a determinação de um certo analito podem ser comparados estatisticamente por suas respectivas curvas analíticas que devem ser construídas no mesmo intervalo de concentração [79].

Ao comparar os valores dos coeficientes linear, angular e de correlação da Tabela 6, nota-se que os valores calculados e teóricos estão próximos. Este fato indica que a metodologia eletroanalítica proposta está de acordo com o método cromatográfico e pode ser utilizada para a determinação do inseticida fipronil em análises de rotina.

4.6 Determinação de fipronil em amostras

A metodologia eletroanalítica desenvolvida com o eletrodo compósito de GPU foi aplicada para a análise de uma amostra de água de um córrego do município de São Carlos/SP.

4.6.1 Análise de amostra de água de córrego

A Figura 23 apresenta os voltamogramas de recuperação de uma amostra de água de córrego represa analisada pela metodologia eletroanalítica desenvolvida.

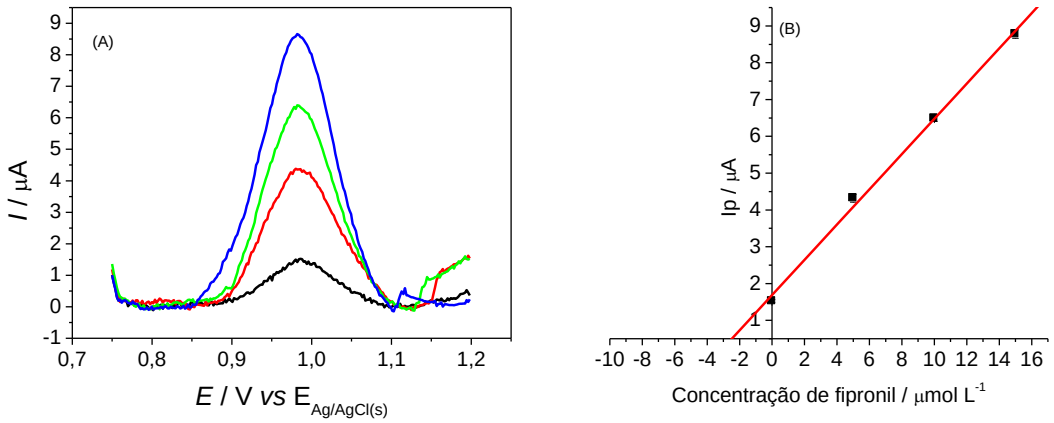

Figura 23: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma amostra de água de córrego fortificada com fipronil em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Valores de concentração do padrão adicionado: (—) 0, (—) 5,0, (—) 10,0, e (—) 15,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Gráfico de adição de padrão (r=0,999).

O valor de recuperação encontrado foi de 97,14% com RSD de 1,47% para n = 3. A metodologia proposta apresentou sensibilidade, rapidez e eficiência na analise do fipronil em amostras de águas com bons resultados. O efeito da matriz foi mínimo, o que resultou em bons resultados de recuperação.

4.6.2 Análise de uma formulação veterinária contendo fipronil

A Figura 24 apresenta os voltamogramas de onda quadrada de uma formulação veterinária contendo fipronil.

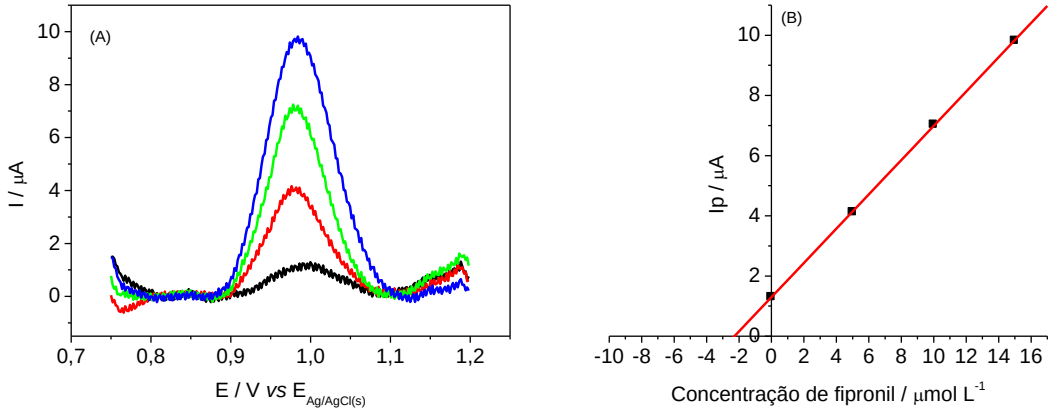

Figura 24: (A) Voltamogramas de onda quadrada de uma formulação veterinária contendo fipronil em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude de 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Valores de concentração do padrão adicionado: (—) 0, (—)5,0, (—) 10,0, e (—) 15,0 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Gráfico de adição de padrão (r=0,999).

Foram obtidos valores de recuperação de 85,31%, com RSD de 3,14% para n = 3. A composição da formulação consiste de fipronil e de isopropanol. A metodologia proposta apresentou sensibilidade, rapidez e eficiência na análise do fipronil na formulação. O valor de recuperação obtido pode estar associado à adsorção de excipientes da formulação comercial na superfície do eletrodo de trabalho.

4.7 Voltametria de redissolução de onda quadrada

Estudos de voltametria de redissolução de onda quadrada foram realizados em soluções de fipronil de 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1}. A Figura 25 apresenta os voltamogramas de onda quadrada em diferentes valores de potencial de acumulação.

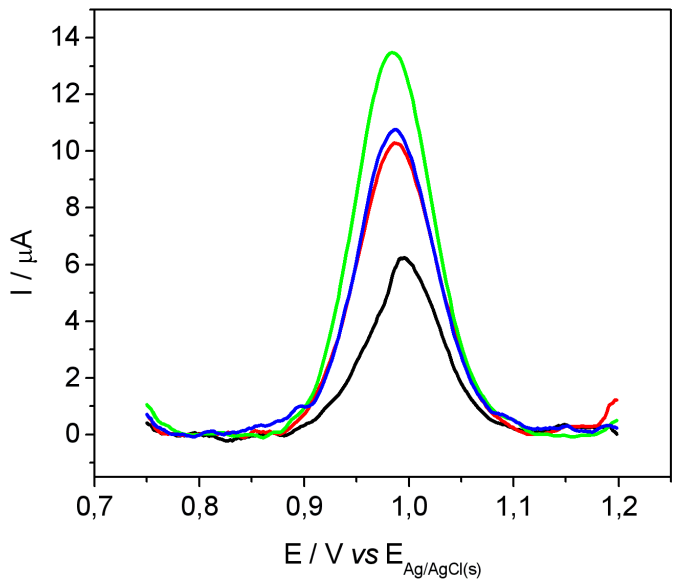

Figura 25: Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de uma solução de fipronil 1,0 × 10^{-5} mol L^{-1} em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Tempo de acumulação:120 s. Potenciais de acumulação: (—) –1,0 V, (—) 0 V, (—) 0,5 V e (—) circuito-aberto.

O potencial de acumulação é aplicado ao eletrodo de trabalho para promover a deposição do analito na superfície do eletrodo e seu valor deve ser menor que o potencial de oxidação do fipronil [80,81]. Este parâmetro é responsável pela seletividade do procedimento de redissolução.

Analisando a Figura 25, o potencial de 0,5 V foi aquele que apresentou a maior intensidade de corrente de pico quando comparado com os demais potenciais. O valor do potencial de circuito aberto oscilou entre 0,01 e 0,07 V apresentando intensidade de corrente de pico próxima do potencial de 0 V. Desta forma, este valor de potencial de 0,5 V foi utilizado para estudar o tempo de acumulação. A Figura 26 apresenta os voltamogramas de redissolução de onda quadrada com potencial de acumulação de 0,5 V em diferentes tempos de acumulação.

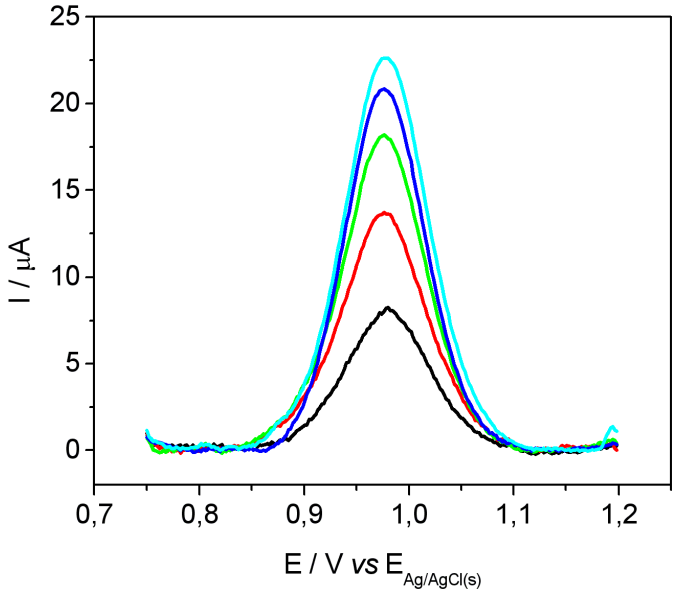

Figura 26: Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de uma solução de fipronil $1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} em solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V. Tempos de acumulação: (—) 0, (—) 30, (—) 60, (—) 90, (—) 120 s.

Analisando a Figura 26, foi verificado que a corrente de pico aumenta com o aumento do tempo de acumulação. A agitação da solução diminui a espessura da

camada de difusão e favorece o transporte de massa do analito da solução para o eletrodo de trabalho e desta forma, quanto maior o tempo de acumulação, maior será a quantidade de fipronil transportada para o eletrodo e maior o sinal de corrente [80].

Após a otimização dos parâmetros potencial e tempo de acumulação, uma curva analítica foi construída no intervalo de concentrações de 0,5 a 2,5 × 10^{-6} mol L^{-1} que está apresentada na Figura 27.

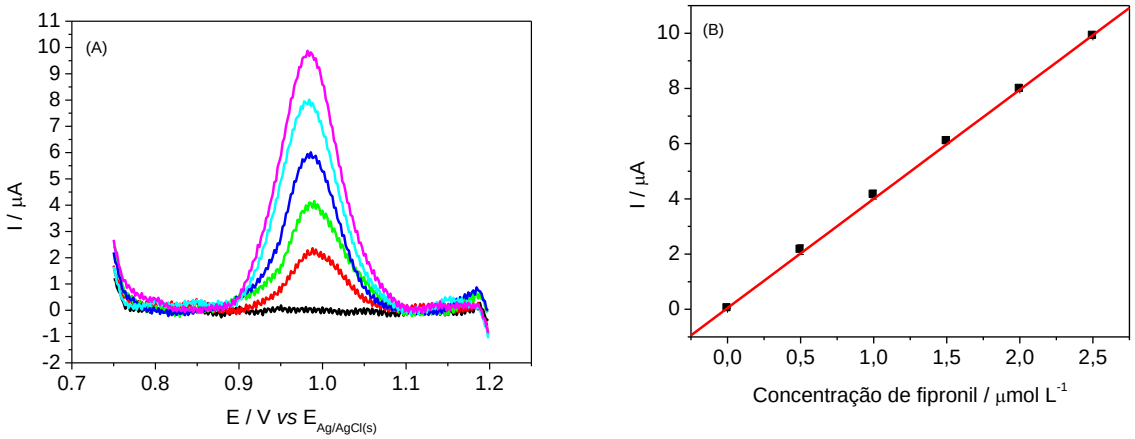

Figura 27: (A) Voltamogramas de redissolução do fipronil em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V, tempo de acumulação 120 s. Intervalo de concentração: (—) 0, (—) 0,5, (—) ,1,0, (—) 1,5, (—) 2,0 e (—) 2,5 × 10^{-6} mol L^{-1}. (B) Curva analítica (r=0,999).

A partir da curva analítica, foi obtida a seguinte equação de reta:

Ip = (0,05±0,01) + (3,95±0,01) x [Fipronil];

r = 0,999

Foram calculados os limites de detecção e de quantificação pela equação da IUPAC e pela extrapolação da curva analítica. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de limites de detecção e de quantificação calculados pelos métodos da IUPAC por Extrapolação da Curva Analítica.

	IUPAC	**Extrapolação**
LD	$(1,83\pm0,02) \times 10^{-9}$ mol L^{-1}	$(3,44\pm1,40) \times 10^{-8}$ mol L^{-1}
	0,80 μg L^{-1}	15,03 μg L^{-1}
LQ	$(6,10\pm0,06) \times 10^{-9}$ mol L^{-1}	$(1,03\pm0,42) \times 10^{-7}$ mol L^{-1}
	2,67 μg L^{-1}	45,01 μg L^{-1}

*Para n = 3.

Os valores dos limites de detecção e de quantificação calculados pelo método da IUPAC foram menores, pois foram calculados considerando o desvio padrão da media de dez brancos. Já para os valores obtidos pela extrapolação da curva analítica, os valores foram maiores, pois as equações empregadas consideram o erro do coeficiente linear e desta forma a magnitude do LD e LQ está próxima dos valores iniciais da curva analítica. A repetibilidade do método eletroanalítico apresentou o valor de RSD de 1,72% para n = 5. A reprodutibilidade apresentou o valor de RSD de 1,51% para n = 5.

4.8 Aplicação da metodologia de pré-concentração para a análise de amostras

A metodologia eletroanalítica desenvolvida foi aplicada para a determinação de fipronil em amostras de águas, uma formulação veterinária e uma amostra de leite. As amostras de água e de leite foram fortificadas com uma solução de fipronil de $2{,}0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em etanol. Em seguida, adições de padrão foram realizadas para o posterior cálculo de recuperação.

4.8.1 Análise de amostras de águas

A Figura 28 apresenta os voltamogramas de pré-concentração do fipronil de uma das amostras de águas naturais.

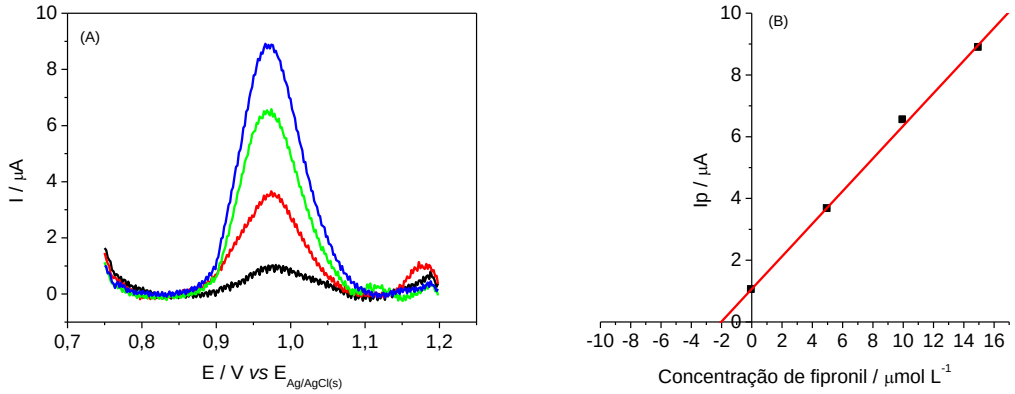

Figura 28: (A) Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de uma amostra de água contendo fipronil em uma solução tampão BR, 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV e incremento de varredura de 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V, tempo de redissolução 120 s. (B) Curva de adição de padrão (r=0,999).

A partir dos valores de adição de padrão, foi calculado o valor de recuperação que está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de recuperação para a análise de amostras de águas naturais.

Amostra	Recuperação (%)	Desvio padrão
1	111,00	9,46
2	106,31	5,93
3	102,21	4,03

*Para n = 3.

Foram observados valores de recuperação entre 102,21 e 111,00%, com RSD entre 4,03 e 9,46. As medidas foram realizadas em triplicata. A metodologia proposta com a etapa de pré-concentração apresentou sensibilidade, rapidez e eficiência na análise de traços do fipronil em amostras de águas. O efeito da matriz foi mínimo, o que resultou em bons resultados de recuperação.

4.8.2 Análise de amostra de leite

A Figura 29 apresenta os voltamogramas de recuperação de uma amostra de leite que foi analisada pelo procedimento de pré-concentração com o eletrodo compósito de GPU.

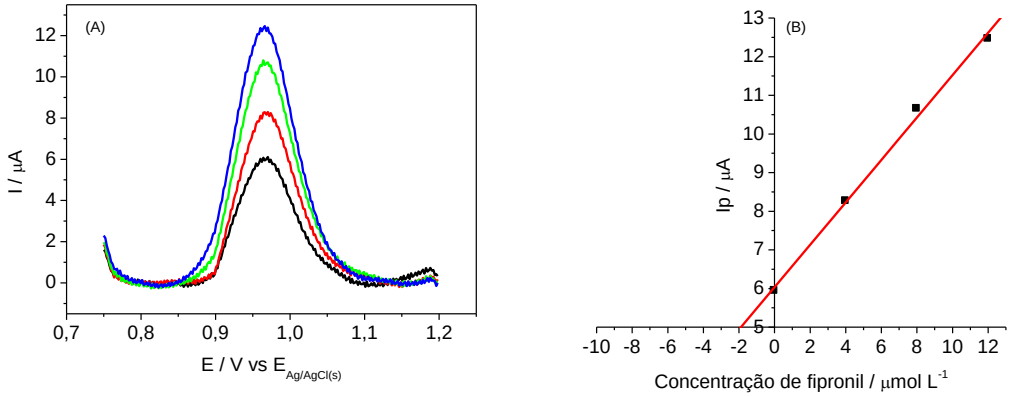

Figura 29: (A) Voltamogramas de redissolução de onda quadrada de fipronil de uma amostra de leite em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento varredura 2 mV. Potencial de acumulação 0,5 V, tempo de redissolução 120 s. (B) Curva analítica (r=0,999).

A Tabela 9 apresenta os valores de recuperação para a análise de amostras de leite fortificadas com fipronil e extraída com diferentes solventes.

Tabela 9: Valores de recuperação de fipronil extraído de amostra de leite por diferentes solventes.

Solvente	Recuperação	Desvio padrão
Acetato de etila	20,90	2,47
Acetona	31,20	4,59
Metanol	32,77	1,70

*Para n = 3.

O leite é uma mistura complexa de substâncias, tais como, água, gorduras, proteínas, açúcares e sais [82]. Os valores de recuperação foram baixos devido à baixa eficiência da extração. O fipronil é um composto apolar que tem afinidade por grupos de baixa polaridade e assim, a extração por solventes não foi realizada com sucesso para a remoção do inseticida fipronil do leite, o que justifica os valores de recuperação em torno de 30%.

Desta forma, outros procedimentos de extração devem ser realizados para uma extração eficiente do inseticida fipronil para a obtenção de melhores valores de recuperação por meio do uso de fases sólidas especificas para determinação do fipronil em matrizes de leite e derivados [83].

5. Conclusões

O fipronil apresentou um comportamento de sistema irreversível no eletrodo compósito de grafite-poliuretana 70% em solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L^{-1}, pH 8,0. Uma corrente de pico foi observada no potencial de 0,95 V com características de processo irreversível. Os estudos por voltametria cíclica mostraram que o processo eletródico é controlado pela cinética com adsorção de reagente e/ou produto na superfície do eletrodo de trabalho. No estudo de variação de pH, foi constatado que em pH 8,0 foi obtida a maior resposta de corrente para a reação de oxidação do fipronil, valor este utilizado no desenvolvimento da nova metodologia eletroanalítica.

A eletrólise do fipronil apresentou valores de carga de 0,21 C para oxidar $1,8 \times 10^{-6}$ mols do inseticida. Os resultados permitiram calcular o número de elétrons envolvidos na oxidação do fipronil por meio da equação de Faraday. Foi verificado que na reação de oxidação envolve a perda de um elétron por molécula de fipronil. Estudos posteriores de caracterização dos produtos de eletrólise serão realizados para propor um mecanismo de oxidação do fipronil.

A metodologia eletroanalítica desenvolvida com o eletrodo compósito de GPU para a determinação do inseticida fipronil utilizando freqüência 100 s^{-1}, amplitude 50 mV, incremento de varredura de 2 mV apresentou um excelente desempenho para fins analíticos e os resultados satisfatórios foram para análises de rotina.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pelo método da IUPAC e pelo método de extrapolação da curva analítica. Foram obtidos valores diferentes devido às equações utilizadas. O método IUPAC considera o desvio padrão da média aritmética de 10 brancos da linha base. O valor do LD é muito baixo e

está distante da menor concentração da curva que pode levar o analista a falsas conclusões.

O método de extrapolação da curva analítica considera os erros associados às medidas das intensidades de correntes (desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica). O valor de LD está próximo do menor valor do primeiro ponto da curva analítica e permite uma interpretação real pelo analista.

Os valores de LD e LQ calculados foram (1,00±0,01) × 10^{-7} e (3,34±0,02) × 10^{-7} mol L^{-1}, respectivamente utilizando as equações da IUPAC. Pelas equações do método de extrapolação de curva analítica, os valores de LD e LQ foram (3,43±2,12) × 10^{-7} e (1,14±7,07) × 10^{-6} mol L^{-1}, respectivamente.

A metodologia eletroanalítica desenvolvida pela técnica da voltametria de onda quadrada utilizando o eletrodo compósito de GPU apresentou concordância com o método oficial, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (HPLC-UV). Por meio do tratamento estatístico utilizando as curvas de calibração no intervalo de concentração de 5,0 a 25,0 × 10^{-6} mol L^{-1} o gráfico que relaciona os sinais analíticos dos procedimentos proposto e oficial apresentou um coeficiente correlação de 0,995.

A aplicação da metodologia em uma amostra de água natural de um córrego da cidade de São Carlos/SP apresentou valores de 97,14% com RSD de 1,47%. Não foi observado efeito da matriz que causasse problemas no sinal de corrente.

A análise da formulação veterinária comercial pela metodologia eletroanalítica desenvolvida com eletrodo compósito de GPU apresentou valores de recuperação de 85,31%, com RSD de 3,14%. Este valor se deve à competição pelos sítios ativos da superfície do eletrodo entre o solvente e o analito.

Os estudos por voltametria de redissolução mostraram que o eletrodo compósito de GPU apresenta potencial para este procedimento de análise. Os valores de corrente mais sensíveis para detecção do fipronil foram obtidos com o potencial de acumulação de 0,5 V e tempo de acumulação de 120 s. Os valores de LD e LQ calculados foram $(1,83\pm0,02) \times 10^{-9}$ e $(6,10\pm0,06) \times 10^{-9}$ mol L^{-1}, respectivamente utilizando as equações da IUPAC. Pelas equações do método de extrapolação de curva analítica, os valores de LD e LQ foram $(3,44\pm1,40) \times 10^{-8}$ e $(1,03\pm0,42) \times 10^{-7}$ mol L^{-1}, respectivamente.

A análise de águas naturais da cidade de São Carlos/SP contendo fipronil utilizando a voltametria de redissolução apresentou valores de recuperação entre 102,21 e 111,00%. O método de redissolução se mostrou adequado para a análise de traços do inseticida com RSD de 4,03 a 9,46%.

A análise de leite contendo fipronil apresentou valores de recuperação entre 20,90 e 32,77 % devido à baixa eficiência do processo de extração. Além disso, o fipronil apresenta afinidade pela matéria orgânica do leite que é composta por lipídeos e proteínas.

De maneira geral, a metodologia eletroanalítica desenvolvida para a determinação de fipronil utilizando o eletrodo compósito de GPU apresentou resultados satisfatórios para as análises de rotina em águas e em formulação comercial, podendo ser utilizada como uma alternativa aos procedimentos cromatográficos usuais.

6. Referências Bibliográficas

[1] HOLLAND, P. T. Pesticides report 36. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 1996). **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1167-1193, 1996.

[2] LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 161-166, 1992.

[3] TURK, J. **Introduction to environmental studies.** 3. ed. Philadelphia: Saunders College, 1989. 392p.

[4] BAIRD, C. **Química ambiental**. São Paulo: Bookman 1999. 622p.

[5] MANAHAN, S. E. **Fundamentals of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 844p.

[6] MATOLCSY, G. **Pesticide chemistry.** Amsterdan: Elsevier, 1988. 786p.

[7] BOBE, A.; COLSTE, C. M.; COOPER, J. F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 4861-4865, 1997.

[8] PEI, Z.; YITONG, L.; BAOFENG, L.; GAN, J. J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field system. **Chemosphere**, v. 57, p. 1691-1696, 2004.

[9] COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Actions of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemical Physiology**, v. 46, p. 47-54, 1993.

[10] THE PESTICIDE Manual: a world compendium: incorporating the agrochemicals handbook. 10. ed. Cambridge: British Crop protection Council, 1994. 1340p.

[11] RAMESH, A.; BALASUBRAMANIAN, M. Kinetics and hydrolysis of fenamiphos, fipronil, and trifluralin in aqueous buffer solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 3367-3371, 1999.

[12] BOBE, A.; MEALLIER, P.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M. Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (Hydrolysis and Photolysis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2834-2839, 1998.

[13] BOBE, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M.; MILLER, M. A. Behaviour of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. **Pesticide Science**, v. 52, n. 3, p. 275-281, 1998.

[14] HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Agricultural Sciences**, v. 93, p. 12764-12767.

[15] AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1347-1352, 2003.

[16] HUSEN, T. J.; SPOMER, N. A.; KAMBLE, S. T. Degradation of fipronil (Termidor®) in aqueous solution stored in polyethylene tanks exposed to sunlight or shade. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 5, p. 605-609, 2009

[17] SARAN, R. K.; KAMBLE, S. T. Concentration-dependent degradation of three termiticides in soil under laboratory conditions and their bioavailability to eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 1373-1383, 2008.

[18] RAVETON, M.; AAJOUD, A.; WILLISON, J.; CHERIFI, M.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, v. 69, p. 1124-1129, 2007.

[19] WALSE, S. S.; PENNINGTON, P. L.; SCOTT, G. I.; FERRY, J. L. The fate of fipronil in modular mesocosms. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, n. 1, p. 58-64, 2004.

[20] LIU, D.; WANG, P.; ZHU, W.; GU, X.; ZHOU, W.; ZHOU, Z. Enantioseletive degradation of fipronil in Chinese cabbage (Brassica pekinensis). **Food Chemistry**, v. 110, p. 399-405, 2008.

[21] TAN, H.; CAO, Y.; TANG, T.; QIAN, K.; CHEN, W. L.; LI, J. Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 428-437, 2008.

[22] WILSON, W. A.; KONWICK, B. J.; GARRISON, A. W.; AVANTS, J. K.; BLACK, M. C. Enantioselective Chronic Toxicity of Fipronil to *Ceriodaphnia dubia*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, p. 36-43, 2008.

[23] JONES, W. J.; MAZUR, C. S.; KENNEKE, J. F.; GARRISON, A. W. Enantioselective Microbial Transformation of the Phenylpyrazole Insecticide Fipronil in Anoxic Sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 24, p. 8301-8307, 2007.

[24] KONWICK, B. J.; GARRISON, A. W.; BLACK, M. C.; AVANTS, J. K.; FISK, A. T. Bioaccumulation, Biotransformation and Metabolite Formation of Fipronil and Chiral Legacy Pesticides in Rainbow Trout. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 2930-2936, 2006.

[25] BALANÇA, G.; VISSCHER, M. N. Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. **Crop Protection**, v. 16, p. 553-564, 1997.

[26] LIMA, W. S.; MALACCO, M. A. F.; BORDIN, E. L.; OLIVEIRA, E. L. Evaluation of prophylactic effect and curative efficacy of fipronil 1% pour on (Topline®) on post-castration scrotal myiasis caused by Cochlimyia hominivorax in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 373-377, 2004.

[27] POLLMEIER, M.; PENGO, G.; LONGO, M.; JEANNIN, P. Effective treatment and control of biting lice *Felicola subrostratus* (Nitzsch in Burmeister, 1838), on cats using fipronil formulations. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 157-165, 2004.

[28] DAVOUST, B.; MARIÉ, J. L.; MERCIER, S.; BONI, M.; VANDEWEGHE, A.; PARZY, D. F.; BEUGNET, F. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. **Veterinary Parasitology**, v. 112, p. 91–100, 2003.

[29] PAYNE, P. A; DRYDEN, M. W.; SMITH, V.; RIDLEY, R. K. Effect of 0.29% w/w fipronil spray on adult flea mortality and egg production of three different cat flea, *Ctenocephalides felis* (Bouché), strains infesting cats. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 331-340, 2001.

[30] DAVEY, R. B.; AHRENS, E. H.; GEORGE, J. E.; HUNTER III, J. S.; JEANNIN, P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 261-276, 1998.

[31] LEGHAIT, J.; GAYRARD, V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M.; PERDU, E.; TOUTAIN, P. -L.; VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**, v. 255, p. 38-44, 2009.

[32] ROCHE, H.; TIDOU, A. First Ecotoxicological Assessment Assay in a Hydroelectric Reservoir: The Lake Taabo (Côte d'Ivoire). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 322-326, 2009.

[33] GUPTA, S.; SHARMA, R. K.; GUPTA, R. K.; SINHA, S. R.; SINGH, R.; GAJBHIYE, V. T. Persistence of New Insecticides and Their Efficacy Against Insect Pests of Okra. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 243-247, 2009.

[34] EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, p. 30-39, 2005.

[35] SCHLENK, D.; HUGGETT, D. B.; ALLGOOD, J.; BENNETT, E.; RIMOLDI, J.; BEELER, A. B.; BLOCK, D.; HOLDER, A. W.; HOVINGA, R.; BEDIENT, P. Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus* sp.: field and laboratory studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 325-332, 2001.

[36] LIN, K.; HAVER, D.; OKI, L.; GAN, J. Transformation and Sorption of Fipronil in Urban Stream Sediments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8594-8600, 2008.

[37] MASUTTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. Sorption of fipronil and its sulfide derivative by soils and goethite. **Geodherma**, v. 140, n. 1-2, p. 1-7, 2008.

[38] MUKHERJEE, I. Sorption of fipronil in tropical soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 334-340, 2006.

[39] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 10 jun. 2006.

[40] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp>. Acesso em: 26 mar. 2009.

[41] LIU, Y.; ZHAO, E.; ZHU, W.; GAO, H.; ZHOU, Z.; Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 885-891, 2009.

[42] JIMÉNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. D.; MARTÍN, M. T.; MAYO, R. Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 40-45, 2008.

[43] PIRARD, C.; WIDART, J.; NGUYEN, B. K.; DELEUZE, C.; HEUDT, L.; HAUBRUGE, E.; DE PAUW, E.; FOCANT, J. –F. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, n. 1-2, p. 116-123, 2007.

[44] BICHON, E.; RICHARD, C. A.; LE BIZEC, B. Development and validation of a method for fipronil residue determination in ovine plasma using 96-well plate solid-phase and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, n. 1, p. 91-99, 2007.

[45] SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; ALBERO, B.; TADEO, J. L. Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 7-14, 2008.

[46] LIU, X.; YAN, C.; DONG, J.; YU, X.; XU, D. Poly- and Monoclonal Antibody-based ELISAs for fipronil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 226-230, 2007.

[47] HADJMOHAMMADI, M. R.; NIKOU, S. M.; KAMEL, K. Determination of fipronil residue in soil and water in the rice fields in north of Iran by RP-HPLC method. **Acta Chimica Slovenica**, v. 53, n. 4, p. 517-520, 2006.

[48] KADAR, A.; FAUCON, J. P. Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9741-9746, 2006.

[49] MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 982, n. 2, p. 267-273, 2002.

[50] VÍLCHEZ, J. L.; PRIETO, A.; ARAUJO, L.; NAVALÓN, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 919, n. 1, p. 215-221, 2001.

[51] WANG, J., **Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine**. New York: VCH, 1988. 171p.

[52] GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

[53] SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.

[54] PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T.; Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

[55] MENDES, Renata Kelly. **Desenvolvimento de eletrodos à base de grafite e poliuretana**. 2002. 91f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

[56] MENDES, R. K.; CLARO-NETO, S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of a new rigid carbon-castor oil polyurethane composite as an electrode material. **Talanta**, v. 57, n. 5, p. 909-917, 2002.

[57] MENDES, R. K.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of a graphite-castor oil polyurethane composite electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 708-712, 2006.

[58] SEMAAN, F. S.; PINTO, E. M.; CAVALHEIRO, E. T.G.; BRETT, C. M. A. A Graphite-Polyurethane Composite Electrode for the Analysis of Furosemide. **Electroanalysis** v. 20, n. 21, p. 2287-2293, 2008.

[59] CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T.G. Graphite-Polyurethane Composite Electrode as an Amperometric Flow Detector in the Determination of Atenolol. **Analytical Letters,** v. 41, n. 10, p. 1867-1877, 2008.

[60] CERVINI, P.; CAVALHEIRO, E. T.G. Determination of Paracetamol at a Graphite-Polyurethane Electrode as an Amperometric Flow Detector. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 836-841, 2008.

[61] TOLEDO, R. A.; SANTOS, M. C.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F.; CAVALHEIRO, E. T. G.; MAZO, L. H. Use of Graphite-Polyurethane Composite Electrode for imipramine oxidation – Mechanism Proposal and Electroanalytical Determination. **Analytical Letters,** v. 39, p. 507-520, 2006.

[62] TOLEDO, R. A.; VAZ, C. M. P. Use of a graphite-polyurethane for electroanalytical determination of indole-3-acetic acid in soil samples. **Microchemical Journal,** v. 86, p. 161-165, 2007.

[63] TEIXEIRA, M. F. S.; MARCOLINO-JÚNIOR, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O.; DOCKAL, E. R.; BERGAMINI, M. F. An electrochemical sensor for L-dopa based on oxovanadium-salen thin film electrode applied flow injection system. **Sensors and Actuators B**, v. 122, p. 549-555, 2007.

[64] MALAGUTTI, A. R.; ZUIN, V. G.; CAVALHEIRO, E. T. G.; MAZO, L. H. Determination of rutin in green tea infusions: using square-wave voltammetry with a rigid carbon-polyurethane composite electrode. **Electroanalysis** v. 18, n. 10, p. 1028-1034, 2006.

[65] AMARAL, Raquel Bonatto. **Estudo voltamétrico e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação do inseticida fipronil**. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

[66] IVES, D. J. G.; JANZ, G. J. **Reference electrodes:** theory and practice. New York: Academic Press, 1960. v. 1.

[67] BRITTON, H. T. S.; ROBINSON, R. A., Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. **Journal of Chemical Society**, v. 458, p. 1456-1462, 1931.

[68] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica:** princípios, métodos e aplicações. Coimbra: Livraria Almedina, 1996. 471p.

[69] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods:** fundamentals and applications. New York: John Wiley, 2001. 389p.

[70] KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. 986p.

[71] TANIMOTO, Sonia Tomie. **Comportamento eletroquímico e eletroanalítico do O,O-Dimetil O-(3Metil-4-Nitrofenol) Fosfotionato (Fenitrontion)**. 2002. 91f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

[72] CODOGNOTO, Lúcia. **Desenvolvimento de metodologias para a determinação e remoção eletroquímica de pentaclorofenol em amostras ambientais utilizando eletrodos de diamante**. 2003. 157f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

[73] SOUZA, Djenaine. **Utilização de ultramicroeletrodos na quantificação dos pesticidas paraquat e diclorvos em diferentes matrizes por voltametria de onda quadrada**. 2004. 167f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

[74] SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

[75] DA SILVA, Osmair Benedito, **Estudo estatístico do desempenho analítico das técnicas eletroquímicas VPD, VOQ e MVOQ para a redução do herbicida paraquat em UME-Au e sua análise e quantificação e águas naturais**. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

[76] HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876p.

[77] SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387p.

[78] PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. Mexico: Thomson Learning, 2001. 579p.

[79] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. **Statistics for analytical chemistry**. Chichester: Ellis Horwood, 1993. 233p.

[80] WANG, J. **Stripping analysis:** principles, instrumentation and applications. Amsterdam: VCH, 1985. 160p.

[81] BARECHT, E. Stripping voltammetry. In: BARD, A. J. **Electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1967. v. 2, p. 53.

[82] BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. São Paulo: Nobel, 1999. 319p.

[83] LE FAOUDER, J.; BICHON, E.; BRUNSCHWIG, P.; LANDELLE, R.; ANDRE, F.; LE BIZEC, B. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**, v. 73, n. 4, p. 710-717, 2007.