

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Priscila Dotto Rosa Balbinot

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS,
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS, EM ERVA-MATE (*ILEX
PARAGUARIENSIS*) PRODUZIDA NA AMÉRICA DO SUL**

Santa Maria, RS
2022

Priscila Dotto Rosa Balbinot

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS, EMPREGANDO CROMATOLOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS, EM ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) PRODUZIDA NA AMÉRICA DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ionara Regina Pizzutti

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Balbinot, Priscila Dotto Rosa
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS,
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS, EM ERVA-MATE (ILEX
PARAGUARIENSIS) PRODUZIDA NA AMÉRICA DO SUL / Priscila
Dotto Rosa Balbinot.- 2022.
87 p.; 30 cm

Orientadora: Ionara Regina Pizzutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Cromatografia gasosa 2. Ditiocarbamatos 3. Erva
mate 4. Fungicidas I. Pizzutti, Ionara Regina II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, PRISCILA DOTTO ROSA BALBINOT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Priscila Dotto Rosa Balbinot

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS, EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS, EM ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) PRODUZIDA NA AMÉRICA DO SUL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**.

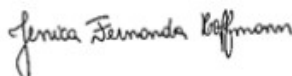
Aprovada em 28 de fevereiro de 2022



Ionara Regina Pizzutti, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Rosselei Caiel da Silva, Dr^a. (UFSM)



Jessica Hoffmann, Prof^a. Dr^a. (UNISINOS)

Santa Maria, RS
2022

Dedico este trabalho a Deus que sempre esteve ao meu lado dando forças para seguir em frente. Aos meus pais e irmão que me ensinaram a jamais desistir dos meus objetivos. Ao meu querido esposo que me deu todo suporte durante esta longa caminhada. Ao meu Anjo Benjamin. A minha amada filha Ana Clara!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida, por me dar força para seguir em frente, superar dificuldades e alcançar meus sonhos.

Aos meus pais e irmão, pelas palavras de carinho e apoio a cada dia, pelos exemplos de coragem e determinação para jamais desistir dos meus objetivos.

Ao meu querido esposo, por todo apoio e cuidado nesta longa jornada. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar em todas as minhas decisões, diariamente. Meu amor por ti é imenso.

Ao meu anjo Benjamin, que embora tenha partido tão cedo, me deixou grandes aprendizados. A minha amada Ana Clara, que me acompanhou durante as tardes de escrita e pesquisa, me dando ânimo para chegar até aqui. Amo vocês, meus filhos.

À Rosselei Caiél da Silva, Júlia Paula Neu, Ingrid Duarte, Robson Wouters e Marlos Zorzella Fontana, que me deram todo o suporte durante o mestrado, nos momentos que mais precisei. Pessoas incríveis e sempre dispostas a ajudar. A vocês toda minha admiração, carinho e gratidão.

À Ionara Pizzutti que abriu as portas do CEPARC, me recebendo desde o início com um abraço de mãe, palavras de carinho e conforto. Obrigada por não me deixar desistir, por sempre me estender a mão e acreditar em mim. Obrigada por seres orientadora, professora e amiga. Que Deus a abençoe sempre.

Aos membros da banca, Dr^a. Rosselei Caiél da Silva, Prof^a. Dr^a. Jessica Hoffmann, Prof^a. Dr^a. Simone Noremborg Kunz, por contribuírem com este trabalho. As sugestões de vocês foram de grande importância.

Às amigas que fiz no CEPARC, Bárbara Diana Jänisch, Lisandra Kopp Cuti, Marlos Zorzella Fontana, Robson Wouters e Júlia Paula Neu, obrigada pelos momentos de estudo, ensinamentos, pelos momentos de descontração e carinho. Obrigada pelas risadas e alegria contagiante. Vocês estarão sempre em meu coração. Que nossa *playlist* do #sextounolab jamais seja esquecida!

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS, EMPREGANDO CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS, EM ERVA-MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) PRODUZIDA NA AMÉRICA DO SUL

AUTORA: Priscila Dotto Rosa Balbinot
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ionara Regina Pizzutti

Os fungicidas da classe dos ditiocarbamatos (DTC) apresentam características particulares relacionadas à alta instabilidade quando em presença de umidade e oxigênio, necessitando assim, de preparo especial da amostra a ser trabalhada, bem como desenvolvimento e validação de método individual para análise dos compostos gerados. Neste trabalho, um método individual para determinação de DTC em erva-mate foi miniaturizado e validado, com base na hidrólise ácida da amostra em presença de cloreto de estanho II (SnCl_2), purificação do extrato e posterior análise do dissulfeto de carbono (CS_2) gerado utilizando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography–mass Spectrometry*). As condições de otimização foram avaliadas através da miniaturização no processo de extração das amostras, com base na quantidade de amostra, volume de solvente extrator e solução ácida e o tempo de agitação durante o banho quente. Essas condições foram comparadas às já descritas na literatura. Por se tratar de uma matriz complexa, foi realizada uma etapa de purificação do extrato através do processo de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) utilizando como sorventes amina primária e secundária (PSA, do inglês, *Primary Secondary Amine*) e carvão grafitizado (GCB, do inglês *Grahitized Carbon Black*) além de sulfato de magnésio (MgSO_4) como secante. Para o estudo de validação do método, foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito matriz, limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*), precisão e exatidão. Dentro dos resultados obtidos no estudo de validação, o LOD foi estabelecido em $0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ CS}_2$, e o LOQ $0,1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$. O coeficiente de determinação (r^2) obtido através das curvas analíticas foi $r^2 > 0,99$. Os resultados obtidos através do estudo de precisão foram valores aceitáveis com $\text{RSD}_r \leq 11,2\%$ e $\text{RSD}_{pi} \leq 19,4\%$ e, assim como as recuperações, na faixa de 71,3 a 118,2%. O efeito matriz calculado foi de -5,1%, estando dentro dos valores aceitáveis para determinação de contaminantes em níveis traço. Os parâmetros de validação estão em acordo com descrito no DG-SANTE (2019) e, portanto, apropriados à determinação de DTC em erva-mate. O método validado mostrou ser mais rápido, simples e barato quando comparado ao método tradicional descrito na literatura e bastante eficaz para determinação de DTC em erva-mate. O método miniaturizado foi aplicado a 58 amostras produzidas e comercializadas no sul do Brasil, 3 produzidas no Brasil e exportadas ao Uruguai, e 4 produzidas na Argentina e comercializadas no Brasil. Das 65 amostras de erva que foram utilizadas para o estudo de monitoramento, 33,8% com níveis detectáveis de CS_2 , sendo que, 14% apresentaram níveis de concentração maior que o LOQ.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa. Ditiocarbamatos. Erva-mate. Fungicidas.

ABSTRACT

DETERMINATION OF DITHIOCARBAMATES RESIDUES, USING GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS SPECTROMETRY, IN YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) PRODUCED IN SOUTH AMERICA

AUTHOR: Priscila Dotto Rosa Balbinot
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Ionara Regina Pizzutti

Dithiocarbamates (DTC) fungicides have characteristics related to high instability when in the presence of moisture and oxygen, thus requiring special preparation of the sample to be worked on, as well as the development and validation of an individual method for analysis of the generated compounds. In this work, an individual method for the determination of DTC in yerba mate was miniaturized and validated, based on the acid hydrolysis of the sample in the presence of tin chloride II, purification of the extract and subsequent analysis of the carbon disulfide (CS₂) generated using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The optimization conditions were evaluated through miniaturization in the sample extraction process, based on the amount of sample, volume of extracting solvent and acid solution and the stirring time during the hot bath. These conditions were compared to those already described in the literature. As it is a complex matrix, an extract purification step was carried out through the dispersive solid phase extraction (d-SPE) process using primary and secondary amine (PSA) as sorbents, graphitized carbon (GCB) in addition to magnesium sulfate (MgSO₄) as a drier. For the method validation study, the following parameters were evaluated: linearity, matrix effect, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), precision and accuracy. Within the results obtained in the validation study, the LOD was established at 0.05 mg L⁻¹ CS₂, and the LOQ at 0.1 mg kg⁻¹ CS₂. The coefficient of determination (r^2) obtained through the analytical curves was $r^2 > 0.99$. The results obtained through the precision study were acceptable values with RSDr $\leq 11.2\%$ and RSDpi $\leq 19.4\%$ and, as well as the recoveries, in the range of 71.3 to 118.2%. The matrix effect calculated was -5.1%, which is within acceptable values for determining trace levels of contaminants. The validation parameters are in accordance with those described in DG-SANTE (2019) and, therefore, suitable for the determination of DTC in yerba mate. The validated method proved to be faster, simpler, and cheaper when compared to the traditional method described in the literature and quite effective for determining DTC in yerba mate. The miniaturized method was applied to 58 samples produced and sold in southern Brazil, 3 produced in Brazil and exported to Uruguay, and 4 produced in Argentina and sold in Brazil. Of the 65 herb samples that were used for the monitoring study, 33.8% had detectable levels of CS₂, and 14% had concentration levels higher than the LOQ.

Keywords: Gas chromatography. Dithiocarbamates. Yerba mate. Fungicides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Interação entre os sítios ativos no interior do injetor do cromatógrafo com analito alvo e os componentes da matriz.....33
- Figura 2- Hidrólise ácida da molécula de tiram formando amina e CS₂.....38
- Figura 3- Maiores países produtores, exportadores e consumidores de erva-mate da América do Sul (A) e regiões de cultivo de erva-mate no Brasil (B).....52
- Figura 4- Cromatograma com tempo de retenção da solução analítica de CS₂ 1 ppm.....55
- Figura 5- Cromatograma da avaliação de interferentes com mesmo tempo de retenção do CS₂ em (A) solução analítica de CS₂ 1 ppm; (B) branco solvente e (C) branco matriz.....55
- Figura 6- Teste realizado para o preparo de 10 g de erva-mate com volumes de água de A) 10 mL; B) 15 mL; C) 20 mL; D) 25 mL e E) 30 mL.....57
- Figura 7- Representação esquemática do método tradicional para determinação de CS₂ em frutas e vegetais e o método otimizado proposto para determinação de CS₂ em erva-mate com as respectivas modificações, indicadas pelas cores.....59
- Figura 8- Comparação entre os extratos de erva-mate (A) sem etapa de purificação; (B) 25 mg de PSA + 2,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄; (C) 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄; (D) 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄.....62
- Figura 9- Cromatograma obtido para os extratos de erva-mate fortificados a 0,9 mg kg⁻¹ CS₂ após etapa de purificação dos extratos por d-SPE empregando (A) 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄; (B) 25 mg de PSA + 2,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄ e (C) 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄.....63
- Figura 10- Curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade para soluções analíticas preparadas em solvente e em extrato branco de erva-mate, na faixa linear de concentração de 0,05 a 2,0 mg L⁻¹ CS₂65
- Figura 11- Cromatograma com LOD (A) e LOQ (B) do método.....68

Figura 12- Resultados do monitoramento obtidos para os quatro tipos de erva-mate utilizadas neste estudo quanto a presença de resíduos de DTC.....	70
Figura 13- Espectro de massas dos íons monitorados na faixa de interesse de 76 e 78 m/z	71
Figura 14- Cromatogramas das amostras de erva-mate comercial com níveis quantificáveis de CS ₂ da (A) Argentina (0,92 mg kg ⁻¹ CS ₂), (B) Brasil (0,73 mg kg ⁻¹ CS ₂), (C) Uruguai (0,59 mg kg ⁻¹ CS ₂), (D) erva-mate correspondente ao LOQ 0,1 mg kg ⁻¹ CS ₂	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Classificação toxicológica e cor apresentada nos rótulos dos frascos de pesticidas para cada classe.....	21
Tabela 2– Ditiocarbamatos de uso permitido no Brasil, subgrupos e fórmulas estruturais de cada um deles.....	28
Tabela 3– Concentração das soluções de CS ₂ para a curva analítica e as concentrações das soluções de partida.....	45
Tabela 4– Testes de purificação dos extratos com suas respectivas recuperações...	61
Tabela 5– Média das áreas e seus respectivos RSD% obtidos após injeção (n=7) das soluções das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato branco de erva-mate, nas concentrações de 0,05 a 2,0 mg L ⁻¹ CS ₂	66
Tabela 6– Recuperações médias, precisão em termos de repetitividade (RSD _r), e de precisão intermediária (RSD _{pi}) obtidos para a fortificação das amostras de erva-mate com tiram nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 mg kg ⁻¹ CS ₂ , realizadas por dois analistas diferentes com intervalo de tempo de 15 dias.....	69
Tabela 7– Níveis de concentração de CS ₂ obtidos após monitoramento em amostras de erva-mate produzidas no Brasil e Argentina e comercializadas no Brasil e Uruguai.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCPR	do inglês <i>Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues</i>
DAD	Detector por Arranjo de Diodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DRfA	Dose de Referência Aguda
d-SPE	do inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
ECD	Detecção por Captura de Elétrons, do inglês <i>Electron Capture Detection</i>
EI	do inglês <i>Electron Impact</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>
FID	Detector por Ionização em chama, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
FPD	Detector Fotométrico de Chama, do inglês <i>Flame Photometric Detection</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography–mass spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
MAE	do inglês <i>Microwave Assisted Extraction</i>
MMR	Método Multirresidual
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PAM	Produção Agrícola Mundial
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal
PND	Plano Nacional do Desenvolvimento
Q	Concentração
r^2	Coefficiente de determinação
R%	Percentual de recuperação
RSD	Desvio Padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RSD _r	Repetitividade
RSD _{pi}	Precisão Intermediária
SANTE	Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Sante et Protection des Consommateurs</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>Standard Deviation</i>
SPE	do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>
s	Estimativa do desvio padrão absoluto
x	concentração do analito em estudo

Xm
y
WHO

médias das medidas em replicatas
resposta medida pelo instrumento
do inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	ERVA-MATE.....	16
2.1.1.	Áreas de ocorrência natural, produção e consumo	17
2.1.2.	Composição fitoquímica da erva-mate	18
2.2.	PESTICIDAS	20
2.2.1.	História dos pesticidas	21
2.2.2.	Contaminação por pesticidas.....	22
2.2.3.	Utilização de pesticidas nas culturas de erva-mate	24
2.3.	DITIOCARBAMATOS	26
2.3.1.	Toxicidade.....	28
2.4.	LIMITES MÁXIMO DE RESÍDUOS (LMR).....	29
2.5.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	30
2.5.1.	Linearidade, curva analítica, faixa linear e faixa linear de trabalho	31
2.5.2.	Efeito Matriz	32
2.5.3.	Limite de detecção e de quantificação	34
2.5.4.	Exatidão	34
2.5.5.	Precisão.....	36
2.6.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS	37
2.7.	PURIFICAÇÃO DE EXTRATOS E PRINCIPAIS SORVENTES	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1.	INSTRUMENTAÇÃO	43
3.2.	GÁS UTILIZADO	44
3.3.	REAGENTES E SOLVENTES.....	44
3.4.	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	44
3.4.1.	Preparo das soluções estoque de tiram – Ensaio de frotificação e recuperação	44
3.4.2.	Preparo das soluções analíticas - Curva analítica.....	44
3.4.3.	Preparo da solução ácida de cloreto de estanho	45
3.5.	AVALIAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BRANCO DE ERVA- MATE.....	46

3.6.	ANÁLISE DOS SOLVENTES E REAGENTES	46
3.7.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	46
3.7.1.	Testes para o preparo da amostra	46
3.7.2.	Procedimento de extração	47
3.7.3.	Testes para purificação do extrato	47
3.8.	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	48
3.9.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	48
3.9.1.	Linearidade e efeito matriz	49
3.9.2.	Limite de detecção e limite de quantificação	50
3.9.3.	Exatidão e precisão	50
3.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3.11.	LIMPEZA DO MATERIAL UTILIZADO.....	51
3.12.	ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
4.1.	AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA.....	54
4.2.	ANÁLISE DOS SOLVENTES E REAGENTES	55
4.3.	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS	56
4.4.	PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS.....	60
4.5.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	65
4.5.1.	Linearidade e efeito matriz	65
4.5.2.	Limite de detecção e limite de quantificação	67
4.5.3.	Precisão e exatidão	68
4.5.4.	Aplicação do método em amostras comerciais.....	69
5	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	APÊNDICE A – CÁLCULO PARA O PREPARO DA SOLUÇÃO DE CLORETO DE ESTANHO A 1,5% EM ÁCIDO CLORÍDRICO 4 MOL L⁻¹	86
	APÊNDICE B – CÁLCULO DO FATOR DO MÉTODO	87

1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são substâncias utilizadas com a finalidade de garantir ao agricultor um aumento na produção agrícola, mediante ao controle de pragas, doenças, plantas e animais indesejáveis, bem como na conservação dos produtos durante a estocagem até a distribuição ao consumidor final.

Sem dúvidas, os pesticidas são ferramentas poderosíssimas e com grande capacidade em auxiliar a agricultura, por outro lado, deve-se ter atenção à forma correta de utilização dessas substâncias evitando sua propagação ao meio ambiente, por meio de contaminação dos solos, água e, até mesmo através do ar. Além disso, deve-se atentar à segurança alimentar, não apenas pela qualidade dos alimentos que chegam à mesa do consumidor mas, principalmente, através do controle dos resíduos de pesticidas presentes nestes alimentos, para que estes estejam em acordo com o Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecidos e sua aplicação respeite, assim, os níveis de resíduos que não tragam riscos à saúde do consumidor (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; PERES; MOREIRA, 2003).

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com sua utilização, ou seja, o organismo alvo, assim sendo, inseticidas, herbicidas, fungicidas, fumigantes, acaricidas, dentre outros (RIBEIRO et al., 2008).

Na classe dos fungicidas, encontram-se os DTC. Estes são compostos organossulfurados, empregados mundialmente devido a sua eficiência no controle de vários fungos e bactérias, podendo ser aplicado a uma grande variedade de culturas, baixo custo, baixa toxicidade aguda a mamíferos e ao meio ambiente (MOZZAQUATRO et al., 2019; VARELI et al., 2018a). No Brasil, atualmente, os cinco ditiocarbamatos que estão registrados para uso em culturas são: mancozebe, metam, metiram, propinebe e tiram, sendo que, o mancozebe ocupa a terceira posição no destaque dos pesticidas mais utilizados no Brasil, atrás dos herbicidas 2,4-D e glifosato (ANVISA, 2019a; IBAMA, 2019).

Esta classe de fungicidas exige cuidados ao manuseio e ao consumo dos alimentos submetidos a tratamentos com eles, devido a resíduos metabólicos tóxicos, principalmente a etilenotioureia (ETU), no caso do mancozebe, pertencente à subclasse dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC), o qual apresenta reações adversas à saúde humana (BALARDIN, 2017).

São compostos com elevada instabilidade quando em contato com umidade e oxigênio e, além disso, alguns deles como mancozebe, metiram e propinebe são praticamente insolúveis em solventes orgânicos, metam sódico solúvel em metanol e tiram solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Os DTC são também agentes complexantes. Por essas características necessitam de métodos individuais de análise e, portanto, não podem ser determinados por métodos multirresiduais (BALARDIN, 2017; GRIMALT; DEHOUCK, 2016).

Os métodos para determinação de DTC baseiam-se na quantificação de CS₂ obtido após etapa de digestão ácida da amostra, e analisado através de GC-MS ou através de Espectrofotometria UV-Visível, estas destacam-se por apresentarem boa detectabilidade para a determinação desses compostos (MUJAWAR et al., 2014; ROSA; MARQUES; PÉREZ, 2011; VRYZAS; PAPADAKIS; MOURKIDOU, 2002).

A erva-mate, utilizada como matriz neste estudo, é um produto comercial de uso bastante popular na América do Sul, que vem ganhando espaço no cenário mundial por suas diversas propriedades que trazem benefícios à saúde, como estimulante, antioxidante, diurético, dentre outros. Devido a isso e ao consequente aumento na produção e qualidade do produto final, mesmo que não se tenham dados acerca da adição de pesticidas nessa cultura, faz-se necessário esse estudo, uma vez que, na literatura, não foram encontrados métodos para determinação de pesticidas em erva-mate, sobretudo a classe dos ditiocarbamatos.

Atualmente, a legislação brasileira não prevê adição de pesticidas no cultivo de erva-mate, porém, como qualquer outra cultura, esta também está exposta a agentes que podem danificar a produção e trazer prejuízos ao produtor.

Em especial, aqui será abordado o fungicida tiram da classe dos ditiocarbamatos, utilizando procedimento miniaturizado para extração dos compostos em erva-mate, com etapa de purificação dos extratos e análise por GC-MS.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi a otimização do método tradicional de extração para a matriz estudada e validação do método de Cromatografia Gasosa empregando como detector o Espectrômetro de Massas para determinação de resíduos de ditiocarbamato em 65 amostras comerciais de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) de diferentes tipos (tradicional, artesanal, nativa, *blend*), produzidas e comercializadas na América do Sul, nos estados do sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Uruguai e Argentina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ERVA-MATE

Erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., uma planta originária da América do sul, das regiões de clima subtropical e temperado, pertencente à família das *Aquifololeáceas*, foi assim classificada pelo naturalista francês Auguste de Saint-Hilaire (1779-1853), em sua viagem ao Brasil, em meados do século XIX, para estudos sobre a fauna e a flora local. Ao retornar à França, em 1822, Saint-Hilaire registrou seus estudos no Museu de História Natural de Paris. As informações deste estudo, indicam que o material analisado foi coletado em regiões próximas à Curitiba, embora a expressão “*paraguariensis*” seja referente a regiões do Paraguai, onde também foram encontrados materiais de mesma espécie (FERLA; DA SILVA; JOHANN, 2018; OLIVEIRA; ROTTA, 1985).

A espécie que, na época, chamou a atenção do naturalista francês, desde muito tempo atraía a atenção de povos indígenas que habitavam a região que compreende à Argentina, Paraguai, Uruguai e sul do Brasil. Esses povos consumiam a erva-mate por acreditar que a planta era rica em propriedades farmacológicas. O hábito de beber a infusão das folhas de erva-mate permanece até os dias atuais, evoluindo para uma bebida que representa um modo de socialização, tornando-se parte da rotina diária de várias sociedades modernas da América do Sul (BRACESCO et al., 2011). Além do tradicional chimarrão, a erva-mate é também, matéria-prima para vários outros produtos que trazem benefícios à saúde.

A exploração da erva-mate foi um dos fatores que motivou o desenvolvimento de diversas regiões do sul do Brasil, como Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além de Mato Grosso do Sul, sendo que, atualmente, a cultura da erva-mate destaca a economia de vários municípios da porção sul, constituindo o principal produto não madeireiro do agronegócio florestal destas regiões, representando importante papel econômico, social e ecológico (EMBRAPA, 2019).

2.1.1 Áreas de ocorrência natural, produção e consumo da erva-mate

A ocorrência natural da erva-mate no Brasil, abrange uma área que compreende aos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, e em menor quantidade, no sul do Mato Grosso do Sul (LION *et al.*, 2017). Além do Brasil, a planta também é nativa na Argentina, nas províncias de Misiones, Corrientes e Tucumã, ao longo do Rio Paraná e seus afluentes, estendendo-se às regiões do Paraguai (EMBRAPA, 2019; VIEIRA, 2012).

Através de costumes dos povos indígenas, o consumo da erva-mate espalhou-se pelas várias regiões da América do Sul e, a partir de seus costumes o uso da erva-mate passou a ser difundido tornando-se popular, transformando-se em um vínculo sócio-histórico, resultando em uma cadeia de produção e consumo de erva-mate. (FERLA; DA SILVA; JOHANN, 2018; ROSA; OSÓRIO SILVA, 2019).

A Resolução nº 277 de 22 de setembro de 2005, aprova, em seu art. 1º o “Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-mate e Produtos Solúveis” no qual estabelece que a erva-mate, para o consumo na forma de chimarrão ou tererê, deve ser o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hil, obtido através do processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo dessas bebidas, podendo ser adicionado de açúcar (ANVISA, 2005).

Porém, o uso da erva-mate não se restringe apenas ao consumo na forma de bebida. Devido as suas propriedades nutricionais e medicinais, torna-se matéria-prima para uma diversidade de produtos, que vão desde bebidas variadas, produtos alimentícios, cosméticos, produtos de higiene e farmacêuticos (DALLABRIDA *et al.*, 2016).

Com a crescente aplicação na indústria, a erva-mate vem alcançando espaço em diferentes áreas de consumo, com produtos diversificados à base dessa matéria-prima, viabilizando a expansão e inovação do segmento ervateiro, abrangendo diferentes regiões e culturas, variando o público-alvo e, deste modo, favorecendo o aumento da lucratividade e da cadeia produtiva ervateira (DALLABRIDA *et al.*, 2016).

Nesse contexto, foi aprovada em 3 de janeiro de 2019 a Lei nº 13.791, que institui a Política Nacional da Erva-Mate, a qual, em seus artigos, cita como objetivos o incentivo à produção sustentável, bem como a potencialização para processamento de novos produtos, com o propósito de elevar o padrão de qualidade, incentivando e

apoiando o comércio interno e externo de erva-mate e de seus produtos derivados. Além disso, visa o amparo aos agricultores familiares, pequenos e médios produtores rurais, através de linhas de crédito e financiamento em conjunto a assistência técnica e extensão rural. Outro ponto favorável dessa lei, é o apoio à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico, o que favorece às inovações nesta área, fortalecendo e impulsionando a produção e consumo da erva-mate (BRASIL, 2019).

Ao comparar, em números, a produção de erva-mate nos países da América do Sul no ano de 2018, observa-se que a produção, esteve presente, em maior parte no Brasil com 939.580 toneladas de erva-mate (IBGE, 2018), seguido pela Argentina com 809 mil toneladas (INYM - INSTITUTO NACIONAL DE LA YERBA MATE, 2018) e por último, Paraguai com 116.192 toneladas (DGEEC – DIRECCIÓN GENERAL DE ESTADÍSTICAS, 2018).

De acordo com dados de 2020 fornecidos pelo IBGE, o Brasil é o maior produtor de erva-mate, contando com a produção de 527.546 mil toneladas de erva-mate neste mesmo ano, sendo o estado do Paraná o maior produtor, com 228.382 mil toneladas, seguido do Rio Grande do Sul, com 214.552 mil toneladas (IBGE, 2020).

Mesmo com o baixo amparo tecnológico e a resistência dos produtores em aceitar e adaptar suas culturas à modernização das técnicas de manejo, o que representa certa barreira ao desenvolvimento dos sistemas de produção nacional, o setor ervateiro apresenta mudanças e, ainda que o avanço no beneficiamento seja escasso, gera empregos e novos negócios, trazendo ao setor novos produtores, com propostas mais inovadoras, adotando técnicas mais modernas e com uma visão bem mais organizada, visando o mercado internacional (MARONI, 2019).

2.1.2 Composição fitoquímica da erva-mate

Os benefícios da erva-mate são atribuídos a sua composição química, propriedades nutritivas, bem como ao processo de produção da erva-mate, o qual pode influenciar na composição final do produto. Por esse motivo, não se deve atribuir o uso da erva-mate apenas ao consumo do chimarrão pois existe um grande potencial que, quando bem aplicado, pode se tornar um aliado à saúde. Por tanto, essa complexa composição química pode ser um ponto favorável a ser explorado.

A utilização da erva-mate para produção de bebidas, cosméticos, medicamentos entre outros, deve-se as suas propriedades diurética, estimulante do

sistema nervoso central, antioxidante, antibacteriana além de regular diversas outras funções do organismo humano, como por exemplo, a melhora no processo digestivo e auxiliar na diminuição dos níveis de triglicérides, colesterol e glicose (COLPO, 2012; QUEIROZ RIBEIRO et al., 2012).

Entre as substâncias químicas presentes na erva-mate estão os ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos, flavonoides, metilxantinas, compostos fenólicos e polifenólicos, proteínas, saponinas, taninos e terpenóides. Além de todas essas classes, ainda estão presentes minerais e vitaminas, como as vitaminas A, B1, B2, B6 e C, e os minerais alumínio, cálcio, cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco (BERTÉ, 2011; FREITAS et al., 2011).

Dentre todos estes componentes, os que mais ganham destaque por agregar maior valor e característica aos produtos derivados da erva-mate são as metilxantinas, os fenóis e polifenóis (COLPO, 2012).

As metilxantinas encontradas na erva-mate são a cafeína, a teobromina e a teofilina, esta última em menor quantidade (HENRIQUE, 2018). Estas substâncias conferem à erva-mate propriedades estimulantes, principalmente a cafeína, a qual possui efeito mais potente (CASTALDELLI et al., 2011; ESMELINDRO et al., 2002).

As metilxantinas agem no sistema nervoso central, sistema cardiovascular, cardiorrespiratório, digestivo, renal entre outros. Quando em excesso no organismo, as metilxantinas podem causar reações transitórias indesejáveis, como tremores, agitação, insônia e distúrbios gastrointestinais, levando até mesmo a quadros de ansiedade (COLPO, 2012; FREITAS et al., 2011).

Outra substância presente na erva-mate é a clorofila, a qual confere pigmentação verde a organismos fotossintéticos.

Essa composição fitoquímica confere à matriz em estudo a característica de matriz complexa, onde a presença de inúmeros compostos tornam-se fatores interferentes durante a análise de pesticidas, principalmente quando se trabalha com análise a nível traço, precisando submeter a amostra em estudo a etapas de purificação de seus extratos, a fim de eliminar ou minimizar o efeito destes interferentes sob os resultados. A discussão com relação a etapa de purificação de matrizes complexas, bem como os efeitos de interferentes durante as análises serão abordadas ao longo deste estudo.

2.2. PESTICIDAS

Existem inúmeras denominações os agrotóxicos, pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas, agroquímicos, fitossanitários, entre outras. Estas substâncias, independente de sua nomenclatura, são utilizadas com o objetivo de aumentar a produção através do controle, prevenção ou eliminação de pragas e doenças que atacam a produção agrícola, bem como de espécies indesejáveis de plantas ou animais que possam vir a causar danos seja à produção, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira, ração animal ou que seja administrado à animais de criação na prevenção e controle de ectoparasitas (PERES; MOREIRA, 2003; SILVA, 2011). O mecanismo de ação dos pesticidas está no bloqueio de processos metabólicos vitais aos organismos aos quais são tóxicos.

O termo pesticida obedece a dois critérios principais necessários a sua classificação: organismo alvo e classe química a qual pertence. Em relação ao organismo alvo, os pesticidas classificam-se em inseticidas, herbicidas, fumigantes, algicidas, fungicidas, nematocidas, moluscicidas, acaricidas, além de reguladores de crescimento, desfoliantes e dissecantes. No que se refere ao grupo químico, podem pertencer a classe dos benzimidazóis, bupiridinas, carbamatos, ditiocarbamatos, fosfonatos, organoclorados, organofosforados, piretróides, triazinas, entre outros (RIBEIRO et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a orientação sobre a classificação recomendada para pesticidas com relação ao seu grau de toxicidade, traz como base de classificação a distinção entre as formas mais e menos perigosas de pesticidas relacionando a toxicidade do composto com sua formulação. Ainda de acordo com a OMS, esta classificação baseia-se na toxicidade aguda por via oral ou dérmica quanto ao seu poder de causar danos em relação à Dose Letal (DL_{50}), que é uma estimativa da quantidade, em mg de tóxico, por kg de peso corporal, necessário para matar 50% de uma população de animais em teste, em um curto espaço de tempo (OMS, 2019).

No Brasil, a responsabilidade sobre as orientações, classificação toxicológica e precauções à saúde humana contidas em rótulos e bulas de pesticidas é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual, sob regulamento descrito na Resolução de nº 296, de 29 de julho de 2019, estabelece que junto aos rótulos e bulas do produto comercial deve haver uma faixa colorida com a cor da respectiva classe

toxicológica junto com frases de perigo e palavras de advertência, bem como a forma correta de uso e manipulação do produto. Além disso, recomenda-se também, que tenham informações com relação a dose letal de cada classe (ANVISA, 2019b). Na Tabela 1, estão representadas as classificações toxicológicas conforme o produto formulado e a respectiva cor, segundo a qual se refere a classificação quando apresentada nas embalagens dos mesmos.

Tabela 1: Classificação toxicológica e cor apresentada nos rótulos dos frascos de pesticidas conforme o produto formulado.

Classificação	Toxicidade
Classe I - Vermelha	Extremamente Tóxico
Classe II - Vermelho	Altamente Tóxico
Classe III - Amarelo	Moderadamente Tóxico
Classe III - Azul	Pouco Tóxico
Classe IV - Azul	Improvável de causar dano agudo
Não Classificado - Verde	Produto não classificado

Fonte: ANVISA, 2019.

Conforme o produto formulado, os DTC tem classificação toxicológica II para metam-sódico e tiram, e classificação toxicológica III para propinebe, metiram e mancozebe, de acordo com monografias da ANVISA (ANVISA, 2021; BALARDIN, 2017).

2.2.1 História dos pesticidas

Desde muito tempo o homem procura métodos de controle às pragas que assolam as produções agrícolas. Com o passar dos anos e o aumento da produção agrícola com conseqüente aumento populacional, fez-se necessário que o homem desenvolvesse métodos mais eficazes de prevenção e combate a essas pragas afim de melhorar a qualidade de vida, a produtividade e garantir melhores resultados atendendo assim a demanda populacional.

Os pesticidas começaram a ser utilizados no Brasil em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas. A partir de 1960 passaram a ser utilizados na agricultura (OPAS, 1997; WAICHMAN; EVE; NINA, 2007). O Governo

Federal Brasileiro, através do Plano Nacional do Desenvolvimento (PND), em 1975 investiu na implementação da indústria de pesticidas, proporcionando ao Brasil a abertura ao comércio destes agentes, condicionando o agricultor a comprá-los com recursos do crédito rural, determinando a inclusão de uma cota definida para cada financiamento requerido (OPAS, 1997).

A fim de minimizar os riscos associados aos pesticidas, em 1989, o Governo Federal Brasileiro publicou a lei 7.802, estabelecendo várias condições e critérios para uso, venda, transporte, importação, comercialização e rotulagem de pesticidas. Esta lei também forçou os agricultores a adquirirem uma prescrição para obtenção legal destes compostos. Esta iniciativa foi ineficaz, devido à fraca aplicação e monitoramento, principalmente em áreas mais remotas do Brasil, onde muitos agricultores tinham como conhecimento, apenas as informações contidas nos rótulos, como dosagens, riscos, toxicidade e cuidados no manuseio (WAICHMAN; EVE; NINA, 2007).

A partir daí, verifica-se uma crescente incorporação de novos compostos, cada vez mais eficazes e seletivos, principalmente devido à resistência dos organismos a esses compostos após algum tempo de contato, tornando-se menos efetivos e, muitas vezes, sem atividade alguma sobre o organismo alvo.

Os primeiros DTC foram sintetizados a partir de uma monoamina e CS₂, utilizados com o objetivo de acelerar processos de vulcanização da borracha. Com o passar dos tempos e avanços químicos, estes compostos deram origem aos primeiros fungicidas derivados de DTC, sendo tiram o primeiro a ser patenteado, em 1934 por Tisdale e Williams, e comercializado pela primeira vez em 1940, após Muskett e Colhoun, demonstrarem a eficácia destes compostos para o tratamento de sementes. Em 1950, após estudos sobre estes compostos com relação a sua estrutura e eficácia frente às culturas e desenvolvimento de novos compostos, DuPont patenteou o manebe, do grupo dos EBDC e, já em 1961, Rohm & Haas, desenvolveu aquele que se tornaria o DTC mais comercializado mundialmente de todos os EBDC, o mancozebe (BALARDIN, 2017; MELLO, 2014).

2.2.2 Contaminação por pesticidas

O uso indiscriminado e, muitas vezes, a falta de orientações sobre o correto manuseio destes produtos, bem como a falta de equipamentos de proteção individual

necessários à manipulação dos pesticidas, resultam em ações negativas tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. Portanto, ao mesmo tempo que os pesticidas são insumos agrícolas, são também produtos perigosos, exigindo uma rigorosa regulamentação por parte dos órgãos competentes.

Devido a capacidade de alguns pesticidas serem bioacumuláveis, esses se tornam perigosos à saúde humana e ao meio ambiente. São compostos potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar problemas hepáticos, problemas respiratórios graves, câncer, aborto, infertilidade, teratogenicidade, além de problemas no desenvolvimento intelectual e físico de crianças, diabetes e distúrbios neurodegenerativos (SAMSIDAR; SIDDIQUEE; SHAARANI, 2018). Os impactos sobre o meio ambiente incluem contaminação das águas, das plantas, do solo, do ar, além da diminuição no número de organismos vivos e aumento na resistência das pragas. (MORAES, 2019).

A interação dos pesticidas com o meio ambiente, como retenção, transporte e transformação, dependem de suas características físico-químicas, quantidade e frequência de uso, bem como as condições meteorológicas, as quais determinarão o destino dos pesticidas no meio ambiente. Tem-se, por exemplo, perdas por volatilização onde o pesticida é transferido do solo ou da superfície da planta para a atmosfera, podendo ser transportado a longas distâncias sendo, novamente, depositado nas superfícies, contaminando o meio ambiente e afetando outros organismos (BORSOI et al., 2014).

Quanto aos riscos à saúde, deve-se considerar as formas de exposição a estes agentes, que podem ocorrer por inalação, contato dérmico ou oral durante manipulação dos pesticidas, neste caso o contato é direto, ou, através do meio ambiente, onde a contaminação se dá por meio da dispersão da pulverização destes compostos atingindo a população, no caso de contato indireto (OPAS, 1997). Apesar de toda a população ser suscetível ao contato e contaminação por pesticidas, cabe ressaltar que, os grupos mais expostos a estas substâncias são os agricultores e trabalhadores das indústrias de pesticidas, pois estão em contato direto e contínuo durante aplicação e manipulação destes compostos (PERES; MOREIRA, 2003).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS), cerca de 193 mil pessoas no mundo, perdem a vida todos os anos, em decorrência de exposição à pesticidas e outras substâncias químicas, por isso, é necessário que se

tenha atuação conjunta dos setores da saúde, agricultura e meio ambiente no processo de regulamentação dos pesticidas (BOJANIC, 2018).

No Brasil, existem dois programas nacionais de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), coordenado pela ANVISA, e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

De acordo com relatório divulgado pela ANVISA, em 2019, das 4.616 amostras analisadas de 14 alimentos de origem vegetal coletadas entre 2017-2018, constatou-se que em 23% dessas amostras analisadas foram encontrados resíduos de pesticidas acima do LMR, além disso, sob o total de amostras analisadas, foram pesquisados até 270 ingredientes ativos de pesticidas, onde 122 ingredientes ativos diferentes foram detectados, dos quais imidacloprido, tebuconazol e carbendazim apresentaram o maior índice de detecção. Do total de ingredientes ativos, 148 não foram detectados. Com relação aos DTC, foram detectados níveis em culturas onde o uso não é autorizado, como a goiaba, e com concentrações acima do LMR, como a beterraba (ANVISA, 2019c).

Na relação dos 10 ingredientes ativos mais detectados no Brasil, nos anos de 2017-2018, os DTC ocupam o 5º lugar, e o ingrediente ativo que representa esta posição é o mancozebe, em 3º lugar como fungicida da classe dos DTC mais comercializado no Brasil e detentor do maior número de culturas com uso permitido (ANVISA, 2019c).

2.2.3 Utilização de pesticidas nas culturas de erva-mate

A erva-mate, assim com todas as outras culturas, não está livre ao ataque de pragas e plantas invasoras que possam vir a prejudicar a produtividade, interferindo na renda do produtor a partir da diminuição da lucratividade. O aumento no consumo da erva-mate faz com que cresça cada vez mais o interesse dos ervateiros pelo uso dos pesticidas, pois economicamente esta aplicação seria viável, pois reduziria as perdas devido ao ataque de pragas e outras adversidades do meio (EMBRAPA, 2016; MARONI, 2019).

Para tanto, deve-se ter o máximo de cuidado no que se refere a aplicação de pesticidas para controle de pragas em erva-mate. Tendo em vista o elevado consumo

de erva-mate, para que se obtivesse uma aplicação segura de pesticidas, o uso estaria condicionado a aplicação de produtos com baixa toxicidade para homens e animais, de baixo impacto ambiental e que ao sofrerem reações químicas no meio ambiente não gerassem subprodutos tóxicos, sem deixar resíduos de espécies no produto final, ou seja, de baixo poder residual (DANIEL, 2009).

De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT), até o momento não existem pesticidas registrados para o controle de doenças, pragas e plantas indesejadas para a cultura da erva-mate (MAPA, 2019). O AGROFIT é uma ferramenta online, de consulta pública, composta por um banco de dados contendo informações sobre pesticidas e afins que possuem registro junto ao MAPA, contendo informações da ANVISA e do IBAMA. Esta ferramenta garante ainda ao produtor acesso às informações corretas quanto ao uso adequado e seguro dos pesticidas, a fim de evitar o uso incorreto.

Embora o uso de DTC não seja autorizado nas culturas de erva-mate e, por isso, a ANVISA não determine LMR para esta cultura, outras culturas têm seu uso permitido com concentrações de LMR expresso em termos de mg kg^{-1} de CS_2 , variando entre 0,1 e 4,0 mg kg^{-1} em termos de CS_2 (ANVISA, 2021).

Apesar de não terem registros para o uso de pesticidas para as culturas de erva-mate, alguns produtores utilizam ou ao menos já utilizaram destes produtos com o objetivo de auxiliar no combate a alguns insetos, fungos e plantas indesejadas que venham a atacar as plantações (DANIEL, 2009; MEDRADO; MOSELE, 2004; PAULA et al., 2018). Por este motivo, os profissionais da área que fazem uso destes produtos, devem estar cientes de que ao fazer uso de pesticidas é preciso estar em acordo com a legislação vigente, e atentar ao rótulo ou bula do produto, sempre orientados de que nenhum pesticida deverá ser adquirido ou utilizado sem um correto receituário expedido por agrônomo responsável, no qual devem constar orientações para o uso correto, especificações do produto, doses, e consequências do uso indevido (DANIEL, 2009).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em conjunto com alguns parceiros, desenvolveu o Sistema Erva 20, um guia com orientações aos produtores de erva-mate, contendo informações que contribuem para o aumento e sustentabilidade dos ervais, a fim de auxiliar os produtores que ainda mantêm em suas práticas de produção de erva-mate costumes antigos de manejo, ou que não tenham

conhecimentos sobre a identificação e correto controle de pragas, doenças e plantas invasoras. Este sistema não é recomendado para o modo de produção do sistema extrativo, o qual possui legislação própria e, onde a única interferência é a colheita direto das florestas naturais, realizada pelo homem (EMBRAPA, 2019).

Com relação às doenças, a pinta-preta é a principal doença fúngica da cultura, causada pelo fungo *Cylindrocladium spathulatum*, atacando folhas já adultas e provocando sua queda prematura (GRIGOLETTI JUNIOR; AUER; IEDE, 2000). O controle desta doença é através da seleção e descarte de mudas doentes além da coleta das folhas caídas, a fim de evitar a disseminação da doença (EMBRAPA, 2019).

Diferente do Brasil, na Argentina e Paraguai o uso de pesticidas em ervateira é comum. Na Argentina, por exemplo, 5 pesticidas tem uso autorizado para culturas de erva-mate, sendo eles, dimetoato, fenazaquin, glifosato, paraquate e oxifluorfenol, porém não há registros para uso de DTC (SEGESSO; TIRADO, 2015; SENASA, 2021).

De acordo com o Relatório de Custos de Produção de 2019, elaborado em conjunto com o Governo Nacional, o Paraguai utiliza quantidades significativas de pesticidas nas culturas de erva-mate, entre eles os inseticidas imidacloprid, cipermetrina, abamectina e o glifosato (MAG, 2019).

2.3 DITIOCARBAMATOS

Os DTC são os fungicidas não sistêmicos mais empregados mundialmente, devido a sua alta eficiência contra um amplo espectro de fungos e bactérias patogênicas em uma grande variedade de culturas de uso alimentares ou não (MOZZAQUATRO et al., 2019; VRYZAS; PAPADAKIS; MOURKIDOU, 2002).

Os DTC têm amplo espectro de atividade biológica e baixos custos de produção, porém, resíduos destes compostos podem ser encontrados em muitos alimentos comercializados no mundo todo. De acordo com Relatório de Comercialização de Agrotóxicos do IBAMA, no Brasil, o mancozebe é o terceiro pesticida mais comercializado, seguido pelos herbicidas 2,4-D e glifosato, sendo o fungicida mais utilizado para proteção contra doenças fúngicas em frutas, legumes e plantas ornamentais (ANVISA, 2019c; CALDAS et al., 2001; IBAMA, 2019; VARELI et al., 2018b).

Os DTC são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico e, de acordo com sua estrutura química, estão subdivididos em dimetilditiocarbamatos (DMDC), etilenobisditiocarbamatos (EBDC), monometilditiocarbamato e propilenobisditiocarbamato (PBDC), esta classificação é importante devido à restrição de alguns países quanto ao uso dos EBDC devido sua toxicidade (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

No Brasil, cinco DTC têm registro para aplicação em 55 culturas, sendo o metiram e propinebe para aplicação foliar, mancozebe para aplicação foliar e imersão de frutos no período pós-colheita, o tiram para aplicação no solo e tratamento de sementes e o metam-sódico para aplicação no solo (ANVISA, 2019a).

Na Tabela 2, estão representados os 5 DTC de uso permitido no Brasil, os subgrupos aos quais pertencem, bem como suas fórmulas estruturais.

Tabela 2: DTC de uso permitido no Brasil, subgrupos e fórmulas estruturais de cada um deles.

Ditiocarbamato	Subgrupo	Fórmula estrutural
Mancozebe	Etilenobisditiocarbamatos	
Metiram	Etilenobisditiocarbamatos	
Metam-sódico	Metilditiocarbamato	
Propinebe	Propilenobisditiocarbamato	
Tiram	Dimetilditiocarbamatos	

Fonte: Adaptado de Balardin, 2017.

2.3.1 Toxicidade

A aplicação mundial dos DTC pode ser atribuída ao fato desta classe possuir baixa toxicidade aguda e curta permanência no meio ambiente. Ainda assim, deve-se ter atenção ao correto manuseio desta classe de fungicidas devido a presença de resíduos tóxicos, como a etilenotiuréia (ETU), formada a partir da decomposição metabólica dos EBDC, como por exemplo, o mancozebe, podendo levar a contaminação de mamíferos, outras plantas e organismos quando expostos ao produto (LEMES et al., 2005).

Devido a esse metabólito, os EBDC têm grande importância neurotoxicológica e embora representem baixo risco de intoxicação por via oral, dérmica ou inalatória, a exposição crônica pode levar a doença graves (AZEVEDO, 2010). Ratos e camundongos de laboratório, quando expostos à ETU, apresentaram alterações carcinogênica, teratogênica e mutagênica, além de alterações na tireóide, como hipotireoidismo, hipertrofia da tireóide, interferindo na circulação e secreção do hormônio tireoestimulante (TSH) (KRÜGER, 2009; WHO, 2001).

Animais de laboratório, quando expostos aos DTC, apresentaram ataxia, hiperatividade seguida de debilidade e perda de tono muscular, além de alguns animais apresentarem danos hepáticos e renais, efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (CARVALHO; BARBOSA, 2013). Neuropatologias e alterações no sistema reprodutor masculino, podem também estar associadas a exposição aos DTC devido a formação de outro metabólito, o CS₂.

2.4 LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUOS (LMR)

Pela legislação nacional, o LMR é definido como sendo a quantidade máxima de resíduos de pesticidas aceita legalmente nos alimentos, em decorrência da aplicação adequada do agrotóxico numa fase específica, desde de a sua produção até seu consumo, geralmente expressa em mg kg⁻¹, ou seja, miligrama de resíduo por quilograma de alimento (MAPA, 2014).

A ANVISA é responsável por avaliar alterações nos LMR permitidos nos alimentos, considerando que os resíduos dos ingredientes ativos possam ser ingeridos em concentrações com valores referentes a experimentos de campo, exigidos para cada cultura, levando em consideração a ingestão diária aceitável (IDA), ou seja, a quantidade máxima do ingrediente ativo que, quando ingerida diariamente durante toda a vida, não ofereça riscos significativos à saúde (GORENSTEIN, 2004). Geralmente os LMR são estabelecidos por concentrações com valores abaixo do que se espera acarretar danos à saúde e são encontrados nas monografias da ANVISA (ANVISA, 2019c).

O Comitê para Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius*, referência mundial em desenvolvimento de regulamentos, normas alimentares e práticas sobre resíduos de pesticidas, juntamente com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e a OMS têm o objetivo de determinar os LMR aceitáveis em

alimentos, estabelecendo regras à segurança alimentar (PASSOS; DOS REIS, 2013). Caso estes LMR não estejam definidos nas monografias da ANVISA, devido a falta de registros, os valores deverão ser comparados aos LMR existentes no *Codex Alimentarius*, assim como os países que não possuem sistemas de registros de pesticidas devem adotar os LMR estabelecidos no *Codex* (GORENSTEIN, 2004).

Estabelecer LMR para pesticidas visa atender aos critérios de proteção à saúde da população, garantindo práticas seguras de comercialização de alimentos tanto regional quanto internacional, estabelecendo a normalização destes limites entre alguns países.

Importante lembrar que, os LMR podem ser minimizados ou controlados respeitando-se o período de carência, ou seja, o intervalo de segurança entre a última aplicação do pesticida e a colheita.

Os LMR para os DTC, são expressos em mg kg^{-1} de CS_2 pois os compostos pertencentes à classe dos DTC após a hidrólise ácida formam duas moléculas de CS_2 (ANVISA, 2020). Porém, cabe aqui ressaltar que, para a cultura da erva-mate, os DTC não tem aplicação autorizada e, portanto os órgão regulamentadores deste parâmetro não estabelecem LMR para tal.

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico é o processo que vai desde o planejamento da estratégia analítica contemplando, ao longo do seu desenvolvimento, parâmetros que garantam aos resultados a obtenção da qualidade exigida com confiabilidade, assegurando assim que, o procedimento utilizado é adequado à finalidade pretendida. Os parâmetros de validação deverão ser definidos, pelo laboratório responsável por desenvolver o método, de modo que melhor evidenciem a adequação do método ao uso pretendido (INMETRO, 2020).

Ainda, a critério de validação afim de confirmar se os métodos são apropriados ao uso pretendido, o laboratório deve validar métodos criados pelo próprio laboratório, métodos não normalizados, modificações em métodos já normalizados e métodos normalizados aplicados fora do escopo original (PEREZ, 2010).

No Brasil, os órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) e a ANVISA. Cada órgão apresenta definições de validação segundo critérios próprios estabelecidos em guias e

resoluções. A ANVISA estabelece critérios de acordo com a Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 e o INMETRO com o documento DOQ-CGCRE-008 (revisão 09) de 2020. Por isso, todo método quando validado, deverá indicar a agência regulamentadora cujas normas foram seguidas bem como os resultados devidamente registrados e documentados de modo organizado e de fácil acesso.

Para as análises de resíduos de pesticidas os parâmetros de validação são seguidos de acordo com o guia da União Europeia, o DG-SANTE (2019) (EUROPEAN COMMISSION, 2019). Este guia apresenta procedimentos e critérios bem estabelecidos para aceitação dos parâmetros analíticos de validação para metodologias que objetivam análise e determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (SILVA; FARIA, 2020).

Alguns dos parâmetros do método analítico avaliados no estudo da validação são: linearidade, efeito matriz, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão (PEREZ, 2010).

2.5.1 Linearidade, curva analítica, faixa linear e faixa linear de trabalho

Em um procedimento analítico, linearidade refere-se à capacidade de resposta do método, de forma linear, à variação da concentração do analito de interesse, em um determinado intervalo de concentração (RIBANI et al., 2004).

Faixa linear, relaciona-se à faixa de concentração para a qual a resposta do instrumento é linear a concentração do analito em estudo, considerando-se o comportamento da curva de calibração, já a faixa linear de trabalho, refere-se a faixa de concentração do analito para a qual os resultados obtidos para o método foram proporcionais à concentração do analito (INMETRO, 2020; MAPA, 2011).

A curva analítica está relacionada à resposta instrumental, por meio de gráficos de calibração, em função das diferentes concentrações da substância em estudo e, é ela que na prática define a linearidade. As curvas analíticas são obtidas de solução padrão de concentração definida a partir de solução padrão de referência e representam o intervalo entre a menor e a maior concentração do analito de interesse no qual foi demonstrado que o procedimento possui um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (INDRAYANTO, 2018; RIMAYI et al., 2015). Para a construção da curva analítica, o INMETRO recomenda que sejam analisadas no mínimo cinco níveis de concentração, em ordem crescente.

Este parâmetro pode ser observado a partir da resposta medida pelo instrumento (y) e a concentração do analito em estudo (x), através do coeficiente de correlação (r), representado por um gráfico de equação de regressão linear, conforme Equação 1.

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida;

x = concentração da solução padrão;

a = coeficiente angular (inclinação da reta);

b = coeficiente linear (interseção com o eixo y , quando $x = 0$).

Segundo recomendação da ANVISA e INMETRO o coeficiente de correlação (r) deve ser, respectivamente, maior que 0,99 e 0,90, pois quanto mais próximo de 1,0 melhor a linearidade do método, o que significa que menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

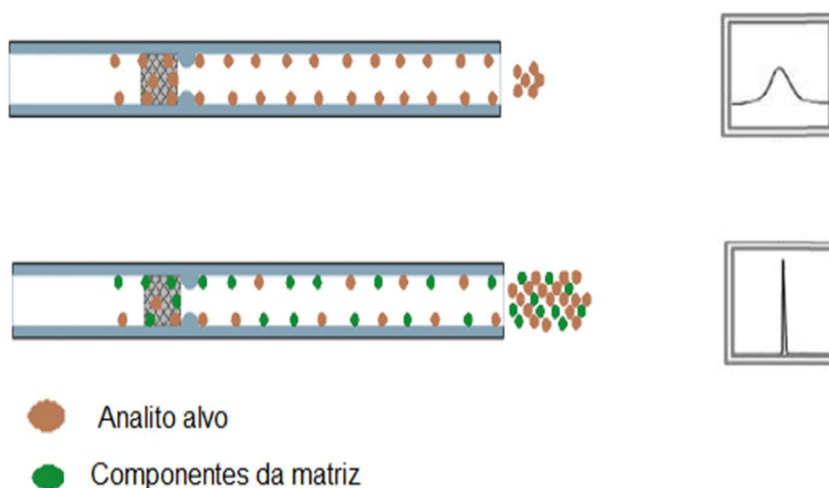
2.5.2 Efeito Matriz

A presença de interferentes na amostra junto ao analito de interesse pode aumentar ou reduzir o sinal, ou seja, pode acentuar ou inibir a detecção ou quantificação do analito de interesse comprometendo o resultado. Este parâmetro está relacionado ao estudo da seletividade, uma vez que pode também depender do fator concentração (INMETRO, 2020).

De acordo com a discussão proposta por Erney et al., em 1993, no qual foram analisados organofosforados em leite e manteiga através da GC, os analitos presentes nas soluções analíticas, quando preparadas em solvente livre de matriz, podem ficar adsorvidos nos sítios ativos livres do sistema de injeção do GC, levando a formação de picos com bandas, caldas e outras alterações. Porém, quando o analito é injetado junto ao extrato da matriz, apresenta aumento na intensidade do sinal, pois os componentes da matriz competem com o analito pelos sítios ativos durante o

transporte do analito do injetor para o detector, diminuindo, assim, a perda do analito uma vez que estes sítios ativos ficam menos disponíveis para interação com o mesmo. Portanto, segundo Erney et al. (1993), a presença do extrato da matriz faz com que um menor número de sítios ativos esteja disponível para interagir com os analitos em estudo, levando a menores perdas e melhoria nos picos cromatográficos (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; ERNEY et al., 1993; FUJIYOSHI et al., 2016; PINHO et al., 2009; SOARES; NETO, 2012) conforme representado na Figura 1.

Figura 1: Interação entre os sítios ativos no interior do injetor do cromatógrafo com analito alvo e os componentes da matriz.



Fonte: Adaptado de Soares; Neto, 2012.

Vários fatores influenciam o efeito matriz, dos quais se pode destacar, tipo de matriz; concentração do pesticida na amostra; tipo de injetor e temperatura do sistema cromatográfico; propriedades físicas do analito; o número e tipo de sítios ativos no injetor e coluna do GC. O efeito matriz pode ser minimizado variando-se um dos outros fatores, porém, o analito e sua concentração não podem ser modificados (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003; ERNEY et al., 1993; PINHO et al., 2009).

Portanto, durante a validação de métodos para análise de pesticidas, utilizando, especialmente a GC, o efeito matriz deve ser avaliado para evitar que interferentes

causem alterações na resposta quando o analito está no extrato da matriz comparado com a resposta deste mesmo analito presente apenas no solvente orgânico.

2.5.3 Limite de detecção e de quantificação

O LOD de um método é definido como sendo a menor concentração do analito de interesse que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada, nas condições experimentais (DE LIMA et al., 2017; INMETRO, 2020), correspondendo ao padrão de calibração de menor concentração (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

O LOD pode ser determinado através do método visual, expresso através da relação sinal/ruído (3:1), processos estatísticos ou aqueles baseados nos parâmetros da curva analítica (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004) porém, quando trabalha-se com níveis muito baixos de concentração, deve-se estabelecer qual o menor nível de concentração do analito que pode ser detectada em matriz com confiabilidade pelo método (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

Já o LOQ, representa a menor concentração do analito em estudo que pode ser quantificado, com níveis aceitáveis de exatidão e precisão (INMETRO, 2020), ou seja, o menor nível de concentração do analito que foi validada com precisão aceitável após aplicação completa do método, atendendo aos critérios de aceitabilidade do mesmo (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

Ainda de acordo com descrito no DG-SANTE (2019), o LOQ do método, definido a partir do menor nível de fortificação, pode ser quantificado com valores aceitáveis de exatidão entre 70-120% e precisão $RSD \leq 20$ (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

Quando se realizam medidas em amostras com baixos níveis de concentração, o LOD e LOQ são expressos em unidades de concentração, devendo-se atentar para a identificação do menor valor de concentração do analito de interesse que poderá ser detectado pelo método (INMETRO, 2020).

2.5.4 Exatidão

A exatidão de um método representa o grau de proximidade entre os resultados individuais encontrados em um ensaio e um valor verdadeiro ou um valor de referência

aceito (EUROPEAN COMMISSION, 2019). A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaios, implica em uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2020).

A exatidão pode ser avaliada através de ensaios de fortificação e recuperação, com resultado expresso em percentual da resposta da fortificação de uma amostra. Neste caso, a recuperação de um analito pode ser estimada a partir da fortificação de uma amostra branco com quantidades conhecidas do mesmo, com posterior análise desta amostra para verificar se o analito foi recuperado após todas as etapas do processo de análise.

A fortificação destas amostras, com o analito em questão, podem ser feitas em três diferentes níveis de concentrações dentro da faixa de concentração em que se está trabalhando, ou seja, um nível de concentração menor, um intermediário e outro maior.

Uma limitação deste procedimento é o fato de que o analito adicionado pode não estar necessariamente na mesma forma que a presente na amostra, e deste modo, a presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode levar a avaliações bastante otimistas da recuperação (INMETRO, 2020).

A recuperação é calculada segundo a Equação 2:

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Onde:

R% = Percentual de recuperação;

C₁ = Concentração do analito na amostra fortificada;

C₂ = Concentração do analito na amostra não fortificada;

C₃ = Concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

O DG-SANTE (2019) sugere intervalos de recuperação entre 70 e 120% para análise de resíduos de pesticidas, com precisão menor ou igual a 20%, porém, caso esses valores não sejam alcançados devido à complexidade analítica e/ou da

amostra, valores de recuperação mais baixos serão aceitos, ficando entre a faixa de 30 e 140% (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

No Brasil, de acordo com o INMETRO, faz-se necessário que os laboratórios estabeleçam critérios referentes aos níveis de concentração para aceitação da recuperação de acordo com documentos orientativos com normas previstas na legislação, atendendo a área relativa à pesquisa em andamento (INMETRO, 2020).

2.5.5 Precisão

Precisão é a estimativa da dispersão dos resultados obtidos de análises individuais, repetidas de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, analisadas sob condições definidas. Existem três formas mais comuns para expressar esta estimativa, repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão. A precisão, é um parâmetro normalmente utilizado para circunstâncias específicas de medição (INMETRO, 2020).

Dependendo da complexidade da amostra, serão aceitos valores de desvio padrão relativo menor ou igual a 20% para métodos empregados para análises a nível de traços ou impurezas (EUROPEAN COMMISSION, 2019). O desvio padrão relativo (RSD, *Relative Standard Deviation*), pode ser calculado através Equação 3.

$$RSD\% = \frac{s}{X_m} \times 100$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = médias das medidas em replicatas.

A repetitividade (RSD_r) representa o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas, de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição. As condições de repetitividade incluem: mesmo analista, mesmo procedimento de medição, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e mesmo local, com repetições em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2020).

A precisão intermediária (RSD_{pi}) expressa a precisão avaliada sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no

mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, com variação de algumas condições, tais como: diferentes analistas, diferentes dias de análise e diferentes equipamentos. A medida da precisão intermediária representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2020).

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS

Vários métodos para determinação de DTC vêm sendo desenvolvidos para auxiliar as análises em diferentes culturas. Muitos desses métodos estão baseados na hidrólise ácida, em presença de SnCl_2 e quantificação do CS_2 gerado por Espectroscopia de Absorção Molecular ou por GC (MUJAWAR et al., 2014; VRYZAS; PAPADAKIS; MOURKIDOU, 2002).

O método desenvolvido por Clarke et. al. (1951), é o mais antigo encontrado na literatura, e pode ser resumido em três etapas: I) decomposição ácida dos DTC para gerar CS_2 , II) absorção do CS_2 em solução alcoólica de KOH, onde ocorre a formação de xanato e, III) determinação do xanato através da titulação com iodo (CLARKE; HARRY BAUM; HESTER, 1951).

Cullen (1964) propôs um método para determinação de CS_2 por espectrofotometria. Este método consiste na determinação de complexo cúprico formado após liberação do CS_2 durante hidrólise ácida do DTC em SnCl_2 , empregado como redutor. O CS_2 liberado é complexado em solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol e, posteriormente, analisado em espectrofotômetro a 435 nm, com resultados sendo expressos em $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ de alimento (CALDAS et al., 2001; CULLEN, 1964).

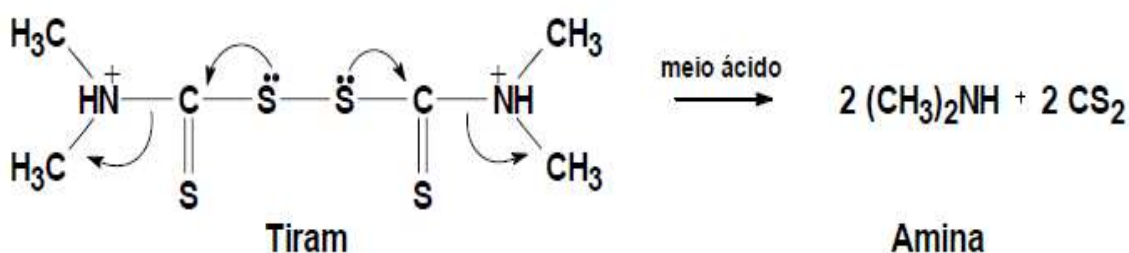
O método baseado na hidrólise ácida dos DTC com HCl em presença de SnCl_2 foi proposto por Keppel, em 1971, no qual ocorre absorção do CS_2 em uma solução contendo amina com formação de um complexo analisado por espectrofotometria UV-Vis. Esse método sofreu modificações principalmente em relação ao pré-tratamento da amostra, afim de reduzir o tempo de análise e as dificuldades com o método, por ser trabalhoso, além da preocupação com as questões ambientais, já que o método original utiliza acetato de chumbo (KEPPEL, 1971). Outra variação no método de Keppel foi com relação a adição de um solvente orgânico, como por exemplo,

isooctano, o qual forma uma camada onde ocorre a dissolução do CS₂ (CHAWLA et al., 2019).

A maioria dos métodos para determinação do CS₂ baseia-se na hidrólise ácida de algum DTC presente na amostra, já que todos os DTC produzem CS₂ nenhum dos métodos até agora estudados permitem a identificação do composto aplicado a cada cultura, por isso os resultados são expressos em mg kg⁻¹ CS₂ (MOZZAQUATRO et al., 2019).

De um modo mais prático, pode-se dizer que, sob condições ácidas e de alta temperatura, a partir de um mol de qualquer DTC, ocorre a formação de dois mols de CS₂, conforme exemplificado na Figura 2, onde a quebra da molécula de tiram leva a formação de duas moléculas de CS₂ (WHO, 1988).

Figura 2: Hidrólise ácida da molécula de tiram formando amina e CS₂.



A conversão entre a massa de qualquer DTC em CS₂ pode ser obtida pela Equação 4 (KEPPEL, 1971).

$$\text{CS}_2 \text{ (g)} = \frac{\text{MM p.a.}}{2 \times \text{MM CS}_2} = \frac{\text{MM p.a.}}{152\text{g}}$$

Onde:

MM = massa molecular;

p.a. = princípio ativo da classe dos DTC, como por exemplo, tiram (Figura 2), cuja massa molecular é 240 g.

Outros métodos foram propostos para determinação dos DTC em diversos tipos de amostras, seja na forma de CS₂, quanto de seus outros compostos. Muitos destes métodos empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês

High Performance Liquid Chromatography), GC-MS, e a Espectrofotometria UV-Visível. Apesar da HPLC permitir a determinação de ditiocarbamatos, a GC-MS e a espectrofotometria UV-Vis destacam-se por apresentarem melhor detectabilidade para a determinação de DTC (ROSA; MARQUES; PÉREZ, 2011).

Na literatura encontram-se alguns registros de estudos realizados utilizando HPLC com detecção ultravioleta (UV) (LEMES et al., 2005), por detecção de diodos (DAD) (GARCINUÑO; FERNÁNDEZ-HERNANDO; CÁMARA, 2004; LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012), e por espectrometria de massas (OELLIG; SCHWACK, 2017), espectrofotometria UV-Vis (BERRADA et al., 2010; MOZZAQUATRO et al., 2019), análises por GC com detector por captura de elétrons (ECD), detector fotométrico de chama pulsada (PFPD), detector de armadilha de íons (ITD), e com detector fotométrico de chama (FPD) (MUJAWAR et al., 2014; PIZZUTTI et al., 2017; SILVA et al., 2021), e por espectrometria de massas (CHAWLA et al., 2019; MUJAWAR et al., 2014; VARELI et al., 2018a; VARGAS et al., 2018).

Um ponto importante a ser levado em consideração na determinação de DTC é com relação à presença natural de CS₂ em algumas culturas, como por exemplo, vegetais pertencentes à família das *Brassicaceae*, principalmente a couve-flor e o repolho que, devido a presença natural de compostos contendo enxofre, podem gerar CS₂, levando a um resultado falso positivo (ARSLAN et al., 2019). Essa formação de CS₂, bem como outros compostos voláteis contendo enxofre, deve-se a degradação natural de isotiocianatos, derivados da degradação enzimática de glicosinolatos, substância presente em plantas dicotiledôneas (PERZ; VAN LISHAUT; SCHWACK, 2000). Outra importante cultura que pode levar a presença natural de CS₂ e outros compostos voláteis de enxofre, é o mamão, pertencente à família *Carica papaya L.*, também devido a degradação natural de derivados de glicosinolatos, encontrados em altos níveis nas sementes do mamão (ABAKERLI et al., 2015).

2.7 PURIFICAÇÃO DE EXTRATOS E PRINCIPAIS SORVENTES

A interferência de alguns compostos presentes em matrizes complexas, muitas vezes, torna-se um problema a ser contornado ao estudo de alguns analitos, principalmente quando se trabalha com monitoramento de resíduos de pesticidas. Para isso, devem ser usados métodos com procedimentos eficientes, que produzam

resultados de qualidade e que atendam aos parâmetros de validação estabelecidos por órgãos regulamentadores (HAN; SAPOZHNIKOVA; LEHOTAY, 2014).

Procedimentos de purificação de extratos, devem contornar essa problemática e garantir melhor confiabilidade aos resultados analíticos. Alguns tipos de purificação, como extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), e extração em fase sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *Dispersive Solid Phase Extraction*) são aplicadas à etapa de preparo de amostras, de modo a garantir a identificação e quantificação do analitos de interesse de forma exata e precisa (RODRÍGUEZ-RAMOS et al., 2020).

A SPE é uma técnica bastante utilizada, em que os analitos contidos na matriz aquosa são extraídos, junto aos compostos interferentes, após passagem por cartucho contendo sorvente, ou seja, ocorre interação entre os compostos da amostra e uma fase extratora (sorvente), onde os analitos ficam retidos. A fase extratora, é, geralmente, um cartucho formado por compostos orgânicos ligados a suportes de sílica que possuem diferentes polaridades, garantindo a seletividade de diferentes analitos. Nesta técnica, um solvente orgânico seletivo é utilizado para remoção dos interferentes, enquanto um outro solvente é utilizado para eluição dos analitos de interesse. A SPE requer várias etapas, como condicionamento dos cartuchos para ativação do sorvente, eluição da amostra e a eluição de solventes para remoção de interferentes e dos analitos desorvidos aprisionados no cartucho (ALBUQUERQUE, 2019; BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

A SPME é uma técnica rápida e sensível que se baseia na adsorção dos analitos em fibra de sílica recoberta por uma camada de sorvente, exposta diretamente à amostra aquosa, concentrando o analito em sua superfície por partição, para, posteriormente, serem desorvidos termicamente ao GC. É, portanto, um método rápido não necessitando de preparo de amostras com uso de solventes, sendo necessário selecionar o tipo e espessura da fibra, determinar o tempo de exposição do analito a mesma, adequando o volume de amostra, tempo e temperatura de desorção (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001; BORTOLUZZI, 2007).

Na d-SPE utiliza-se, em geral, um ou mais sorventes, com auxílio de centrifugação, para remoção de compostos co-extraídos na fase orgânica do extrato de diferentes tipos de matriz complexa, como por exemplo, amostras de origem animal e vegetal, removendo açúcares, lipídios, ácidos orgânicos, proteínas, pigmentos e resíduos de água (CABRERA et al., 2012). Essa técnica envolve duas etapas

importantes. Primeiro, a homogeneização das amostras, com extração dos compostos de interesse utilizando solventes adequados e demais etapas de extração de acordo com o método proposto. Após esta, um pequeno volume do sobrenadante é transferido para tubo de centrífuga para extração e remoção de interferentes co-extraídos junto ao extrato de matriz, contendo um ou mais sorventes. O extrato purificado, é então, levado à análise (SCHENCK, 2002).

Vários sorventes podem ser utilizados, sozinhos ou uma combinação deles para purificação de extratos. Soma-se à combinação de sorventes, a utilização de sais secantes, como $MgSO_4$ ou Na_2SO_4 com a finalidade de remover resíduos de água presente nos extratos. O $MgSO_4$ mostra-se mais eficiente para remoção de água quando comparado aos outros sais, além de sua hidratação ocorrer em temperaturas entre 40 e 45 °C de aquecimento da amostra na etapa de extração, facilitando, principalmente, a extração de compostos apolares (MEIRA, 2015; PRESTES et al., 2009).

O PSA, atua como trocador aniônico capaz de interagir com outros compostos por ligações de hidrogênio, pois sua estrutura bidentada possui forte efeito quelante devido à presença dos grupos amino primária e secundária, e por esse motivo, torna-se eficaz na remoção de compostos polares da matriz, açúcares, ácidos orgânicos, alguns pigmentos e, até mesmo, analitos que possam interferir nos resultados das análises (CABRERA et al., 2012). Este sorvente tem demonstrado eficácia quando associado a outros sorventes, como C18 (octadecilsilano) que possui bons resultados na purificação de diferentes tipos de amostras com interferentes apolares, em especial aquelas com alto teor de gordura, como lipídios. Utiliza-se este sorvente em matrizes aquosas com compostos orgânicos através da SPE. Além da associação com C18, PSA também tem sido aplicado junto ao GCB, o qual tem eficácia na remoção de pigmentos naturais presentes em algumas amostras vegetais e, assim como PSA possui afinidade para formação de ligações de hidrogênio devido às estruturas com alta polaridade presentes em sua superfície, retendo compostos planares, levando a baixas recuperações para compostos com essas características (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY et al., 2010; LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Estudo realizado em maçã, uva vinífera, alface, pimentão, tomate e morango para determinação de DTC através de HPLC-DAD, utilizou procedimento SPE para etapa de purificação das amostras, utilizando como sorventes sílica, Florisil, Envi-Carb

II/PSA e d-SPE com PSA e MgSO₄. Os extratos purificados com Envi-Carb II/PSA baixas recuperações, indicando que neste sorvente ocorre a retenção do fungicida alvo, provavelmente devido à interação entre o fungicida e compostos de carbono do sorvente. Para d-SPE e Florisil, apresentaram altas recuperações, o que pode ser explicado devido à baixa remoção dos compostos interferentes presentes na matriz. No entanto, as altas recuperações foram corrigidas quando utilizado como sorvente a sílica (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

Mello (2014) desenvolveu e validou método para determinação de DTC em repolho, couve, brócolis, goiaba e caju. Neste estudo foi aplicada metodologia baseada na decomposição dos DTC, metilação, extração por QhEChERS e etapa de purificação dos extratos utilizando procedimento de partição líquido-líquido e d-SPE com análises por HPLC-UV e por método espectrofotométrico. Com relação à etapa de purificação dos extratos, foram realizadas oito fases de purificação dos extratos com diferentes parâmetros de fase móvel (pH, vazão e gradiente) sendo que os melhores resultados obtidos foram com PSA, GCB e MgSO₄ com fase móvel em gradiente com água:acetonitrila e vazão 1,1 mL/min (MELLO, 2014).

Silva et. al (2021) desenvolveu e validou método para determinação de DTC em soja por GC-ITD-MS e GC-PFPD utilizando PSA, C18OH, C18, sílica, óxido de alumínio e Florisil como sorventes para purificação dos extratos em d-SPE. A eficiência desses sorventes foram avaliadas por HPLC-DAD e HPLC-ELSD devido à componentes da matriz, como ácidos graxos, interferirem nos resultados mas não serem detectados por GC-ITD ou GC-PFPD. A detectabilidade de compostos de ácidos graxos por ELSD mostrou-se melhor do que com DAD e os sorventes que apresentaram melhor remoção de ácidos graxos e outros componentes da matriz foram a sílica, óxido de alumínio e Florasil (SILVA et al., 2021).

A erva-mate é uma matriz de origem vegetal e apresenta em sua composição fitoquímica compostos complexos, como ácidos orgânicos, açúcares e clorofila, neste sentido, faz-se necessário utilizar a técnica de purificação dos extratos através de d-SPE, aplicando associação dos sorventes PSA, GCB, além de MgSO₄ para remoção de resíduos de água.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento e a validação do método cromatográfico para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em erva-mate, empregando GC-MS, foi realizado no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), Departamento de Química da Universidade da Federal de Santa Maria (UFSM), em parceria com o Núcleo de Tecnologia em Alimentos (NTA), Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Neste estudo, foram empregados os seguintes equipamentos e materiais:

- cromatógrafo a gás Shimadzu QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão);
- amostrador automático AOC-20i (*autosampler*);
- coluna capilar de sílica fundida SLBTM-5MS (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25µm) (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) revestida com 5% difenil 95% dimetilsiloxano;
- espectrômetro de massas e sistema de aquisição de dados;
- sistema de purificação de água Milli-Q Sistema da Millipore resistividade com 18,2 MΩ cm⁻¹ MilliPore® (Barueri, São Paulo);
- balança analítica de precisão com 4 casas decimais Sartorius (Alemanha);
- balança analítica de precisão com 2 casas decimais Mettler Toledo PM600 (Barueri, São Paulo);
- homogeneizador *Vortex Scientific Industries* (Nova Iorque, EUA);
- micropipetadores automáticos de várias capacidades;
- pipetador *Hand Step Brand* (Alemanha);
- dispensadores de volume, capacidades de 15, 25 e 30 mL;
- centrífuga *Thermo Fisher Scientific* (Alemanha);
- banho termostático com agitação, Dubnoff NI 1232 (Piracicaba, São Paulo);
- frascos de vidro Duran com capacidade de 250 mL, com tampa rosqueável.

3.2 GÁS UTILIZADO

- Hélio 99,996% de pureza (White Martins, Brasil) – utilizado como gás de arraste.

3.3 REAGENTES E SOLVENTES

- Ácido clorídrico p.a. - Synth (São Paulo, Brasil);
- água purificada em Milli-Q Sistema da Millipore (Barueri, Brasil);
- cloreto de estanho II diidratado p.a. - Synth (São Paulo, Brasil);
- CS₂ com pureza de 99,9% - Sigma Aldrich (São Luis, EUA);
- tiram com pureza de 99,95% - Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha);
- isoctano grau pesticida - J.T. Baker Chemicals (Nova Jersey, EUA);
- tolueno grau pesticida - Mallinckrodt (São Luis, EUA).

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

3.4.1 Preparo das soluções estoque de tiram – Ensaio de fortificação e recuperação

Preparou-se a solução estoque de tiram na concentração de 1000,0 mg L⁻¹ (solução A) através da dissolução do padrão em tolueno. A partir da solução A, preparou-se uma solução intermediária de concentração 100,0 mg L⁻¹ (solução B) e, a partir desta preparou-se uma solução de concentração 10,0 mg L⁻¹ (solução C), ambas em tolueno. As soluções B e C foram empregadas nos ensaios de fortificação e recuperação do analito.

As soluções foram estocadas em frascos âmbar e armazenadas em freezer, à temperatura de -18 °C.

3.4.2 Preparo das soluções analíticas – Curva analítica

Para a confecção das curvas analíticas, preparou-se, inicialmente, duas soluções estoque de CS₂ em isoctano nas concentrações de 4000,0 e 400,0 mg L⁻¹. A partir de diluições da solução estoque, preparou-se as soluções de trabalho nas

concentrações de 40,0 e 4,0 mg L⁻¹, ambas em isoctano. As soluções de trabalho foram preparadas, mensal e semanalmente, respectivamente. As soluções para o preparo das curvas analíticas nas concentrações de 0,05; 0,08; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ CS₂ foram preparadas a partir das diluições das soluções de trabalho.

A solução de CS₂ na concentração de 2,0 mg L⁻¹ CS₂, foi preparada a partir da solução de trabalho de concentração 40,0 mg L⁻¹, as soluções de concentrações 1,0 e 0,6 mg L⁻¹ CS₂, foram preparadas a partir da solução de trabalho de concentração 4,0 mg L⁻¹. As demais concentrações, 0,3; 0,1; 0,08 e 0,05 mg L⁻¹ CS₂ foram preparadas a partir das diluições da solução de concentração 1,0 mg L⁻¹ CS₂. Na Tabela 3 encontram-se as concentrações da solução de partida para o preparo das soluções analíticas.

Tabela 3: Concentração das soluções de CS₂ para a curva analítica e as concentrações das soluções de partida.

Concentração (mg L ⁻¹ CS ₂)	Concentração das soluções para o preparo da solução analítica (mg L ⁻¹)
0,05	1,0
0,08	1,0
0,1	1,0
0,3	1,0
0,6	4,0
1,0	4,0
2,0	40,0

3.4.3 Preparo da solução ácida de cloreto de estanho

Preparou-se solução de cloreto de estanho a 1,5% em ácido clorídrico 4,0 mol L⁻¹, a partir da dissolução de 15,0 g de SnCl₂ em 1,0 L de solução de HCl 4,0 mol L⁻¹. O cálculo para o preparo da solução ácida encontra-se no Apêndice 1. Devido a perda de ação do SnCl₂, a solução foi preparada semanalmente, de acordo com o que seria utilizado. Após o preparo, armazenou-se a solução em frasco âmbar, limpo e seco, tomando-se os devidos cuidados para que o mesmo ficasse bem vedado.

3.5 AVALIAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS BRANCO DE ERVA-MATE

Para a validação do método foram utilizadas amostras de erva-mate do tipo orgânica, embaladas à vácuo, comercializadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Estas foram avaliadas para o uso como amostras branco, ou seja, amostras sem a presença de resíduos de DTC.

As amostras de erva-mate estavam dentro do prazo de validade e foram devidamente identificadas e armazenadas em suas embalagens originais, pacotes de 500 g embaladas à vácuo, em freezer, à temperatura de -18 °C.

Importante destacar que, depois de abertas as embalagens, deve-se ter cuidado durante o manuseio, armazenamento e preparo das amostras branco a fim de evitar possíveis contaminações e alterações nas recuperações dos analitos.

Para a extração das amostras, foram pesadas $10,0 \pm 0,2$ g de erva-mate, em frascos de vidro Duran de 250 mL, com tampa de rosca, certificando-se de que os mesmos encontravam-se devidamente higienizados e secos.

3.6 ANÁLISE DOS SOLVENTES E REAGENTES

A verificação da pureza dos solventes e reagentes utilizados foi realizada através da análise dos mesmos por meio dos procedimentos de extração, que serão discutidos no item 3.7.2, sem adição da amostra.

Esta etapa garante que os solventes e reagentes estejam livres de possíveis interferentes e que, deste modo, são apropriados para serem empregados no estudo e desenvolvimento do método.

3.7 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

3.7.1 Testes para o preparo da amostra

Para a etapa de preparo da amostra, foram testados diferentes volumes de água, entre 10 e 30 mL, aumentando em 5 mL cada adição de água a fim de verificar em qual dos volumes se conseguiria a hidratação ideal da amostra para a etapa seguinte de extração.

3.7.2 Procedimento de extração

Para o procedimento de extração, preparou-se extrato branco com $10,0 \pm 0,2$ g de erva-mate e 25 mL de água de Milli-Q®, em frasco de vidro com tampa rosqueável, com capacidade de 250 mL.

As fortificações foram efetuadas adicionando-se 142 μ L da solução estoque de tiram na concentração 100 mg L^{-1} para o nível $0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ CS₂ de amostra. Na sequência, foram adicionados 15 mL de isoctano e adicionou-se 90 mL de solução de SnCl₂ 1,5% preparada em solução aquosa de HCl 4 mol L^{-1} .

Os frascos foram fechados, certificando-se de que as tampas ficassem bem vedadas, e colocados em banho de água à 80 °C, durante 1 h, sob agitação a 70 rpm. Passado este período, os frascos foram retirados e resfriados em banho de água fria até que atingissem a temperatura ambiente.

Devido a alta volatilidade do CS₂ quando os DTC são expostos a condições que favoreçam a hidrólise da molécula, após fortificações e adição dos reagentes, os frascos devem ser fechados imediatamente, a fim de se evitar perda de CS₂.

Uma alíquota de 1,5 mL foi retirada da fase orgânica superior, onde ficou particionado o CS₂, para o processo de purificação do extrato.

3.7.3 Testes para purificação do extrato

Para a realização da etapa de purificação, via d-SPE, foram testadas combinações de, respectivamente, dois sorventes e um sal secante, sendo eles PSA, GCB e MgSO₄. Para avaliar a eficiência dos sorventes nesta etapa, foram testadas combinações dos mesmos em três testes (I, II e III), mudando apenas as quantidades empregadas de PSA e GCB, mantendo-se a massa de MgSO₄ para cada um dos testes.

As quantidades utilizadas para as combinações de sorventes em cada um dos testes foi: I) 25 mg de PSA + 2,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄; II) 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄ e III) 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO₄. Cada um dos tubos contendo os extratos e as combinações de sorventes foram agitados em vortex por 20 segundos.

Os extratos, já purificados, foram levados para a centrifuga, em tubos tipo falcon, à 3000 rpm por 3 minutos. Após etapa de centrifugação, uma alíquota dos

extratos purificados foram coletados com auxílio de micropipetador automático, transferidos para vials e analisados por GC-MS.

3.8 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições do GC-MS utilizadas para a validação do método foram de acordo com Vargas et al. (2018) e estão descritas abaixo (VARGAS et al., 2018).

A separação cromatográfica foi realizada em coluna capilar de sílica fundida SLBTM-5MS (30 m x 0,25 mm I.D x 0,25 μ m, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), revestida com 5% difenil e 95% dimetilsiloxano. Como gás de arraste foi utilizado hélio a uma vazão inicial de 1,78 mL min⁻¹ a pressão de 14,5 psi, no modo de injeção pulsada sob alta pressão por 1 min, e então o injetor foi mantido a uma pressão constante de 7 psi, com vazão de 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 1 μ L com auxílio de amostrador automático e programação da válvula do *split* do injetor na razão de 1:10, e a temperatura do injetor foi definida em 250 °C. O programa de temperatura da coluna teve início rápido a 40 °C durante 1,8 minutos, aumentando para 240 °C com elevação da temperatura de 50 °C min⁻¹ e mantida por 2 minutos. O tempo total de corrida foi de 7,8 minutos, enquanto o tempo de retenção do CS₂ foi de 1,1 minutos.

As condições do MS foram de 200 °C para o *transferline* e de 230 °C para a fonte de íons. A quantificação foi efetuada com uma fonte de impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Impact*) no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, do inglês, *Selected Ion Monitoring*), na faixa de interesse 76 e 78 m/z. Utilizou-se o íon 76 para quantificação e 78 para confirmação.

A aquisição de dados foi feita com auxílio do *software* LabSolutions GC-MS, versão 4.20.

3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para este estudo, os resíduos de ditiocarbamatos foram determinados na forma de CS₂, empregando-se GC-MS, nas condições descritas no item 3.8. Os parâmetros avaliados no estudo da validação do método estão descritas nos próximos itens, de acordo com os documento orientativos sobre qualidade analítica, procedimentos de controle e validação de métodos para determinação de resíduos de pesticidas.

3.9.1 Linearidade e efeito matriz

As curvas analíticas foram obtidas através da diluição de diferentes volumes da solução de trabalho para as seguintes concentrações: 0,05; 0,08; 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de CS₂ e fator do método de 1,5. O cálculo para o fator do método encontra-se no Apêndice 2. As soluções analíticas foram preparadas em isooctano e em extrato de matriz em branco.

No estudo de linearidade foram feitas 7 replicatas de cada concentração da curva analítica preparadas tanto em solvente quanto em matriz.

Com auxílio do programa Microsoft® Excel versão X, os valores das concentrações de CS₂ foram colocados no eixo das abscissas (x) e as áreas obtidas no eixo das ordenadas (y), fornecendo o coeficiente angular (a), coeficiente linear (b) e o coeficiente de determinação (r²) das curvas analíticas, onde pode-se observar, a linearidade do método cromatográfico em estudo, de acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 3.

Para o estudo do efeito matriz, primeiramente, realizou-se uma avaliação a partir do preparo de duas curvas analíticas, uma preparada a partir da solução analítica em solvente orgânico e outra preparada em extrato branco de erva-mate, nas concentrações já citadas.

A obtenção do valor do efeito matriz utilizando as duas variáveis, foi realizado através de cálculo a partir da Equação 5, em que se verifica o efeito matriz sobre o resultado da análise, se houve aumento ou diminuição do sinal, sendo que, resultados fora da faixa de ± 20% o efeito matriz começa a interferir nas análises. Quando ocorre esta interferência, recomenda-se a construção de curvas analíticas no extrato da matriz, a fim de evitar erros nas análises e minimizar o efeito (EUROPEAN COMMISSION, 2019). A Equação 5 foi utilizada para o cálculo do efeito matriz.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \left[\left(\frac{\text{inclinação da curva analítica em matriz}}{\text{inclinação da curva analítica em solvente}} \right) - 1 \right] \times 100$$

3.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O LOD e LOQ do método foram obtidos a partir da injeção dos extratos fortificados com solução de tiram $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, nas seguintes concentrações: 0,1; 0,3; 0,5 e $1,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$, com número de replicatas igual a 7 para cada nível de concentração.

O LOD foi definido como sendo a menor concentração da curva analítica com $\text{RSD} \leq 20\%$.

O LOQ foi definido como a menor concentração com recuperação na faixa de 70-120% e $\text{RSD} \leq 20\%$.

3.9.3 Exatidão e precisão

Para o estudo de exatidão do método foram realizados ensaios de fortificação e recuperação. A recuperação do CS_2 foi avaliada a partir da fortificação de amostras branco de erva-mate com soluções diluídas de tiram nas concentrações 10,0 e $100,0 \text{ mg L}^{-1}$. As fortificações foram feitas em diferentes níveis de concentração: 0,1; 0,3; 0,5 e $1,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$ ($n=7$). As extrações foram feitas de acordo com descrito no item 3.7.2.

Para o estudo da precisão com relação à repetitividade foram calculados os RSD_r das 7 extrações realizadas para cada concentração estudada.

A precisão intermediária (RSD_{pi}) foi avaliada utilizando-se o mesmo procedimento de fortificação e extração utilizados para a RSD_r , porém executado por diferentes analistas, com intervalo de 15 dias entre as análises.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram estatisticamente tratados de acordo com a análise de variância (ANOVA), seguida pela comparação das diferentes médias entre cada resultado e análise, através de Pared T-test, cujo nível de confiança é de 95%. As análises foram realizadas no suporte de *software* BioEstat, na versão 5.3.

3.11 LIMPEZA DO MATERIAL UTILIZADO

O procedimento de limpeza de toda a vidraria utilizada após o procedimento de extração foi feito com bastante cuidado para que não ficassem com resíduos de DTC, a fim de se evitar possíveis contaminações de outras amostras.

Todas as vidrarias utilizadas foram deixadas de molho de um dia para o outro em uma solução aquosa de Extran® alcalino 5% (v/v). Após o molho, lavadas em água corrente para retirada da solução de limpeza e, posteriormente, enxaguadas com acetona e secas em temperatura ambiente.

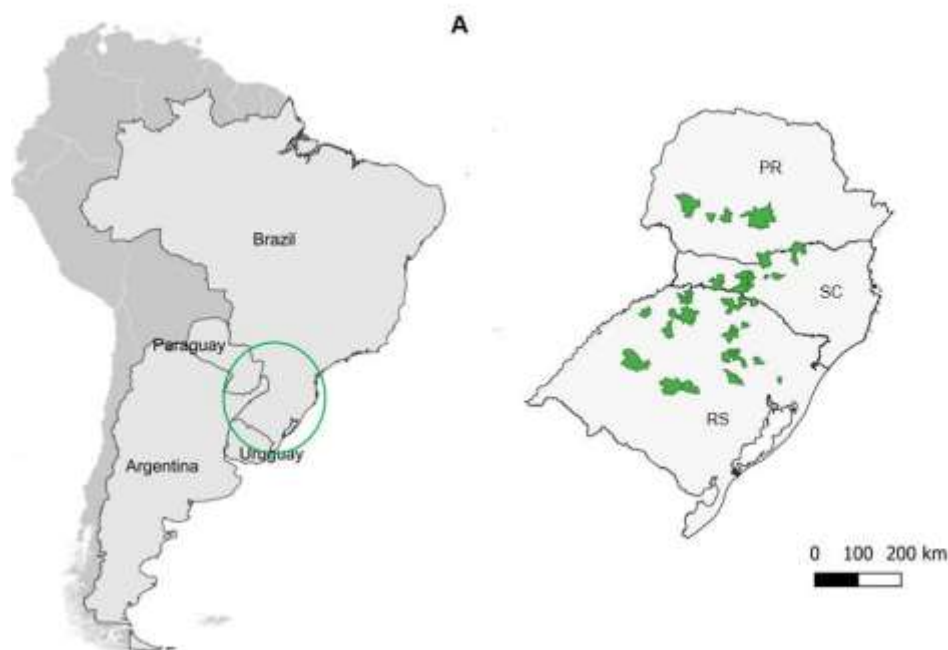
Os frascos de vidro Duran utilizados no procedimento de extração, depois de secos, foram armazenados separadamente de outras vidrarias, para que fossem utilizados novamente neste mesmo estudo.

3.12 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

No que se refere à produção e exportação de erva-mate, o Rio Grande do Sul é responsável por 45% desta atividade, sendo ela afetuada a 39 países, com destaque para Chile, Estados Unidos, Alemanha e Uruguai (IBRAMATE, 2018; PÉREZ-PARADA et al., 2010; SINDIMATE, 2021). A Figura 3 demonstra os maiores países produtores, exportadores e consumidores de erva-mate da América do Sul, bem como as regiões de cultivo de erva-mate no Brasil.

Dados da Secretaria de Comércio Exterior do Ministério da Economia do Brasil, no ano de 2019, 93,7% da erva-mate produzida no estado do Rio Grande do Sul foi exportada para o Uruguai, onde se tem maior consumo do produto, atingindo 8 kg/habitante ao ano (PÉREZ-PARADA et al., 2010; SINDIMATE, 2021).

Figura 3: Maiores países produtores, exportadores e consumidores de erva-mate da América do Sul (A) e regiões de cultivo de erva-mate no Brasil (B).



Uma das principais formas de consumo da erva-mate é através de infusões, por hábito, ingerida várias vezes ao dia, levando os consumidores a ingerir até 1 L da bebida a cada 1 hora, levando o mesmo ao contato direto não só com os compostos fitoquímicos presentes na erva-mate, mas também com possíveis resíduos de pesticidas, entre eles os DTC (BRACESCO et al., 2011).

Devido a este elevado consumo de erva-mate na América do Sul e por não haver registros sobre uso de DTC na mesma, faz-se necessário analisar amostras comerciais do produto através de método analítico confiável, exato e preciso.

Para isso, após a validação do método, realizou-se o monitoramento de 65 amostras de erva-mate comercial dos tipos nativa, tradicional, artesanal e *blend*, sendo que, 58 amostras foram produzidas e comercializadas em estados do sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), 3 produzidas e comercializadas no Brasil com exportação ao Uruguai, e 4 amostras produzidas na Argentina e comercializadas no Brasil.

As amostras foram coletadas entre os meses de agosto de 2020 e julho de 2021, todas em suas embalagens originais de, no mínimo 0,5 kg. Para a determinação de resíduos de pesticidas, de acordo com métodos recomendados de amostragem, a

quantidade de alimentos processados de origem vegetal e derivados de produtos de origem vegetal, como chás, é no mínimo de 0,2 kg (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

As amostras de erva-mate estavam dentro do prazo de validade, foram devidamente identificadas e armazenadas em local limpo, seco e abrigado da exposição solar, a uma temperatura de 20 °C até o momento das análises. Para cada amostra foram registradas informações importantes com relação a data de compra, lote, tipo, prazo de validade e cidade/estado de origem.

Os parâmetros de validação estudados e aplicados às amostras de erva-mate orgânica foram, também, aplicados às amostras comerciais a fim de realizar o monitoramento da análise de DTC nas mesmas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme abordado no item 2.3, os fungicidas da classe dos DTC apresentam grande complexidade ao serem analisados, devido a alta instabilidade em presença de umidade e oxigênio e baixa solubilidade na maioria dos solventes e, por este motivo, torna-se difícil a análise desses compostos através de métodos multirresiduais. Por isso, os DTC necessitam ser analisados através de método individual.

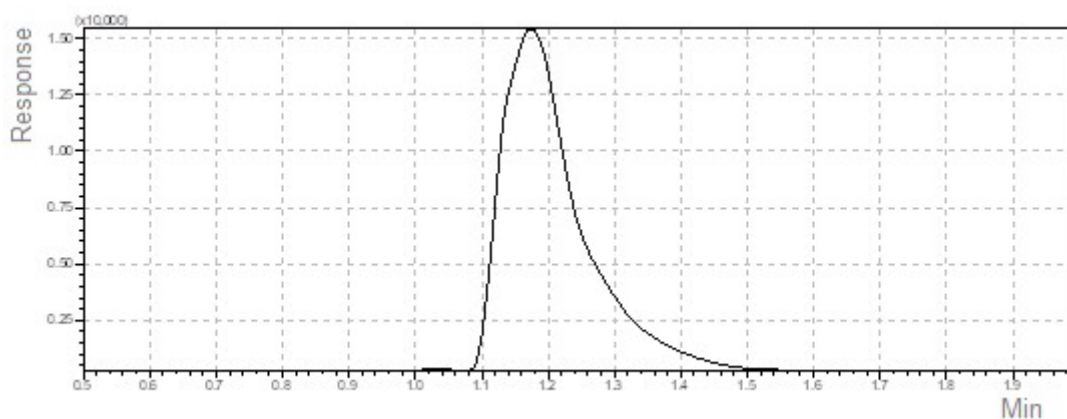
Na literatura, não foram encontrados métodos para determinação de DTC em erva-mate, apenas para a determinação destes compostos em algumas matrizes, tais como, frutas e hortaliças (DE KOK, A & VAN BODEGRAVEN, 2000; MUJAWAR et al., 2014; PIZZUTTI et al., 2017), grãos (CHAWLA et al., 2019), *biobeds* (VARELI et al., 2018b), e vinho (VARGAS et al., 2018).

Desta forma, o presente estudo foi baseado no método tradicional já descrito na literatura apresentado por de Kok & Van Bodegraven (2000), o qual foi otimizado e validado para a matriz erva-mate e, posteriormente aplicado às amostras de erva-mate comercial no estudo do monitoramento.

4.1 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

O procedimento para verificar o tempo de retenção do CS₂, foi estimado através da injeção de vapores no GC-MS. Nas mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.8, a fim de se confirmar o tempo de retenção do composto, injetou-se uma solução analítica de CS₂ na concentração de 1 ppm. O tempo de retenção estimado para o CS₂ foi entre 1,18 e 1,2 minutos, com tempo de análise de 1,9 minutos, de acordo com cromatograma representado na Figura 4.

Figura 4: Cromatograma com tempo de retenção da solução analítica de CS₂ 1 ppm.



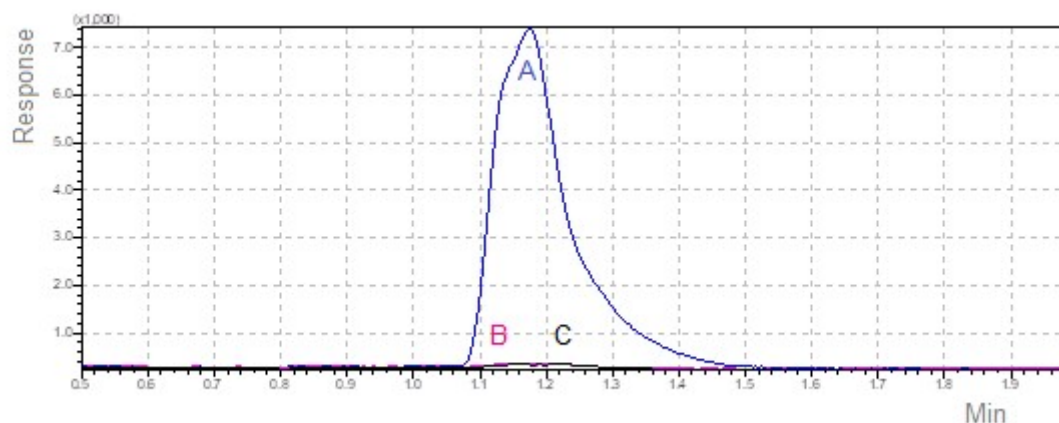
4.2 ANÁLISE DOS SOLVENTES E REAGENTES

Para verificar a pureza e avaliar a presença de interferentes com mesmo tempo de retenção do CS₂ nos solventes e reagentes, os mesmos foram submetidos aos procedimentos de extração, sem adição da amostra, como discutido no item 3.7.2.

Nesta avaliação não foram encontrados interferentes no mesmo tempo de retenção do CS₂, o que demonstra que os solventes e reagentes estavam isentos de contaminação por CS₂ e, deste modo, apropriados ao uso e desenvolvimento do estudo do método.

Na Figura 5, pode-se verificar o tempo de retenção da solução analítica de CS₂ 1 ppm, do branco solvente e branco matriz.

Figura 5: Cromatograma da avaliação de interferentes com mesmo tempo de retenção do CS₂ em (A) solução analítica de CS₂ 1 ppm; (B) branco solvente e (C) branco matriz.



4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

No método tradicional, encontrado na literatura, descrito por de Kok & Van Bodegraven (2000), que utiliza como solvente isoctano para partição de CS₂ na determinação de DTC em frutas e hortaliças a quantidade de amostra e o volume de isoctano e da solução ácida de cloreto de estanho, bem como o tempo de extração em banho-maria sob agitação demandam maior tempo para extração e maior consumo de amostra e reagentes, além de gerar mais resíduos químicos. Neste método, são utilizados 50 ± 0,5 g de amostra, 25 mL de isoctano, 150 mL de solução ácida de cloreto de estanho e 120 minutos em banho-maria sob agitação, além de os extratos serem analisados por GC sem passar pelo procedimento de limpeza e purificação.

No método oficial descrito pela União Europeia para análise de resíduos de DTC em alimentos de origem vegetal, no que se refere ao procedimento de extração em matrizes secas, são utilizados 10,0 ± 0,1 g da amostra, seguido da adição de 50 mL de água e 25 mL de isoctano. O volume de solução ácida de SnCl₂ utilizada neste procedimento é 150 mL e o tempo de permanência dos frascos, sob agitação, em banho de água sob temperatura de 80 °C é de 120 minutos. Os extratos são, então, resfriados a temperatura de 30 °C, e uma alíquota coletada para análise por GC (CVUA, 2009).

Na prática, sabe-se que, os métodos para determinação de pesticidas devem ser rápidos, de baixo custo, eficazes e gerar o mínimo possível de resíduos químicos. Desse modo, para esse estudo, optou-se por otimizar a etapa de extração das amostras do método tradicional.

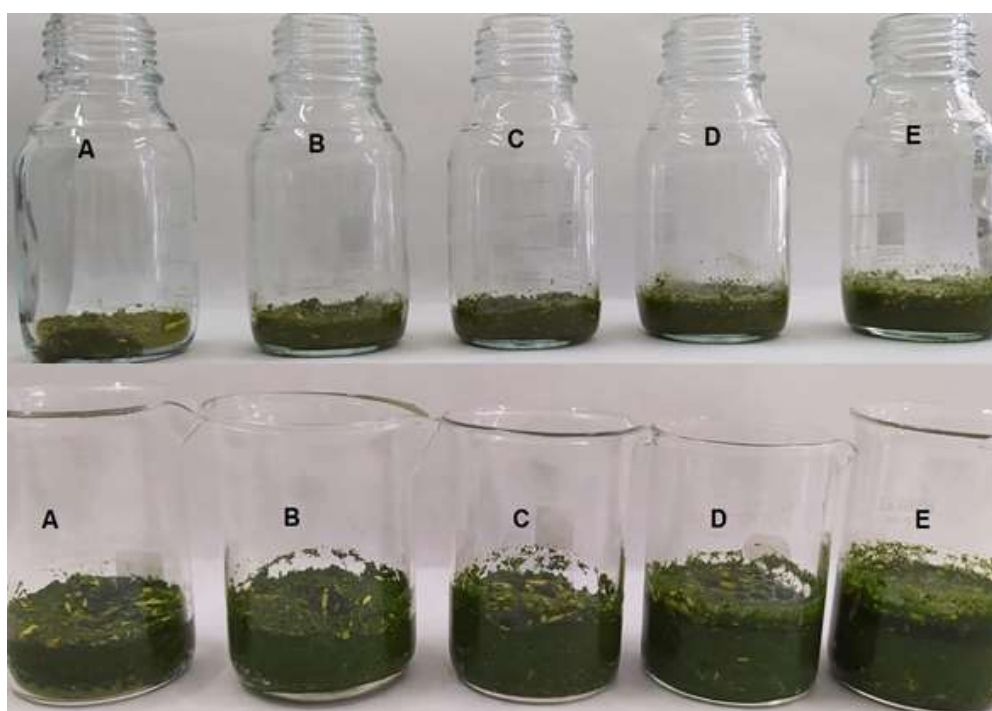
Para amostras com baixo teor de umidade, faz-se necessário uma etapa de hidratação antes do processo de extração, a fim de facilitar a extração dos compostos através da hidratação dos poros da amostra, deixando-os mais acessíveis a ação do solvente extrator e, deste modo, melhorando os percentuais de recuperação (DÍEZ et al., 2006; PIZZUTTI et al., 2007; WALORCZYK, 2007, 2008). Deste modo, na erva-mate por ser uma matriz com baixo teor de umidade, foram realizados testes de hidratação para o preparo da amostra com diferentes volumes de água adicionados com o objetivo de hidratar a mesma e facilitar, assim, a extração do analito de interesse para se chegar a bons percentuais de recuperação sem que houvesse qualquer interferência desta etapa na detectabilidade do método (SILVA, 2011).

Conforme mostra a Figura 6, os testes foram realizados em 10 g de erva-mate com diferentes volumes de água, onde ao adicionar 10 mL de água não se obteve umidade necessária na amostra para a etapa seguinte de fortificação, ficando a erva-mate praticamente seca. Com 15 e 20 mL de água, a amostra apresentou-se um pouco mais úmida, porém, ainda assim, com uma consistência pastosa e de difícil homogeneização. Ao adicionar 25 mL de água, chegou-se a uma mistura com textura mais líquida, de fácil homogeneização, com boa hidratação da erva-mate, diferente de quando se adicionou 30 mL, em que ficou com uma textura muito líquida, com quantidade maior de água em relação a erva-mate, além de ficar um volume total elevado para o frasco, levando-se em consideração que ainda serão adicionados 15 mL de isoctano e 90 mL de solução ácida.

Ainda na Figura 6, para melhor visualização das proporções entre os 10 g de erva-mate e os volumes de água adicionados, a mesma sequência de fotos foi realizada em copos de béquer, onde se pode observar a hidratação da erva-mate.

A quantidade de amostra utilizada para a otimização desta etapa do procedimento de extração foi reduzida para $10 \pm 0,2$ g da erva-mate, pesada diretamente em frasco Duran de 250 mL, com tampa de rosca seguido da adição de 25 mL de água ultrapura em uma proporção de 1:2,5 p/p.

Figura 6: Teste realizado para o preparo de 10 g de erva-mate com volumes de água de A) 10 mL; B) 15 mL; C) 20 mL; D) 25 mL e E) 30 mL.



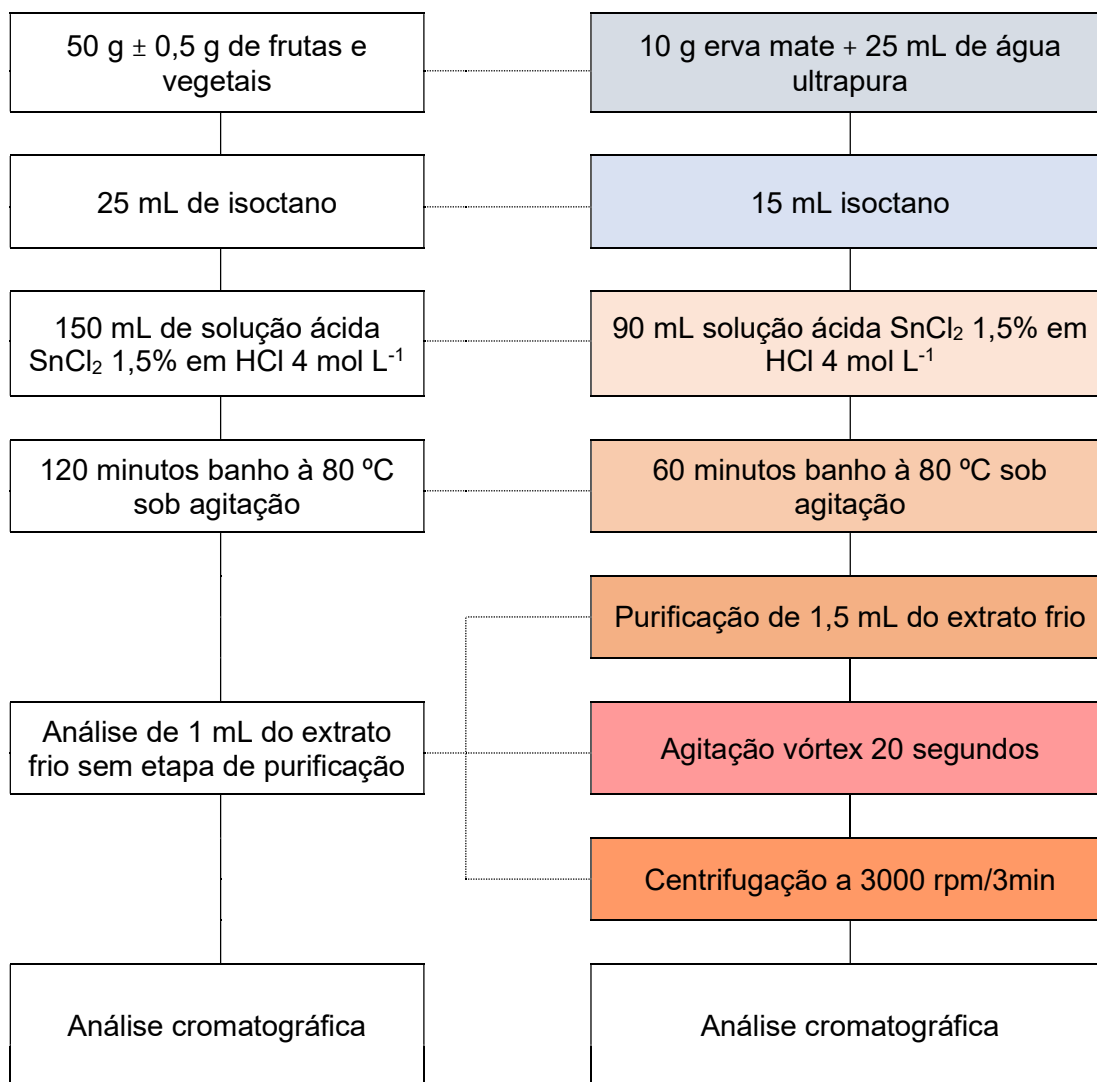
Na sequência, após a etapa de fortificação das amostras, adicionou-se 15 mL de isoctano e 90 mL de solução ácida de cloreto de estanho, seguidos dos testes de purificação e limpeza dos extratos, a fim de avaliar a recuperação do analito após fortificação das amostras de erva-mate.

O tempo de extração, ou seja, permanência dos frascos sob agitação, em banho de água, a temperatura de 80 °C, também foi reduzido de 120 para 60 minutos. Para o método de extração em frutas e hortaliças, o tempo de permanência dos frascos no banho sob agitação foi de 120 minutos (PIZZUTTI et al., 2017), porém, para o procedimento de extração em grãos e derivados (SILVA, 2011), foram testados os dois tempos de extração, obtendo bons resultados de recuperação tanto para 120 quanto para 60 minutos. Vargas et al. (2018), também utilizou o mesmo tempo para o método de extração de DTC em vinho, obtendo resultados satisfatórios. O tempo de extração de 60 minutos em banho sob agitação também foi utilizado para o procedimento de extração em maçã, alface, batata, morango e tomate e, de acordo com a estudo, pode também ser aplicado a outras frutas, legumes e cereais, pois os resultados foram satisfatórios (ČESNIK; GREGORČIČ, 2006).

Portanto, para este estudo, optou-se por deixar os frascos em banho de água a temperatura de 80 °C por 60 minutos, já que os resultados obtidos em estudos anteriormente desenvolvidos haviam sido satisfatórios utilizando este tempo para a extração.

Na Figura 7 estão representados o método tradicional e o método otimizado proposto para determinação de CS₂ em erva-mate com as respectivas modificações efetuadas.

Figura 7: Representação esquemática do método tradicional para determinação de CS₂ em frutas e vegetais e o método otimizado proposto para determinação de CS₂ em erva-mate com as respectivas modificações, indicadas pelas cores.



A validação da otimização das condições para a etapa de extração das amostras, em comparação ao método tradicional, apresentou algumas vantagens, como o aumento no número de análises utilizando o mesmo volume de isoctano do método tradicional, ou seja, com 1 L de isoctano o número de extrações aumentou de 40 para 66, assim como no volume utilizado da solução ácida de cloreto de estanho, com 1 L de solução houve um aumento de 6 para 11 análises.

Outro ponto positivo a ser destacado com relação a otimização das condições de extração é com relação à velocidade das extrações e número de amostras

extraídas. O tempo de extração foi reduzido de 120 minutos para 60 minutos, garantindo a extração do dobro de amostras no mesmo tempo.

Otimizar as condições de extração das amostras de erva-mate para determinação de resíduos de DTC proporcionou a utilização de menores quantidades de amostra e, com isso, uma menor quantidade de reagentes, diminuindo custos, garantindo rapidez e eficácia nas análises e menor volume de resíduos gerados.

A etapa posterior à conclusão dos testes e avaliações necessárias ao desenvolvimento do método foi a de validação do mesmo utilizando as condições otimizadas de extração das amostras.

4.4 PROCEDIMENTO DE PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS

Uma das etapas cruciais para determinação de resíduos de pesticidas em matrizes complexas é a purificação dos extratos, para evitar que compostos interferentes presentes na mesma levem a possíveis resultados incorretos, como mascaramento de compostos por componentes co-extraídos da matriz, resultados falsos positivos e quantificações imprecisas. Deste modo, deve-se avaliar a remoção de compostos co-extraídos, a fim de garantir melhora na seletividade da detecção dos analitos em estudo, além de evitar danos ao sistema cromatográfico, tanto no detector, como no injetor, uma vez, o bloqueio de sítios ativos presentes no injetor, devido a presença do extrato de matriz complexa, pode levar a transferência de compostos interferentes presentes na mesma à coluna cromatográfica, ocasionando a degradação ou adsorção térmica dos analitos em estudo (HAJŠLOVÁ et al., 1998).

No entanto, deve-se ter cautela nesta etapa de purificação dos extratos, pois alguns sorventes, quando utilizados em grandes quantidades ou aplicados de modo geral a qualquer tipo de matriz, sem estudo prévio, podem acarretar perdas parciais de alguns analitos, conseqüentemente obtém-se baixas recuperações dos analitos e resultados errôneos, como no caso do GCB que, quando aplicado em excesso, pode adsorver também os analitos presentes nos extratos (FU et al., 2019; HAJŠLOVÁ et al., 1998).

Esses sorventes são aplicados como agentes protetores dos analitos, como no caso dos carbamatos ($-O-CO-NH-$), por realizarem ligações de hidrogênio, podendo interagir com grupos silanol ($\equiv Si-OH$) presentes na coluna cromatográfica. A resposta da aplicação desses agentes depende do número de sítios ativos a serem

preenchidos no sistema cromatográfico, bem como a afinidade entre estes e os agentes, além de estarem, ao mesmo tempo, interagindo com os sítios ativos do injetor e da coluna e o analito de interesse. Para isso, os sorventes devem ter propriedades semelhantes as do analito estudado, como volatilidade, não podem reagir com os analitos em solução ou com o sistema GC, devem preservar coluna e detector não interferindo no desempenho dos mesmos (ANASTASSIADES; MAŠTOVSKÁ; LEHOTAY, 2003).

O PSA é um sorvente com capacidade de interação por meio de ligações de hidrogênio devido a presença dos grupos amina primária e secundária, é eficaz na purificação de extratos auxiliando na remoção de ácidos orgânicos, açúcares e alguns pigmentos polares. O GCB, tem afinidade com moléculas de pigmentos, como por exemplo, a clorofila. A combinação entre PSA e GCB é eficaz à purificação dos extratos de matriz complexa, pois cada um deles é responsável pela remoção de diferentes compostos interferentes (ANASTASSIADES et al., 2003), como no caso da matriz utilizada neste estudo, que possui em sua composição clorofila, ácidos orgânicos e outros pigmentos naturais.

A avaliação da etapa de purificação dos extratos foi realizada através da comparação dos resultados entre os testes, em termos de recuperação do analito, em amostras fortificadas com $0,9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$ ($n=3$), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Testes de purificação dos extratos com suas respectivas recuperações.

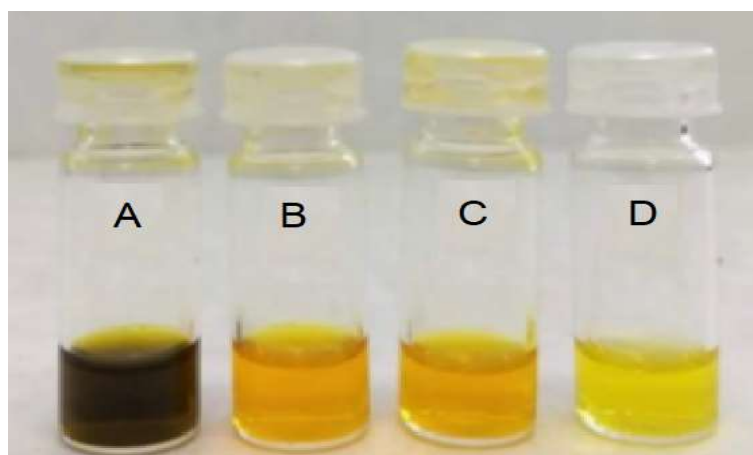
Teste	Recuperação	Média	SD	RSD%
I. 25 mg de PSA + 2,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO ₄	54,0	54,8	2,2	4,0
	57,3			
	53,1			
II. 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO ₄	86,8	82,5	4,9	5,9
	83,6			
	77,2			
III. 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO ₄ .	23,1	23,6	1,9	8,1
	25,7			
	22,0			

O resultado para o teste I, em termos de recuperação média, foi de $54,8 \pm 4\%$, demonstrando que a baixa quantidade de GCB (2,5 mg) permitiu a presença de alguns co-extratos, o que possivelmente levou a supressão do sinal de CS_2 . Em comparação ao teste III, onde foram utilizados 50 mg de GCB, os resultados da recuperação média foram mais baixos, apenas $23,6 \pm 8,1\%$, indicando que, possivelmente, uma parte do CS_2 tenha ficado adsorvido irreversivelmente no GCB, uma vez que este foi utilizado em maior quantidade.

Ao analisar os resultados obtidos para o teste II, onde foram utilizados 25 mg de PSA e 7,5 mg de GCB mais 150 mg de MgSO_4 , observou-se uma recuperação média de $82,5 \pm 5,9\%$, valor este dentro do intervalo de recuperação aceitável (70-120%) sugerido pelo DG-SANTE (2019). Portanto, o teste II demonstrou ser eficaz na remoção de compostos da erva-mate que foram co-extraídos, sem que houvesse perdas significativas de CS_2 .

Na Figura 8, podemos observar a comparação visual com relação a remoção dos pigmentos presentes na matriz, entre o extrato sem a etapa de purificação (Figura 8 A), o qual ficou com uma cor bem mais intensa, escurecida, e os testes realizados com os sorventes (Figura 8 B, C e D), onde a diferença de coloração entre eles não muda muito quando observados apenas visualmente.

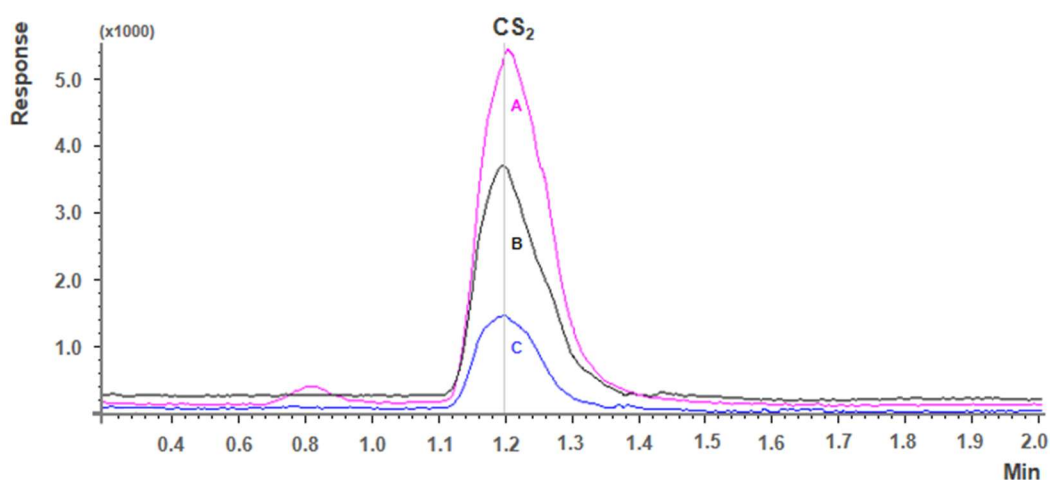
Figura 8: Comparação entre os extratos de erva-mate (A) sem etapa de purificação; (B) 25 mg de PSA + 2,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 ; (C) 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 ; (D) 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 .



Por mais que, visualmente não se observe muita diferença entre os extratos já purificados, ao se analisar a Figura 9, onde se tem a comparação do sinal

cromatográfico para cada um dos teste realizados, conseguimos verificar as recuperações dos analitos em amostras fortificadas a $0,9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$, demonstrando qual dos testes foi mais eficiente nesta etapa de purificação dos extratos de erva-mate nesse nível de concentração. Neste caso, devido a melhor remoção dos compostos interferentes da matriz que foram co-extraídos, como ácidos, açúcares, carotenóides e clorofila, o teste realizado com 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 , demonstrou ser o mais eficiente nos extratos de erva-mate fortificados a $0,9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$, conforme cromatograma apresentado a seguir.

Figura 9: Cromatograma obtido para os extratos de erva-mate fortificados a $0,9 \text{ mg kg}^{-1} \text{ CS}_2$ após etapa de purificação dos extratos por d-SPE empregando (A) 25 mg de PSA + 7,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 ; (B) 25 mg de PSA + 2,5 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 e (C) 50 mg de PSA + 50 mg de GCB + 150 mg de MgSO_4 .



Estudos realizados com erva-mate e outras matrizes semelhantes a mesma, abordam diferentes metodologias utilizadas para purificação dos extratos, detecção e quantificação de analitos alvo para determinação de resíduos de pesticidas.

De acordo com estudo realizado por Pareja et al. (2015), dois métodos foram comparados e validados para determinação de 42 pesticidas organofosforados em erva-mate, utilizando como procedimentos de extração e limpeza dos extratos, a extração assistida por microondas (MAE, do inglês *Microwave Assisted Extraction*) e CEN-QuEChERS modificada, ambos com detecção e quantificação por GC-FPD.

A MAE utiliza como solvente extrator acetonitrila (MeCN) com auxílio de microondas a 800 W, pressão de 10 psi, aquecimento a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ em 10 minutos e mantido por 15 minutos, filtração à vacuo do extrato com MeCN, levado à evaporador

para concentração. A purificação ocorre com a redissolução do extrato seco em MeCN em cartucho de sílica com adição de tolueno, eluição dos analitos com acetona-tolueno para cartucho de ENVI-carb e, finalizado com eluição em MeCN. O extrato final coletado, com evaporação do solvente, e o analito dissolvido em acetato de etila (EtOAc) para análise em GC-FPD (PAREJA et al., 2015).

No CEN-QuEChERS na etapa de extração junto a amostra, adiciona-se gelo e MeCN em tubo PTFE, com MgSO₄, NaCl, e citrato de sódio, levando para centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm, seguido da etapa de limpeza com PSA, GCB e MgSO₄, agitação por 20 segundos em vortex e centrifugação nas mesmas condições anteriores, em seguida, adição de ácido fórmico em MeCN, finalizando com evaporação e dissolução em EtOAc para análise em GC-FPD. De acordo com os resultados apresentados no estudo, o método que utilizou QuEChERS apresentou menor efeito matriz do que o MAE, devido a utilização dos sorventes PSA e GCB serem eficazes na remoção de compostos interferentes presentes nos extratos de erva-mate, porém, de modo geral, o MAE apresentou melhor extração para os resíduos dos pesticidas estudados devido à utilização de microondas no procedimento de extração e, portanto, melhor desempenho nas condições experimentais testadas de acordo com os parâmetros de validação próprios (PAREJA et al., 2015).

Estudos com chás produzidos a partir de folhas secas semelhantes à erva-mate, foram avaliadas para determinação de pesticidas utilizando diferentes metodologias, incluindo extração por diferentes solventes, como EtOAc, cicloexano e MeCN, combinando diferentes procedimentos de purificação dos extratos como SPE com cartuchos Carb-NH₂, SPE com cartuchos Envi-Carb e cromatografia de permeação em gel (GPC), d-SPE com PSA, GCB e florisil, aplicando LC-MS/MS e GC-MS para detecção e quantificação dos analitos estudados (HUANG et al., 2007, 2009; KANRAR; MANDAL; BHATTACHARYYA, 2010). Os resultados apresentados para essas metodologias foram satisfatórios, atendendo aos parâmetros de validação estabelecidos pelos órgão regulamentadores próprios. O método que utilizou d-SPE com PSA, GCB e florisil foi bastante eficiente, devido aos compostos presentes nos extratos de chá serem de origem vegetal, assim como erva-mate.

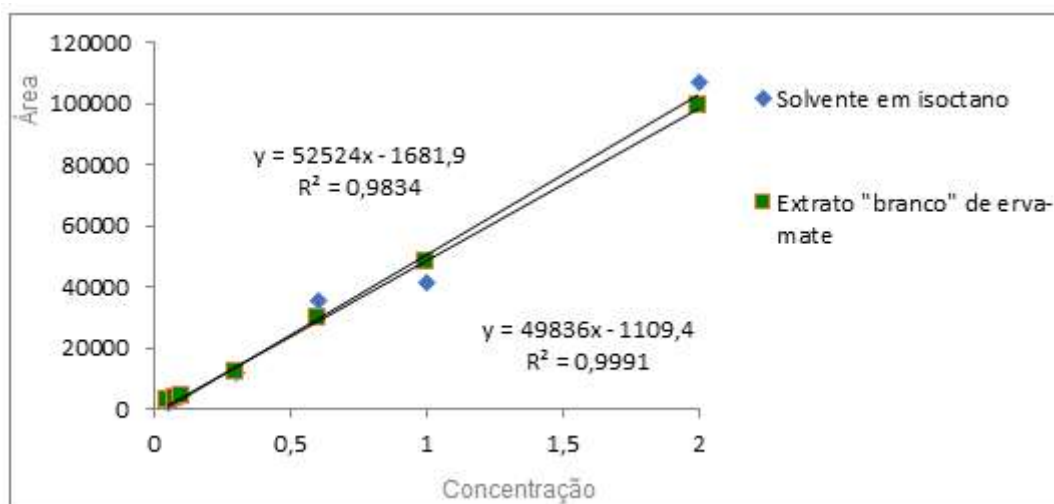
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Os resultados da avaliação do método cromatográfico para determinação de DTC, em termos de CS₂, em erva-mate, conforme os parâmetros de validação estão descritos abaixo. Esses resultados foram obtidos empregando-se as condições cromatográficas descritas anteriormente, no item 3.8.

4.5.1 Linearidade e efeito matriz

As equações das soluções das curvas analíticas para o CS₂, apresentadas no gráfico da Figura 10, mostram os coeficientes angulares (a), coeficientes lineares (b), o coeficiente de determinação (r^2) e a faixa linear de concentração de 0,05 a 2,0 mg L⁻¹ de CS₂ (n=7) das soluções das curvas analíticas preparadas tanto em solvente quanto em extrato branco de erva-mate.

Figura 10: Curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade para soluções analíticas preparadas em solvente e em extrato branco de erva-mate, na faixa linear de concentração de 0,05 a 2,0 mg L⁻¹ de CS₂.



De acordo com a equação da reta obtida para soluções das curvas analíticas preparadas em extrato branco de erva-mate, dentro das condições cromatográficas estabelecidas no item 3.8, verificou-se que o método apresenta resposta linear no intervalo de concentrações estudadas para a solução analítica preparada em extrato de matriz, uma vez que, o coeficiente de determinação (r^2) obtido foi maior que 0,999,

valor este considerado satisfatório segundo DG-SANTE (2019) e que a faixa linear de trabalho é a mesma fixa linear, ou seja, são as mesmas concentrações da curva.

Na Tabela 5, estão apresentados os dados referentes ao estudo da linearidade, com as respectivas médias das áreas e os RSD% para as soluções das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato branco de erva-mate, nas concentrações estudadas.

Tabela 5: Média das áreas e seus respectivos RSD% obtidos após injeção (n=7) das soluções das curvas analíticas preparadas em solvente e em extrato branco de erva-mate, nas concentrações de 0,05 a 2,0 mg L⁻¹ de CS₂.

Concentração (mg L ⁻¹ de CS ₂)	Curva analítica em solvente isooctano		Curva analítica em extrato branco de erva-mate	
	Média das áreas (n=7)	RSD%	Média das áreas (n=7)	RSD%
	0,05	2184	4,4	2455
0,08	3440	3,1	3464	8,5
0,1	4409	2,9	4034	8,2
0,3	11848	3,7	11640	8,5
0,6	35269	2,0	29331	11,3
1,0	41239	1,6	48194	11,4
2,0	106760	2,5	98940	9,1
Efeito matriz	-5,1%			

O valor calculado para o efeito matriz através dos coeficientes angulares das retas das curvas analíticas, demonstrado na Tabela 5, mostra que o efeito matriz observado foi relativamente baixo (-5,1), uma vez que, de acordo com DG-SANTE (2019), os resultados para o efeito matriz $\geq -20\%$ a $\leq +20\%$ estão dentro dos valores aceitáveis para determinação de contaminantes em níveis traço. Este valor indica uma tendência a supressão do sinal dentro da faixa aceitável, comprovando eficiência da etapa de purificação do extrato.

Além disso, os valores obtidos para os RSD%, tanto para a solução analítica preparada em solvente quanto preparada em extrato de matriz, também ficaram

dentro da faixa de valores descritos como satisfatórios (entre 1,6 e 12,7%) pelo DG-SANTE (2019), que devem ser $\leq 20\%$.

O teste t, ou seja, a comparação estatística entre os resultados obtidos para o efeito matriz, indicou não haver diferenças significativas ($p = 0,895$) entre as soluções preparadas em solvente orgânico daquelas preparadas em extrato de erva-mate, indicando que a purificação dos extratos teve bons resultados para a remoção dos interferentes co-extraídos e que não houve aumento ou diminuição significativas na resposta do detector ao analito em estudo, preservando também a vida útil do sistema cromatográfico.

Portanto, a avaliação da etapa de limpeza do extrato de matriz complexa é indispensável para redução dos efeitos causados pela mesma, como alterações nas porcentagens de recuperação, mascaramento do pico do analito de interesse, levando a resultados errôneos, podendo ocorrer erros de identificação do analito, mesmo este estando ausente, devido aos interferentes presentes na matriz apresentarem semelhança, gerando um resultado falso positivo. Outra alteração é a superestimação do resultado devido a um aumento do sinal do detector, quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos pesticidas. Para minimizar esses efeitos, pode-se fazer uma calibração utilizando, inicialmente, extrato da matriz em branco, afim de compensar os efeitos causados por interferentes presentes na matriz (PINHO et al., 2009).

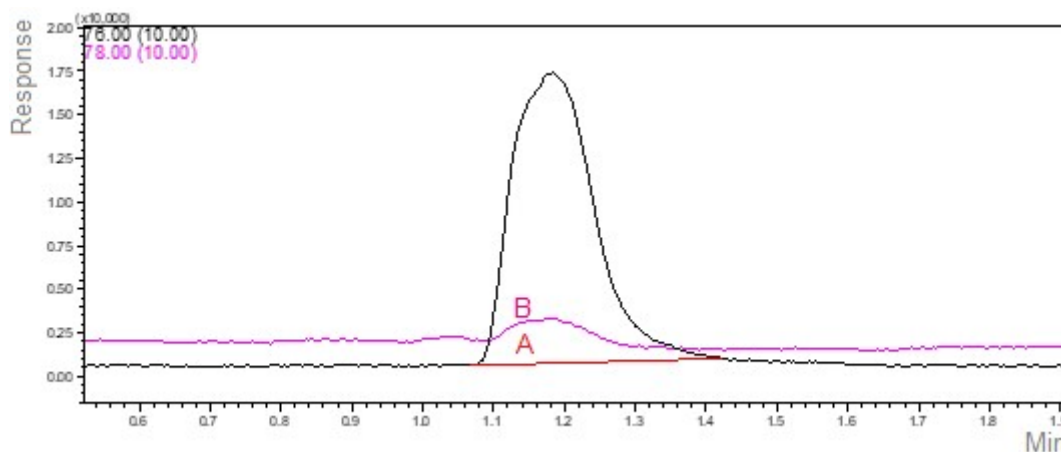
4.5.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores estimados para o LOD e LOQ do método para CS₂, foram, respectivamente, 0,05 mg L⁻¹ CS₂ e 0,1 mg kg⁻¹ CS₂, conforme Figura 11, e estes valores foram obtidos de acordo com os procedimentos já descritos no item 3.9.2.

Deste modo, o LOQ do método foi considerado como sendo a concentração 0,1 mg kg⁻¹ de CS₂, por ser a menor concentração validada, que atende aos critérios descritos no DG-SANTE (2019) para um método quantitativo, sendo esses, recuperação entre 70-120% e RSD $\leq 20\%$, e o LOD 0,05 mg L⁻¹ CS₂ como sendo o menor nível de concentração detectado pelo método a partir das 7 injeções de padrão de CS₂ preparado em extrato de matriz e com RSD $\leq 20\%$, correspondendo a 0,08 mg

kg⁻¹ CS₂ na matriz. A Figura 11 apresenta o cromatograma para o LOD e LOQ do método.

Figura 11: Cromatograma com LOD (A) e LOQ (B) do método.



4.5.3 Precisão e exatidão

Para o estudo da exatidão em termos de recuperação, realizou-se a fortificação das amostras em erva-mate com tiram em quatro níveis de concentração 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 mg kg⁻¹ CS₂, realizado em 7 replicatas (n=7) para cada nível de concentração, conforme descrito no item 3.9.3.

Para avaliação do método em termos de precisão relacionada à repetibilidade (RSD_r), foram realizados os mesmos procedimentos descritos para estudo da recuperação. Para o estudo da precisão intermediária (RSD_{pi}), realizou-se o mesmo procedimento utilizado na RSD_r, porém executado por diferentes analistas com um intervalo de 15 dias.

Os resultados para esses parâmetros estão demonstrados a seguir, na Tabela 6.

Tabela 6: Recuperações médias, precisão em termos de repetitividade (RSD_r), e de precisão intermediária (RSD_{pi}) obtidos para a fortificação das amostras de erva-mate com tiram nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 mg kg^{-1} CS_2 , realizadas por dois analistas diferentes com intervalo de tempo de 15 dias.

Nível de fortificação em termos de CS_2 (mg kg^{-1})	Recuperação % \pm RSD (%) (n=7)		Média das recuperações (%) \pm RSD (%) (n=14)	Valores de p
	Analista 1	Analista 2		
0,1	118,2 \pm 5,3	83,4 \pm 9,5	100,8 \pm 19,4	<0,0001
0,3	98,9 \pm 11,2	86,4 \pm 8,1	92,5 \pm 11,4	0,03
0,5	93,0 \pm 6,8	96,0 \pm 5,0	94,5 \pm 5,8	0,20
1,0	73,1 \pm 4,5	71,3 \pm 5,7	72,2 \pm 5,1	0,51

Os resultados obtidos para fortificação e recuperação de CS_2 ficaram entre 71,3 e 118,2%, com repetitividade e precisão intermediária, respectivamente, $RSD_r \leq 11,2\%$ e $RSD_{pi} \leq 19,4\%$, ou seja, resultados satisfatórios para as concentrações estudadas, uma vez que estão dentro dos limites aceitos e recomendados para processos de validação de métodos cromatográficos, conforme descrito pelo DG-SANTE (2019).

Mesmo a exatidão e precisão estando dentro dos limites recomendados, ao se comparar os resultados de exatidão e precisão nas amostras fortificadas observa-se que nas concentrações 0,5 e 1,0 mg kg^{-1} CS_2 , realizadas por diferentes analistas, não há grandes diferenças entre os valores obtidos. Porém, ao comparar com os resultados obtidos nas amostras fortificadas, em mesmas condições, nas concentrações 0,1 e 0,3 mg kg^{-1} de CS_2 , ou seja, concentrações mais baixas, verifica-se que há diferença entre os resultados.

Esta diferença indica a importância em se ter analistas devidamente treinados e experientes para este tipo de análises, principalmente quando se trabalha em concentrações mais baixas.

4.5.4 Aplicação do método em amostras comerciais

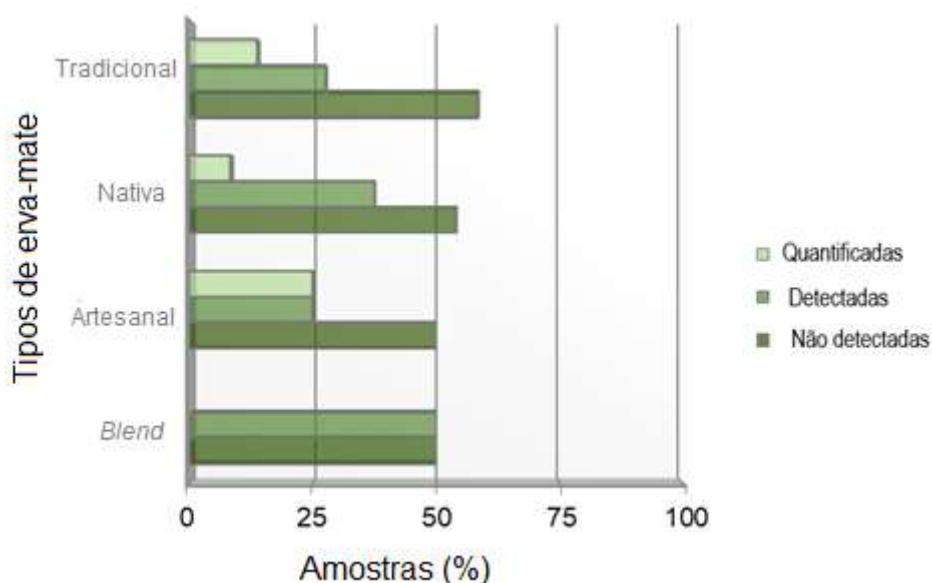
Após estudo e validação do método miniaturizado para determinação de resíduos de DTC em erva-mate, foi aplicado o método para analisar amostras comerciais.

Ao todo foram analisadas 65 amostras de erva-mate, destas, 61 amostras produzidas e comercializadas no sul do Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, 3 amostras de erva-mate produzidas no Brasil e exportadas para o Uruguai e, 4 amostras de erva-mate produzidas na Argentina e comercializadas no Brasil. As amostras coletadas para o monitoramento eram de diferentes tipos, sendo, tradicional, nativa, artesanal e *blend*.

Ao analisar os resultados das 65 amostras estudadas neste monitoramento, em 33,8% delas foram detectados resíduos de CS₂, com valores inferiores ao LOQ. A nível de quantificação, foram obtidas 10,8% das amostras de erva-mate com concentração de CS₂ variando entre 0,14 e 0,92 mg kg⁻¹.

A seguir, na Figura 12 estão os resultados do monitoramento obtido para os quatro tipos de erva-mate utilizados neste estudo.

Figura 12: Resultados do monitoramento obtidos para os quatro tipos de erva-mate utilizadas neste estudo quanto a presença de resíduos de DTC.



A legislação brasileira não prevê uso de pesticidas em erva-mate durante seu cultivo e, por isso, não há um LMR estabelecido para este produto no Brasil. Porém, de acordo com o Regulamento da Comissão da União Europeia 2017/171, o qual estabelece como LMR de DTC 0,1 mg kg⁻¹ de CS₂ em chás produzidos a partir de erva-mate, para o uso de fungicidas da classe dos ditiocarbamatos, como manebe, mancozebe, metiram, propinebe, tiram e ziram (EUROPEAN COMMISSION, 2017), os níveis quantificáveis de resíduos de CS₂ para as amostras comerciais de erva-mate

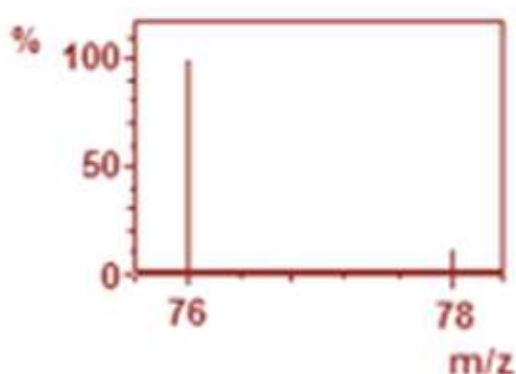
monitoradas neste estudo, estariam acima do LMR para DTC por ele estabelecido, com os níveis de resíduos mais altos quantificáveis de DTC para as amostras produzidas na Argentina, em uma concentração 0,79 e 0,92 mg kg⁻¹ CS₂ e Brasil com 0,73 mg kg⁻¹ CS₂. Na Tabela 7, podem ser observados os resultados obtidos para o monitoramento das amostras de erva-mate.

Tabela 7: Níveis de concentração de CS₂ obtidos após monitoramento em amostras de erva-mate produzidas no Brasil e Argentina e comercializadas no Brasil e Uruguai.

Amostra	Origem de produção	Origem de mercado	Concentração de CS ₂ (mg kg ⁻¹)
Artesanal	RS/Brasil	RS/Brasil	0,73
Nativa	RS/Brasil	RS/Brasil	0,14
		RS/Brasil	0,26
Tradicional	RS/Brasil	Uruguai	0,59
	Argentina	RS/Brasil	0,79
	Argentina	RS/Brasil	0,92
	SC/Brasil	SC/Brasil	0,40

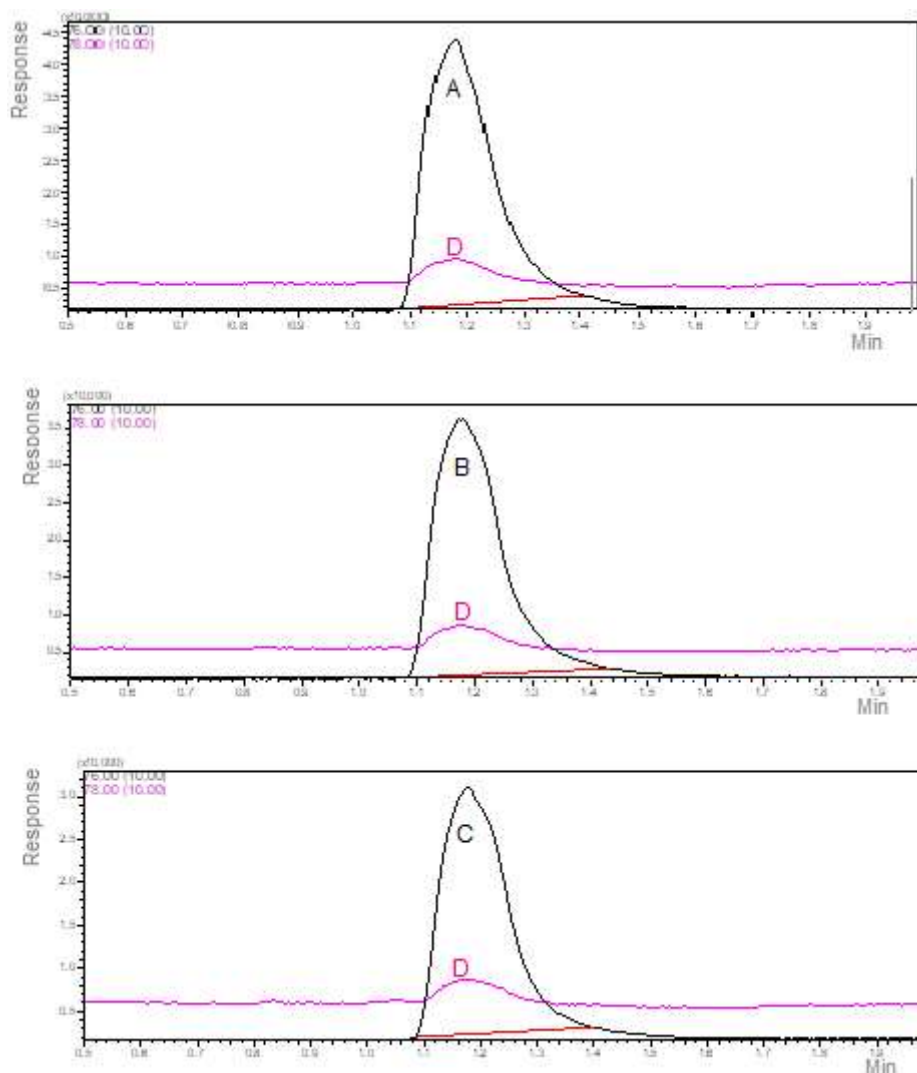
Para que não houvessem erros na identificação do analito em estudo, foram utilizadas as mesmas referências do estudo de quantificação, como o tempo de retenção de $\pm 1,8$ minutos, bem como as referências das formas dos picos cromatográficos e razão isotópica 10:1 entre m/z 76 e 78. A Figura 13 mostra o espectro de massas dos íons monitorados.

Figura 13: Espectro de massas dos íons monitorados na faixa de interesse 76 e 78 m/z.



Na Figura 14 estão representados os cromatogramas das amostras de erva-mate com níveis quantificáveis de CS₂ em amostras de erva-mate comercializadas na Argentina, Brasil e Uruguai.

Figura 14: Cromatogramas das amostras de erva-mate comercial com níveis quantificáveis de CS₂ da (A) Argentina (0,92 mg kg⁻¹ CS₂), (B) Brasil (0,73 mg kg⁻¹ CS₂), (C) exportadas para o Uruguai (0,59 mg kg⁻¹ CS₂), (D) erva-mate correspondente ao LOQ 0,1 mg kg⁻¹ CS₂.



Em 33,3% das amostras monitoradas de produção no Rio Grande do Sul/Brasil, foram encontrados resíduos de DTC, sendo que, em 21,4% destas foi possível a quantificação dos resíduos de DTC. As amostras de erva-mate monitoradas, produzidas no Brasil e exportadas ao Uruguai, também obtiveram resultados positivos

quanto a presença de resíduos quantificáveis de DTC, em uma concentração de 0,59 mg kg⁻¹ CS₂.

A erva-mate, por se tratar de um produto muitas vezes de uso diário por uma grande parte da população, principalmente na porção sul do Brasil, por questões de tradição e hábito e, por não termos na legislação brasileira nenhuma lei em vigor que sustente o uso de pesticidas nesse tipo de cultivo, não havendo assim, um limite máximo para estes resíduos, e com base nos resultados apresentados neste estudo, fica o alerta para a presença de resíduos de DTC na erva-mate comercializada no Brasil, caracterizando uma possível contaminação àquelas pessoas que a consomem diariamente e em grandes quantidades.

5 CONCLUSÃO

O estudo, desenvolvimento e validação do método para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em amostras complexas como a erva-mate, desde a otimização do procedimento de extração através da miniaturização até a análise por GC-MS, foram, sem dúvidas, imprescindíveis para que fossem obtidos os resultados acerca da avaliação de resíduos de ditiocarbamatos nas amostras de erva-mate dos tipos tradicional, nativa, artesanal e *blend*, produzidas e comercializadas no Brasil.

Deste modo, os resultados apresentados neste estudo, permitem concluir que, o método para determinação de ditiocarbamatos em erva-mate, é eficiente e de grande importância para que se tenha um adequado controle de qualidade dos produtos que chegam à mesa dos consumidores.

O desenvolvimento da etapa de purificação utilizada para os extratos de erva-mate, além de ser um procedimento prático e de baixo custo quando comparado ao valor dos componentes de um sistema cromatográfico, apresentou resposta positiva quanto à retirada de pigmentos co-extraídos pelo solvente orgânico, uma vez que a matriz em estudo é bastante complexa.

Os resultados dos parâmetros de validação obtidos ao longo deste estudo para o método individual de determinação dos resíduos de DTC em erva-mate, foram satisfatórios para análise de resíduos de pesticidas, demonstrando ser eficiente, exato e preciso.

Fica o alerta sobre a importância no preenchimento das lacunas da legislação brasileira quanto ao uso de pesticidas, beneficiando, assim, a cadeia produtiva da erva-mate, a fim de garantir segurança alimentar aos consumidores do produto final uma vez que resíduos de ditiocarbamatos foram encontrados nas amostras avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAKERLI, R. B. et al. Carbon disulfide formation in papaya under conditions of dithiocarbamate residue analysis. **Food Chemistry**, v. 188, p. 71–76, 2015.

ALBUQUERQUE, R. Á. M. **Extração Em Fase Sólida (Spe) E Microextração Em Fase Sólida (Spme) Para Análise De Agrotóxicos Em Água Potável**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2019.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412–431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1–2, p. 163–184, 2003.

ANVISA. **Resolução RDC nº276, de 22 de setembro de 2005** Diário Oficial da União Brasil, 2005.

ANVISA. **Monografias Autorizadas de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-eautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 30 jul. 2020a.

ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 296, DE 29 DE JULHO DE 2019** Publicada no DOU nº 146, de 31 de julho de 2019, 2019b.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília/DF. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>.

ANVISA. **Monografias autorizadas**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/t/4529json-file-1>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/monografias-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ARSLAN, S. et al. The false positive effect of residue of sulphur sources on dithiocarbamate analysis based on CS₂ measurement. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 36, n. 1, p. 131–140, 2019.

AZEVEDO, M. Abordagem inicial no atendimento ambulatorial em distúrbios neurotoxicológicos . Parte II – agrotóxicos. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 46, n. 4, p. 21–28, 2010.

BALARDIN, R. S. Conheça o mancozebe. **Mancozebe: muito Além de Um Fungicida**, p. 147, 2017.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) DE PIRETRÓIDES EM ÁGUA. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001.

BERRADA, H. et al. Surveillance of pesticide residues in fruits from Valencia during twenty months (2004/05). **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 36–44, 2010.

BERTÉ, K. A. D. S. **TECNOLOGIA DA ERVA-MATE SOLÚVEL**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2011.

BOJANIC, A. **OPAS/OMS Brasil - OPAS/OMS destaca importância da atuação conjunta dos setores da saúde, agricultura e meio ambiente na regulamentação de agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5756:op-as-oms-destaca-importancia-da-atuacao-conjunta-dos-setores-da-saude-agricultura-e-meio-ambiente-na-regulamentacao-de-agrotoxicos&Itemid=839>.

BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 1, p. 86–100, 2014.

BORTOLUZZI, J. H. **Aplicação da técnica de SPME-GC-MS na determinação dos produtos voláteis gerados na degradação térmica de polímeros**. UFSC - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2007.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10–15, 2012.

BRASIL. **Presidência da República - LEI Nº 13.791, DE 3 DE JANEIRO DE 2019**. Brasil, 2019.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003.

CABRERA, L. C. et al. Extração em Fase Sólida Dispersiva na determinação de r - esíduos e contaminantes em alimentos Dispersive Solid Phase Extraction in the determination. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 227–240, 2012.

CALDAS, E. D. et al. Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by a spectrophotometric method using a vertical disulfide reaction system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4521–4525, 2001.

CARVALHO, R. D. E.; BARBOSA, F. H. F. Resíduos de agrotóxicos organofosforados e ditiocarbamatos presentes na cultura de tomate consumidos no estado de minas gerais nos anos de 2006, 2007 e 2008: Avaliação da exposição humana. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 13, n. 1, p. 171–190, 2013.

CASTALDELLI, A. P. A. et al. Efeito da erva mate (*Ilex paraguariensis* A . St . -Hill) no comportamento e fisiologia de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 514–519, set. 2011.

ČESNIK, H. B.; GREGORČIČ, A. Validation of the method for the determination of dithiocarbamates and thiuram disulphide on apple, lettuce, potato, strawberry and tomato matrix. **Acta Chimica Slovenica**, v. 53, n. 1, p. 100–104, 2006.

CHAWLA, S. et al. Validation and analysis of thiram, a dithiocarbamate, as CS₂ from soybean (*Glycine max*) samples on GC–MS. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 11, p. 6991–6998, 2019.

CLARKE, D. G.; HARRY BAUM, E. L. S.; HESTER, W. F. Determination of Dithiocarbamates. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 23, n. 12, p. 1842–1846, 1951.

CODEX ALIMENTARIUS. **RECOMMENDED METHODS OF SAMPLING FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES FOR COMPLIANCE WITH MRLS.**

Disponível em: https://apeda.gov.in/apedawebsite/Announcements/CODEX_method_for_sampling_for_determination_of_pesticides.pdf. Acesso em: 17 mar. 2022.

COLPO, A. Z. C. **PERFIL FITOQUÍMICO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.St. Hill.)**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA, 2012.

CULLEN, T. E. Spectrophotometric Determination of Dithiocarbamate Residues on Food Crops. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 221–224, 1964.

CVUA, Community Reference Laboratories for Residues of Pesticides Single Residue Methods Analysis of Dithiocarbamate Residues in Foods of Plant Origin involving Cleavage into Carbon Disulfide, Partitioning into Isooctane and Determinative Analysis by GC-ECD, Stuttgart, Germany. Version 2. 2009

DALLABRIDA, V. R. et al. Com erva-mate não se faz só chimarrão! Situação atual e perspectivas de inovação no setor ervateiro do Planalto Norte Catarinense. **DRd - Desenvolvimento Regional em debate**, v. 6, n. 2, p. 247–273, jul. 2016.

DANIEL, O. **Erva-mate: Sistema de produção e processamento industrial**. Douradoos-MS: Universidade Federal da Grande Dourados, 2009. v. 53

DE KOK, A & VAN BODEGRAVEN, P. The determination of dithiocarbamate pesticides in fruits, vegetables and cereals via iso-octane extraction of carbondisulfide and subsequent GC- ECD analysis. 2000.

DE LIMA, M. F. B. et al. Experimento didático abordando a importância da validação metodológica no estudo da química do sulfato no meio ambiente. **Educacion Quimica**, v. 28, n. 4, p. 295–301, 2017.

DGEEC – DIRECCIÓN GENERAL DE ESTADÍSTICAS, E. Y C. **COMPENDIO ESTADÍSTICO 2018**Gobierno Nacional.

DÍEZ, C. et al. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, n. 1–2, p. 11–23, 2006.

EMBRAPA. **Anais do Seminário Erva-mate XXI: modernização no cultivo e diversificação do uso da erva-mate**.

EMBRAPA. **Erva 20 Sistema de produção de erva-mate**. 1ª ed. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2019.

ERNEY, D. R. et al. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n. 1, p. 57–63, 1993.

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 199–204, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION REGULATION (EU) 2017/171 of 30 January 2017 - Pesticide residue(s) and maximum residue levels (mg/kg). **Official Journal of the European Union**, n. 396, 2017.

EUROPEAN COMMISSION. **Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/12682/2019)**European Commission, 2019. Disponível em: <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmp/plt_article.asp?CntID=727>. Acesso em: 25 abr. 2021.

FERLA, N. J.; DA SILVA, G. L.; JOHANN, L. **A cultura da erva-mate e os ácaros : situação atual e perspectivas**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora Evangraf, 2018.

FREITAS, G. B. L. DE et al. ERVA-MATE, MUITO MAIS QUE UMA TRADIÇÃO, UM VERDADEIRO POTENCIAL TERAPÊUTICO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VIII, n. 3, p. 101–113, jul. 2011.

FU, Y. et al. A comprehensive analysis of 201 pesticides for different herbal species-ready application using gas chromatography–tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1125, n. May, p. 121730, 2019.

FUJIYOSHI, T. et al. Evaluation of the matrix effect on gas chromatography - mass spectrometry with carrier gas containing ethylene glycol as an analyte protectant. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 136–141, 2016.

GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÁMARA, C. Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, n. 2, p. 225–229, 2004.

GORENSTEIN, O. MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM FRUTAS E HORTALIÇAS FRESCAS COMERCIALIZADAS NA CEAGESP : análise de resultados de 2003. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 10, p. 34–42, 2004.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G.; IEDE, E. T. **MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO DE PRAGAS E DOENÇAS DA ERVA-MATE (Ilex paraguariensis St. Hil.)**. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2000.

GRIMALT, S.; DEHOUCK, P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1433, p. 1–23, 2016.

HAJŠLOVÁ, J. et al. Matrix-induced effects: A critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 283–295, 1998.

HAN, L.; SAPOZHNIKOVA, Y.; LEHOTAY, S. J. Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp. **Analytica Chimica Acta**, v. 827, p. 40–46, 2014.

HENRIQUE, F. A. **Caracterização físico-química da erva mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil) e infusão, comercializada no sul do Brasil propondo critérios de confiabilidade do produto**. UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA, 2018.

HUANG, Z. et al. Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1–2, p. 154–162, 2007.

HUANG, Z. et al. Simultaneous determination of 103 pesticide residues in tea samples by LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 9, p. 1294–1301, 2009.

IBAMA. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal PAM**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 1 fev. 2022.

IBRAMATE. **Diagnóstico da cadeia produtiva da erva-mate**. Disponível em: <<http://ibramate.com.br/2018/05/28/diagnostico-da-cadeia-produtiva-da-erva-mate>>. Acesso em: 23 mar. 2022.

INDRAYANTO, G. **Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs**. 1. ed. Elsevier Inc., 2018. v. 43

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS** Documento de caráter orientativo Instituto Nacional de Metrologia.

INYM - INSTITUTO NACIONAL DE LA YERBA MATE. **Informe del Sector Yerbatero**. Posadas - Provincia de Misiones. Disponível em: <<http://www.inym.org.ar/>>. Acesso em 10 ago. 2021.

KANRAR, B.; MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, A. Validation and uncertainty analysis of a multiresidue method for 42 pesticides in made tea, tea infusion and spent leaves using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 12, p. 1926–1933, 2010.

KEPPEL, G. E. Collaborative study of the determination of the dithiocarbamate residues by a modified carbon disulfide evolution method. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 54, n. 3, p. 528–532, 1971.

KRÜGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa**. Centro Universitário Feevale, 2009.

LEHOTAY, S. J. et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548–2560, 2010.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; LIGHTFIELD, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 615–629, 2005.

LEMES, V. R. et al. Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 50–57, 2005.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O. et al. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 366–374, 2012.

MAG. **Costos de producción agrícola 2019**. Dirección General de Planificación, 2019.

MAPA. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Resíduos e Contaminantes em Alimentos**.

MAPA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA Nº 1, DE 16 DE JUNHO DE 2014** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Defesa Agropecuária, 2014.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - AGROFIT.** Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 27 jul. 2020.

MARONI, J. R. **Mercado internacional está sedento por erva-mate brasileira.** Disponível em: <<https://www.gazetadopovo.com.br/agronegocio/mercado-internacional-esta-sedento-por-erva-mate-brasileira/>>. Acesso em: 29 abr. 2020.

MEDRADO, M.; MOSELE, S. **O Futuro da Investigação Científica em erva-mate** **Article.** Colombo, PR: CIP – Brasil. Catalogação na Publicação Embrapa Florestas, 2004.

MEIRA, A. P. G. Técnicas de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos de origem vegetal: uma revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 2, p. 766, 2015.

MELLO, D. C. **DETERMINAÇÃO DOS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS ETILENOBISDITIOCARBAMATOS (EBDC) E PROPINEBE EM ALIMENTOS POR HPLC-UV.** Universidade de Brasília, 2014.

MORAES, R. F. DE. **Agrotóxicos no Brasil : padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória.**

MOZZAQUATRO, J. O. et al. Dithiocarbamate residues in fruits and leaves of passion fruit (*Passiflora edulis*) from different Brazilian regions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 9, p. 1834–1840, 2019.

MUJAWAR, S. et al. Validation of a GC-MS method for the estimation of dithiocarbamate fungicide residues and safety evaluation of mancozeb in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 150, p. 175–181, 2014.

OELLIG, C.; SCHWACK, W. Comparison of HILIC columns for residue analysis of dithiocarbamate fungicides. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 40, n. 8, p. 415–418, 2017.

OLIVEIRA, C. N. S. et al. **ERVA-MATE Boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico.** Brasília/DF.

OLIVEIRA, Y. M. M. DE; ROTTA, E. Area de distribuição natural de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Embrapa Florestas**, n. 1969, p. 17–36, 1985.

OMS. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification.** World Health Organization, 2019.

OPAS. **Manual De Vigilância Da Saúde De Populações Expostas a Agrotóxicos.** Brasília

PAREJA, L. et al. Comparison and evaluation of two methods for the pesticide residue analysis of organophosphates in yerba mate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 98–104, 2015.

PASSOS, F. R.; DOS REIS, M. R. Resíduos De Agrotóxicos Em Alimentos De Origem Vegetal: Revisão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 23, p. 49–58, 2013.

PAULA, S. et al. Doenças fúngicas em erva-mate. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. Sci. Elec. Arch. Vol. 11 (2), p. 27–34, 2018.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003.

PÉREZ-PARADA, A. et al. Transfer of pesticides to the brew during mate drinking process and their relationship with physicochemical properties. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 45, n. 8, p. 796–803, 2010.

PEREZ, M. Â. F. Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante? **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens**, v. 22, n. 3, p. 1–9, 2010.

PERZ, R. C.; VAN LISHAUT, H.; SCHWACK, W. CS₂ blinds in Brassica crops: False positive results in the dithiocarbamate residue analysis by the acid digestion method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 792–796, 2000.

PINHO, G. P. et al. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987–995, 2009.

PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1142, n. 2, p. 123–136, 2007.

PIZZUTTI, I. R. et al. Comparison between three chromatographic (GC-ECD, GC-PFPD and GC-ITD-MS) methods and a UV-Vis spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamates in lettuce. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 775–781, 2017.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51–64, 2011.

QUEIROZ RIBEIRO, M. et al. Efeitos Da Ingestão Crônica De Extrato Aquoso De Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*) Preparado Na Forma De "Chimarrão" Sobre Os Níveis Séricos De Colesterol, Triglicérides E Glicose 1. **Ries**, v. 1, n. 1, p. 25–37, 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, M. L. et al. Pesticides: Use and Risks for the Environment. **Holos Environment**, v. 8, n. 1, p. 53–71, 2008.

RIMAYI, C. et al. Alternative calibration techniques for counteracting the matrix effects in GC-MS-SPE pesticide residue analysis - A statistical approach. **Chemosphere**, v. 118, n. 1, p. 35–43, 2015.

RODRÍGUEZ-RAMOS, R. et al. Critical review and re-assessment of analyte protectants in gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1632, 2020.

ROSA, A. C. DA; MARQUES, M. R. DA C.; PÉREZ, D. METODOLOGIA PARA PRESERVAÇÃO DO FUNGICIDA MANCOZEBE EM AMOSTRAS DE SOLO. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1639–1642, 2011.

ROSA, L. DA; OSÓRIO SILVA, L. M. Ascensão e declínio da exportação ervateira da província do Rio Grande do Sul na segunda metade dos oitocentos. **Geosul**, v. 34, n. 72, p. 435–458, 2019.

SAMSIDAR, A.; SIDDIQUEE, S.; SHAARANI, S. M. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, n. November 2017, p. 188–201, 2018.

SCHENCK, F. J. SPE Cleanup and the Analysis of PPB Levels of Pesticides in Fruits and Vegetables. **Florida Pesticide Residue Workshop**, 2002.

SEGESSO, F.; TIRADO, R. **AGRICULTURA ECOLÓGICA Caso Misiones: LA CUNA DE LA YERBA MATE**. Misiones, Argentina: Greenpeace Argentina, 2015.

SENASA. **Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución-934- 2010**. Disponível em: <<http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-934-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>>. Acesso em: 27 out. 2021.

SILVA, R. C. DA. **DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM GRÃOS E DERIVADOS POR GC-PFPD , GC-ITD-MS E LC-MS / MS**. Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

SILVA, R. C. DA et al. Clean-up Strategy for Dithiocarbamate Fungicide Determination in Soybean by GC-ITD-MS and GC-PFPD: Method Development and Validation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 38, p. 11485–11493, 2021.

SILVA, R. A. G.; FARIA, A. M. DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM MÉIS PRODUZIDOS NA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO POR UHPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 307–313, 2020.

SINDIMATE. **Sindicato da Indústria do mate no estado do Rio Grande do Sul. Dados estatísticos: erva amigo (2021)**. Disponível em: <<http://www.sindimaters.com.br/pagina.php?cont=estatisticas.php&sel=9>>. Acesso em: 23 mar. 2022.

SOARES, L. C. T.; NETO, Á. J. DOS S. Protetores de analitos e efeito de matriz em GC. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 2, p. 58–71, 2012.

VARELI, C. S. et al. Analytical method validation to evaluate dithiocarbamates degradation in biobeds in South of Brazil. **Talanta**, v. 184, p. 202–209, 2018a.

VARELI, C. S. et al. Validação de método analítico para avaliar a degradação de ditiocarbamatos em biobeds no sul do Brasil. **Elsevier**, v. 184, p. 202–209, 2018b.

VARGAS, T. DE S. et al. Fungicides in red wines produced in south america. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 35, n. 11, p. 2135–2144, 2018.

VIEIRA, T. **Viabilidade econômica da cultura de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St. - Hil.) em áreas de reserva legal no Paraná**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2012.

VRYZAS, Z.; PAPADAKIS, E. N.; MOURKIDOU, E. P. Microwave-assisted extraction (MAE)-acid hydrolysis of dithiocarbamates for trace analysis in tobacco and peaches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2220–2226, 2002.

WAICHMAN; EVE; NINA. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. **Crop Protection**, v. 26, n. 4, p. 576–583, 2007.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, n. 1–2, p. 200–212, 2007.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. II. Improvement and extension to new analytes. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 202–214, 2008.

WHO. Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: A general introduction. **Environmental Health Criteria**, n. 78, p. 1–140, 1988.

WHO. IARC MONOGRAPHS RISKS TO HUMANS OF CARCINOGENIC ON THE EVALUATION -. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**, v. 79, 2001.

APÊNDICE A – CÁLCULO PARA O PREPARO DA SOLUÇÃO DE CLORETO DE ESTANHO A 1,5% EM ÁCIDO CLORÍDRICO 4 MOL L⁻¹.

- Para preparar 1 L de HCl 4 M partindo do HCl puro com 37% de pureza e densidade de 1,19 g mL⁻¹:

1 mol ----- 36,46 g
 4 mol ----- X → **X = 145,84 g de HCl puro**

100 g HCl ----- 37 g de HCl puro
 X ----- **145,84 g de HCl puro** → **X = 394,16 g de HCl comercial**

Densidade → $D = \frac{m(g)}{v(mL)}$ $1,19 \frac{g}{mL} = \frac{394,16 g}{v}$

**v = 331,22 mL do produto comercial para preparar
 1 L de solução de HCl 4 M**

- SnCl₂ 1,5%:
 1,5 g de SnCl₂ ----- 100 mL
 X ----- 1000 mL → **X = 15 g de SnCl₂ para preparar 1 L de solução**

Preparo da solução:

Pesou-se 15 g de SnCl₂ em um béquer de 500 mL e, logo em seguida, adicionou-se 331,22 mL de HCl concentrado. Em uma proveta de 1 L, adicionou-se 600 mL de água ultrapura, adicionando-se, vagarosamente, a solução ácida de SnCl₂ sobre a água. Completou-se o volume a 1000 mL.

Após preparo da solução, armazenou-se a mesma em frasco de cor âmbar, certificando-se da vedação e devidamente rotulado.

APÊNDICE B – CÁLCULO DO FATOR DO MÉTODO

Cálculo fator do método:

3,0 mg CS₂ kg⁻¹ em matriz

3,0 mg CS₂ ----- 1000 g de matriz (erva-mate)

X ----- 10 g de matriz utilizada no procedimento

X = 0,03 mg CS₂ em 10 g de erva-mate

Essa massa de CS₂ presente em 10 g de erva-mate vai estar no volume adicionado de isoctano utilizado no procedimento, ou seja, 15 mL.

0,03 mg CS₂ ----- 10 g erva-mate ----- 15 mL isoctano

X ----- 1000 mL

X = 2,0 mg CS₂ L⁻¹ em solução

Logo: 3,0 mg CS₂ kg⁻¹ em matriz corresponde à 2,0 mg CS₂ L⁻¹ em solução. Para esta relação, tem-se que o fator do método é 1,5.