

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

Júlia Paula Neu

**APLICAÇÃO DE DESENHO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO PARA
OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
DITIOCARBAMATO EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)**

Santa Maria, RS

2022

Júlia Paula Neu

**APLICAÇÃO DE DESENHO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO PARA
OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATO
EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Curso 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

Neu, Júlia Paula

APLICAÇÃO DE DESENHO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO PARA OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATO EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) / Júlia Paula Neu.- 2022.

83 p.; 30 cm

Orientadora: Ionara Regina Pizzutti

Coorientadora: Carmem Dickow Cardoso

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Delineamento experimental Plackett-Burman 2. Delineamento do Composto Central Rotacional 3. Estudo univariado 4. Otimização de método analítico 5. Determinação de ditiocarbamato em erva mate I. Pizzutti, Ionara Regina II. Cardoso, Carmem Dickow III. 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, JÚLIA PAULA NEU, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) 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.

Júlia Paula Neu

**APLICAÇÃO DE DESENHO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO PARA
OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATO
EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso 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 30 de março de 2022



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



Rosselei Caiel da Silva, Dr^a (UFSM)



Rochele Cassanta Rossi, Dr^a (UNISINOS)

Santa Maria, RS
2022

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo
que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, obrigada por mais esta etapa vencida e por todas as pessoas maravilhosas que tu colocaste em meu caminho.

A toda a minha família, especialmente meus pais, pelo incentivo, por acreditarem em mim e por, principalmente, confiarem que este dia chegaria! Obrigada pelo amor, amizade e torcida.

Aos meus irmãos Ismael e Adriana por todo auxílio dado, principalmente nos últimos momentos de finalização deste trabalho.

A minha querida amiga Rose, que me auxiliou tantas vezes, tanto para o desenvolvimento deste trabalho quanto em conselhos tanto profissional como pessoal, com toda certeza foi necessário. Está sendo um enorme prazer compartilhar este momento com você.

Agradeço à Professora Dra. Ionara Regina Pizzutti, por me aceitar ser minha orientadora de Mestrado no CEPARC. Agradeço do fundo do coração poder ter concluído comigo esta etapa da minha vida.

A Dra. Rosselei Caiel da Silva pela participação no exame de qualificação e banca examinadora. As Profa. Dra. Simone NoreMBERGER Kunz pela participação no exame de qualificação. A Profa. Dra. Rochele Cassanta Rossi pela participação na banca examinadora. Obrigada, vocês também fazem parte desta conquista.

A todos os colegas e amigos CEPARCIANOS, Bárbara, Paola, Priscila, Ingrid que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho. Agradeço pelo companheirismo e ótimos momentos desfrutados ao longo desses dois anos juntos.

Agradeço IMENSAMENTE ao secretário do PPGQ-UFSM Ademir pela simpatia e atenção de sempre.

E a todos que, de forma direta ou indireta, se fizeram presentes no processo de desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

APLICAÇÃO DE DESENHO EXPERIMENTAL ESTATÍSTICO PARA OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATO EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

AUTOR: Júlia Paula Neu

ORIENTADORA: Dr^a. Ionara Regina Pizzutti

A erva mate, originária da América Latina, vem sendo consumida de diversas formas, devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Ao longo dos anos os fungicidas ditiocarbamatos (DTC) tem sido utilizado no controle de doenças fúngicas em uma grande variedade de culturas. Atualmente não existe na legislação brasileira recomendações fitossanitárias nem Limite Máximo de Resíduos (LMR) para a erva mate, por isso a necessidade de desenvolver e otimizar um método confiável para a identificação e quantificação de resíduos de DTC. Neste trabalho, foi realizado um delineamento experimental por Placket-Burman (PB), para determinar as variáveis experimentais independentes. Em seguida, foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para obter os melhores resultados para a otimização do método. Após os resultados obtidos, foi realizado um estudo univariado bem como a miniaturização do método. Por último o estudo da validação do método foi realizado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), seletividade precisão e exatidão. As curvas analíticas foram lineares na faixa de 0,05 a 10 mg L⁻¹ de CS₂, com um coeficiente de determinação (r²) maior que 0,99, o LOD do método foi de 0,05 mg kg⁻¹ de CS₂. Já o LOQ do método foi de 0,1 mg Kg⁻¹. A precisão mostrou-se adequada, com valores de RSD médios entre 8,2 e 16,1% e recuperações médias de 81,4 e 116,2%. O efeito matriz (-14,9) não foi significativo. Assim os resultados obtidos pela otimização e validação do método foram satisfatórios e apresentam um grande avanço no método analítico para a determinação de DTC em erva mate, por se ter um procedimento de rápido e barato de preparação de amostras para análise de (DTC) em erva-mate, usando Cromatografia gasosa acoplado a Espectrometria de Massas (GC-MS), além de ser um método amigável com o meio ambiente, pois gera menos resíduos químicos. Amostras de erva mate de diferentes supermercados de Santa Maria/ RS foram analisadas e em nenhuma delas detectada a presença de DTC.

Palavras-chaves: Placket-Burman. DCCR. DTC. CS₂. Erva mate

ABSTRAT

ANWENDUNG EINES STATISTISCHEN EXPERIMENTELLEN DESIGNS ZUR OPTIMIERUNG EINES VERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG VON DITHIOCARBAMAT IN YERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)

AUTHOR: Júlia Paula Neu

ADVISOR: Dr^a. Ionara Regina Pizzutti

Dithiocarbamates (DTC) are one of the main classes of fungicides applied to the control of fungal diseases on a large variety of crops. In this work, a fast and cheap sample preparation procedure for DTC analysis in yerba mate using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed. A multivariate approach by Plackett-Burmann Design (PBD) was carried out for screening of DTC extraction variables (concentration and volume of hydrolysis acid solution, isooctane volume, and water bath shaking time and temperature). The significant variables were studied by a Central Composite Rotational Design (CCRD) to optimize the DTC recovery. A complete validation study was performed according to the European Union guideline - SANTE document. The screening experiment obtained by PBD indicates that three experimental parameters were significant: concentration and volume of hydrolysis solution, and time of hydrolysis. The final optimized and validated method proved to be reproducible and robust in routine analysis. For recovery studies, blank yerba mate samples were spiked with a thiram solution at the 3 spike concentrations of 0.1; 0.5 and 2.0 mg kg⁻¹, as CS₂, and analyzed by 3 analysts (n = 7, per analyst). Excellent recoveries, in the range of 81.4 to 116.2%, with good precision (all RSDs ≤ 16.1%), were obtained. The intermediate precision (RSD_R) was evaluated by different analysts (1 and 2) and a RSD_R ≤ 8.2% was obtained, indicating the very good repeatability of the method. The interlaboratory reproducibility also showed recovery and precision values within the acceptable limits (70-120%, and <20%, respectively). The robustness of the method was proven to be good, based on the acceptable deviations with changes of most conditions of the critical parameters. The analytical curves were linear in the concentration range of 0.05-10 mg L⁻¹ CS₂, r² > 0.999, and the matrix effect was not significant (-14.9%). The LOD and LOQ were 0.05 and 0.1 mg kg⁻¹ CS₂, respectively. The method presented important advantages: a five-fold reduction of the isooctane extraction volume; an increase of sample throughput from 1 to 30 sample extractions, due to sample mass reduction without HCl addition; a two-fold reduction of extraction time; a smaller sample amount to process, and less waste volume aiming at green chemistry principles. The application of the multivariate approach proved to be of influence in improving the extraction efficiency.

Keywords: Plackett-Burmann. CCRD, Dithiocarbamate. CS₂. Yerba mate

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fluxograma do procedimento inicial de otimização da extração de ditiocarbamatos em erva mate	38
FIGURA 2 - Fluxograma do procedimento de extração fortificação empregado neste estudo.....	43
FIGURA 3 - Espectros de massas obtidos (A) no centro de dados da biblioteca NIST® e (B) para a solução de 2 mg kg ⁻¹ de CS ₂	48
FIGURA 4 - Gráfico de Pareto de efeito principal padronizado	49
FIGURA 5 - Gráfico de superfície de resposta em função da concentração da solução ácida de hidrólise e tempo de banho de água com agitação.....	54
FIGURA 6 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de CS ₂ , preparadas em isooctano e em extrato “branco” de erva mate	56
FIGURA 7 - Cromatograma a partir de solução analítica em extrato branco e fortificação na concentração de 0,1 mg kg ⁻¹ de CS ₂	58
FIGURA 8 - Cromatograma obtido por GC-MS para as recuperações/fortificação nos três níveis a, b e c (0,1; 0,5; e 2,0 mg kg ⁻¹ CS ₂ , respectivamente)	61
FIGURA 9 - Cromatograma obtido por GC-MS com a confirmação negativa de CS ₂ na razão de íons 10:1 entre m/z 76:78, na análise de amostras comerciais de erva mate, mostrando o comportamento da duplicata designada como EM 17	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Fatores experimentais e níveis de delineamento Plackett-Burman.....	37
TABELA 2 - Parâmetro para cada variável significativa, em considerações de hidrólise multivariada, para extração de DTC na erva mate	39
TABELA 3 - Parâmetros utilizados para o estudo univariado, para a extração de DTC na erva mate	40
TABELA 4 - Condições de hidrólise para extração de DTC da erva-mate, estudadas em cada experimento PB, resultados das médias de recuperação (%) e RSD (%)	50
TABELA 5 - Recuperação (%) para cada variável significativa, em condições de hidrólise multivariada, para extração de DTC na erva-mate.....	52
TABELA 6 - Condições de hidrólise, e média das recuperações, com respectivo RSD% para o estudo univariado	55
TABELA 7 - Recuperações médias, precisão em termos de repetibilidade (RSDr) obtidas para erva-mate fortificadas com tiram em concentrações equivalentes de 0,1, 0,5 e 2,0 mg kg ⁻¹ CS ₂ e resultados estatísticos da ANOVA para a análise de precisão intermediária e reprodutibilidade dos ensaios de recuperação/fortificação com o valor de confiança de 95% (n=7)	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Σ	– Somatório
a	– Coeficiente angular
b	– Coeficiente linear
CEPARC	– Centro de Pesquisa e Análises de Resíduos e Contaminantes
CS ₂	– Dissulfeto de carbono
DCCR	– Delineamento Composto Central Rotativo
DMT	– Dimetilditiocarbamato
DTC	– Ditiocarbamato
EDCB	– Etenobisdicarbamato
EPA	– Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
ETU	– Etilenotioreia
GCB	– Carvão ativado- do inglês <i>graphitized carbon black</i>
GC	– Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
IBAMA	– Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LMR	– Limite Máximo Permitido
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDTC	– Metilditiocarbamato
MS	– Detector de Espectrometria de Massas, <i>Mass Spectrometry</i>
m/z	– Razão massa/carga
PBDC	– Propilenobisditiocarbamato
PBD	– Planejamento Plankett-Burman
PFPD	– Cromatografia Gasosa com foto detecção por chama pulsada
PSA	– Amina primária secundária, do inglês <i>Primary and Secondary Amine</i>
PARA	– Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
QuEChERS	– Do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>
RSD	– Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
WHO	– Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	ERVA MATE	17
3.1.1	Composição química	18
3.1.2	Produção e consumo	19
3.2	AGROTÓXICOS	20
3.2.1	Ditiocarbamato	22
3.3	LIMITES MÁXIMOS RESÍDUOS (LMR) E TOXICIDADE	25
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	25
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
2.5.1	Plackett-Burman	29
3.5.2	Delineamento Composto Central Rotacional	30
3.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODO	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS	34
4.2	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	35
4.3	PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES	35
4.4	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E DILUÍDA DE TIRAM E CS ₂	36
4.5	ESTUDO MULTIVARIADO	36
4.5.1	Delineamento experimental Plackett-Burman	37
4.5.2	Delineameto Composto Central Rotacional	39
4.6	ESTUDO UNIVARIADO	39
4.7	ESTUDO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODO	40
4.7.1	Extração otimizada da amostra “branco”	40
4.7.2	Limite de detecção e limite de quantificação	41
4.7.3	Curva analítica, linearidade e efeito matriz	41
4.7.4	Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) ...	42
4.7.5	Recuperação e exatidão	42
4.7.6	Robustez	44
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45

4.9	APLICAÇÃO DO MÉTODO	45
4.10	LIMPEZA DOS MATERIAIS USADOS	46
4.11	DESCARTE DE RESÍDUOS.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	ANÁLISE POR GC-MS.....	47
5.2	DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN	48
5.3	DESIGN COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL	51
5.4	ESTUDO UNIVARIADO	54
5.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODO	56
5.5.1	Curva analítica, estudo da linearidade e efeito matriz.....	56
5.5.2	Limites de detecção e de quantificação	57
5.5.3	Exatidão e precisão	59
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
5.7	APLICAÇÃO DO MÉTODO	62
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE B - CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	76
	APÊNDICE C- FATOR DO MÉTODO	77
	APÊNDICE D - EFEITOS ESTIMADOS PARA A EXTRAÇÃO DE DTC EM ERVA MATE.....	78
	APÊNDICE E - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE CS₂	79
	APÊNDICE F - LINEARIDADE DAS CURVAS EM SOLVENTE E EXTRATO MATRIZ	80
	APÊNDICE G - RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO/ FORTIFICAÇÃO	81

1 INTRODUÇÃO

A erva mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta originária da América do Sul, com significativa importância econômica e cultural em países como Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai devido ao consumo regular de mate, que é uma infusão preparada a partir de suas folhas (BRACESCO, 2019).

Suas folhas contêm substâncias como polifenóis (ácido clorogênico), metilxantinas (cafeína e teobromina), saponinas e mais de 200 fitoquímicos, que contribuem para a atividade antioxidante de seus extratos (VARGAS et al., 2021). Além disso, estudos têm demonstrado que o consumo de bebidas à base de erva mate pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento de câncer e doenças cardiovasculares, bem como pode estar associado a efeitos estimulantes, propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas, antimutagênicas e antiobesidade (da SILVEIRA, 2017).

Para o cultivo de erva mate, no Brasil, não existe agrotóxico autorizado, em consequência disto, não se têm Limite Máximo de Resíduos (LMR). Porém, é realizado o controle químico para a maioria das pragas de acordo com recomendações para outras culturas (DANIEL, 2009).

Os fungicidas ditiocarbamato DTC são amplamente usados para prevenir vários patógenos fúngicos nas plantas, tentando garantir rendimento e qualidade, associado a baixos custos de produção agrícola (WANG et al., 2021; LIU et al., 2015; CRNOGORAC E SCHWACK, 2009).

Os métodos utilizados para determinação de DTC são diferentes da maioria sendo necessário um método individual para sua determinação, devido a sua baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos e na água, além da rápida degradação na presença de oxigênio e/ ou umidade. Portanto, não podem ser extraídos ou analisados utilizando métodos analíticos multirresíduos, como por exemplo QuEChERS (VARELI et al., 2018; TSEN et al., 2021).

Esses métodos baseiam-se na hidrólise ácida de DTC na presença de cloreto de estanho (II) (SnCl_2) e quantificado como dissulfeto de carbono (CS_2), por diferentes técnicas, como Espectrofotometria de absorção no UV-Visível ou Cromatografia gasosa (CG) associado a diferentes detectores (PIZZUTTI et al., 2017).

Por ser uma classe de fungicidas mais comercializada no BR, o desenvolvimento e a otimização de métodos analíticos para a determinação de

resíduos de DTC em diferentes matrizes, de forma mais fácil, eficaz, com menor quantidade de reagentes e conseqüentemente menos resíduos químicos é necessário.

O delineamento Plackett-Burman (PB) permite a avaliação simultânea de muitas variáveis independentes com um pequeno número de experimentos (NEVES et al., 2021). As variáveis importantes, podem ser otimizadas usando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (FRANCK, 2014). Assim técnicas multivariadas vêm sendo muito utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos por serem mais econômicas e efetivas, além de permitir que as variáveis estudadas sejam otimizadas simultaneamente (NOVAES et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a partir de delineamentos experimentais, o preparo de amostra e validar um método cromatográfico simples, econômico e seguro para a determinação de DTC em termos de CS₂ em erva mate.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Modelar, filtrar e avaliar a partir do delineamento PB as variáveis independentes que possam afetar a extração da amostra.
- ✓ Otimizar o método e minimizar a quantidade de amostra, volume de reagentes químicos e tempo de análise com base em DCCR.
- ✓ Validar o método miniaturizado para a determinação de DTC, como CS₂ em erva mate.
- ✓ Aplicar o método validado em amostras de erva mate comerciais, adquiridas no supermercado de Santa Maria, no Rio Grande do Sul (RS), Brasil.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ERVA MATE

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida por erva mate, foi classificada em 1820 pelo botânico francês Saint-Hilaire. Pertence à família botânica aquifoliácea. É uma espécie nativa que cresce naturalmente nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul e é encontrada principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (SANTO et al., 2021)

Segundo Ibramate & Fundomate (2018) relatos cronológicos de acontecimentos, comprovam a utilização da erva mate por diferentes tribos indígenas da América do Sul, devido a existência de suas folhas em túmulos dos índios quíchuas, antecessores aos incas, no Peru. Desde os primórdios da colonização portuguesa e espanhola encontram-se registros da sua utilização pelos nativos, contudo por volta de 1610 começou a extração para fins comerciais, tornando-se o principal produto de exportação das Missões Jesuíticas.

Na década de 1930, a produção brasileira sofreu um duro golpe, pelo cultivo intensivo do mate na Argentina, fomentado por uma política de incentivos, resultando em autossuficiência no país que era grande importador do produto brasileiro (FODRA, 2019). Ainda neste período, se teve um incentivo para a criação de cooperativas de erva mate no Brasil, sendo em Santa Catarina (SC) a primeira cooperativa dos produtores e mateiros. No ano de 1938 foi criado o Instituto Nacional do Mate (INM), que tinha a finalidade de defender os interesses do mercado ervateiro (IBRAMATE & FUNDOMATE, 2018).

A partir da década de 1980, a cultura da erva mate despertou novamente o interesse como fonte de renda alternativa de pequenas e médias propriedades rurais. Assim, surgiram programas de incentivo visando a expansão dos mercados interno e externo (FODRA, 2019).

Na década de 1990 foram criadas as Câmaras Setoriais estaduais da erva mate nos estados produtores. Atualmente, cerca de 250 municípios do RS produzem erva mate, porém a maior parte do volume total da produção está concentrada em 219 municípios que formam os cinco principais polos produtivos, sendo eles: polos do Alto Taquari, Alto Uruguai, Vale do Taquari, Nordeste Gaúcho e Planalto/Missões (IBRAMATE & FUNDOMATE, 2018).

3.1.1 Composição química

Portando, no decorrer da história, a erva mate sempre esteve presente no RS, sendo consumida por diferentes imigrantes (italianos, alemães e açorianos) (RABAIOLLI, 2019), de diferentes formas, como chimarrão e chás, seja quente ou gelado (RIBEIRO, 2018). Seu uso, muito relacionado ao hábito de tomar chimarrão¹, por fazer parte da cultura gaúcha, vai além de aspectos históricos e culturais, por ser uma bebida natural e apresentar vasta propriedades benéficas, há uma grande associação no mercado consumidor como saudável (RABAIOLLI, 2019).

A erva mate é um alimento considerado rico em elementos essenciais como cálcio, potássio, magnésio, fósforo, cobre, ferro manganês entre outros (ROSSI& LAZANO, 2020). Contém ainda aminoácidos, flavonoides (rutina e luteolina), saponinas e taninos, bem como vitaminas C, B₁ e B₂ (SANTO et al., 2021; ARRIETA et al., 2018).

Estudos apontam que as propriedades farmacológicas da erva mate estão principalmente associadas ao alto teor de compostos fenólicos, encontrados predominantemente em suas folhas (FERRARIO et al., 2018; SANTETTI et al., 2021). Dentre estas, podem ser citadas as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (FERRARIO et al., 2018), além de possuir ações hipocolesterolêmicas, hepatoprotetoras e diuréticas, estimular o sistema nervoso central (KAUFMANN, et al., 2021), proteção contra o estresse oxidativo (PETRILLI et al., 2016), efeitos anti-obesogênicos (KIM et al., 2015) e efeitos antimutagênicos (BRACESCO et al., 2018), entre outros.

No entanto, uma série de fatores podem alterar a composição química da erva mate como: clima, solo, idade da folha, época de plantio e colheita, local de cultivo ou até mesmo o processamento industrial a que o material vegetal é submetido antes de ser vendido. Estes fatores naturais interferem diretamente nos componentes físico-químicos, assim como os sistemas de processamento determinam a qualidade de sobrevida do material erva mate e suas características sensoriais em especial (SANTO et al., 2021).

¹ Chimarrão: ou mate é uma bebida característica da cultura do sul da América do Sul consumida na forma de infusão à quente, de erva mate moída, em uma cuia com uma bomba.

3.1.2 Produção e consumo

A erva mate faz parte da dieta diária de grande parte das populações do Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil, sendo três as formas de consumo mais importantes: o chimarrão (extrato de água quente das folhas verdes secas; mate em países de língua espanhola), o tererê (extrato de água fria das folhas verdes secas) e o chá mate (extrato de água quente das folhas torradas) (KUNGEL et al., 2018).

O cultivo da erva mate ocorre majoritariamente em pequenas unidades de exploração, com utilização de mão de obra familiar (RABAIOLLI, 2019). Atualmente, quatro estados brasileiros concentram toda a produção de erva mate nacional. Em 2020 a produção nacional foi de 527.546 toneladas, destacando-se como maior produtor o estado do Paraná (PR), seguido pelo estado do RS, SC e por último Mato Grosso do Sul (MS). O estado do PR apresentou produção de 228.382 toneladas, seguido do RS que apresentou produção de 214.552 toneladas (IBGE, 2020).

Os municípios de Arvorezinha, Ilópolis, Anta Gorda, Palmeiras das Missões e Fontoura Xavier estão entre os cinco municípios que mais produziram erva mate no RS (IBGE, 2020). Estima-se que a Argentina seja o maior exportador de erva mate, enquanto o Brasil e o Uruguai são os consumidores mais importantes (SANTOS et al., 2020).

Considerada uma cultura economicamente importante, principalmente para os países sul-americanos, está se tornando popular em todo o mundo (FERRAZ JÚNIOR et al., 2020). Por ser uma planta que não é cultivada em escala comercial em nenhum outro lugar, a produção local tem sido impulsionada tanto pelo consumo interno quanto pela exportação (MOTTA et al., 2020).

Com isso, a erva mate tem desempenhado papéis econômicos e sociais importantes em muitas comunidades remotas no Brasil; estima-se que mais de 180 mil agricultores cultivem esta espécie, especialmente em pequenas propriedades (MOTTA et al., 2020).

O aumento da procura da erva mate, não está apenas relacionado as tradicionais destinações dela, mas sim, a um aumento da sua utilização na indústria química (tintas e resinas, medicamentos, desinfetantes e outros produtos), por mais que essa utilização ainda seja reduzida e sofre concorrência de outras matérias-primas (SINDIMATE PR, 2021).

3.2 AGROTÓXICOS

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pragas, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. A utilização de agrotóxicos no controle de pragas data do período clássico da Grécia e Roma, sendo o mais antigo registro atribuído aos sumérios que, em 2500 a. C., utilizavam enxofre para combater insetos (BARBOSA, 2004).

No século XX, muitos agrotóxicos serviram de arma química nas guerras da Coreia e do Vietnã, como, por exemplo, o Agente Laranja (mistura de 2,4 D e 2,4,5 T), desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis (LARINI, 1999).

A partir da década de 1950, quando se iniciou a chamada “Revolução Verde”, foi possível observar profundas mudanças no processo tradicional da produção agrícola, bem como nos impactos dessa atividade sobre o ambiente e a saúde humana. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agrotóxicos, foram disponibilizadas aos agricultores aumentando a produtividade através do controle de doenças e proteção contra insetos e outras pragas (RIBAS & MATSUMURA, 2009).

Já alguns ditiocarbamatos como, por exemplo, o mancozebe, embora proibido em vários países, é muito empregado no Brasil.

Os agrotóxicos, ou, pesticidas no Brasil, estão regulamentados pelo Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002, que estabelece em seu Artigo 1º as definições para agrotóxicos e afins:

produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos abrangem um grande número de substâncias químicas que diferem bastante em suas propriedades químicas e físicas, com diferentes modos de ação e grau de toxicidade, sendo divididos em três grandes classes: inseticidas, fungicidas e herbicidas, apesar de haver ainda os rodenticidas, moluscicidas, nematocidas e acaricidas (ARAUJO, 2019).

Quanto à natureza do ingrediente ativo, os agrotóxicos pertencem a diferentes grupos químicos. Na Quadro 1 estão inseridos os principais grupos químicos dos inseticidas, herbicidas e fungicidas (ANVISA, 2021).

Quadro 1 - Classificação química das principais classes de agrotóxicos e organismo alvo a combater, bem como alguns grupos químicos

Classe	Organismo-Alvo	Grupos Químicos
Inseticidas	Insetos, larvas e formigas	Organoclorados
		Organofosforados
		Carbamatos
		Piretróides (sintéticos)
Fungicidas	Fungos	Ditiocarbamatos
		Estrobilurinas
		Dicarboximidas
		Triazóis
Herbicidas	Plantas invasoras	Sulfanililcarbamatos
		Sulfoniluréias
		Bipiridílios
		Ácido piridinocarboxílicos

Fonte: Anvisa, 2021.

Depois dos herbicidas, os fungicidas, principalmente os ditiocarbamatos são os mais utilizados na agricultura, tanto durante o cultivo como na pós-colheita (ARAUJO, 2019).

No Brasil não existem agrotóxicos autorizados para o cultivo da erva-mate, porém o controle químico da maioria das pragas é feito de acordo com as recomendações para outras culturas. Entre os agrotóxicos usados popularmente estão os inseticidas carbaril e dimetoato, e os fungicidas captan e mancozebe (DANIEL, 2009).

3.2.1 Ditiocarbamato

Os DTC são fungicidas não sistêmicos amplamente utilizados na produção agrícola de frutas e vegetais, para tratamento do solo, sementes, aplicação foliar e pós-colheita (SCHIMIDT et al., 2013).

Os DTC são derivados do ácido ditiocarbâmico ($\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$), análogos dos carbamatos (CH_3NO_2), onde ambos os átomos de oxigênio são substituídos por átomos de enxofre e produzidos a partir da reação de amina primária e secundária, com dissulfeto de carbono sob condições alcalinas (KANCHI et al., 2013).

Pesquisas realizadas pela DuPont Company em 1931 revelam que alguns derivados do ácido ditiocarbâmico apresentavam atividade inseticida e fungicida (MELLO, 2014). Os primeiros DTC foram sintetizados a partir de uma monoamina e do dissulfeto de carbono, e o primeiro a alcançar importância como fungicida foi o dissulfeto de tetrametil-tiram, mais comumente conhecido como tiram, para o qual teve sua patente concedida em 1934 para Tisdale e Williams (GULLINO et al., 2010). No entanto, em 1940, o tiram não demonstrou ser eficiente na aplicação foliar, o que levou ao desenvolvimento de moléculas mais ativas, baseadas em sais metálicos do ácido ditiocarbâmico (MELLO, 2014).

Ainda em 1940, a companhia Rohm & Hass, prepararam o primeiro etilenobisditiocarbamato (EBDC), a partir de uma diamina, o nabam, utilizado em forma líquida, por ser instável em fase sólida. Entretanto, o nabam teve sua patente concedida apenas em 1943. Contudo, treze anos depois, foi demonstrado que o nabam não era em si um fungicida, mas apenas um composto ativo fungicida, quando exposto ao ar (DIMOND et al., 1943).

Em 1942, os pesquisadores Anderson e Kincaid relataram o DTC dimetil férrico (ferbam). Em sequência, o ferbam foi fortemente relacionado com o ziram (dimetil-ditiocarbamato de zinco). Sendo útil no manejo de doenças nas culturas (HEUBERGER & WOLFENBARGER, 1944).

Heuberger e Manns (1943) descobriram que o nabam sofria um efeito estabilizador quando adicionado sulfato de zinco ao tanque de pulverização. Assim surgiu, em 1944 o produto de nome comercial: Dithane-D₁₄. Com a adição de sulfato de zinco ao nabam, a estabilidade era melhorada e o produto de reação formado era o EBDC de zinco (zinebe). No qual em 1945, esse fungicida mostrou-se estável e superior, sendo comercializado como Dithane-Z-78. (GULLINO et al., 2010).

Em 1950, foi concedida a patente do EBDC de manganês (manebe) para DuPont, sendo mais ativo que o nabam e zinebe. No ano de 1962, novamente a companhia de Rohm & Hass patenteou um composto formado por complexo de íons de zinco com o manebe, passando a se chamar mancozebe (o qual é o mais importante de todos os DTC (GULLINO et al., 2010).

Nesta mesma época, o metiram foi introduzido na Alemanha pela Basf e o propinebe reportado pela primeira vez em 1963, ambos alquilenobisditiocarbamato (TOMLIN, 2006).

Baseado na estrutura do esqueleto de carbono, os DTC são categorizados em subclasses, dependendo da natureza do elemento que forma um complexo com o esqueleto organosulfurado (CRNOGORAC & SCHWACK, 2009).

Os grupos EBDC e propileno-bis-ditiocarbamatos (PBDC) são praticamente insolúveis em água e solventes orgânicos, formando quelatos poliméricos, já dimetilditiocarbamatos (DMDC) são ligeiramente solúveis em água e alguns solventes orgânicos polares (CRNOGORAC & SCHWACK, 2009).

Atualmente cinco DTC são registrados em 52 culturas no Brasil: o tiram, para aplicação no solo e tratamento de sementes, o metam-sódio para tratamento de solo, e o mancozebe, metiram e propinebe para aplicação foliar e pós-colheita (mancozebe) (ANVISA, 2021). Suas estruturas químicas estão apresentadas na Quadro 2.

Os DTC, principalmente o mancozebe, é o terceiro agrotóxico mais utilizado no Brasil, após os herbicidas glifosato e 2,4D (IBAMA, 2019), consequentemente seus resíduos estão em 5º lugar no ciclo de 2017/2018 com 464 detecções de 4.616 amostras analisadas, no Programa de Análise de Resíduos e Agrotóxicos em Alimentos (PARA) (ANVISA, 2019).

Quadro 2 – Estrutura química e características dos DTC de uso permitido no Brasil

Subclasses	Ditiocarbamatos	Fórmula Estrutural	Uso no Brasil
Etilenobis-ditiocarbamato (EBDC)	Mancozebe		Aplicação foliar em 51 culturas e em pós-colheita por imersão de frutos em 3 culturas.
Etilenobis-ditiocarbamato (EBDC)	Metiram		Aplicação foliar 22 culturas e por sulco de plantio em 1 cultura
Propilenobis-ditiocarbamato (PBDC)	Propinebe		Aplicação foliar em 9 culturas
Dimetil-ditiocarbamato (DMDC)	Tiram		Tratamento de semente em 12 culturas e solo 2 culturas
Metil-ditiocarbamato (MDDC)	Metam-sódico		Aplicação no Solo em 6 culturas

Fonte: Anvisa, 2021.

3.3 LIMITES MÁXIMOS RESÍDUOS (LMR) E TOXICIDADE

Segundo a Resolução nº 165, de 29 de agosto de 2003, LMR é definido como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa ppm ou mg kg^{-1} , ou seja, a quantidade máxima de resíduo de um agrotóxico que pode estar legalmente presente nos alimentos, sem causar danos à saúde do consumidor (BRASIL, 2003).

Os LMRs de DTC autorizados no Brasil variam de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para a cultura de alho a $4,0 \text{ mg kg}^{-1}$ em termos de CS_2 para pêsego (ANVISA, 2021).

Os DTC apresentam baixa toxicidade aguda, baixo custo de produção e baixa persistência ambiental, caracterizando-se por serem não sistêmicos, de amplo uso agrícola em frutas e vegetais, desde o preparo do solo, sementes, aplicação foliar e, até mesmo, na pós-colheita (SCHMIDT et al., 2013).

Porém nos últimos anos, esses fungicidas têm recebido uma atenção especial devido aos riscos do consumo de alimentos e bebidas contendo os produtos de degradação, a etilenotiuréia (ETU) produzida pelos EBDC, e propilenotioureia (PTU), produzida pelos PBDC. Esses metabólitos mostraram serem carcinogênicos e mutagênicos em ratos, além de a ETU apresentar mutagenicidade, teratogenicidade e propriedades antitireoidianas (BASTOS et al., 2007; ARAUJO, 2019).

As intoxicações por DTC frequentemente ocorrem através das vias oral e respiratória, podendo também ser absorvidos pela via cutânea. Nos casos de exposição intensa provocam dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite (EPA, 2001). Também associados a efeitos crônicos que incluem desregulação endócrina, alteração da resposta do sistema imunológico, defeitos de desenvolvimento em crianças e doença de Parkinson (ATUHAIRE et al., 2017).

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Uma variedade de métodos tem sido desenvolvida ao longo dos anos para analisar resíduos de DTC em diferentes culturas. Muitos desses métodos são baseados na hidrólise ácida de DTC na presença de cloreto de estanho (II) empregando HCl para subsequente análise do carbono dissulfeto de carbono (CS_2), como inicialmente proposto por Keppel (1971).

Ao longo dos anos, modificações do método original têm sido relatadas, como demonstrado no Quadro 3, principalmente em relação ao pré-tratamento da amostra, com o objetivo de reduzir o tempo e as dificuldades do método de Keppel, tendo em vista a preocupação ambiental, uma vez que o método original utiliza acetato de chumbo. No entanto, a maioria dos métodos comumente empregados ainda se baseia na detecção do CS₂ gerado após a hidrólise ácida de algum ditiocarbamato presente na cultura. (GONZÁLVEZ, 2011).

Por causa da insolubilidade inerente aos solventes de extração comuns e à baixa estabilidade, os DTC não são capazes de extração em conjunto com outros grupos de pesticidas (MUJAWAR et al., 2014).

Quadro 3 – Principais métodos para determinação de ditiocarbamatos desde a década de 1950 até a atualidade

continua

Década	Matriz	Método	Autor
1950	Folhas de batata e salsão	Hidrólise ácida empregando H_2SO_4 ($2,2 \text{ mol L}^{-1}$) seguido de análise titulométrica	Clarke et al., 1951
1960	Frutas e hortaliças	Hidrólise ácida empregando H_2SO_4 (20 mol L^{-1}) seguido de análise espectrofotométrica	Cullen & Tomas, 1964
	Frutas, hortaliças, grãos e rações	Hidrólise ácida empregando solução de HCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$) seguido de análise espectrofotométrica	Keppel, 1969
	Frutas e hortaliças	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl_2 (1,5%) em HCl (4 mol L^{-1}) seguido de análise cromatográfica	Mcleod & Mccully, 1969
1970	Frutas e hortaliças	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl_2 (40%) em HCl ($1,2 \text{ mol L}^{-1}$) seguido de análise espectrofotométrica	Keppel, 1971
1995	Frutas e hortaliças	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl_2 (1,5%) em HCl (6 mol L^{-1}) seguido de análise cromatográfica	Friedrichs et al., 1995
2000	Frutas e hortaliças	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl_2 (1,5%) em HCl (4 mol L^{-1}) seguido de análise cromatográfica	De Kok e Van Bodegraven, 2000
	Tabaco e pêssego	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl_2 (1,5%) em HCl (5 mol L^{-1}) seguido de análise cromatográfica	Vryzas et al., 2002
2010	Mamão	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl_2 (1,5%) em HCl (4 mol L^{-1}) seguido de análise cromatográfica	Abakerli et al., 2015

conclusão

2010	Alface	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl ₂ (1,5%) em HCl (4 mol L ⁻¹) seguido de análise cromatográfica	Pizzutii et al., 2017
	Camas biológicas	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl ₂ (1,5%) em HCl (4 mol L ⁻¹) seguido de análise cromatográfica	Vareli, et al., 2018
	Tomate	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl ₂ (1,25%) em HCl (0,0065 mol L ⁻¹) seguido de análise cromatográfica	Soares, 2018
	Soja	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl ₂ (40%) em HCl concentrado seguido de análise cromatográfica	Chawla et al., 2019
	Maracujá	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl ₂ (1,25%) em HCl (6 mol L ⁻¹) seguido de análise espectrofotométrica	Mozzaquatro et al., 2019
2020	Soja, milho e arroz	Hidrólise ácida empregando solução de SnCl ₂ (1,5%) em HCl (4 mol L ⁻¹) seguido de análise cromatográfica	Silva et al., 2021

Fonte: Autor.

Na determinação de resíduos de DTC, além da escolha de métodos com detectabilidade adequada, deve-se ter cuidados especiais durante o preparo da amostra, pois se sabe que a maioria dos DTC são instáveis a umidade, oxigênio e degradam-se facilmente em meio ácido (GARCINUÑO et al., 2004).

Outro cuidado importante na determinação de DTC é a presença natural de CS₂ em alguns vegetais, sendo assim suscetível a resultados falso-positivos ou superestimados em espécies com CS₂ endógeno (ABAKERLI et al., 2015). Um exemplo desta interferência é bem conhecido para a família Brassicaceae na qual os níveis de *background* CS₂ podem atingir os LMR estabelecidos (PERZ et al., 2000).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No desenvolvimento de um processo é essencial planejar um procedimento experimental para avaliar os efeitos de interação das variáveis independentes envolvidas, pois o planejamento experimental a ser escolhido depende da quantidade de variáveis e as respostas que estão sendo pretendidas nesta análise. Outros fatores a serem analisados na escolha do procedimento são o número de ensaios a ser realizado, o tempo para realização e o custo do ensaio (GONÇALVES, 2019).

Os planejamentos fatoriais são utilizados para melhorar os métodos analíticos, bem como a minimização do tempo e dos reagentes químicos caros e perigosos necessários nos métodos de preparo de amostras. Como vantagem desses projetos têm-se o número reduzido de tentativas ou repetições e, conseqüentemente, menos tempo e custo final; além de análise simultânea de múltiplas variáveis (PETRARCA et al., 2014).

2.5.1 Plackett-Burman

Um projeto de triagem em 1946, foi desenvolvido pelos estatísticos Plackett e Burman (PLACKETT & BURMAN, 1946), sendo considerado um dos métodos quimiométricos mais utilizados para triagem de fatores. Normalmente o delineamento experimental Plackett-Burman (PB) é usado para apontar os fatores mais importantes no começo da fase de experimentação (LI et al., 2016).

O PB é um projeto fatorial fracionário de dois níveis para examinar N-1 fatores, onde N é um múltiplo de 4 fatores (N= 8, 12, 16, 20, 24, 36 ... ensaios) (ABDULRA'UF & TAN, 2015).

Sugere-se escolher um número de ensaio maior que o número de variáveis estudadas, ou seja, não se deve escolher uma matriz PB igual ao número de variáveis, um exemplo é a utilização de 16 ensaios para 9 fatores (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O delineamento PB usa uma abordagem linear e assume que não há interação entre os diferentes componentes da média na série de análise de variáveis, x_i em análise. Uma abordagem linear é considerada suficiente para triagem Equação 1. (TERRAZZAS, 2012).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (i = 1, \dots, k) \quad \text{Equação 1}$$

Onde: Y é a função alvo estimada e β_i são os coeficientes de regressão.

O projeto PB é uma triagem inicial, sendo considerado uma concepção fatorial fracionária e o coeficiente de contraste ou efeito principal de uma tal concepção pode ser simplesmente calculado como a diferença entre a média das respostas do experimento nos níveis mais altos (+1) e nos níveis mais baixos (-1). Esses delineamentos possuem colunas mutualmente ortogonais, contendo o mesmo número de sinais positivos e negativos (SALVATO, 2019). Independente do delineamento PB escolhido, é necessário, no mínimo, 3 repetições na condição do ponto central (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

3.5.2 Delineamento Composto Central Rotacional

O DCCR é uma forma econômica de se obter o máximo de informações com o menor número de experimentos sobre uma variável dependente (KAFSHGARI et al., 2017).

Segundo Li et al. (2016), o DCCR é um método que permite o desenvolvimento de um modelo de regressão de segunda ordem que pode ser usado para estimar a relação entre os fatores e a resposta variável para uso em otimização de processos.

Assim, não só permite que os fatores que possuem um efeito significativo no resultado medido sejam determinados com precisão estatística, como gera superfícies de respostas e curvas de contorno para a análise, definindo conseqüentemente as faixas ótimas de cada variável do processo.

No entanto, há um número mínimo de ensaios a ser cumprido conforme o número de fatores envolvidos. No caso de 2 ou 3 variáveis independentes é recomendado o uso de DCCR, que determina uma quantidade mínima de 17 amostras com repetição de 3 vezes no ponto central determinado, pois esta condição permite que se analise o experimento estatisticamente de forma a não comprometer as respostas que estão sendo analisadas (RODRIGUES & LEMMA, 2005)

Devido à presença de um ponto central e pontos axiais no DCCR, o ponto central é separado de cada ponto fatorial por ± 1 e a distância entre os pontos axiais e o centro do espaço de projeto é $\pm \alpha$, onde $\alpha = (2^k)^{1/4}$, ou seja, para 3 variáveis ($n=3$) por exemplo, $\alpha = \pm 1,68$. O número total de execução experimental (R) no DCCR é determinado pela seguinte Equação 2 (SAHA & MAZUMDAR, 2019).

$$R = 2^k + 2k + n_0 \quad \text{Equação 2}$$

Onde k é o número de variáveis independentes usadas para construir o modelo e n_0 é o número de experimentos repetidos no ponto central.

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A validação do método dentro do laboratório deve ser realizada para fornecer evidências de que um método realmente é adequado para a finalidade pretendida (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Alguns parâmetros envolvidos no processo de validação são seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e exatidão (INMETRO, 2020).

A seletividade é o grau em que o método tem capacidade de identificar e quantificar o analito de interesse, na presença de outros analitos, matrizes ou de outros componentes potencialmente interferentes. Um método capaz de produzir

respostas para diversos analitos, mas que pode distinguir um analito do outro, é considerado seletivo (INMETRO, 2020).

A sensibilidade analítica deve ser demonstrada através de sua capacidade de identificar e quantificar o analito de interesse, ou seja, é a inclinação da curva analítica em extrato branco matriz e solvente (BRASIL, 2017).

A linearidade de um método analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (INMETRO, 2020).

O efeito matriz é a influência dos componentes extraídos da amostra matriz, na medição da concentração ou massa do analito pode ser definido como efeito matriz. Portanto pode ser observado como um aumento ou diminuição da resposta do detector, comparada com aquela produzida por soluções em solventes do analito. A presença ou ausência de tais efeitos podem ser demonstrada por comparação entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz (EUROPEAN COMMISSION, 2020).

A menor concentração que pode ser quantificada e relatada é o limite de detecção do método (LOD). Já o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração que foi validado com precisão aceitável, sob condições experimentais estabelecidas do método analítico (EUROPEAN COMMISSION, 2020).

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito de interesse pelo menos em três níveis diferentes de concentrações (alta, mediana e baixa) da faixa de uso do método (INMETRO, 2020). Assim, a exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre resultados individuais do método estudado em relação ao valor aceito como verdadeiro, ou seja, ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito conhecido adicionado a amostra (BRASIL, 2017).

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme condições definidas pelo método analítico (BRASIL, 2017). Sua medida geralmente é calculada como desvio padrão relativo (RSD%) do resultado do teste (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Há três maneiras de expressá-la, por meio de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

- ✓ Repetibilidade: deve representar a proximidade entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, e repetições em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2020).
- ✓ Precisão intermediária: refere-se à proximidade entre resultados de uma mesma amostra, avaliada utilizando o mesmo método, o mesmo laboratório e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, para isto, deve-se definir exatamente quais condições vão variar, tais como: diferentes equipamentos, diferentes dias de análise, diferentes analistas. (INMETRO, 2020).
- ✓ Reprodutibilidade: é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, obtidas em laboratórios diferentes, analistas diferentes, diferentes equipamentos e/ ou época diferentes (BRASIL, 2017).

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. A robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação, muitas vezes estando mais associado a estudos de otimização (INMETRO, 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de desenvolvimento, otimização, e validação de método analítico foram desenvolvidos no Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes (CEPARC), Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com Núcleo de Tecnologia em Alimentos (NTA), Departamento de Tecnologia em alimentos da UFSM e com o Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifer), Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Campi São Leopoldo (UNISINOS).

4.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS

- ✓ Balança analítica de precisão 4 casas decimais, calibrada (Sartorius, Alemanha)
- ✓ Balança analítica de precisão 2 casas decimais PM600, calibrada (Mettler, Suíça)
- ✓ Pipetador automático, calibrado (Brand, Alemanha)
- ✓ Micropipetadores automáticos de capacidade 100, 1000 e 5000 μ L, calibrados (Brand, Alemanha)
- ✓ Dispensador de volume ajustável, capacidade 10 e 30 mL
- ✓ Banho termostaticado com agitação tipo Banho Dubnoff (Nova Instruments, Brasil)
- ✓ Homogeneizador Vortex Genie-2 (Scientific Industries, EUA)
- ✓ Centrífuga modelo Heraeus Megafuge 16R Centrifuge (Thermo Fischer, Alemanha)
- ✓ pHmetro (BEL Engineering, Itália)
- ✓ Sistema de purificação de água Milli Q[®] Elix (Milipore, Brasil)
- ✓ Frascos de vidro com capacidade de 100 mL e 250 mL, com tampa rosqueável.
- ✓ Vidrarias de uso do laboratório (béqueres, balões volumétricos calibrados, pipeta volumétrica, entre outros).

4.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Os instrumentos e as condições de análise utilizadas neste estudo foram estabelecidas por Vargas et al. (2018), e estão descritos a seguir

- ✓ Cromatógrafo a Gás (QP2010 Plus) equipado com amostrador automático AOC-20i (UFSM) ou AOC-5000 Plus (UNISINOS), acoplado a Espectrômetro de Massas (GC-MS), com sistema de aquisição e processamento de dados *software* LabSolutions versão 4.20 (Shimadzu Corporation, Japão)
- ✓ Temperatura do injetor de 250 °C
- ✓ Programação da válvula do *split* do injetor na razão de 1:10
- ✓ Volume de injeção de 1 µL
- ✓ Vazão do gás de arraste Hélio (99,996% de pureza, Air Liquid, França) mantida em 1,78 mL min⁻¹ (*Hight Pressure Injection*) por 1 minuto, posteriormente constante em 1,0 mL min⁻¹ até o final da análise (UFSM). Na UNISINOS, a vazão foi constante em 1,0 mL min⁻¹ durante toda a análise cromatográfica
- ✓ Colunas capilares SLB™-5MS e RTX-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm de espessura de filme e 0,25 µm diâmetro interno adquiridas de Supelco (EUA) e Restek (França)
- ✓ Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 40 °C, por 1,8 min, aumentando para 240 °C a uma taxa de 50 °C min⁻¹ e mantida por 2 min
- ✓ Modo de ionização EI (do inglês, *Electron Impact*)
- ✓ Temperatura da fonte de ionização em 230 °C e da linha de transferência em 200 °C
- ✓ Modo de operação por monitoramento do íon selecionado - SIM (do inglês, *Selected Ion Monitoring*)
- ✓ Íons monitorados: íon 76, empregado para a quantificação, e confirmação com o pico do isótopo de m/z 78

4.3 PRODUTOS QUÍMICOS E REAGENTES

- ✓ Tiram (pureza de 99,95%) (Dr. Ehrenstorfer, Alemanha) - padrão analítico de ditiocarbamato

- ✓ Dissulfeto de carbono (CS_2) (pureza de 99,9%) (Sigma Aldrich, EUA)
- ✓ Água ultrapura Milli-Q (Millipore, Brasil)
- ✓ Isooctano (2,2,4-trimetilpentano), grau resíduo de agrotóxico (JT Baker Chemicals, EUA)
- ✓ Tolueno grau pesticida (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Cloreto de estanho (II) grau analítico (Synth, Brasil);
- ✓ Ácido clorídrico 37% p.a. (Qhemis, Brasil)
- ✓ Amina primária secundária PSA (Varian, EUA)
- ✓ Carvão ativado GCB (Califórnia, EUA)
- ✓ Sulfato de Magnésio anidro (Sharlab, Espanha)

4.4 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E DILUÍDA DE TIRAM E CS_2

A solução estoque de tiram 1000 mg L^{-1} foi preparada através da dissolução do sólido de referência no solvente tolueno. A partir desta, diluiu-se com tolueno para preparar soluções intermediárias de 100 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} . Ambas as soluções foram utilizadas nos ensaios de fortificação e recuperação do analito (Apêndice A). Todas essas soluções foram estocadas em frascos âmbar, e armazenadas em congeladores com temperatura controlada por termômetro calibrado à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para o preparo das curvas analíticas, primeiramente preparou-se uma solução estoque padrão de CS_2 em isooctano a 4000 mg L^{-1} . A partir desta solução, preparou-se soluções diluídas nas concentrações de 400 e 40 mg L^{-1} , no mesmo solvente. Destas soluções foram preparadas, semanalmente, as soluções de trabalho nas concentrações de 1 e 4 mg L^{-1} , para posteriormente a obtenção das curvas analíticas.

4.5 ESTUDO MULTIVARIADO

As análises estatísticas de PBD e DCCR foram planejadas e tratadas pelo *software Protimiza Experimental Design*. Para isto, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para ambos os desenhos, triagem de variáveis e procedimento de otimização.

4.5.1 Delineamento experimental Plackett-Burman

O PB foi realizado para rastrear cinco variáveis independentes em 28 execuções (12 ensaios preparados em duplicata e 4 ensaios na condição do ponto central).

Variaram, portanto o volume de isooctano, volume e concentração de solução ácida, tempo e temperatura do banho de água com agitação, em duplicata (n=2).

Então cada fator significativo ou variável independente foi avaliada em três níveis díspares (-, 0, +), como mostrado na Tabela 1, através do software *Protimiza Experimental Design*.

Tabela 1 - Fatores experimentais e níveis de delineamento Plackett-Burman

Parâmetros		Valor experimental		
		Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
Solução de hidrólise de ácido contendo SnCl₂ 1,5%	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	1	2,5	4
	Volume (mL)	30	60	90
Isooctano	Volume (mL)	10	15	20
Banho de água com agitação para hidrólise	Tempo (min)	45	60	75
	Temperatura (°C)	60	70	80

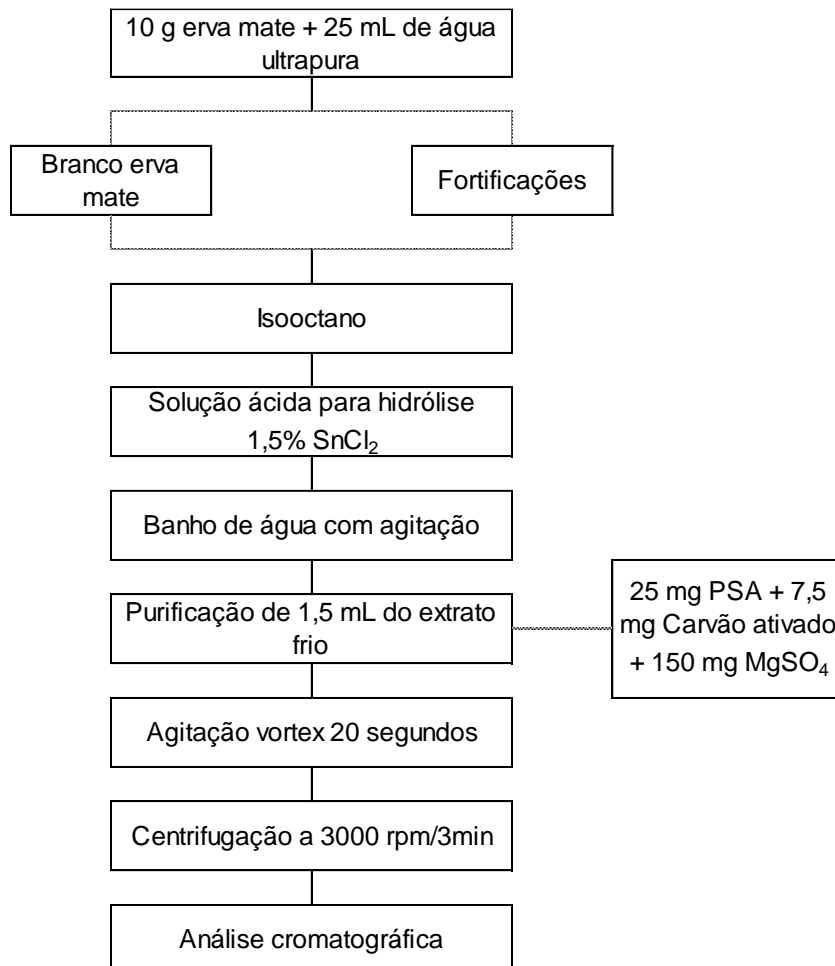
Fonte: Adaptação software *Protimiza Experimental Design*

Inicialmente pesaram-se 10 g de amostra em uma balança analítica de duas casas decimais, frascos rosqueáveis, com tampa de capacidade 250 mL, e adicionou-se 25 mL de água ultrapura para total homogeneização. Posteriormente, fortificou-se a amostra “branco”, com 158 µL de solução de tiram (100 mg L⁻¹), na concentração de 2 mg kg⁻¹ em termos de CS₂. Adicionaram-se os diferentes volumes de isooctano e os diferentes volumes de solução ácidas com suas respectivas concentrações, de forma aleatória, conforme a matriz do delineamento experimental (Tabela 1). Os frascos foram imediatamente fechados, levados para o banho de água com agitação, em suas respectivas temperaturas de banho e tempo.

Transcorrido o tempo necessário, retirou-se do banho de água com agitação e deixou-se esfriar a temperatura ambiente. Em seguida retirou-se uma alíquota de 1,5 mL da fase orgânica, passou-se para um tubo de falcon contendo 25 mg de PSA, 7,5 mg de GCB e 150 mg de $MgSO_4$. Estes frascos foram agitados no vórtex por 20 segundos (tempo padronizado), e posteriormente levados para a centrífuga em uma condição de 3000 rpm a 3 min.

Depois de centrifugado retirou-se o sobrenadante do frasco e acondicionou-se nos *vials* para a análise cromatográfica gasosa. O procedimento pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do procedimento inicial de otimização da extração de ditiocarbamatos em erva mate



Fonte: Autor.

4.5.2 Delineamento Composto Central Rotacional

Em um segundo momento, após a triagem de fatores significativos usando PB, empregou-se o projeto DCCR, variando-se apenas o volume e concentração de solução ácida bem como tempo de banho de água com agitação, fixando-se assim a quantidade de amostra pesada (10 g), o volume de isooctano (10 mL) e a temperatura de banho de água com agitação (80 °C).

Esses parâmetros foram realizados para estudar as interações entre fatores significativos selecionados com um efeito positivo na hidrólise ácida de DTC e, portanto, na recuperação. Os fatores selecionados foram avaliados em diferentes níveis: baixo (-), médio (0), alto (+) e nos pontos axiais $-\alpha$ e $+\alpha$, conforme a Tabela 2. Para reduzir efeitos externos, os experimentos DCCR foram executados de forma aleatória.

Tabela 2 - Parâmetro para cada variável significativa, em considerações de hidrólise multivariada, para extração de DTC na erva mate

Parâmetros		Valor experimental				
		α (-)	1(-)	0	1(+)	α (+)
Solução de hidrólise de ácido contendo SnCl_2 1,5%	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	0	0.5	1.25	2	2.5
	Volume (mL)	3.2	10	20	30	36.8
Banho de água sob agitação para hidrólise	Tempo (min)	40	60	90	120	140

Fonte: Adaptação software *Protimiza Experimental Design*.

4.6 ESTUDO UNIVARIADO

A partir dos resultados do projeto DCCR, foi realizado um estudo univariado em que foram mantidas a massa de 10 g de amostra, bem como o volume de 10 mL de isooctano e a temperatura de banho de água com agitação em 80 °C. Fortificaram-se as amostras na concentração de 2 mg kg⁻¹, em termos de CS₂. O volume da solução

aquosa de SnCl_2 e o tempo de extração em banho de água com agitação foram realizados em duplicata ($n = 2$) e variados conforme dados da Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para o estudo univariado, para a extração de DTC na erva mate

Experimento	Volume de solução aquosa SnCl_2 1.5% para hidrólise (mL)	Tempo de banho de água com agitação (min)
1		30
2	10	60
3		90
4		30
5	20	60
6		90

Fonte: Autor.

4.7 ESTUDO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Após definidas as melhores condições de extração da amostra foi realizado a validação do método analítico conforme os parâmetros a seguir.

4.7.1 Extração otimizada da amostra “branco”

Pesaram-se 5 g de amostras em “branco” em um frasco de tampa rosqueável de capacidade 100 mL, adicionou-se 12,5 mL de água ultrapura. Adicionaram-se 5 mL de isooctano, em seguida 5 mL de solução aquosa de SnCl_2 1,5%, fechou-se bem e levou-se para o banho com agitação a uma temperatura de 80 °C.

Transcorrido o tempo de 30 min, retirou-se os frascos do banho e deixou-se os mesmos resfriando, em água gelada. Em seguida retirou-se uma alíquota de 1,5 mL da fase orgânica, passou-se para um tubo falcon contendo 25 mg de PSA, 7,5 mg de GCB e 150 mg de MgSO_4 . Estes frascos foram agitados no vórtex por 20 segundos

(tempo padronizado), e posteriormente levados para a centrifuga em uma condição de 3000 rpm a 3 min. Após centrifugado, os sobrenadantes foram retirados e acondicionados nos *vials* para a análise cromatográfica.

4.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o LOD do instrumento e o LOQ teórico foram realizadas injeções de soluções de CS₂ nas concentrações de 10,0; 4,0; 2,0; 0,5; 0,1; 0,08 e 0,05 mg L⁻¹ (n=7).

Para a determinação do LOQ do método foram realizadas as fortificações das amostras com solução de tiram, o LOQ foi definido como a menor concentração validada, que atende os critérios aceitos de exatidão e precisão pelo documento SANTE (70-120% de recuperação e RSD% ≤ 20%).

4.7.3 Curva analítica, linearidade e efeito matriz

Para a obtenção das curvas analíticas, foram preparadas soluções de CS₂ nas seguintes concentrações: 0,05; 0,08; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10 mg L⁻¹ tanto em extrato “branco” da matriz quanto em solvente orgânico (isooctano). Injetou-se 1 µL de cada solução no cromatógrafo, obtendo-se as áreas, no tempo de retenção pré-determinado. A partir dos dados obtidos, foi realizado os cálculos das médias das áreas dos analitos e do valor do RSD%.

No Apêndice B, encontram-se as concentrações de CS₂ da curva analítica e seus respectivos volumes medidos das soluções de trabalho.

O efeito matriz foi calculado levando em consideração a inclinação da curva analítica em solvente e em extrato “branco” da matriz conforme a Equação 3.

$$\text{Efeito matriz}(\%) = \frac{A_1}{A_2} - 1 \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: A₁ inclinação da curva analítica em matriz e A₂ inclinação da curva analítica em solvente

4.7.4 Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade, em ambos os equipamentos utilizados (UFSM e UNISINOS).

A repetibilidade da resposta dos instrumentos (RSD_{ri}) foi avaliada efetuando-se 7 injeções de cada solução de CS_2 nas concentrações de 0,05; 0,08; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10 $mg L^{-1}$. Já a repetibilidade do método (RSD_{rm}) foi avaliada efetuando-se o procedimento de extração e análise das amostras “branco” fortificadas, em três concentrações (0,1; 0,5 e 2,0 $mg L^{-1}$ em termos de CS_2), em sete replicatas ($n = 7$).

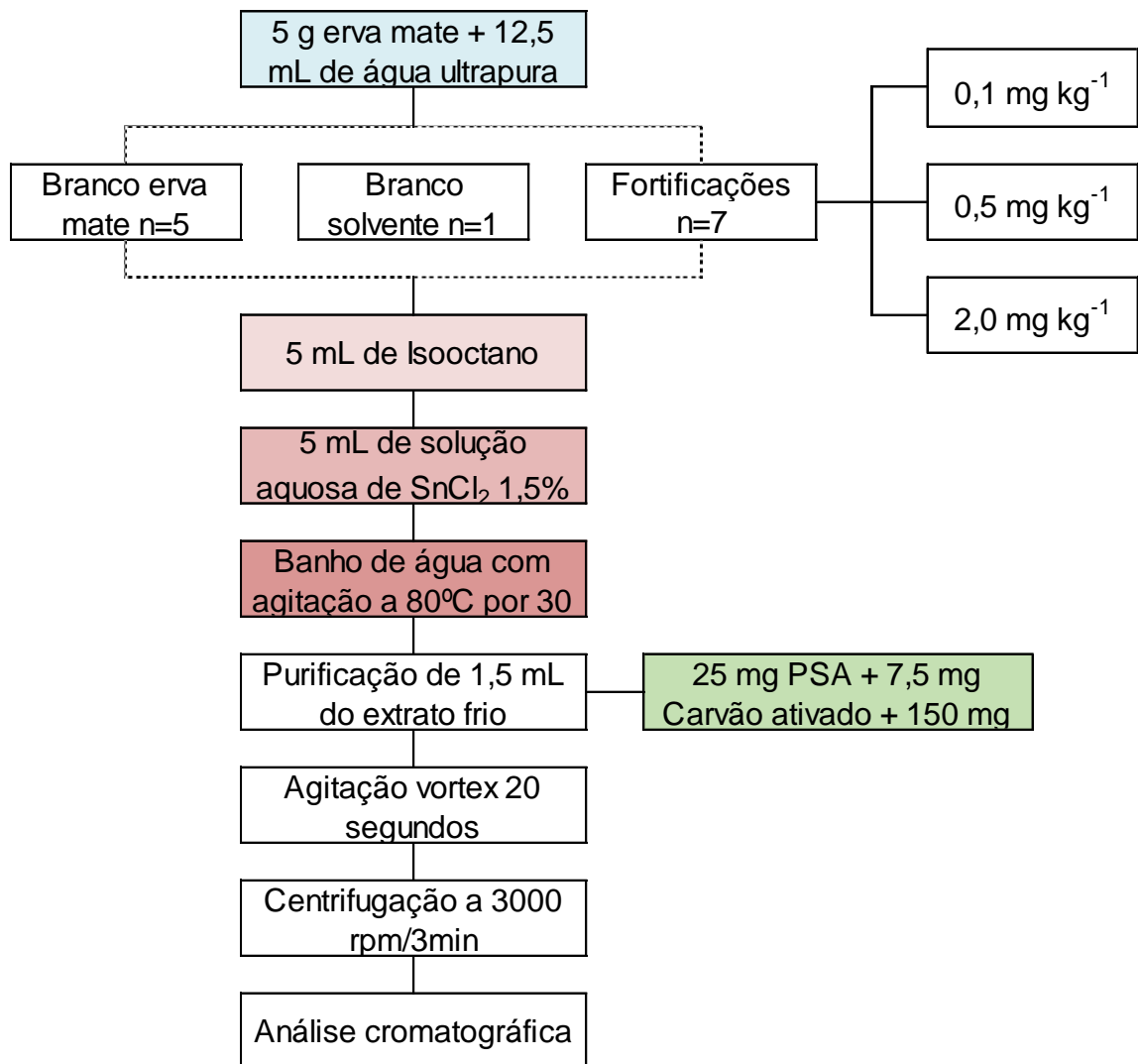
Para a avaliação da precisão intermediária do método, realizou-se estudo de fortificação e recuperação, com analistas diferentes e no intervalo de 3 dias, entre as análises. Este estudo foi realizado somente na UFSM.

Após 4 meses o estudo de repetibilidade, realizou-se a reprodutibilidade do método, no laboratório Itt Nutrifor da UNISINOS, a partir do estudo de fortificação e recuperação, nas mesmas concentrações estudadas na UFSM, porém com analistas, equipamentos e materiais diferentes.

4.7.5 Recuperação e exatidão

Para o estudo de fortificação e recuperação foram fortificadas as amostras “branco” de erva mate empregando a solução de tiram 100 e 10 $mg L^{-1}$ de CS_2 , em três níveis de concentrações 0,1; 0,5 e 2,0 $mg kg^{-1}$, com sete replicatas cada ($n=7$). A extração foi realizada conforme descrito no item 4.7.1 e ilustrado na Figura 2. O fator para este método é 1,0 (Apêndice C); quando aplicado o fator do método encontram-se as concentrações ao qual cada nível de fortificação corresponde em solução de CS_2 expressa em $mg L^{-1}$.

Figura 2 - Fluxograma do procedimento de extração fortificação empregado neste estudo



Fonte: Autor.

Para os cálculos da recuperação (%), levou-se em consideração a concentração do analito na amostra fortificada, amostra “branco” e a concentração do analito adicionado a amostra fortificada, sendo calculada conforme a Equação 4.

$$\text{Recuperação}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

C1: concentração do analito na amostra fortificada;

C2: concentração do analito na amostra não fortificada

C3: concentração do analito adicionado a amostra fortificada

4.7.6 Robustez

Neste estudo, além do estudo de reprodutibilidade, foi realizado o estudo de robustez, uma vez que as condições laboratoriais da UNISINOS não eram as mesmas da UFSM.

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade permanecer inalterado sob pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017).

O procedimento de fortificação e recuperação para o estudo de reprodutibilidade e robustez foi realizada conforme descrito no item 4.7.1 e ilustrado na Figura 2, com algumas alterações nas etapas, materiais e condições do procedimento de extração, como pode ser observado no Quadro 4.

Quadro 4 - Comparação da variação das etapas, materiais e condições do procedimento de hidrólise realizados na UFSM e na UNISINOS

Etapas/ materiais/ condições do procedimento	UFSM	UNISINOS
Frascos	Tipo Schott Duran com capacidade para 100 mL	Tipo Schott Duran com capacidade para 250 mL
Adição de água	Massa pesada em balança analítica	Volume medido com pipeta volumétrica
Adição de isooctano	Volume medido com dispensador automático	Volume medido com pipeta volumétrica
Adição de solução aquosa de SnCl ₂ 1,5%	Volume medido com pipetador automático	Volume medido com pipeta volumétrica
Agitação do banho de água	Mecânica e contínua	Manual, a cada 5 min, por 5 seg

Fonte: Autor.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a recuperação e efeito matriz os dados foram tratados estaticamente de acordo com a análise de variância (ANOVA) com um nível de confiança de 95%, suportado pelo software BioEstat[®] versão 5.3.

4.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO

As amostras comerciais de erva-mate foram adquiridas em supermercados da cidade de Santa Maria/ RS, Brasil, entre outubro e novembro de 2021. No total foram 19 marcas diferentes de erva-mate (mínimo 0,5 kg para cada amostra) coletadas aleatoriamente nos mercados locais. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento da análise para a aplicação do método.

A extração das amostras foi realizada conforme o descrito no item 4.8.1, em duplicata (n=2). Juntamente a extração das amostras, foram realizadas extrações controle de fortificação/recuperação nas concentrações de 0,1 e 2 mg kg⁻¹, em termos de CS₂.

As amostras foram designadas como EM 01 ao EM 19 realizando assim em dois momentos, primeiramente extraindo todas as amostras designadas como EM 01 ao 19 A, e após todas as amostras designadas como EM 01 ao 19 B.

4.10 LIMPEZA DOS MATERIAIS USADOS

Após o uso, e descartadas as amostras no devido lugar, as vidrarias foram deixadas de molho em uma solução aquosa de Extran[®] 5% por 24 horas. Em seguida, foram lavadas e enxaguadas com água corrente e acetona pura, deixados secar em temperatura ambiente e posteriormente guardados em seus devidos lugares.

4.11 DESCARTE DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados após os experimentos foram descartados em um recipiente adequado, o qual foi rotulado adequadamente, e disposto no laboratório, assim que o recipiente estava em sua capacidade máxima, foi entregue ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM; do almoxarifado é disponibilizado a uma empresa especializada em descarte de resíduos químicos.

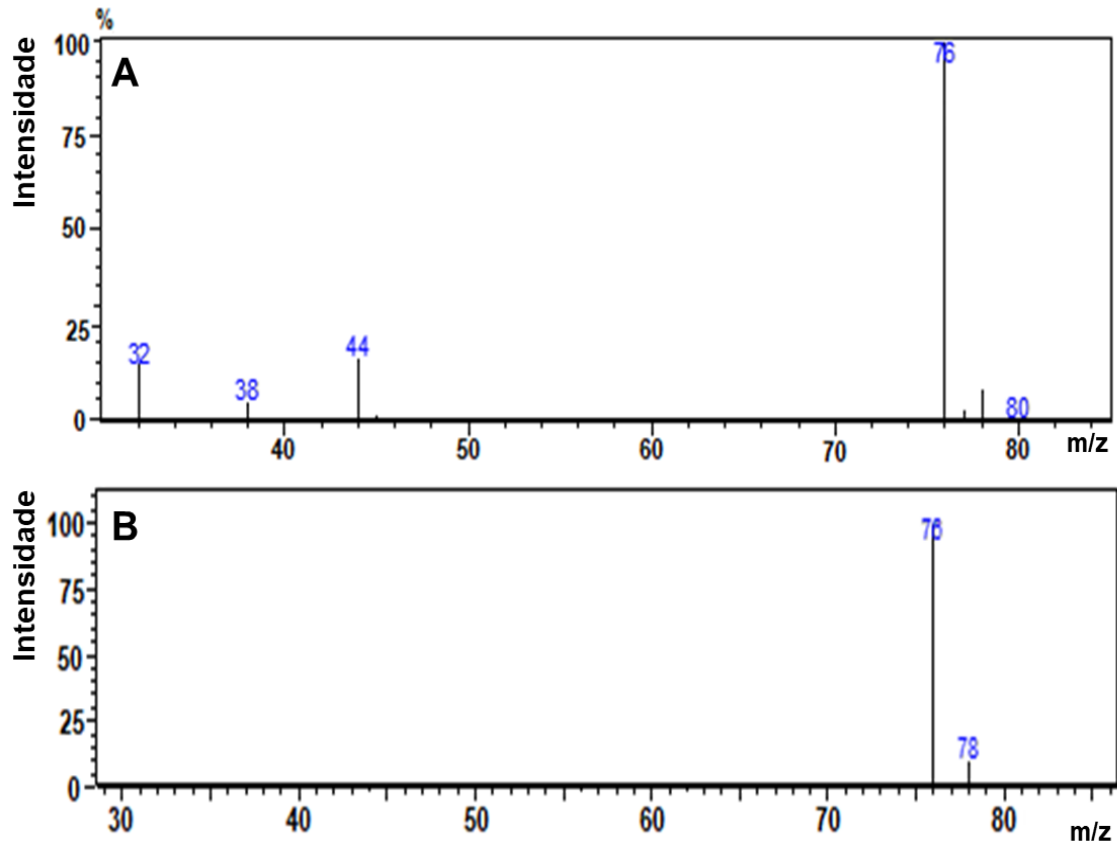
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE POR GC-MS

O tempo de retenção do CS₂ foi de 1,1 min nas condições de análise empregadas na UFSM, e de 2,2 min naquelas da UNISINOS (conforme item 4.2); o tempo total da análise foi de 7,8 min, a fim de assegurar a limpeza do sistema e não gerar interferências nas análises cromatográficas seguintes.

Devido à baixa massa molecular do CS₂ (76 g), a fragmentação da molécula gera um espectro de massas formado por fragmentos de m/z inespecíficos, conforme pode ser visualizado no espectro padrão presente na Figura 3A. Por isso, devem ser levados em consideração outros critérios para a identificação do CS₂. Na Figura 3B está presente o espectro de massas de uma solução analítica na concentração de 2 mg kg⁻¹ de CS₂, apresentando a relação específica de 10:1 entre as razões m/z dos íons monitorados 76 e 78 (modo SIM), característicos para a confirmação do CS₂, a qual pode ser observada em ambos os espectros de massas da Figura 3.

Figura 3 - Espectros de massas obtidos (A) no centro de dados da biblioteca NIST® e (B) para a solução de 2 mg kg⁻¹ de CS₂

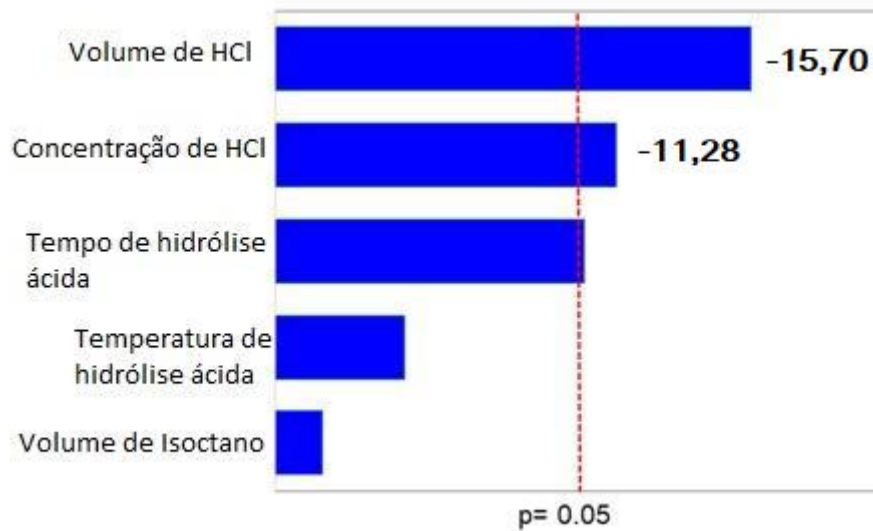


Fonte: Software.

5.2 DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN

A análise estatística dos dados obtidos nos testes de extração realizados, variando volume e concentração de solução ácida para a hidrólise, volume de isooctano, tempo e temperatura (descritos no item 4.5.1), indica que dentro das cinco variáveis avaliadas, três delas foram significativas para as porcentagens de recuperação. No gráfico de Pareto (Figura 4), o comprimento da barra é proporcional ao valor absoluto do efeito principal de cada variável, ao mesmo tempo a linha vertical indica um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Figura 4 - Gráfico de Pareto de efeito principal padronizado



Fonte: Adaptação software *Protimiza Experimental Design*.

O delineamento demonstrou que a concentração e volume de ácido (HCl) contendo SnCl₂ 1,5%, e o tempo de banho de água para a hidrólise foram as variáveis com efeito significativo ($p < 0,05$) para a recuperação de CS₂. Os dados obtidos foram avaliados por ANOVA. Os resultados indicam que a curvatura não foi estatisticamente significativa com $p = 0,34$ para quaisquer respostas, indicando assim que nenhuma das variáveis avaliadas está em sua condição ideal (Apêndice D).

As variáveis concentração e volume de solução ácida de hidrólise contendo SnCl₂ 1,5% apresentaram um efeito negativo com valores de -11,28 a -15,70, respectivamente. Indicando assim, que uma menor concentração e volume de solução ácida extratora tende a ter resultados adequados de recuperação.

Essa tendência pode ser observada na Tabela 5, no qual os melhores percentuais de recuperação foram obtidos quando utilizado volume de apenas 30 mL da solução ácida, na menor concentração avaliada (1 mol L⁻¹) de HCl.

Tabela 4 - Condições de hidrólise para extração de DTC da erva-mate, estudadas em cada experimento PB, resultados das médias de recuperação (%) e RSD (%)

Experimento	Solução ácida contendo SnCl ₂ 1.5%		Volume de isooctano (mL)	Banho de agitação		Recuperação (%)	Média das recuperações (%)	RSD (%)
	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	Volume (mL)		Tempo (min)	Temperatura (°C)			
1	1	30	10	45	60	72,4	76,1	4,9
	1	30	10	45	60	79,7		
2	1	30	10	75	80	99,3	100,9	1,6
	1	30	10	75	80	102,6		
3	1	30	20	75	80	88,5	88,3	0,2
	1	30	20	75	80	88,2		
4	1	90	10	45	60	68,7	67,3	2,1
	1	90	10	45	60	66,0		
5	1	90	20	45	80	76,9	77,6	0,9
	1	90	20	45	80	78,3		
6	1	90	20	75	60	97,3	96,0	1,3
	1	90	20	75	60	94,6		
7	2.5	60	15	60	70	83,3	84,3	1,5
	2.5	60	15	60	70	83,5		
	2.5	60	15	60	70	83,6		
	2.5	60	15	60	70	87,0		
8	4	30	10	45	80	98,7	95,8	2,9
	4	30	10	45	80	93,0		
9	4	30	20	45	60	64,7	69,7	7,2
	4	30	20	45	60	74,7		
10	4	30	20	75	60	91,7	88,6	3,5
	4	30	20	75	60	85,5		
11	4	90	10	75	60	60,9	61,9	1,6
	4	90	10	75	60	62,9		
12	4	90	10	75	80	65,7	65,6	0,2
	4	90	10	75	80	65,5		
13	4	90	20	45	80	43,1	56,9	24,3
	4	90	20	45	80	70,7		

Fonte: Autor

Os experimentos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 10 apresentaram resultados dentro do recomendado pelo SANTE. Desta forma, a continuidade do estudo foi baseada na condição com melhores recuperações e menor volume de reagente. Quanto a escolha da temperatura do banho de água com agitação, a mesma foi baseada em estudos de análises de DTC já publicados na literatura, em que na maioria dos casos se teve bons resultados a de 80 °C.

Keppel (1969) verificou que com o aumento da temperatura do banho houve um aumento da evolução de CS₂ e um equilíbrio foi alcançado no intervalo de 60 a 80 °C. Estudos realizados por Abakerli et al. (2015) e Pizzutti et al. (2017) mantiveram o banho de agitação a 80 °C por 2 h e obtiveram recuperações médias de 74 a 103% e 87,7 a 107,4% respectivamente.

Mujawar et al. (2014), utilizaram banho-maria a 80 °C por 1 h tendo como resultados de recuperação 76 a 104% para frutas e hortaliças. Vargas et al. (2018), em que se obteve resultados de recuperação na faixa de 64,5 a 141,1% para amostras de vinho. Estes resultados corroboram com os resultados dos testes de PB onde se obteve recuperações na faixa de 77,6 a 100,9% com RSD inferior a 2,9%.

Vareli et al. (2018) utilizaram banho-maria foi realizado por apenas 1 h, obtendo assim recuperações de 89 a 96%.

5.3 DESIGN COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL

Um segundo delineamento experimental utilizando DCCR foi realizado para estabelecer as condições ótimas das variáveis estatisticamente significativas apontadas no delineamento PB. Desta forma, foram estudados concentração e volume de HCl e tempo de banho de água, a fim de melhorar a etapa de hidrólise ácida. A extração da amostra ocorreu conforme descrito no item 4.5.2.

Conforme apresentado na tabela 6, todas as condições testadas hidrolisaram os DTC, com recuperações na faixa de 78,7 a 119,4%, com média de recuperação de $102,8 \pm 10\%$, conforme na Tabela 6, estando todos os resultados dentro da recomendação para a determinação de agrotóxico, isto é, de 70 a 120% (EUROPEAN COMMISSION, 2020). As curvas analíticas foram preparadas em extrato matriz, nas mesmas condições de extração estipulada pelos testes.

Tabela 5 - Recuperação (%) para cada variável significativa, em condições de hidrólise multivariada, para extração de DTC na erva-mate

Experimento	Solução ácida contendo SnCl ₂ 1.5%		Banho de água com agitação (min)	Recuperação (%)*
	Concentração de HCl (mol L ⁻¹)	Volume (mL)		
1	0 (-α)	20	90	101,5
2	0.5	10	60	85,4
3	0.5	10	120	103,5
4	0.5	30	60	97,6
5	0.5	30	120	107,4
6	1.25	3.2 (-α)	90	78,7
7	1.25	20	40 (-α)	92,0
8	1.25	20	90	107,1
9	1.25	20	90	119,4
10	1.25	20	90	104,8
11	1.25	20	90	115,6
12	1.25	20	90	111,7
13	1.25	20	140 (+α)	110,0
14	1.25	36.8 (+α)	90	112,2
15	2	10	60	98,3
16	2	10	120	101,4
17	2	30	60	101,6
18	2	30	120	111,3
19	2.5 (+α)	20	90	93,1
Faixa	0 – 2.5	3.2 – 36.8	40 – 140	78.7 – 119.4

*Média: 102.8 ± 10%

Fonte: Autor.

A fim de buscar as melhores recuperações bem como explorar as melhores condições do método. Gerando menos resíduos, a melhor recuperação obtida foi do experimento 1 (101,5%), nas condições de 20 mL de solução ácida de hidrólise sem a presença de HCl, por 90 min.

Como este resultado apresentou uma excelente recuperação, utilizando apenas solução aquosa SnCl₂ 1,5% (sem HCl), realizaram-se mais testes de extrações nas mesmas condições (n=3) para confirmação. Além disso, outras amostras (n=3) foram fortificadas na concentração de 0,5 mg kg⁻¹, em termos de CS₂. A média das recuperações foram de 87,9 ± 10% e 116,7 ± 2%, para as concentrações

de 2 e 0,5 mg kg⁻¹, em termos de CS₂, respectivamente, revelando assim que a presença de ácido não se faz necessária para a hidrólise do DTC neste estudo.

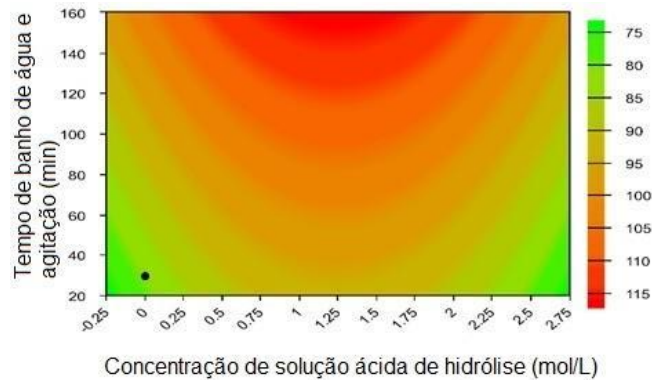
A presença de uma substância redutora, como o SnCl₂, favorece a hidrólise de DTC e conseqüentemente a formação de CS₂, justificando assim a necessidade de adição deste na fase de análise (WHO, 1988).

O SnCl₂ é complexado pelo enxofre a partir de C=S, atuando como um inicializador, a fim de favorecer o ataque intramolecular do par de elétrons NH, iniciando assim a reação. Após o ataque, o hidrogênio do NH liga-se ao enxofre que estava complexando o SnCl₂, formando o H₂S, que pode ser responsável por deixar o meio levemente ácido, portanto, capaz de protonar os nitrogênios e levar à formação do CS₂ (Apêndice E).

Além disso, a erva mate apresenta características ácidas (BRAGHINI et al. 2014). Ao verificar o pH, as amostras deste estudo apresentaram pH em torno de 5; após o processo de extração, o pH medido ficou entre 2 e 2,63. Portanto, nesse caso, a hidrólise do DTC provavelmente foi favorecida pela presença de ácidos orgânicos, incluindo aminoácidos presentes na erva mate (MELO et al, 2020), os quais podem ser co-extraídos levando a redução do pH do meio e beneficiando a análise. Cabe ressaltar que a etapa de purificação é importante justamente para reduzir a interferência destes na análise cromatográfica.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 5) indicou as condições de 20 mL de solução aquosa SnCl₂ (sem conter o HCl) e 30 min de banho de água com agitação seriam suficientes para alcançar recuperações excelentes (81 ± 7,3 %), sugerindo assim que condições de menor tempo extração e sem uso de HCl são suficientes para recuperações adequadas.

Figura 5 - Gráfico de superfície de resposta em função da concentração da solução ácida de hidrólise e tempo de banho de água com agitação



Fonte: Adaptação software *Protimiza Experimental Design*.

Portanto, a fim de utilizar o mínimo de reagentes optou-se por realizar outros testes variando apenas o volume de solução aquosa de SnCl_2 e o tempo de banho de água com agitação, ou seja, menor tempo bem como menor volume a ser utilizado de solução extratora. O estudo univariado está descrito no item 5.4.

5.4 ESTUDO UNIVARIADO

Variando-se o volume de solução aquosa e o tempo de banho de extração sob agitação, os melhores resultados de recuperação foram obtidos com 10 mL de solução aquosa de SnCl_2 1,5% e banho de água com agitação de 30 e 90 min, a 80 °C conforme a Tabela 6, atendendo os requisitos recuperação entre 70 a 120% e RSD menor que 20%.

Tabela 6 - Condições de hidrólise, e média das recuperações, com respectivo RSD% para o estudo univariado

Experimento	Volume de solução aquosa SnCl₂ 1.5% para hidrólise (mL)	Tempo de banho de água com agitação (min)	Média de recuperação (%)	RSD%
1		30	97,8	1,9
2	10	60	66,2	4,1
3		90	111,7	2,8
4		30	95,3	22,8
5	20	60	68,3	4,4
6		90	121,6	2,0

Fonte: Autor.

Estudos realizados por McLeod & McCully (1969), que testaram tempos de 30 e 60 minutos para hidrólise e escolheram o primeiro pois 60 minutos foi considerado longo demais. Keppel (1969) concluiu que 30 minutos seriam adequados para a reação. Pode-se observar que os melhores resultados dos testes realizados são obtidos na condição de 10 mL de solução aquosa de SnCl₂ e 30 min de banho de água e agitação, onde o percentual de recuperação é mais próximo a 100% e com um menor RSD (1,9%).

Assim, com base nesses resultados e visando uma miniaturização ainda do método, foi realizado mais um teste a fim de verificar se a recuperação se manteria e se haveria proporcionalidade entre a quantidade de amostra, volume de isooctano e solução aquosa de SnCl₂ 1,5%.

O teste final foi realizado em duplicata (n=2), reduzindo assim pela metade a quantidade de amostra (10 passando para 5 g) (de 10 para 5 mL) isooctano e da solução aquosa de hidrólise contendo SnCl₂ 1,5% (de 10 para 5 mL). Já o tempo e a temperatura do banho de água de hidrólise foram mantidos em 30 min e 80 °C, respectivamente. A erva mate foi fortificada no nível de concentração de 2 mg kg⁻¹ de CS₂.

Os resultados do teste final demonstram que houve recuperação adequada ($88,8 \pm 5 \%$), indicando assim que estas condições, para este estudo podem ser utilizadas para a extração de DTC em erva mate. Assim, essas condições foram utilizadas no procedimento de extração para a validação do método desenvolvido e otimizado.

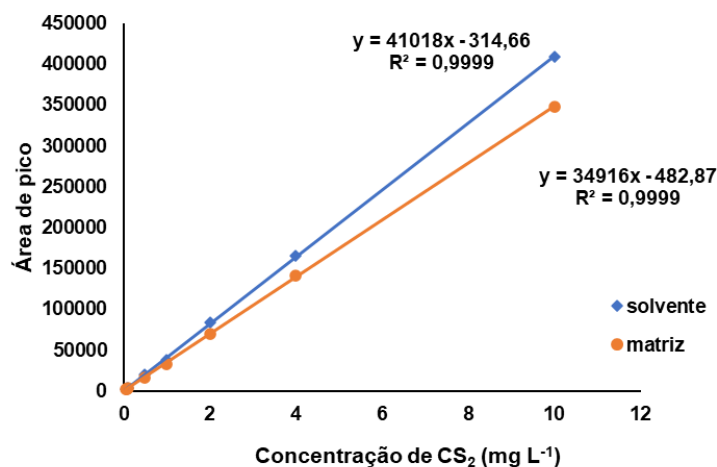
5.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

5.5.1 Curva analítica, estudo da linearidade e efeito matriz

A Figura 6 apresenta as equações das curvas analíticas para o CS_2 , com os respectivos coeficientes: angular (a – inclinação), linear (b – intersecção) e coeficiente de determinação (r^2), bem como a faixa linear do método para as soluções analíticas preparadas em solvente orgânico e em extrato “branco” de erva mate, concentrações de 0,05; 0,08 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 mg L^{-1} .

As soluções preparadas em extrato “branco” de erva mate e em solvente orgânico foram analisadas cromatograficamente de forma aleatória, até que todas as 7 repetições fossem analisadas.

Figura 6 - Comparação entre as curvas analíticas obtidas a partir de soluções analíticas de CS_2 , preparadas em isooctano e em extrato “branco” de erva mate



Fonte: Autor.

Observa-se através das equações das retas, que o modelo sugerido é linear no intervalo de 0,05 – 10 mg CS₂ L⁻¹, já que o coeficiente de determinação é maior que 0,9999, o que segundo o SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2020) é satisfatório, tanto para as curvas obtidas empregando-se extrato “branco” de erva mate quanto para as preparadas em isooctano. Os dados do estudo da linearidade, com as médias das áreas e os RDS%, bem como o efeito matriz, estão apresentados na Apêndice F.

Quando comparadas as oito concentrações das soluções preparadas em extrato de erva mate “branco” com aquelas preparadas em solvente orgânico (Figura 6), percebe-se uma leve diferença na inclinação das retas das curvas analíticas, sendo assim, pode ser atribuído ao efeito matriz.

O efeito matriz foi calculado de acordo com a Equação 4 descrita no item 4.7.3, o valor obtido neste estudo para o efeito matriz foi negativo (-14,9).

De acordo com o SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2020), os resultados com efeito matriz entre -20 e +20% são considerados aceitáveis para a determinação de contaminantes a nível de traços, portanto, se estiverem nesta faixa o efeito matriz é insignificante. Para valores de efeito matriz que excedem a faixa de $\pm 20\%$, o ideal é que a quantificação seja realizada empregando curva analítica preparada em extrato branco da matriz. Desta forma, a análise torna-se mais confiável, devido às semelhanças na composição entre o analito presente no extrato da amostra e na curva analítica em questão.

Uma das maneiras de minimizar e/ou eliminar o efeito matriz é reduzir a quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector e, para isto, devem ser desenvolvidos métodos de extração mais seletivos e etapas mais eficientes de purificação. A etapa de purificação do extrato é essencial para que componentes da matriz não interfiram nos resultados, caso contrário se terá uma supressão ou aumento do sinal analítico, uma vez que componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção (CASSÓL, 2019).

5.5.2 Limites de detecção e de quantificação

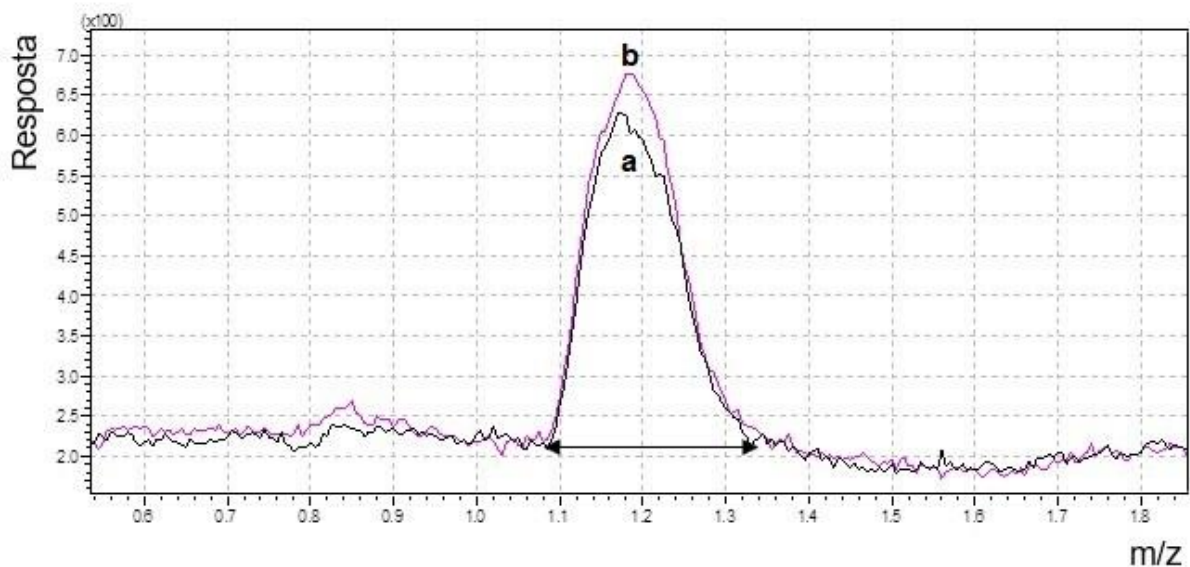
O LOD foi obtido a partir de 7 injeções de solução de CS₂ preparada em extrato “branco” de erva mate. Foi estabelecido em 0,05 mg kg⁻¹ de CS₂ (equivalente a solução de 0,05 mg L⁻¹ de CS₂ com RSD= 14,4%).

O limite de quantificação (LOQ) teórico foi estabelecido da mesma forma descrita que o LOD, 7 injeções de solução de CS₂ em extrato “branco” matriz, ficando assim estimado em 0,08 mg kg⁻¹ de CS₂ com um RSD=13,8%.

Já o LOQ do método foi estabelecido através do estudo de fortificação e recuperação, avaliando assim os critérios de desempenho de recuperação e precisão seguindo a recomendação do documento SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2020), onde a recuperação média das replicatas deve estar dentro da faixa de 70 a 120%, com um RSD ≤ 20%. O LOQ para este método foi de 0,1 mg kg⁻¹ em termos de CS₂, com recuperação média de 116,1 e RSD de 4,6%.

Na Figura 7, mostra os cromatogramas para a solução de 0,1 mg kg⁻¹ de CS₂ preparados em extrato branco (a) e fortificada a mesma concentração (b), mostrando que não teve nenhum pico de interferência eluindo no mesmo tempo de retenção do CS₂, bem como o pico da concentração de fortificação praticamente possui o mesmo comportamento quando comparado à solução em extrato “branco”, na mesma concentração.

Figura 7 - Cromatograma a partir de solução analítica em extrato branco e fortificação na concentração de 0,1 mg kg⁻¹ de CS₂



Fonte: Software.

5.5.3 Exatidão e precisão

A erva-mate em branco foi fortificada com solução de tiram nas concentrações de 0,1; 0,5 e 2,0 mg kg⁻¹ em termos de CS₂. A extração foi realizada de acordo com as condições otimizadas apresentadas no item 4.7.1. Os valores das médias de recuperações, com respectivo RSD%, estão descritos na Tabela 8. No Apêndice G, estão apresentadas todas as recuperações (n=7) em cada nível (n=3) e seus respectivos RSD%.

Tabela 7 - Recuperações médias, precisão em termos de repetibilidade (RSDr) obtidas para erva-mate fortificadas com tiram em concentrações equivalentes de 0,1, 0,5 e 2,0 mg kg⁻¹ CS₂ e resultados estatísticos da ANOVA para a análise de precisão intermediária e reprodutibilidade dos ensaios de recuperação/fortificação com o valor de confiança de 95% (n=7)

Concentração (mg kg ⁻¹)	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Precisão Intermediária	Reprodutibilidade/ Robustez	
	Recuperação média (%) ± RSD (%) (n= 7)	Recuperação média (%) ± RSD (%) (n= 7)	Recuperação média (%) ± RSD (%) (n= 7)	Recuperação média (%) ± RSD (%) (n= 14)	Recuperação média (%) ± RSD (%) (n= 21)	p value
0,1	116,2 ± 4,6	102,0 ± 4,9	106,9 ± 14,0	109,1 ± 8,2	108,4 ± 10,6	0,0526
0,5	85,6 ± 5,9	91,0 ± 4,3	86,4 ± 12,2	88,3 ± 5,2	87,7 ± 8,6	0,3755
2	81,4 ± 2,6	92,2 ± 9,0	92,4 ± 16,1	86,8 ± 8,1	88,7 ± 12,8	0,103

Fonte: Autor.

Os resultados encontrados para o estudo de fortificação e recuperação foram satisfatórios para as três estudadas. Sendo assim, todos os níveis de fortificação encontraram-se dentro dos limites recomendados pelo documento orientativo SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2020), que preconiza a faixa de recuperação de 70 a 120% e valores de RSD $\leq 20\%$ para a validação do método.

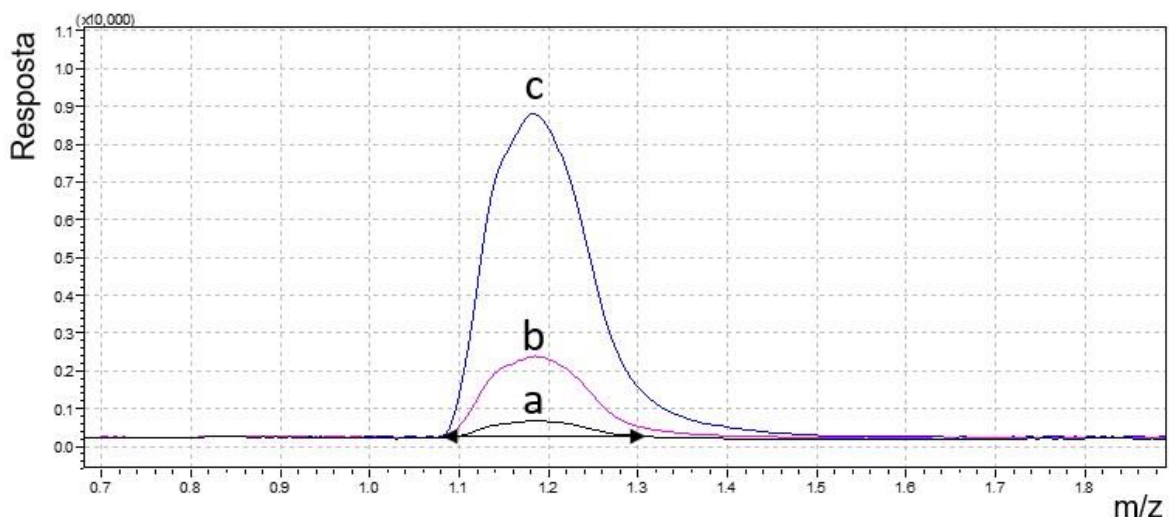
Para o estudo da precisão intermediária foram repetidos os ensaios de fortificação e recuperação descrito no item 4.7.1, alterando o analista e com intervalo de três dias após o primeiro procedimento. Os resultados obtidos pelo segundo analista estão descritos na Tabela 8.

Assim como para a repetibilidade e precisão intermediária, os resultados obtidos para a reprodutibilidade do método para os três níveis de fortificação estão dentro dos parâmetros aceitos pelo SANTE.

Além de avaliar o RSD% entre os analistas realizou-se teste estatístico ANOVA a fim de testar se as condições testadas (dos diferentes analistas) exercem influências significativas no valor do RSD% da precisão intermediária e reprodutibilidade.

Na Figura 8, está apresentado o cromatograma obtido por para as amostras fortificadas nos níveis de concentração 0,1, 0,5 e 2,0 mg kg⁻¹ CS₂, respectivamente.

Figura 8 - Cromatograma obtido por GC-MS para as recuperações/fortificação nos três níveis a, b e c (0,1; 0,5; e 2,0 mg kg⁻¹ CS₂, respectivamente)



Fonte: Software.

A partir dos primeiros métodos propostos para determinação dos DTC, o preparo da amostra tem sido geralmente realizado em meio ácido (McLEOD & McCULLY, 1969; KEPPEL, 1971). Contudo, neste trabalho, foram obtidas precisão e exatidão adequadas, mesmo sem a adição de ácido na etapa de preparo da amostra. Apenas utilizando o agente redutor se obteve resultados adequados, ou seja, o SnCl₂ favoreceu a formação do CS₂ e juntamente com as características de pH ácido da erva mate.

Quando comparado com o método tradicional, adotado pela Comissão Europeia (de KOK & VAN BODEGRAVEN, 2000), o presente método otimizado e validado apresentou vantagens como: (i) redução de 5x do volume de isooctano usado na extração DTC (25 → 5 mL); (ii) aumento de 1 para 30 extrações, utilizando o mesmo volume de solução de hidrólise (150 → 5 mL) mantendo apenas a concentração de SnCl₂ e sem HCl - todos os estudos anteriores utilizaram ácido em diferentes concentrações; (iii) aumento de 200% na velocidade de extração (120 → 30 min), (iv) manipulação de menor quantidade de amostra (50 g de frutas e vegetais → 5 g de erva mate), e conseqüentemente (v) menor volume de resíduos, ou seja, um novo método ambientalmente correto.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com base nos resultados de RSD% e da ANOVA apresentados na Tabela 8 é possível verificar que os dados são estatisticamente significativos pois o *p value* é superior a 0,05, e com isso, assegurar a precisão intermediária e a reprodutibilidade do método para cada nível de fortificação/recuperação. Portanto a média de maior analista, não diferem da média do menor analista.

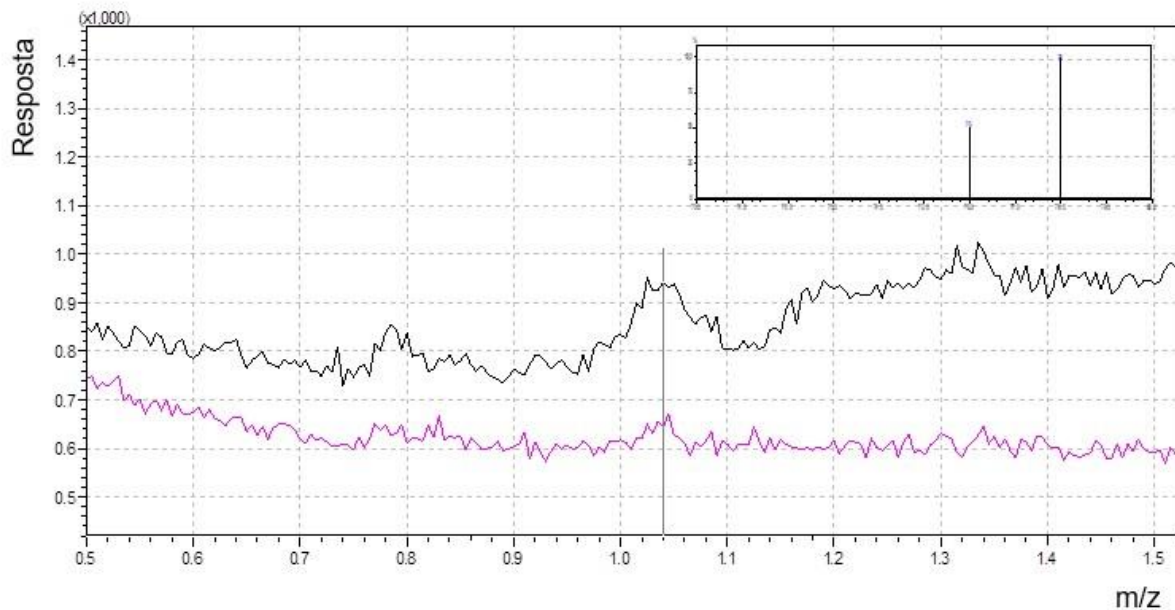
5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO

A partir das análises das amostras comerciais de erva mate foi detectada a presença de DTC em nenhuma das 19 amostras (LOD= 0,05 mg Kg⁻¹ em termos de CS₂).

A Figura 9, mostra o comportamento da amostra comercial designada como EM 17 em duplicata como um exemplo, para demonstrar que não foi encontrado a

presença de DTC. Não houve nenhum pico no tempo de retenção do CS₂ e quando analisado o espectro de massas não apresentou a relação de íon 10:1 para m/z 76 e 78, característico para a presença de CS₂.

Figura 9 - Cromatograma obtido por GC-MS com a confirmação negativa de CS₂ na razão de íons 10:1 entre m/z 76:78, na análise de amostras comerciais de erva mate, mostrando o comportamento da duplicata designada como EM 17



Fonte: *Software*.

Considerando a erva-mate como uma matriz semelhante ao chá ou plantas medicinais (SCOTTA et al., 2017), a Farmacopeia Brasileira (2019) estabeleceu o LMR para DTC em 2 mg kg⁻¹, em termos de CS₂. Já o Regulamento da Comissão da União Europeia (2017) estabelece 0,1 mg kg⁻¹ de CS₂ como LMR em mate (chá de erva-mate), a partir do uso de manebe, mancozebe, metirame, propinebe, tiram e ziram.

Comparando os resultados das amostras analisadas com a Farmacopeia Brasileira ou com o Regulamento da Comissão da União Europeia para chá mate, todas as amostras seriam aptas para consumo pois não foram detectados resíduos de DTC.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento e a validação de método para determinação de resíduos de DTC são de grande importância, a fim de garantir a qualidade dos alimentos que chegam aos consumidores.

O desafio atual na determinação de resíduos de DTC é o desenvolvimento de métodos ambientalmente seguros e sustentáveis em conjunto com procedimentos rápidos, fáceis e amigáveis aos analistas.

Usar o projeto experimental PB e o DCCR, foi uma maneira rápida, barata e eficiente para otimizar fatores importantes de hidrólise na hora da extração para a determinação de DTC.

Os resultados deste estudo apresentam enormes avanços no método analítico para a determinação de DTC em uma matriz complexa, como a erva mate. O novo método apresentou muitas vantagens, como curto tempo de análise, menor volume de reagentes, simples e fácil para os analistas.

Este estudo mostrou-se através de ensaios de fortificação/ recuperação que o método analítico apresenta exatidão e precisão para os três níveis de fortificação, uma vez que, excelentes percentuais médios de recuperação (na faixa de 81,4 a 116,2%), com RSD inferior a 16,1% foram obtidos.

O procedimento de purificação do extrato de erva mate apresentou desempenho satisfatório e alta eficiência para a retirada de possíveis interferentes como pigmentos, ácidos orgânicos.

Os parâmetros avaliados durante a etapa de validação do método mostraram-se eficiente na determinação de resíduo de DTC por GC-MS em erva mate e para a aplicação em amostras adquiridas nos supermercados de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

REFERÊNCIAS

ABAKERLI, R.B.; SPARRAPAN, R.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; JARA, J.L.P. ; RODRIGUES, N.R.; FAY, E.F.; LUIZ, A.J.B.; Galvão, T.D.L.; Martins, D. dos S.; Yamanishi, O.K.; Toledo, H.H.B. **Carbon disulfide formation in papaya under conditions of dithiocarbamate residue analysis**, Food Chemistry, v. 188, p. 71-76, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.059>

ABDULRA'UF, L. B.; TAN G.H. **Abordagem quimiométrica para a otimização de HS-SPME / GC-MS para a determinação de resíduos de pesticidas multiclasse em frutas e vegetais**. Food Chemistry, v. 177, p. 267 – 273, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.031>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil**, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>>. Acesso em: 22/11/2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimento - PARA, Relatório das amostras analisadas no período 2017/2018, Primeiro Ciclo do Plano Plurianual 2017-2020**, Brasília, 2019. Disponível em: <[https:// bit.ly/2WD8grj](https://bit.ly/2WD8grj)>. Acesso em: 22/10/2021.

ARAUJO, F. J. M. de. **Análise De Resíduos De Fungicidas Ditiocarbamatos Em Hortaliças Produzidas Na Região De Vargem Bonita, Distrito Federal**. 2019 Dissertação(Mestrado)- Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, 2019.

ARRIETA, M. P.;PEPONI, L.; LÓPEZ, D.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. **Recovery of yerba mate (Ilex paraguariensis) residue for the development of PLA-based bionanocomposite films**, Industrial Crops and Products, v.111, p. 317-328, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.042>.

ATUHAIRE A, KAYE E, MUTAMBUZE IL, MATTHEWS G, FRIEDRICH T, JØRS E. **Avaliação de resíduos de ditiocarbamato em tomates cultivados convencionalmente em Uganda e o efeito da lavagem simples para reduzir o risco de exposição aos consumidores**. Environ Health Insights, v.11, 2017. Doi: 10.1177 / 1178630217712218

BASTOS, L. H. P.; GOÉS, H. C. A.; CARDOSO, M. H. W. M.; GOUVÊA, A. V.; DIAS, D. P.; ALMEIDA, R. R. R.; NÓBREGA, A.; ABRANTES, S. **Ensaio de Proficiência para Análise de Ditiocarbamatos em Polpa de Banana**. Revista Quim. Nova, Vol. 30, n. 1, p.32-35, 2007.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004.

BRACESCO, N.; SOSA, V.; BLANC, L.; CONTRERAS, V.; CANDREVA, E. C; SALVO, V. A.; HOCART, S.; MECHOSO, B.; NUNES, E. **Analysis of radioprotection and antimutagenic effects of Ilex paraguariensis infusion and its component rutin**, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 51 (9), p. 1-8, 2018, DOI: 10.1590/1414-431X20187404.

BRACESCO, N. **Ilex paraguariensis as a healthy food supplement for the future world** Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 16 (1), p. 1-3,2019, DOI: 10.26717/bjstr.2019.16.002808.

BRAGHINI, F.; DE CARLI, C.G; BONSAGLIA, B.; SILVEIRA JUNIOR, J.F. DOS D.; DE OLIVEIRA, D.F.; TRAMUJAS, J.; TONIAL, I. B. **Composição físico-química de erva-mate, antes e após simulação do chimarrão**. Pesquisa Agropecuária Gaúcha, 20(1/2), 7-15, 2014.

BRASIL. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento,[...] e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, poder executivo, Brasília; 181º da Independência e 114º da República, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária RESOLUÇÃO-RE Nº 165, DE 29 DE AGOSTO DE 2003, O Diretor da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere a Portaria nº 327, de 16 de maio de 2003, [...] Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, publicada no DOU de 22 de dezembro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília; 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional De Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição,[...], resolve adotar a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada, conforme deliberado em reunião realizada em 11 de julho de 2017. **Diário Oficial Da União**, Brasília, edição 114 (1), p. 87, 2017.

CASSÓL, R. R. C. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em uva empregando método QuEChERS e UHPLC-MS/MS**. 2019. Dissertação(Mestrado)- Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

CHAWLA, S., PATEL, H. K., KALASARIYA, R. L., & SHAH, P. G. **Validation and analysis of thiram, a dithiocarbamate, as CS2 from soybean (Glycine max) samples on GC-MS**. International Journal of Environmental Science and Technology, 16(11), 6991–6998, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2069-0>.

CLARKE, D. G., BAUM, HARRY, STANLEY, E. L., HESTER, N. F. **Determination of Dithiocarbamates**. Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pa. Anal. Chem. 23, 1842 1951.

CULLEN E THOMAS. **Spectrophotometric Determination of Dithiocarbamate Residues on Food Crops**. Niagara Chemical Division, FMC Corp., Middleport, N. Y.1964.

CRNOGORAC, G.; SCHWACK, W. **Residue analysis of dithiocarbamate fungicides**.Trends in Analytical Chemistry, v. 28, n. 1, p. 40–50, 2009, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.008>.

da SILVEIRA, T. F.F.; MEINHART, A. D.; de SOUZA,T. C.L.; CUNHA, E. C. E.; MORAES,M.R. de; Godoy, H.T. **Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate based beverages**, Food Research International, v. 102, p. 348-354, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.098>.

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial**. UEMS - Universidade Federal da Grande Dourados. Editora UFGD, Dourados, MS, 2009, 288, DOI: <https://doi.org/10.13140/2.1.3312.9603>.

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**, York, UK, 2000.

DIMOND, ALBERT & HEUBERGER, J. & HORSFALL, JAMES. **Copper spray substitutes**. American Journal of Potato Research. 20. 141-153, 1943, DOI: 10.1007/BF02889526.

EPA. **The determination of whether dithiocarbamate pesticides share a common mechanism of toxicity**, Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, Environmental Protection Agency, Washington,DC, EUA, p.38, 2001.

EUROPEAN COMISSION. **Pesticide residue(s) and maximum residue levels (mg/kg). Reg. (EU) 2017/171**, 2017. Disponível em: < https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/index.cfm?event=details&pest_res_ids=83&product_ids=&v=1&e=search.pr&p=&v=1>. Acesso em 24/11/2021.

EUROPEAN COMISSION. **Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed**. Document no SANTE/12682/2019, European Commission Directorate-General for Health and Food Safety, 2020.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Plantas Medicinais**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 6ª edição Volume II – Monografias Brasília, 2019.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; ETCHELET, M. I.; BRAGA, A. F. M.; CLAVIJO, L.; LOACES, I.; NOYA, F.; ETCHEBEHERE, C. **Alkaline pretreatment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) waste for unlocking low-cost cellulosic biofuel**, Fuel, v. 266, 117068, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117068>.

FERRARIO, M.; SCHENK, M.; CARRILLO, G.; GUERRERO, S. **Development and quality assessment of a turbid carrot-orange juice blend processed by UV-C light assisted by mild heat and addition of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) extract**, Food Chemistry, v. 269, p. 567-576, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.149>.

FRANCK, C.J., **Modelagem Matemática Para Dosadores De Fertilizantes Por Delineamento Composto Central Rotacional**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação Em Engenharia Agrícola, Universidade Federal De Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil 2014.

FRIEDRICHS, K.; WINKELERL, H.D.; PETRA GERHARDS, P. **Bestimmung von Dithiocarbamaten in Lebensmitteln mittels Headspace-Gaschromatographie und flammenphotometrischer Detektion**. Lebensm Unters Forsch, 201: 69- 73, 1995.

FODRA, T. C. W. **Dinâmica das relações comerciais de erva-mate entre brasil e Seus principais importadores**. Monografia(Especialização em Gestão Florestal)- Pós Graduação em Graduação em Gestão Florestal, Setor de Ciências agrárias, Universidade Federal do Paran., Curitiba, p. 38. 2019.

GARCINUÑO, R. M., RAMOS, L., FERNÁNDEZ-HERNANDO. P. **Optimization of matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples**. J. Chromatogr. A, v. 1041, p. 35-41, 2004.

GONÇALVES, P. G. **Reutilização da Água Recuperada da Quebra da Emulsão de Fluido de Corte Degradado proveniente de Indústria Metal Mecânica**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Londrina, p. 80, 2019.

GONZÁLVEZ, A. et al. Analytica Chimica Acta, v. 688, 191-196, 2011.

GULLINO, M. L.; TINIVELLA, F.; GARIBALDI, A.; KEMMITT, G. M.; BACCI, L.; SHEPPARD, B. **Mancozeb: Past, Present, and Future**. Plant Disease, USDA, v. 94, n.9, p.1076-1087, 2010.

HEUBERGER, J. W.; WOLFENBARGER, D. O. **Preliminary report on DDT in the potato fungicide program**. Phytopath. 34: 1003, 1944.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola - Lavoura Permanente, 2020. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/11863>.

IBRAMATE & FUNDOMATE, Instituto Brasileiro Da Erva-mate& Fundo de Desenvolvimento e Inovação da Cadeia Produtiva de Erva-Mate. **Diagnóstico da cadeia produtiva da Erva-mate no estado do Rio Grande do Sul**, Ilópolis- RS, ano I, nº01/2018, 2018.

INMETRO. **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Revisão 09, DOQ- CGCRE-008, pág. 1-30. Junho de 2020.

KANCHI, S.; SINGH, P.; BISETTY, K. **Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: A critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century**. Arabian Journal of Chemistry, v. 7, p. 11–25, 2013.

KAFSHGARI, A.L.; GHORBANI, M.; AZIZI, A.; AGARWAL, S.; GUPTA, V.K. **Modeling and optimization of Direct Red 16 adsorption from aqueous solutions using nanocomposite of MnFe₂O₄/MWCNTs: RSM-CCRD model**, Journal of Molecular Liquids, v. 233, p. 370-377, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.03.047>

KAUFMANN, K. C.; CZAKOSKI, A.; BARBIN, D. F.; DA CUNHA, R. L. **Incompatibility between sodium caseinate - locust bean gum induced by NaCl and yerba mate extract**, International Journal of Biological Macromolecules, v. 183, 2021, Pages 276-284, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.106>.

KEPPEL, G. E. **Modification of the Carbon Disulfide Evolution Method for Dithiocarbamate Residues**. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 52(1), 162–167, 1969. DOI:10.1093/jaoac/52.1.162.

KEPPEL, G. E. **Collaborative Study of the Determination of Dithiocarbamate Residues by a Modified Carbon Disulfide Evolution Method**. Journal of Association of Official Analytical Chemists. 54(3), 528–532, 1971 DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/54.3.528>.

KIM, S. Y.; OH, M. R.; KIM, M. G.; CHAE, H. J.; CHAE, S. W. **Anti-obesity effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*): A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial**, BMC Complementary and Alternative Medicine, 15 (1), p. 1-8, 2015, DOI:10.1186/s12906-015-0859-1.

KUNDEL, P. T. A. N.; CORREA, V. G.; CORRÊA, R. C. G.; PERALTA, R. A.; SOKOVIĆ, M.; Calhelha, R. C.; Bracht, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Peralta, R. M. **Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba**

mate (*Ilex paraguariensis*), International Journal of Biological Macromolecules, v. 114, 2018, p.1161-1167, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.020>.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**, São Paulo: Ed. Manole, 1999.

LI, C.; FARROKHPAY, S.; RUNGE, K.; SHI, F. **Determining the significance of flotation variables on froth rheology using a central composite rotatable design**, Powder Technology, v. 287, p. 216-225, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.10.013>.

LIU, S.; BAI, A.; ZHOU, L.; YU, C.; LI, Y.; FAN, S.; PAN, C. **Dissipation and Residues of Thiram in Potato and Soil**. Journal of Chemistry Hindawi Publishing Corporation, v. 2015, 623847, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/623847>.

MCLEOD, H. A., & MCCULLY, K. A. **Head Space Gas Procedure for Screening Food Samples for Dithiocarbamate Pesticide Residues**. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 52(6), 1226–1230, 1969. DOI:10.1093/jaoac/52.6.1226.

MELO, T. O. DE; MARQUES, F. A.; WENDLING, I.; KOPKA, J.; ERBAN, A.; HANSEL, F. A. **Compostos presentes em extrato metanólico de tecido foliar de erva-mate, por meio da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. Colombo: Embrapa Florestas (Comunicado técnico, 458), 19, 2020.

MELLO, D. C. **Determinação Dos Fungicidas Ditiocarbamatos Etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e propinebe em alimentos por HPLC-UV**. 2014, Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MOTTA, A. C. V.; BARBOSA, J. Z.; MAGRI, E.; PEDREIRA, G. Q.; SANTIN, D.; PRIOR, S. A.; CONSALTER, R.; YOUNG, S. D.; BROADLEY, M. R.; BENEDETTI, E. L. **Elemental composition of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) under low input systems of southern Brazil**, Science of The Total Environment, v. 736, 139637, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139637>.

MOZZAQUATRO, J. O., MELLO, D. C., OLIVEIRA, R. C. S., ROSA, R. C. C., COSTA, A. M. C., CALDAS, E. D. **Dithiocarbamate Residues in Fruits and Leaves of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) from Different Brazilian Regions**. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 30, No. 9, 1834-1840, 2019, DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190091>.

MUJAWAR, S.; UTTURE, S. C.; FONSECA, E.; MATARRITA, J.; BANERJEE, K. **Validation of a GC-MS method for the estimation of dithiocarbamate fungicide residues and safety evaluation of mancozeb in fruits and vegetables**. Food Chem. 150, 175–181, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.148>.

NEVES, A. D.; OLIVEIRA, W. DA S.; PETRARCA, M. H.; RODRIGUES, M. I.; GODOY, H. T. **A multivariate approach to overcome chlorophyll interferences in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen)**. Journal of Food Composition and Analysis, v. 104, 104189, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104189>.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R.T.; DE PAULA, V. F.; JÚNIOR, B. B. DO N.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G.S.; BEZERRA, M. A. **Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo**. Rev. Virtual Quim. V. 9 (3), p. 1184-1215, 2017.

PERZ, C.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, p. 792-796, 2000.

PETRARCA, M.H., RODRIGUES, M.R., ROSSI, E. A., SYLOS, C. DE M. Optimisation of a sample preparation method for the determination of fumonisin B1 in rice, Food Chemistry, v 158, 270-277, 2014, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.126>.

PETRILLI, A. A.; SOUZA, S. J.; TEIXEIRA, A. M.; PONTILHO, P. M.; SOUZA, J. M. P.; LUZIA, L. A.; RONDÓ, P. H. C. **Effect of chocolate and yerba mate phenolic compounds on inflammatory and oxidative biomarkers in HIV/AIDS individuals**, Nutrients, 8 (5), 2016, pp. 1-14, 10.3390/nu8050132.

PLACKETT, R. L., BURMAN, J.P. **The Design of Optimum Multifactorial Experiments**, 33 (4) pp. 305 – 325, 1946.

PIZZUTTI, I. R.; DE KOK, A.; DA SILVA, R. C., & ROHERS, G. N. **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(5), p. 775–781, 2017, DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160227>.

RABAIOLLI, J. A. **A Erva-Mate Orgânica Como Estratégia De Produção E Reprodução Social: O Caso Dos Agricultores Familiares De Ilópolis/RS**. 2019. Tese(Doutorado)- Programa De Pós-Graduação Em Geografia, Universidade Federal De Santa Maria, Santa Maria, 2019.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. **A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente**. Revista Liberato, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009

RIBEIRO, L. **Anatomia Ecológica De Folhas De *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Na Mesorregião Serrana De Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação

em Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba/SC, 2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1ª ed. Campinas, SP: Cárita Editora, 2005.

ROSSI, G.B.; LOZANO, V.A. **Simultaneous determination of quality parameters in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) samples by application of near-infrared (NIR) spectroscopy and partial least squares (PLS)**, LWT, v. 126, 2020, 109290, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109290>.

SAHA, S. P.; MAZUMDAR, D. **Optimization of process parameter for alpha-amylase produced by *Bacillus cereus* amy³ using one factor at a time (OFAT) and central composite rotatable (CCRD) design based response surface methodology (RSM)**, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 19, 101168, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101168>.

SALVATO, L. A. **Otimização estatística de variáveis da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* para maior produção de biomassa com capacidade adsorvente de micotoxinas**. 2019. 59p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SANTETTI, G. S.; DACOREGGIO, M. V.; INÁCIO, H. P.; BIDUSKI, B.; HOFF, R. B.; FREIRE, C. B. F.; GUTKOSKI, L. C.; AMBONI, R. D. DE M. C. **The addition of yerba mate leaves on bread dough has influences on fermentation time and the availability of phenolic compounds?**, LWT, v. 146, 111442, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111442>.

SANTO, A. T. DO E.; SIQUEIRA, L. M.; ALMEIDA, R. N.; VARGAS, R. M. F.; FRANCESCHINI, G. DO N.; KUNDE, M. A.; CAPPELLARI, R. A.; MORRONE, F. B.; CASSEL, E. **Decaffeination of yerba mate by supercritical fluid extraction: Improvement, mathematical modelling and infusion analysis**, The Journal of Supercritical Fluids, v. 168, 105096, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105096>.

SANTOS, M. C. D.; AZCARATE, S. M.; LIMA, K. M. G.; GOICOECHEA, H. C. **Fluorescence spectroscopy application for Argentinean yerba mate (*Ilex paraguariensis*) classification assessing first- and second-order data structure properties**, Microchemical Journal, v. 155, 104783, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104783>.

SCHMIDT, B.; CHRISTENSEN, H. B.; PETERSE, A.; SLOTH, J. J.; POULSEN, M. E. **Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LCMS/MS**, Food Addit. Contam. Part. A, 30 (7) 1287-1298, 2013.

SCOTTA, A. V., BONGIOVANNI, G. A., SORIA, E. A. **Actividad Moduladora In Vitro de Extractos Acuosa de Plantas Americanas sobre la Toxicidad Inducida por Clorpirifos en Esplenocitos Murinos**. Revista de La Facultad de Ciencias Médicas, 74(4), 325–330, 2017. DOI:10.31053/1853.0605.v74.n4.15361

SILVA, R. C., WICKERT, C., PIZZUTTI, I. R., de KOK, A. **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, 69 (38), 11485-11493, 2021. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c01870.

SINDIMATE PR, Sindicato da Indústria do Mate do Estado Paraná. **Consumo e Exportação da Erva-Mate**. Curitiba/PR, 2021. Disponível em: <<https://www.fiepr.org.br/sindicatos/sindimateold/FreeComponent3525content24302.shtml#>>.

SOARES, N. F. **Otimização, Validação E Implementação De Método Analítico Para Determinação De Ditiocarbamatos Na Matriz Tomate E Seu Estudo Como Candidato A Item De Ensaio De Proficiência**. Monografia (Especialização) – Pós - Graduação Em Vigilância Sanitária, Instituto nacional de controle de qualidade em saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

TERRAZAS, W. D. M. **Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante Pichia pastoris**. 2012. 132 f. Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

TSEN, C.-M.; YU, C.-W.; CHEN, S.-Y.; LIN, C.-L.; CHUANG, C.-Y. **Application of surface-enhanced Raman scattering in rapid detection of dithiocarbamate pesticide residues in foods**, Applied Surface Science, v. 558, 149740, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149740>.

TOMLIN, C. D.S. **The Pesticide Manual**, 14th Edn. British Crop Prot. Conselho, Surrey, Reino Unido, ED. 2006.

VARELI, C. S.; PIZZUTTI, I.R.; GEBLER, L.; CARDOSO, C.D.; GAI, D.S.H.; FONTANA, M.E.Z. **Analytical method validation to evaluate dithiocarbamates degradation in biobeds in South of Brazil**. Talanta, v.184,p.202–209,2018.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.009>.

VARGAS, T.D.S.; SALUSTRIANO, N.D.A.; KLEIN, B.; ROMÃO, W.; RIBEIRO, S.; WAGNER, R. **Fungicides in red wines produced in South America**. Food Additives & Contaminants: Part A., 35:11, 2135-2144, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1529439>.

VARGAS, B. K.; FROTA, E.G.; SANTOS, L.F. DOS; GUTKOSKI, J. P.; LOPES, S. T.; BERTOL, C. D.; BERTOLIN, T. E. **Yerba mate (Ilex paraguariensis) microparticles**

modulate antioxidant markers in the plasma and brains of rats, Food Bioscience, v. 41, 2021, 100999, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100999>.

VRYZAS, Z.; PAPADAKIS, E. N.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. **Microwave Assisted Extraction (MAE)–Acid Hydrolysis of Dithiocarbamates for Trace Analysis in Tobacco and Peaches**. J. Agric. Food Chem. 50, 8, 2220–2226, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0111864>.

WANG,D.; LIU,D.; ZHOU,Z.; WANG,P. **Tyrosinase coupled with boron-doped carbon nanodots for fluorometric determination of dithiocarbamate fungicide ziram**, **Microchemical Journal**, v. 166, 106241, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106241>.

WHO. **Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea: a general introduction**. Environmental Health Criteria 78, Geneva. 1998, ISBN 92 4 154278 0, 1-140.

APÊNDICE A - ENSAIO DE FORTIFICAÇÃO/RECUPERAÇÃO DO MÉTODO

Ensaio de Fortificação/recuperação do método

Nível de Fortificação (mg kg⁻¹)	Concentração da solução de tiram (mg L⁻¹)	Volume adicionado(μL)	Fator do método
0,1	10	79	1,0
0,5	100	39	
2,0	100	158	

Fonte: Autor.

APÊNDICE B - CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

Concentração das soluções de CS₂ da curva analítica e volumes medidos da solução diluída para confecção da curva analítica em branco matriz e solvente.

Concentração mg L ⁻¹	Concentração da solução intermediária (mg L ⁻¹)	Volume de concentração de CS ₂ (µL)	Volume de isooctano ou extrato (µL)	Volume final
10,0	40	250	750	1000
4,0	40	100	900	1000
2,0	40	50	950	1000
1,0	4	250	750	1000
0,5	4	125	875	1000
0,1	1	100	900	1000
0,08	1	80	920	1000
0,05	1	50	950	1000

Fonte: Autor.

APÊNDICE C- FATOR DO MÉTODO

Cálculo para o fator do método:

2 mg kg⁻¹ ou 2 ppm

2 mg ----- 1000g

x ----- 5 g de amostra

x = 0,01 mg de CS₂ em 5 g de amostra

g de amostra = 5 mL de isooctano = 0,01 mg de CS₂

5 mL de isooctano ----- 0,01 mg CS₂

1 mL ----- x

x = 0,002 mg de CS₂ mL⁻¹

x = 2 mg de CS₂ L⁻¹

$$\text{Fator do método} = \frac{\text{Amostra(fortificada)}}{\text{Solução analítica}}$$

$$\text{Fator do método} = \frac{2}{2}$$

$$\text{Fator do método} = 1,0$$

APÊNDICE D - EFEITOS ESTIMADOS PARA A EXTRAÇÃO DE DTC EM ERVA MATE

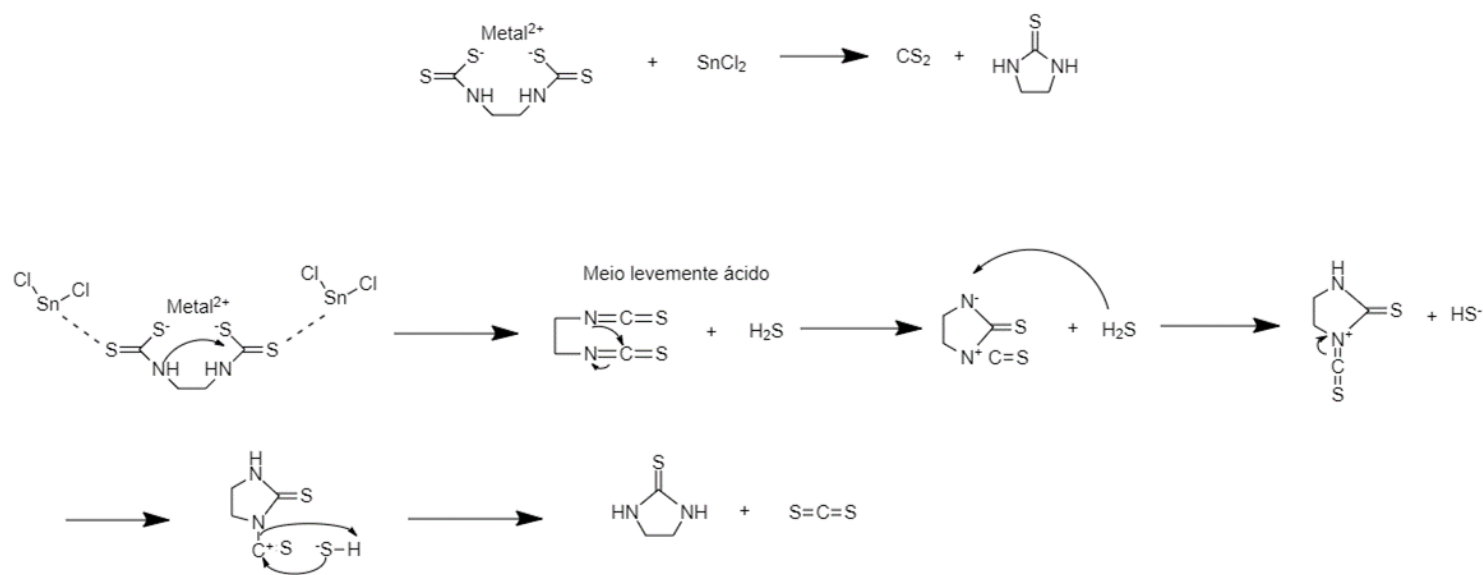
Principais efeitos estimados para a extração de DTC em erva mate a partir dos resultados do PB

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	78,73	2,2	35,77	0,00
Curvatura	11,23	11,65	0,96	0,3458
Solução de HCl concentração (x₁)	-11,28	4,4	-2,56	0,0181
Volume da solução (x₂)	-15,7	4,4	-3,57	0,0018
Volume de Isooctano (x ₃)	1,57	4,4	0,36	0,7255
Tempo de extração (x₄)	9,65	4,4	2,19	0,0398
Temperatura de extração (x ₅)	4,28	4,4	0,97	0,3416

Valores em negrito representam os valores significativos dos efeitos principais a um nível de significância de 5%

Fonte: Adaptação software *Protimiza Experimental Design*.

APÊNDICE E - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE CS₂



Fonte: Autor.

APÊNDICE F - LINEARIDADE DAS CURVAS EM SOLVENTE E EXTRATO MATRIZ

Média das áreas (n=7) obtidas através de injeções das soluções das curvas analíticas, nas concentrações de CS₂ 0,05 a 10 mg L⁻¹, preparadas no extrato “branco” de erva mate e em isoctano, com seus respectivos RSD%

Concentração CS ₂ (mg L ⁻¹)	Curva analítica (em Solvente)		Curva analítica (extrato branco matriz)		Efeito matriz (%)
	Média das áreas	RSD (%)	Média das áreas	RSD (%)	
0,05	2243	19,3	1725	14,4	-14,9
0,08	3112	7,7	2624	13,8	
0,1	4032	8,1	3313	16,4	
0,5	19823	4,4	16310	15,5	
1	37413	6,0	32692	18,0	
2	83234	3,9	69708	16,8	
4	165780	7,7	140582	16,2	
10	409094	6,0	348247	16,1	

Fonte: Autor.

APÊNDICE G - RESULTADOS DE RECUPERAÇÃO/ FORTIFICAÇÃO

Resultados de recuperação/ fortificação bem como o RSD% obtidos a partir da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade

Fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Precisão				
	Repetitividade				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
0,1	a	120,3	116,2	5,4	4,6
	b	119,2			
	c	118,2			
	d	114,4			
	e	107,1			
	f	111,8			
	g	122,4			
	Precisão intermediária				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
	h	92,9	102,0	5,0	4,9
	i	105,2			
	j	108,7			
	k	100,9			
	l	104,9			
	m	100,5			
	n	100,7			
	Reprodutibilidade				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
	o	79,8	106,9	16,2	15,1
	p	107,8			
	q	120,9			
	r	110,7			
	s	126,1			
	t	91,5			
u	111,9				

Fonte: Autor.

Fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Precisão				
	Repetitividade				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
0,5	a	90,5	85,6	5,0	5,9
	b	93,6			
	c	86,5			
	d	84,0			
	e	80,1			
	f	80,2			
	g	84,5			
	Precisão intermediária				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
	h	98,7	91,0	4,0	4,3
	i	92,0			
	j	91,0			
	k	91,4			
	l	86,0			
	m	89,4			
	n	88,6			
	Reprodutibilidade				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
	o	89,7	86,4	11,4	13,2
	p	94,5			
	q	87,0			
r	102,8				
s	69,1				
t	87,0				
u	74,6				

Fonte: Autor.

Fortificação (mg CS ₂ kg ⁻¹)	Precisão				
	Repetitividade				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
2,0	a	81,8	81,4	2,1	2,6
	b	81,8			
	c	83,6			
	d	82,8			
	e	82,5			
	f	77,3			
	g	79,8			
	Precisão intermediária				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
	h	78,4	92,2	8,3	9,0
	i	98,5			
	j	98,8			
	k	88,4			
	l	87,1			
	m	102,3			
	n	91,9			
	Reprodutibilidade				
	Réplica	Recuperação (%)	Recuperação (% média)	SD	RSD (%)
	o	61,2	92,7	16,1	17,4
	p	101,1			
	q	104,9			
r	105,4				
s	80,9				
t	97,7				
u	97,5				

Fonte: Autor.