



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, EMPREGANDO  
GC-ECD, GC-FPD E GC-MS, E ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM ALFACE**

**Rosselei Caiél da Silva**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, EMPREGANDO  
GC-ECD, GC-FPD E GC-MS, E ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM ALFACE**

por

**Rosselei Caiél da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Área de  
Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2005**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, EMPREGANDO  
GC-ECD, GC-FPD E GC-MS, E ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM ALFACE**

Elaborada por  
**Rosselei Caiél da Silva**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Renato Zanella – Orientador**  
Universidade Federal de Santa Maria

---

**Profa. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider**  
Universidade de Santa Cruz do Sul

---

**Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime**  
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 03 de agosto de 2005

*“Homem nenhum é uma ilha. E nenhuma pessoa conseguiu chegar aonde chegou inteiramente sozinho. Em algum lugar, alguma vez e de alguma maneira, deve ter aparecido alguém que desempenhou um papel importante. Nossa vida é tão entrelaçada com a de outros, que ninguém é capaz de conseguir o sucesso por si mesmo. Praticamente tudo o que sabemos, aprendemos de outros. Quase tudo o que fazemos está construído sobre o fundamento colocado por outros. Cada um tem uma contribuição a prestar, que só ele é capaz de dar.”*

*Alf Lohne*

*A Deus que sempre esteve presente iluminando meu caminho e dando-me a sabedoria necessária para realizar os meus sonhos.*

*Aos meus queridos e amados pais, Alcir e Zeli, que me ensinaram desde pequena o caminho certo a trilhar e os verdadeiros valores da vida. Que sempre me incentivaram a ir atrás dos meus sonhos e realizá-los. A vocês dedico este trabalho. Lembrem-se sempre: Amo Vocês!!!*

*Ao Meu Amor, que sempre acreditou em mim, que me incentivou a ir a busca dos meus sonhos e que suportou a ausência e a saudade! Edson, tu és parte desta conquista! Te Amo!!!*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação neste trabalho e pela oportunidade em participar deste grupo de pesquisa.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Martha Bohrer Adaime pela co-orientação, pelas sugestões no exame de qualificação e pela participação na banca examinadora de defesa de dissertação.

A Prof<sup>a</sup>. Dra Rosana de Cassia Schneider pela participação e sugestões na banca examinadora de defesa de dissertação.

A Prof<sup>a</sup>. MSc. Ionara Regina Pizzutti pela oportunidade em participar deste grupo de pesquisa desde o início da iniciação científica e pelas valiosas sugestões no exame de qualificação. Obrigada pela amizade e por todo o incentivo.

Ao Dr. André de Kok pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no VWA e aos amigos que conquistei durante a minha estada em Amsterdã. Obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos. *Thank you for everything!*

A todos os colegas do LARP, que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho. Agradeço especialmente aos amigos Sandra, Bárbara, Caroline, Graciele, Catiucia e Osmar pelo companheirismo, amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos meus amigos Ana Paula, Gleice, Rafael e Rochele que sempre me apoiaram e torceram por mim. A minha amiga Cristine que esteve ao meu lado me ajudando a suportar a distância e a saudade.

Aos funcionários da UFSM, especialmente ao Ademir e a Valéria pela simpatia e atenção de sempre.

Aos meus queridos pais Alcir e Zeli pelo amor, incentivo e por acreditarem em mim. A minha sobrinha Pietra e aos meus queridos irmãos e cunhados Zelair e Ademar, Alex e Cléia, e especialmente a Rosane e o Toni. Obrigada pelo amor, amizade e torcida!

Aos meus queridos Willy e Irmgard pelo apoio, torcida e todas as orações.



Ao Edson, pela confiança, apoio, compreensão, amizade, carinho e amor. Muito Obrigada, meu amor, por acreditar nos meus sonhos e por estar sempre presente na minha vida! Amo muito você!

A Deus pelo dom da vida e inigualável amor. Obrigada por mais esta etapa vencida e por todas as pessoas maravilhosas que tu colocaste em meu caminho.

## ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xviii
LISTA DE APÊNDICES.....	xx
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Alface.....	4
2.1.1 Valor nutricional e uso medicinal.....	4
2.1.2 Produção e consumo.....	5
2.2 Pesticidas.....	6
2.2.1 Contaminação por pesticidas.....	8
2.3 Ditiocarbamatos.....	9
2.3.1 Considerações gerais.....	9
2.3.2 Toxicidade.....	13
2.4 Limites Máximos de Resíduos (LMRs).....	14
2.5 Métodos analíticos para determinação de ditiocarbamatos.....	17
2.6 Validação de métodos.....	24
2.6.1 Curva analítica e linearidade.....	24
2.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	25
2.6.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	27
2.6.4 Recuperação.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Instrumentação.....	30

3.2 Gases utilizados.....	32
3.3 Reagentes e solventes.....	32
3.4 Fungicidas selecionados.....	33
3.5 Preparo das soluções.....	34
3.5.1 Preparo das soluções estoque de tiram.....	34
3.5.2 Preparo das soluções analíticas para os métodos cromatográficos.....	34
3.5.3 Preparo das soluções analíticas para o método espectrofotométrico.....	35
3.6 Armazenamento das amostras branco de alface.....	37
3.7 Análise dos solventes e reagentes.....	37
3.8 Avaliação das amostras para uso como amostra branco.....	38
3.9 Avaliação da estabilidade de mancozebe em solução.....	38
3.10 Avaliação da estabilidade do complexo formado entre CS <sub>2</sub> , cobre e dietanolamina.....	39
3.11 Procedimento de fortificação e extração das amostras.....	39
3.11.1 Para os métodos cromatográficos.....	40
3.11.2 Para o método espectrofotométrico.....	41
3.12 Limpeza do material utilizado.....	43
3.13 Avaliação da separação cromatográfica.....	44
3.14 Condições cromatográficas.....	44
3.14.1 Sistema GC-ECD.....	44
3.14.2 Sistema GC-FPD (modo enxofre).....	44
3.14.3 Sistema GC-MS.....	45
3.14.4 Sistema de injeção.....	45
3.15 Validação dos métodos cromatográficos (GC-ECD, GC-FPD, GC- MS).....	46
3.15.1 Curva analítica e linearidade.....	46
3.15.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
3.15.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	47
3.15.4 Recuperação.....	47
3.16 Condições espectrofotométricas.....	48
3.17 Validação do método espectrofotométrico.....	48

3.17.1 Curva analítica e linearidade.....	48
3.17.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	49
3.17.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	49
3.17.4 Recuperação.....	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
4.1 Avaliação da separação cromatográfica.....	50
4.2 Análise dos solventes e reagentes.....	50
4.3 Avaliação das amostras para uso como amostra branco.....	51
4.4 Avaliação da estabilidade de mancozebe em solução.....	54
4.5 Avaliação da estabilidade do complexo formado entre CS <sub>2</sub> , cobre e dietanolamina.....	55
4.6 Comparação entre os procedimentos de extração dos métodos 1 e 2.....	57
4.7 Procedimento de extração e fortificação da amostra.....	57
4.8 Validação dos métodos cromatográficos.....	58
4.8.1 Curva analítica e linearidade.....	58
4.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	59
4.8.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	60
4.8.4 Recuperação.....	61
4.9 Validação do método espectrofotométrico.....	62
4.9.1 Curva analítica e linearidade.....	62
4.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	63
4.9.3 Repetitividade e precisão intermediária.....	64
4.9.4 Recuperação.....	64
4.10 Comparação entre os métodos cromatográficos e espectrofotométrico.....	65
4.10.1 Curva analítica e linearidade.....	65
4.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....	67
4.10.3 Repetitividade.....	67
4.10.4 Recuperação.....	68

5 CONCLUSÕES.....	70
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8 APÊNDICES.....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição nutricional média em 100 g de alface.....	5
<b>Tabela 2.</b>	Ditiocarbamatos registrados no Brasil para algumas culturas, sub-grupos aos quais pertencem e estruturas químicas.....	12
<b>Tabela 3.</b>	Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os ditiocarbamatos autorizados no Brasil.....	15
<b>Tabela 4.</b>	Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pelas legislações para resíduos de ditiocarbamatos em alface.....	16
<b>Tabela 5.</b>	Fungicidas e produto de degradação utilizados nesse estudo com respectivos fornecedores e grau de pureza.....	33
<b>Tabela 6.</b>	Concentração das soluções de CS <sub>2</sub> da curva analítica e volumes medidos da solução de trabalho, para preparar 10 mL de solução em isoctano.....	35
<b>Tabela 7.</b>	Concentração das soluções de CS <sub>2</sub> da curva analítica e volumes medidos da solução 2C utilizados para preparar 25 mL de solução em álcool etílico e solução complexante.....	36
<b>Tabela 8.</b>	Volume adicionado de solução estoque de tiram, nos 3 níveis de fortificação do Método 2.....	43
<b>Tabela 9.</b>	Concentração média de CS <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> ), percentuais de recuperação e RSD% obtidos para a mesma solução analisada por GC-ECD e GC-FPD, nos diferentes dias do estudo. Preparo da amostra e condições cromatográficas descritas nos itens 3.11.1, 3.14.1 e 3.14.2, respectivamente.....	54
<b>Tabela 10.</b>	Valores das médias das absorvâncias para as diferentes concentrações das soluções analíticas em relação ao tempo após a formação do complexo, conforme item 3.10.....	56
<b>Tabela 11.</b>	Percentuais médios de recuperação para folhas de alface picadas ou homogeneizadas, no nível de fortificação de 0,4 mg CS <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> , para cada um dos sistemas empregados, conforme o item 3.11 e condições nos itens 3.14 e 3.16.....	58

<b>Tabela 12.</b> Parâmetros das curvas analíticas obtidas na faixa de 0,08 a 2,0 mg CS <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> , nas condições cromatográficas do item 3.14.....	59
<b>Tabela 13.</b> Resultados de LOD e LOQ, instrumental e do método, obtidos para o CS <sub>2</sub> , nos três sistemas cromatográficos, conforme condições descritas no item 3.14.....	59
<b>Tabela 14.</b> Resultados de precisão, em termos de repetitividade (RSD <sub>ri</sub> ) e de precisão intermediária do instrumento (RSD <sub>p<sub>ii</sub></sub> ), baseado nas áreas obtidas para três níveis de concentração. Condições conforme item 3.14.....	61
<b>Tabela 15.</b> Valores de recuperação e RSD%, em 2 níveis de fortificação, para os sistemas GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, conforme condições descritas no item 3.14.....	62
<b>Tabela 16.</b> Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o CS <sub>2</sub> conforme concentrações descritas na Tabela 7.....	63
<b>Tabela 17.</b> Resultados de LOD e LOQ, instrumental e do método, obtidos conforme condições descritas no item 3.16.....	63
<b>Tabela 18.</b> Resultados de precisão, em termos de repetitividade (RSD <sub>ri</sub> ) e de precisão intermediária do instrumento (RSD <sub>p<sub>ii</sub></sub> ), baseado nas absorbâncias obtidas para solução analítica. Condições conforme item 3.16.....	64
<b>Tabela 19.</b> Valores de recuperação e RSD <sub>rm</sub> %, em 3 níveis de fortificação, por Espectrofotometria UV-visível, conforme condições descritas no item 3.16.....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Classificação toxicológica presente nos rótulos dos frascos de pesticidas.....	9
<b>Figura 2.</b>	Quebra da molécula de tiram, em meio ácido, formando amina e CS <sub>2</sub> .....	18
<b>Figura 3.</b>	Diagrama demonstrando o ruído da linha base, e o sinal para LOD e LOQ para os métodos cromatográficos.....	26
<b>Figura 4.</b>	Complexo formado ente CS <sub>2</sub> , cobre e dietanolamina.....	39
<b>Figura 5.</b>	Banho termostatizado com agitação empregado no procedimento de extração do Método 1.....	41
<b>Figura 6.</b>	Sistema utilizado para o procedimento de extração do Método 2....	42
<b>Figura 7.</b>	Cromatograma obtido por GC-ECD na análise do branco dos solventes e reagentes. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.....	51
<b>Figura 8.</b>	Cromatograma obtido por GC-ECD na análise da amostra branco. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.1.....	52
<b>Figura 9.</b>	Cromatogramas obtido por GC-FPD na análise da amostra branco. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.2.....	52
<b>Figura 10.</b>	Espectro de massas obtido por GC-MS para solução analítica de CS <sub>2</sub> 4 mg L <sup>-1</sup> . Condições cromatográficas descritas no item 3.14.3.....	53
<b>Figura 11.</b>	Espectro de massas obtido por GC-MS na análise da amostra branco. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.3.....	53
<b>Figura 12.</b>	Concentração média encontrada (n= 6) em cada dia do estudo da estabilidade da solução de mancozebe. Condições cromatográficas nos itens 3.13.1 e 3.13.2.....	55
<b>Figura 13.</b>	Dispersão de todos os valores de absorbâncias encontrados, para os 5 níveis de concentração, nos diferentes tempos após a formação do complexo.....	56



- Figura 14.** Curva analítica obtida por Espectrofotometria UV-vísivel para soluções analíticas na faixa de concentração de 0,44 a 2,23 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Condições do item 3.16..... 66
- Figura 15.** Curva analítica obtida por GC-ECD, GC-FPD e GC-MS para soluções analíticas na faixa de concentração de 0,08 a 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Condições do item 3.14..... 66
- Figura 16.** Cromatograma obtido por GC-FPD nas análises das soluções analíticas de CS<sub>2</sub>, correspondentes ao LOD (A) e ao LOQ (B) do instrumento, e para o nível de concentração 0,1 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (C). Condições cromatográficas descritas no item 3.14.2..... 67
- Figura 17.** Cromatograma obtido por GC-FPD para as amostras fortificadas nos níveis de concentração 0,05 (A) e 0,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> (B). Condições cromatográficas descritas no item 3.14.2..... 68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Sigma$  – somatório

a – Coeficiente angular

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês *Atomic Absorption*

aC - Antes de Cristo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b – Coeficiente linear

C<sub>1</sub> – Concentração determinada na amostra fortificada

C<sub>2</sub> – Concentração determinada na amostra não fortificada

C<sub>3</sub> – Concentração usada para a fortificação

CAS – do inglês *Chemical Abstracts Service*

CCPR – do inglês *Codex Alimentarius Committee on Pesticide Residues*

CE – Eletroforese Capilar, do inglês *Capillary Electrophoresis*

CS<sub>2</sub> – Dissulfeto de carbono

d.i. – Diâmetro interno da coluna cromatográfica

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diodo Array Detection*

EBDC – Etilenobisditiocarbamato

ECD – Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detection*

EDA – Etilenodiamina

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EI – do inglês *Electron Impact*

ELISA – do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA – do inglês *Environmental Protection Agency*

ETU – Etilenotiouréia

EU – Etilenouréia

EUA – Estados Unidos da América

FAO – do inglês *Food and Agriculture Organization*

FIA – Análise por Injeção em Fluxo, do inglês *Flow Injection Analysis*

FPD – Detecção Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detection Spectrometry*

GARP – Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas  
GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*  
GC-ECD – Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons  
GC-FPD – Cromatografia Gasosa com Detecção Fotométrica de Chama  
GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance*  
IDA – Ingestão Diária Aceitável  
ITD – Detector por Trapeamento de Íons, do inglês *Ion Trap Detector*  
JMPR – do inglês *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*  
LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*  
LMR – Limite Máximo de Resíduos  
LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*  
LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*  
MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*  
p.a. – Princípio ativo  
Q – Concentração  
 $r^2$  – Coeficiente de determinação  
RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*  
 $RSD_{pi}$  – Desvio padrão relativo para precisão intermediária  
 $RSD_{pii}$  – Desvio padrão relativo para precisão intermediária do instrumento  
 $RSD_r$  – Desvio padrão relativo para repetitividade  
 $RSD_{ri}$  – Desvio padrão relativo para repetitividade do instrumento  
 $RSD_{rm}$  – Desvio padrão relativo para repetitividade do método  
s – Estimativa do desvio padrão absoluto  
S – Sinal  
SD – Desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*  
 $t_R$  – Tempo de retenção de um analito  
UI – Unidades internacionais  
u.r. – Unidade de resposta  
UV – Ultravioleta  
WHO – do inglês *World Health Organization*  
x – Concentração do composto em estudo  
y – Resposta do detector (área do pico ou valor de absorvância)

**LISTA DE APÊNDICES**

APÊNDICE 1 .....	82
APÊNDICE 2 .....	87
APÊNDICE 3 .....	88
APÊNDICE 4 .....	89
APÊNDICE 5 .....	91
APÊNDICE 6 .....	94

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, EMPREGANDO GC-ECD, GC-FPD E GC-MS, E ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM ALFACE**

Autora: Rosselei Caiél da Silva  
Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella  
Santa Maria, 03 de agosto de 2005

O Brasil é o terceiro maior mercado mundial de pesticidas, com aproximadamente 400 ingredientes ativos registrados no país, incluindo cinco ditiocarbamatos. Esta classe de pesticidas é composta por importantes fungicidas de ação não sistêmica e de amplo espectro de atividade empregados para controle de fungos em uma grande variedade de culturas. Devido a baixa toxicidade, combinado com forte atividade, baixo custo de produção e baixa persistência ambiental, a quantidade destes compostos tem aumentado no mundo inteiro.

Muitos métodos para determinar ditiocarbamatos estão baseados na hidrólise ácida, em presença de cloreto de estanho II, e análise do CS<sub>2</sub> gerado por diferentes técnicas.

Neste trabalho, foram validados três métodos cromatográficos para a quantificação dos resíduos de ditiocarbamatos em alface empregando Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD), Detecção Fotométrica de Chama (GC-FPD) e Detecção Espectrométrica de Massas (GC-MS), e comparou-se com o método espectrofotométrico.

As condições para as análises cromatográficas foram: coluna capilar CP-Sil 8 CB (50 m x 0,32 d.i x 1,2 µm de espessura do filme); programa de temperatura do forno da coluna: 45 °C (1 min) com incremento de 10 °C min<sup>-1</sup> à 250 °C (0 min); vazão do gás de arraste em 2 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 4 µL com *split*

1:10 para GC-ECD e GC-MS, e 1:15 para GC-FPD; temperatura do ECD foi 300 °C e do FPD de 250 °C. O *transferline* e o *trap* foram aquecidos a 230 °C, e o *manifold* a 120 °C. A análise espectrofotométrica foi realizada a 435 nm, após a complexação do CS<sub>2</sub> com dietanolamina e cobre.

Para a validação dos métodos seguiram-se os seguintes parâmetros: limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e recuperação. Os LODs na amostra foram 0,01 e 0,28 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, e os LOQs foram 0,02 e 0,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> para os métodos cromatográficos e espectrofotométrico, respectivamente. As curvas analíticas apresentaram  $r^2 > 0,99$ . Os estudos de precisão apresentaram resultados aceitáveis, com valores de RSD% entre 2,8 e 15,9. As recuperações foram de 87,7 a 107,4%.

Através dos resultados obtidos na validação, pode-se concluir que os métodos são apropriados para determinar resíduos de ditiocarbamatos em alface. Entretanto, os métodos cromatográficos têm apresentado várias vantagens como elevada sensibilidade, simplicidade, além de serem mais rápidos que o método espectrofotométrico, pois é possível realizar o preparo de um grande número de amostras simultaneamente.

## ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **COMPARISON BETWEEN CHROMATOGRAPHIC, USING GC-ECD, GC-FPD AND GC-MS, AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS TO DETERMINATE DITHIOCARBAMATES IN LETTUCE**

Author: Rosselei Caiél da Silva

Adviser: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, August 3<sup>rd</sup>, 2005

Brazil is the third largest market for pesticide sales in the world, with almost 400 active ingredients registered in the country, including five dithiocarbamates. This pesticide class consists of very important protective nonsystemic fungicides with broad-spectrum activity registered for the control of fungal diseases on a large variety of crops. Due to its low acute toxicity, combined with strong action, low-cost production and low environmental persistence, the total amount used of these compounds used is still increasing world-wide.

Many methods to determine dithiocarbamates are based on acid hydrolysis in the presence of stannous chloride and analysis of the evolved CS<sub>2</sub> by different techniques.

In the present work, three chromatographic methods were validated for the quantification of dithiocarbamates residues in lettuce using Gas Chromatography with Electron Capture Detection (GC-ECD), Flame Photometric Detection (GC-FPD) and Mass Spectrometry (GC-MS), and these three methods were compared with a spectrophotometric method.

The experimental conditions for the chromatographic analysis were: capillary column CP-Sil 8 CB (50 m x 0.32 mm i.d. x 1.2 µm film thickness); temperature program column oven: 45 °C (1 min) - 10 °C min<sup>-1</sup> to 250 °C (0 min);

flow-rate of the carrier gas (Helium)  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ; volume of injection  $4 \text{ }\mu\text{L}$ , with split 1:10 for GC-ECD and GC-MS and 1:15 for GC-FPD; temperature of the detector was  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  for ECD and  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  for FPD. The transferline and trap were heated to  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  and the manifold to  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . The spectrophotometric analysis was done in  $435 \text{ nm}$ , after complexation of the  $\text{CS}_2$  with diethanolamine and copper.

In the validation study of the methods, the following parameters were assessed: detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), precision (under repeatability and reproducibility conditions) and recovery. Method LODs in the sample were  $0.01 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  and  $0.28 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  and LOQs were  $0.02 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  and  $0.4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  for chromatographic and spectrophotometric methods respectively. The calibration curves were linear with correlation coefficients  $r^2 > 0.99$ . Acceptable precision with RDS% between 2.8 and 15.9 was obtained. The recoveries ranged from 87.7 to 107.4%.

The results obtained in the validation step allow us to conclude that the methods are quite appropriate to determine residues of dithiocarbamates in lettuce. However, the chromatographic methods have shown a lot of advantages such as to be more sensitive, simple and faster than the spectrophotometric method. Beside, the sample preparation can be done simultaneously for a great number of samples and in a simplified way.



## **1 INTRODUÇÃO**

O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos é uma das grandes preocupações atuais. Visando assegurar maior produtividade, uma quantidade considerável de pesticidas têm sido empregada em alguma etapa da produção agrícola, quer seja no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo ou após a colheita (SANCHES *et al.*, 2003).

O termo pesticida abrange qualquer substância que sirva para prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar pragas, incluindo espécies não desejadas de plantas ou animais durante a produção, estocagem, transporte, distribuição e processamento de alimentos, produtos agrícolas ou ração animal, ou produtos administrados a animais para o controle de ectoparasitas (BLUME & REICHERT, 2002).

O Brasil, com uma extensão territorial de 8,5 milhões de km<sup>2</sup>, tem um grande potencial para a agricultura, e está entre os países que mais utilizam pesticidas, com crescimento em torno de 44% em apenas 10 anos (STERTZ & FREITAS, 2003). No entanto, o emprego excessivo destes compostos pode gerar resíduos os quais são definidos como qualquer substância presente nos alimentos ou ração animal resultante do uso de algum pesticida. Essa definição inclui qualquer produto de conversão, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas de relevância toxicológica (BLUME & REICHERT, 2002).

A ingestão de resíduos de pesticidas através da cadeia alimentar pode tornar-se problema de saúde pública, e tem sido motivo de estudos e discussões por parte de órgãos governamentais. Devido a sua toxicidade, os pesticidas são responsáveis, mundialmente, por mais de 20.000 mortes não intencionais por ano. Além disso, tem dificultado a exportação de muitos produtos vegetais produzidos no Brasil, principalmente as frutas, pois muitos destes produtos apresentam resíduos de determinados pesticidas acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) aceitos pela comunidade internacional (LARA & BATISTA,

1992). Assim, a determinação de resíduos de pesticidas, em diversas matrizes, torna-se de fundamental importância, pois indica se o teor de resíduos está dentro dos LMRs estabelecidos pelas legislações.

De acordo com a atividade, os pesticidas podem ser classificados em herbicidas, inseticidas e fungicidas, dentre outros (ARAÚJO, 2001).

Os ditiocarbamatos são compostos organosulfurados empregados como fungicidas e agem de maneira efetiva contra um largo espectro de doenças causadas por fungos, em grande parte das culturas agrícolas, abrangendo desde frutas e hortaliças até cereais de grande importância econômica (BLASCO *et al.*, 2004). Os principais produtos da hidrólise e fotólise dos ditiocarbamatos são os metabólitos etilenotioréia (ETU), etilenouréia (EU) e dissulfeto de carbono (CS<sub>2</sub>) (GARCINUÑO *et al.*, 2004 a).

Nos últimos anos, os ditiocarbamatos têm recebido especial atenção devido aos efeitos adversos à saúde do homem, especialmente em relação a ETU, a qual tem apresentado efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. A ETU pode ser gerada durante o cozimento de frutas e vegetais que contêm resíduos desses fungicidas (STERTZ & FREITAS, 2003).

Os métodos utilizados para a determinação de ditiocarbamatos são bastante diferentes da maioria dos métodos de análises de resíduos de pesticidas. A elevada instabilidade na presença de umidade e oxigênio torna estes compostos difíceis de serem analisados (STERTZ & FREITAS, 2003). A maioria dos métodos de análises estão baseados na quantificação do CS<sub>2</sub>, por Espectrofotometria de Absorção Molecular ou por Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), após digestão ácida das amostras (GARCINUÑO *et al.*, 2004 a).

Neste trabalho, objetivou-se validar três métodos cromatográficos, empregando diferentes sistemas de detecção: Detecção por Captura de Elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detection*), Detecção Fotométrica de Chama (FPD, do inglês *Flame Photometric Detection*) e Detecção Espectrométrica de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), a fim de comparar o desempenho entre cada um deles com o método espectrofotométrico, que é um método amplamente utilizado para a análise de ditiocarbamatos no Brasil.

A alface foi a matriz escolhida para este estudo por se tratar da hortaliça consumida crua mais popular no Brasil. Segundo a Agência de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2003) não é mais permitido no país o uso de ditiocarbamatos para esta cultura, mas por ser comumente cultivada em conjunto com outros vegetais, como repolho e tomate, para os quais o emprego de alguns ditiocarbamatos é autorizado, pode ocorrer à presença de resíduos de ditiocarbamatos em alface (PENA *et al.*, 2003), uma vez que os pesticidas, ao serem aplicados em uma lavoura, podem ser levados pelo vento (processo denominado deriva) e alcançar mais de mil metros de distância do local da aplicação, contaminando outras áreas onde não houve a aplicação direta do produto (EMBRAPA, 2005).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Alface**

A alface (*Lactuca sativa*) é uma hortaliça folhosa, com caule diminuto, ao qual se prendem folhas, lisas ou crespas, fechando ou não a cabeça conforme a variedade, resistente a baixas temperaturas e geadas leves (PILAU, 2002; LOPES, 2002).

Era conhecida e consumida pelos Persas desde 1.500 a.C. e chegou ao Brasil no século XVI trazida pelos portugueses. Hoje, de consumo cosmopolita e mundialmente cultivada, é utilizada das mais variadas formas, principalmente em saladas e em lanches rápidos (PILAU, 2002).

#### **2.1.1 Valor nutricional e uso medicinal**

A alface apresenta sabor agradável e refrescante sendo considerada de grande importância nutricional devido a sua presença regular na dieta, principalmente dos consumidores das regiões sudeste e sul do Brasil (BLISKA, 1998). Além de constituir uma excelente fonte de vitamina A (MEDEIROS, 1999) também apresenta a vantagem de ser de baixo valor energético (apenas 16 kCal em cada 100 g), razão pela qual é freqüentemente indicada na dieta alimentar de convalescentes e idosos na forma de salada (PILAU, 2002).

Na Tabela 1 tem-se a composição nutricional média para 100 g de folhas de alface (MEDEIROS, 1999).

**Tabela 1.** Composição nutricional média em 100 g de alface.

Nutriente	Quantidade
Glicídios	2,3 g
Proteínas	1,2 g
Lipídios	0,2 g
Cálcio	38 mg
Fósforo	42 mg
Ferro	1,1 mg
Vitamina A	4250 UI
Tiamina (B <sub>1</sub> )	110 µg
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	60 µg
Niacina (B <sub>5</sub> )	0,23 mg
Vitamina C	7,6 mg

Não somente as folhas, mas também o talo floral é utilizado como alimento em alguns países, como por exemplo, o Egito e a China. Existem relatos de que antes da folha da alface ser utilizada como alimento, os egípcios extraíam óleo das sementes, o qual é rico em ácidos oléico e linoléico (LOPES, 2002).

A alface é altamente medicinal apresentando propriedades laxante, diurética, depurativa e calmante, entre outras. O talo da alface contém a lactucina, que possui propriedades hipnóticas e soníferas, podendo assim a alface ser considerada um sedativo natural do sistema nervoso central (PLANTAS MEDICINAIS, 2005).

### 2.1.2 Produção e consumo

As espécies do gênero *Lactuca* são cultivadas na maioria das zonas temperadas e subtropicais do mundo. O período do ano em que é produzida em cada região depende da temperatura, sendo mais facilmente cultivada em

estações relativamente frias a temperaturas moderadas (LOPES, 2002; SANTOS, 2000).

No Brasil a alface é a 4ª hortaliça em importância tanto pela área cultivada quanto pelo valor das produções, ficando atrás apenas da batata, tomate e cebola (AMANTE *et al.*, 2003). Os Estados Unidos são o maior produtor comercial de alface do mundo. No ano de 1997, 113 mil hectares foram cultivados, principalmente na Califórnia e Arizona, produzindo 3,9 milhões de toneladas e gerando uma renda em torno de 1,6 bilhões de dólares (LOPES, 2002). A produção brasileira no ano de 1996 era relativamente baixa (312 mil toneladas) em comparação com outros países como Espanha, Itália, França, Holanda, Alemanha e Israel (LOPES, 2002).

Em virtude de sua alta perecibilidade e baixa resistência ao transporte, a alface é cultivada próxima aos grandes centros consumidores. O estado de São Paulo é o maior produtor nacional (MARQUES *et al.*, 2003) e a Holanda é o único país em que a produção se concentra principalmente em estufas (LOPES, 2002).

No Brasil, o consumo de alface tem crescido não só pelo aumento da população, mas pela tendência de mudança do hábito alimentar do brasileiro, incluindo hortaliças com maior frequência na alimentação. Em 2002, a alface ocupava o primeiro lugar em relação às hortaliças folhosas mais consumidas (LOPES, 2002), com consumo médio *per capita* brasileiro de 1,2 kg por ano, considerado baixo pela Organização Mundial da Saúde (AMANTE *et al.*, 2003).

## 2.2 Pesticidas

O controle de pragas pelo emprego de compostos químicos teve início em 1867, quando o acetoarsenito de cobre, conhecido pelo nome de Verde Paris, foi preparado comercialmente e indicado no controle de uma grande variedade de pragas. Depois surgiu o arseniato de chumbo ( $PbHAsO_4$ ) utilizado como inseticida a partir de 1894, o dinitro-o-cresol em 1925, e o sulfato de tálio em 1930 (LARINI, 1999).

Em 1942, W. H. Tisdale e A. L. Flener estudaram a ação dos derivados do ácido ditilcarbâmico com atividade fungicida. Como consequência, foi lançado no

mercado o Dithane (nome comercial do princípio ativo mancozebe), precursor de outros compostos similares com atividade fungicida (LARINI, 1999).

A maioria dos ditiocarbamatos, entre eles tiram, mancozebe, manebe, ferbam, ziram e zinebe, foram desenvolvidos no início da década de 1930 e 1940, e até os dias atuais são largamente empregados tanto sozinhos quanto combinados com outros fungicidas nas formulações (WARE, 1994).

Os pesticidas começaram a serem largamente utilizados após a segunda Guerra Mundial. Muitos pesticidas 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 (AMBIENTE BRASIL, 2005).

Os países que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica - na África, na Ásia e na América Latina - sofreram fortes pressões de organismos financiadores internacionais para adquirir esses produtos. A promessa era de que os pesticidas garantiriam a produção de alimentos para combater a fome. Com o inofensivo nome de *defensivos agrícolas*, eles eram incluídos compulsoriamente, junto com adubos e fertilizantes químicos, nos financiamentos agrícolas (AMBIENTE BRASIL, 2005).

Na agricultura nacional a utilização de pesticidas teve um aumento considerável, especialmente na década de 1990, resultando no crescimento das vendas brasileiras de pesticidas de US\$ 830 milhões em 1986 para US\$ 1790 milhões em 1996 (LARINI, 1999).

O Brasil é o terceiro maior mercado comprador de pesticidas do mundo, e no âmbito da América Latina, o Brasil desponta como o país que mais utiliza pesticidas, com um consumo estimado em 50% do total comercializado nessa região (SILVA *et al.*, 2001). Atualmente, há aproximadamente 400 ingredientes ativos registrados no país, incluindo cinco fungicidas ditiocarbamatos (CALDAS *et al.*, 2004), cerca de 4.000 produtos comerciais e formulações de pesticidas estão no mercado e a sua utilização continua em crescimento, em função do aumento da área cultivada (SANTOS *et al.*, 2001).

A estimativa mais recente é que 1360,8 toneladas de manebe e 3764,8 toneladas de mancozebe são aplicadas anualmente nos EUA (ZHOU *et al.*, 2004).

### 2.2.1 Contaminação por pesticidas

Atualmente, muita atenção tem sido dada aos efeitos adversos dos pesticidas à saúde do homem e ao meio ambiente, pois durante a fase de produção dos alimentos, diversos produtos químicos são utilizados para garantir maior rendimento na colheita.

O emprego de pesticidas ainda é a principal estratégia no campo para o combate e a prevenção de pragas agrícolas, a fim de garantir alimento suficiente e de qualidade para a população. No entanto, a elevada utilização de pesticidas sem os cuidados necessários, tem contribuído tanto para a degradação ambiental quanto para problemas na saúde dos trabalhadores rurais. Em geral, essas conseqüências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos e a falta de utilização de equipamentos apropriados (SILVA *et al.*, 2001).

A contaminação do homem por pesticidas pode ocorrer de duas maneiras: direta ou indireta. A primeira é conseqüência da exposição ocupacional que se dá principalmente entre os trabalhadores das indústrias fabricantes de pesticidas e os agricultores. Por exemplo, o simples fato de proteger as mãos (5,6% da superfície corpórea), durante a aplicação de pesticidas reduz a exposição de 30 a 80%.

A forma indireta resulta da exposição da população aos pesticidas devido a acidentes, contaminação do ambiente, quer seja por resíduos industriais ou por aplicação dessas substâncias, ou ainda em conseqüência do consumo de alimentos contaminados por resíduos dessas substâncias (ARAÚJO, 2001).

Em relação à classificação toxicológica dessas substâncias, os rótulos dos produtos comercializados no Brasil devem obrigatoriamente apresentar uma faixa que, de acordo com a cor, indica a classe toxicológica de cada pesticida (ARAÚJO, 2001), conforme demonstrado na Figura 1 (AMBIENTE BRASIL, 2005).



<b>Classe I</b>	<b>Faixa Vermelha – extremamente tóxico</b>
<b>Classe II</b>	<b>Faixa Amarela – altamente tóxico</b>
<b>Classe III</b>	<b>Faixa Azul – mediamente tóxico</b>
<b>Classe IV</b>	<b>Faixa Verde – pouco tóxico</b>

**Figura 1.** Classificação toxicológica presente nos rótulos dos frascos de pesticidas.

Esses compostos são potencialmente tóxicos ao homem, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou ser cancerígeno, entre outros (CALDAS & SOUZA, 2000).

## **2.3 Ditiocarbamatos**

### **2.3.1 Considerações gerais**

Existem em torno de 100.000 espécies de fungos que são responsáveis por aproximadamente 75% do total de doenças infecciosas em plantas e vegetais. Todas as culturas estão sujeitas a uma ou mais doenças causadas por fungos, as quais são as mais difíceis de serem controladas. Atualmente, mais de 250 fungicidas de todas as classes são utilizados em vários estágios do desenvolvimento vegetal para prevenir ou tratar essas doenças (WARE, 1994).

Os ditiocarbamatos são complexos poliméricos formados com íons de metal pesado, como por exemplo zinco, manganês e ferro (WHO, 1988).

A sua principal utilização é na agricultura como inseticida, herbicida e como fungicida de ação não sistêmica. São empregados de maneira efetiva contra um amplo espectro de fungos e bactérias patogênicas, em grande variedade de frutas, hortaliças e cereais (CALDAS *et al.*, 2001; VRYZAS *et al.*, 2002).

O primeiro trabalho descrevendo as propriedades dos ditiocarbamatos como fungicida foi descrito em 1934 por Martin, na Inglaterra (THORN & LUDWIG, 1962). Devido a baixa toxicidade, combinado com forte atividade, baixo custo e curta persistência ambiental, a utilização dos ditiocarbamatos tem crescido no mundo todo, no entanto, os resíduos destes compostos são freqüentemente encontrados em vários produtos agrícolas comercializados internacionalmente (VRYZAS *et al.*, 2002). Além disso, também são empregados no tratamento de madeira, armazenamento de grãos e sementes, e ainda na eliminação e controle de vetores, como por exemplo, o mosquito transmissor da dengue (AMBIENTE BRASIL, 2005).

Os ditiocarbamatos são a principal classe de fungicidas empregada mundialmente no controle de aproximadamente 400 patógenos e tem seu emprego permitido para mais 70 culturas, sendo registrados no Brasil (CALDAS *et al.*, 2004), nos EUA (ZHOU *et al.*, 2004), em todos os países membros da União Européia (BLASCO *et al.*, 2004) e em muitos outros países.

A maior utilização dessas substâncias ocorre especialmente nos sistemas de monocultura, em grande extensão (AMBIENTE BRASIL, 2005).

Este grupo apresenta outras aplicações além das agroquímicas. Devido as suas propriedades quelantes, os ditiocarbamatos são empregados como seqüestrantes em tratamento de efluentes (ARAÚJO, 2001) e por apresentarem uma alta atividade anti-viológica podem ainda ser empregados na medicina. O tiram, incorporado a sabonetes e loções, tem sido utilizado desde 1942 no tratamento de algumas dermatites tanto para uso humano quanto veterinário. Outra interessante aplicação dos ditiocarbamatos, principalmente do disulfiram, é o emprego no tratamento do alcoolismo crônico (WHO, 1988).

Para que um composto possa pertencer ao grupo dos ditiocarbamatos, é necessário apresentar as seguintes características: a) ser capaz de liberar CS<sub>2</sub>, b) biotransformar-se em ETU e, c) habilidade de complexar íons (EPA, 2001).

O principal subgrupo dos ditiocarbamatos são os etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), os quais podem formar quelatos poliméricos e são insolúveis tanto em água quanto em solventes orgânicos (WHO, 1988). O subgrupo dos EBDCs é notado pela alta instabilidade no meio ambiente e são, geralmente, instáveis na presença de umidade, oxigênio e nos sistemas biológicos (GARCINUÑO *et al.*,

2004 a). O manebe e o mancozebe são alguns dos EBDCs largamente utilizados na agricultura apresentando manganês como principal componente ativo (WHO, 1988).

O tiram seguido do zinebe são os ditiocarbamatos mais utilizados na cultura da alface na Holanda (VUIK *et al.*, 1992). No Brasil os ditiocarbamatos não são mais autorizados para esta cultura (BRASIL, 2003), no entanto, a alface é comumente cultivada em conjunto com outras culturas como couve, repolho e tomate (PENA *et al.*, 2003) podendo assim apresentar resíduos de ditiocarbamatos.

Cabe salientar que as hortaliças folhosas são os produtos mais críticos no que se refere a resíduos de pesticidas, devido a sua morfologia que apresenta uma elevada relação superfície/peso. De acordo com o comitê de resíduos de pesticidas da Grã-Bretanha, a pulverização com pesticidas em alface geralmente ocorre em maior número quando comparado com as demais hortaliças (DGPC, 2005).

As estruturas químicas dos ditiocarbamatos registrados no Brasil e os sub-grupos aos quais pertencem estão apresentados na Tabela 2 (CALDAS *et al.*, 2004). As demais propriedades físico-químicas dos ditiocarbamatos permitidos no Brasil para diversas culturas encontram-se no Apêndice 1.

**Tabela 2.** Ditiocarbamatos registrados no Brasil para algumas culturas, sub-grupos aos quais pertencem e estruturas químicas.

Ditiocarbamatos	Sub-grupos	Fórmula Estrutural
Mancozebe	Etilenobis-ditiocarbamato	
Manebe	Etilenobis-ditiocarbamato	
Metiram	Etilenobis-ditiocarbamato	
Propinebe	Propileno bis-ditiocarbamato	
Tiram	Dimetil-ditiocarbamato	

### **2.3.2 Toxicidade**

As intoxicações por ditiocarbamatos freqüentemente 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).

Apesar de apresentarem baixa toxicidade aguda, o uso e manuseio dessa classe de fungicidas merece cuidados especiais em virtude da possível presença de metabólitos extremamente injuriosos nas formulações comerciais.

Segundo estudo da Agência de Proteção Ambiental americana (EPA – EUA), animais de laboratório tratados com ditiocarbamatos apresentaram neuropatologias, tireoidismo e distúrbios no sistema nervoso central. Esses estudos sugerem que esses efeitos podem estar associados à formação de um metabólito em comum: o CS<sub>2</sub>, pois é bem conhecido que este induz neuropatologias (EPA, 2001). O CS<sub>2</sub> pode causar ainda decréscimo no nível de testosterona sérica, mudanças degenerativas no tecido testicular, afetar a espermatogênese e provocar alterações epidídimas (KSHEERASAGAR & KALIWAL, 2003).

Em testes realizados em animais de laboratório, foi observado que os ditiocarbamatos provocam ataxia e hiperatividade, seguida de debilidade com perda do tono muscular; os efeitos sobre o sistema nervoso central incluem mudanças do comportamento e convulsões (LARINI, 1999).

Os EBDCs são agentes carcinogênicos que agem diretamente na tireóide. Estudos apontam o manebe e o mancozebe como agentes que podem causar hidrocefalia e parkinsonismo devido à ação do manganês no sistema nervoso central (EPA, 2001).

No homem, a exposição prolongada ao manebe provoca um quadro de insuficiência renal aguda, caracterizado pelos níveis elevados de creatinina, uréia e ácido úrico (LARINI, 1999); pode ainda diminuir a atividade locomotora e desencadear uma disfunção mitocondrial. Quando combinado com o herbicida paraquate tem demonstrado degeneração no sistema dopaminérgico (ZHOU *et al.*, 2004).

Estudos sobre as intoxicações em longo prazo em ratos demonstraram que o manebe reprime a maturidade e o crescimento dos espermatozóides e apresenta uma atividade embriotóxica mais efetiva que o zinebe ou outros compostos dimetilditiocarbamatos (LARINI, 1999).

Alguns estudos têm demonstrado a toxicidade e efeitos teratogênicos em animais expostos ao tiram e também efeitos neurotóxicos, disfunção renal, hepática e no sistema reprodutor têm sido observados (CERESER *et al.*, 2001).

O zinebe é considerado responsável pelo aparecimento de hiperplasia de tireóide em cães, de tumores pulmonares, sarcomas no retículo endotelial e anomalias congênitas em ratos e camundongos. Ainda, a exemplo do manebe, provoca leucopenia, danos hepáticos e nas gônadas (LARINI, 1999). Exposição ao zinebe pode causar também alteração no sistema cardiovascular (KESARI & GUPTA, 1998).

Entre os principais metabólitos dos EBDCs está a ETU, a qual é facilmente encontrada nos vegetais tratados com os EBDCs (LARINI, 1999) e armazenados em condições inadequadas, como na presença de oxigênio e umidade. Além de provocar hiperplasia da tireóide e alterações significativas nos níveis séricos dos hormônios tireoideanos, no homem e em animais de laboratório, a ETU apresenta efeitos teratogênicos, carcinogênicos, mutagênicos e imunotóxicos (GARCINUÑO *et al.*, 2004 b).

## **2.4 Limites Máximos de Resíduos (LMRs)**

LMR é definido pela legislação nacional (BRASIL, 2003) como a quantidade máxima de resíduos de pesticidas legalmente aceita nos alimentos, em decorrência da aplicação adequada de um produto numa fase específica da cultura, desde a sua produção até o seu consumo. No caso dos ditiocarbamatos o LMR é expresso em  $\text{mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ , isto se deve ao fato de que todos os compostos pertencentes à classe dos ditiocarbamatos formam  $\text{CS}_2$ .

O objetivo principal de estabelecer o LMR é garantir, com certa segurança, que a população ao consumir produtos cujos níveis de resíduos de pesticidas

estejam dentro dos limites estabelecidos não deverá, segundo os conhecimentos científicos atuais, ter nenhum problema de saúde associado a esta ingesta.

O órgão *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues* (JMPR), órgão assessor independente do *Codex Committee on Pesticide Residues* (CCPR), calcula o risco à saúde que as pessoas podem estar submetidas ao ingerir alimentos contaminados com resíduos de pesticidas dentro dos limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*. Uma das funções básicas do JMPR é avaliar os riscos para determinar a exposição crônica de cada pesticida examinado, avaliação esta baseada no valor da Ingestão Diária Aceitável (IDA) (GARP, 1999).

Os valores de IDA para os ditiocarbamatos autorizados no Brasil estão indicados na Tabela 3 (BRASIL, 2002).

**Tabela 3.** Ingestão Diária Aceitável (IDA) para os ditiocarbamatos autorizados no Brasil.

Ditiocarbamatos	IDA (mg kg <sup>-1</sup> p.c.*)
Mancozebe	0,03
Manebe	0,03
Metiram	0,03
Propinebe	0,005
Tiram	0,01

\* peso corpóreo

A importância dos LMRs estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* para o comércio internacional adquiriu dimensão maior em 1995, com o acordo sobre a aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias da Organização Mundial do Comércio. O acordo baseia-se nas normas, diretrizes e recomendações da Comissão do *Codex Alimentarius*. O Brasil apresenta, para certas culturas, alguns valores de LMR maiores e outros menores que os estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (GARP, 1999).

Na Tabela 4 têm-se os LMRs estabelecidos pelas legislações nacional e internacional para resíduos de ditiocarbamatos em alface.

**Tabela 4.** Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pelas legislações para resíduos de ditiocarbamatos em alface.

Legislações	LMR (mg CS <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )
ANVISA (Brasil)	n.c.*
<i>Codex Alimentarius</i>	10
União Européia	5
EUA	9,2**

n.c. – não consta

\* LMR até março de 2005: 6 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> (manebe)

\*\* Os ditiocarbamatos permitidos nos EUA são manebe e ziram

O emprego correto e eficaz de pesticidas na agricultura deve ser feito considerando os riscos toxicológicos envolvidos na aplicação, de modo que os resíduos sejam os menores possíveis e dentro dos LMRs aceitáveis. A observância do período de carência, que corresponde ao intervalo entre a última aplicação e a colheita, pode prevenir o aparecimento de resíduos de pesticida superiores aos LMRs.

Segundo CALDAS *et al.* (2004), os ditiocarbamatos são os fungicidas mais comumente encontrados em programas de monitoramento em muitos países.

No Brasil, foram monitorados, no período de 1998 a 2003, 520 amostras entre laranja, banana, morango, batata, tomate, feijão e arroz, adquiridas no comércio do Distrito Federal. Em mais de 60% das amostras analisadas foram encontrados resíduos de ditiocarbamatos e 6% do total analisado apresentaram resíduos acima dos parâmetros definidos pela ANVISA (CALDAS *et al.*, 2004).

Estudo semelhante foi realizado por PIZZUTTI *et al.* (2004), no período de 1999 a 2003, com amostras de maçã, uva, morango, mamão, banana, tomate e pepino. Foram analisadas 440 amostras adquiridas em supermercados e feiras-livres convencionais, e 102 amostras adquiridas em feiras-livres agroecológicas, na cidade de Santa Maria – RS. Das amostras de cultivo convencional, 65% apresentaram resíduos de ditiocarbamatos, mas somente as amostras de morango excederam o LMR nacional. Das amostras cultivadas organicamente



13,7% (mamão, tomate, maçã e banana) apresentaram resíduos de ditiocarbamatos.

## 2.5 Métodos analíticos para determinação de ditiocarbamatos

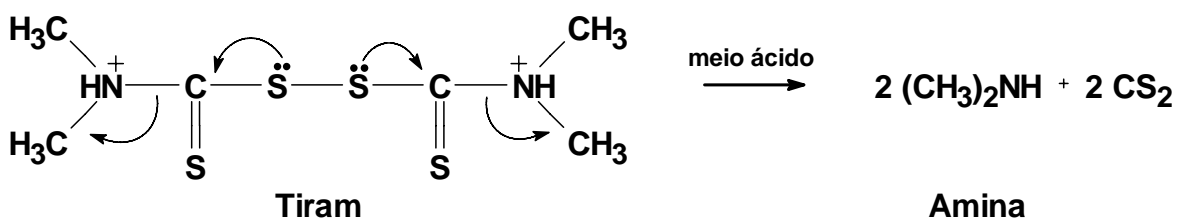
Nos anos de 1950, os métodos espectrofotométricos eram amplamente empregados na análise de resíduos de pesticidas que, associados a simples reações de formação de complexos, possibilitavam a detecção destes compostos. No entanto, ainda naquela década, os resíduos de pesticidas passaram a serem analisados por GC (ERICKSON, 1999).

Em um sistema cromatográfico em fase gasosa o detector é o principal responsável pela quantidade mínima de analito a ser detectada (LANÇAS, 1993). Assim, para a validação dos métodos cromatográficos desse trabalho foram empregados três detectores:

- ✓ ECD: detector seletivo e não destrutivo muito empregado na determinação de resíduos de pesticidas;
- ✓ FPD: detector destrutivo e de uso restrito pelo fato de ser altamente seletivo, pois detecta apenas compostos contendo fósforo e enxofre;
- ✓ MS: apresenta grande seletividade, sensibilidade e pode ainda fornecer informações estruturais a respeito dos compostos eluídos da coluna. Isto possibilita a identificação inequívoca nas análises por GC da grande maioria dos compostos de interesse.

Sabendo-se da utilização em larga escala dos ditiocarbamatos como fungicidas, em ampla variedade de culturas agrícolas, muitos métodos analíticos estão sendo desenvolvidos para permitir tais análises, em diferentes amostras, empregando a Espectrofotometria UV-visível, GC e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (VUIK *et al.*, 1992). Segundo COLDWELL *et al.* (2003) a HPLC permite a determinação de ditiocarbamatos, entretanto a GC apresenta melhor sensibilidade nas determinações destes resíduos. Assim, as determinações por absorção espectrofotométrica e por GC estão entre as técnicas predominantes.

Muitos desses métodos estão baseados na hidrólise ácida dos ditiocarbamatos empregando HCl na presença de SnCl<sub>2</sub>, como proposto por KEPPEL (1971). Modificações do método original têm sido relatadas principalmente em relação ao pré-tratamento da amostra, com o objetivo de reduzir o tempo e as complicações do método de Keppel (VRYZAS *et al.*, 2002). No entanto, a maioria dos métodos comumente empregados ainda baseia-se na detecção do CS<sub>2</sub> gerado após a digestão ácida de algum ditiocarbamato presente na cultura (CALDAS *et al.*, 2004). A partir de um mol de ditiocarbamato, sob condições ácidas e de alta temperatura, ocorre a formação de dois mols de CS<sub>2</sub> (HILL, 1992). Na Figura 2, está exemplificado a quebra da molécula de tiram, em meio ácido, gerando duas moléculas de CS<sub>2</sub> (WHO, 1988).



**Figura 2.** Hidrólise ácida da molécula de tiram formando amina e CS<sub>2</sub>.

A conversão entre a massa de qualquer ditiocarbamato em CS<sub>2</sub> pode ser obtida através da Equação 1 (KEPPEL, 1971).

$$\text{CS}_2 \text{ (g)} = \frac{\text{MM p.a.}}{2 \times \text{PM CS}_2} = \frac{\text{MM p.a.}}{152 \text{ g}} \quad (1)$$

Onde:

MM = massa molecular

p.a. = princípio ativo da classe dos ditiocarbamatos

Segundo ARAÚJO (2001), o método mais antigo para determinação de ditiocarbamatos encontrado na literatura foi desenvolvido por CLARKE *et al.*, em

1951. O método proposto resume-se nas seguintes etapas: a) decomposição ácida dos ditiocarbamatos para gerar CS<sub>2</sub>, b) absorção do CS<sub>2</sub> em solução alcoólica de KOH, onde ocorre a formação de xantato e, c) determinação do xantato através da titulação com iodo.

Em 1964, CULLEN propôs um método espectrofotométrico de baixo custo e aparatos analíticos básicos, que no ano de 1971 foi modificado por Keppel e que até os dias atuais é o método mais empregado na determinação de ditiocarbamatos no Brasil (CALDAS *et al.*, 2001).

O método modificado por KEPPEL (1971) baseia-se na digestão ácida por meio de HCl e SnCl<sub>2</sub>. Um *trap* contendo solução de NaOH e benzeno é utilizado a fim de retirar possíveis interferentes como por exemplo o ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S). O CS<sub>2</sub> gerado forma um complexo de coloração amarela ao reagir com cobre e dietanolamina. O complexo formado é analisado por Espectrofotometria UV-visível a 435 nm.

No início da década de 1980, NASH & BEALL (1981) monitoraram os resíduos de manebe e zinebe, sob a forma de etilenodiamina (EDA) em tomate, água e solo, dez semanas após estes terem sido aplicados à plantação (2 kg ha<sup>-1</sup>). Os resíduos foram analisados através de GC-ECD e os resíduos de manebe e zinebe encontrados foram inferiores a 1 mg kg<sup>-1</sup>.

GUSTAFSSOM & THOMPSON (1983) desenvolveram um método específico para a determinação de zinebe, ziram e tiram em amostras de maçã. Com o auxílio de uma solução alcalina de EDTA, os sais de zinco, ferro e manganês (metais presentes nas estruturas dos ditiocarbamatos) foram transformados em sais de sódio, solúveis em água. A fase orgânica foi concentrada e analisada por HPLC, com detecção no ultravioleta (UV), em 272 nm. Os Limites de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) determinados foram de 0,01 mg kg<sup>-1</sup> para ziram e tiram, e de 0,05 mg kg<sup>-1</sup> para zinebe. As recuperações para as amostras fortificadas em 1,0 mg kg<sup>-1</sup> foram de 88% para tiram e ziram, e de 61% para zinebe.

Já IRTH *et al.* (1990) empregaram HPLC com detecção UV em 435 nm para determinar tiram, sob a forma de dimetilditiocarbamato de cobre II, após complexação com cobre II, em amostras de maçã, alface e extratos de solo.

Um método empregando *Headspace* foi apresentado por HILL (1992). Em frasco fechado com septo de teflon, os ditiocarbamatos foram decompostos a CS<sub>2</sub>, em pH ácido e em banho de água quente. Uma alíquota de vapor do *Headspace* foi retirada e analisada por GC-FPD.

MILES & ZHOU (1991) determinaram nabam em amostras de mamão, alface, pepino e espinafre, empregando HPLC com detector de fluorescência, após a hidrólise do nabam a EDA, e posterior derivatização pré-coluna empregando o-ftaldeido-mercaptanoetanol (OPA-MERC).

Posteriormente, em 1995, WOODROW *et al.* determinaram ziram e mancozebe em amostras de ar. As amostras foram recolhidas em fibras as quais ficaram expostas, por 24 h, no local onde os ditiocarbamatos foram aplicados. O procedimento de extração foi realizado segundo o método isoctano e a análise realizada empregando *Headspace* acoplado a GC-FPD.

LO *et al.* (1996) distinguiram propinebe e EBDCs, empregando HPLC com detecção UV em 272 nm combinado com um método de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*). A distinção destes dois ditiocarbamatos foi possível pela comparação de zinco e manganês totais presentes nos produtos formulados.

MATHEW *et al.* (1996) desenvolveram um método para determinação de ziram em amostras de arroz por Voltametria de Redissolução Anódica. O método proposto pelos autores apresentou ótima sensibilidade, com LOD de 10 µg kg<sup>-1</sup>.

LEE *et al.* (1997) empregaram Eletroforese Capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) com detector de arranjo de diodos para determinação de cinco ditiocarbamatos, com LOD na faixa de 0,1 a 1 mg L<sup>-1</sup>.

Um método espectrofotométrico sensível para determinação de tiram, ziram e zinebe em amostras ambientais foi proposto por KESARI & GUPTA (1998). O método baseia-se na absorção de CS<sub>2</sub> em solução alcoólica de NaOH, formando xantato de coloração amarela. Na seqüência o xantato é tratado por KI liberando iodina que por sua vez oxida o xantato resultando em um composto de coloração violácea o qual é analisado espectrofotometricamente a 595 nm.

Em 1999, BOHRER *et al.* adaptaram o método de Keppel ao sistema de análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*). O procedimento de extração do CS<sub>2</sub> conforme estabelecido por Keppel foi associado

ao sistema em fluxo, e a quantificação do complexo realizada por Espectrofotometria UV-visível.

No ano seguinte, MALIK (2000) desenvolveu um método espectrofotométrico para determinação de ferbam em amostras comerciais de grãos de trigo pela conversão de ferro III, presente na estrutura química do ferbam, a ferro II, o qual forma complexo com 1,10 fenantrolina.

QUEFFELEC *et al.* (2001) desenvolveram um método de imunensaio (ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para a quantificação de tiram em alface. Segundo os autores, o método apresenta ótima sensibilidade (LOD de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As recuperações médias para as fortificações nos níveis de 0,8 e  $3,3 \text{ mg tiram kg}^{-1}$  foram de 86,7 e 94,3%, respectivamente, com desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) inferior a 10%.

CALDAS *et al.* (2001) propuseram um novo modelo para o sistema de *traps* utilizado no procedimento de extração do método de Keppel. Segundo os autores o sistema proposto é menos frágil e proporciona análises mais rápidas que o sistema original.

Um método simples, sensível e rápido por GC *Headspace* para determinação de ditiocarbamatos em batata e cebola foi proposto por ROYER *et al.* (2001). As amostras foram colocadas em frascos de vidro com septo de silicone. Após a hidrólise ácida e sob aquecimento, retiraram-se  $200 \mu\text{L}$  do gás e analisou-se por GC-ECD. Conforme reportado pelos autores, a utilização deste método permite excelentes percentuais de recuperação (85 a 103) e RSD inferior a 4%, para as culturas validadas.

Em 2002, De KOK & Van BODEGRAVEN propuseram um método baseado na análise do extrato de isoctano contendo  $\text{CS}_2$  por GC-ECD, GC-FPD e GC-MS. O método foi validado para seis culturas (alface, pepino, morango, laranja, couve-flor e trigo) e as recuperações médias ficaram na faixa de 80 a 90 %, com RSD na faixa de 3,4 a 7,0%.

No mesmo ano, VRYZAS *et al.* investigaram a eficiência da energia de microondas, para o procedimento de extração e simultânea hidrólise na determinação de ditiocarbamatos em pêssego e folha de tabaco, empregando GC-FPD. Segundo os autores, utilizando a energia de microondas no preparo das

amostras é possível realizar as determinações em 1/10 do tempo total normalmente requerido pelos outros métodos cromatográficos.

No ano de 2003, KUBO *et al.* desenvolveram um método para determinar ziram, mancozebe e propinebe por FIA. O método proposto baseia-se na relação de quimiluminescência entre o luminol e os íons metálicos dos ditiocarbamatos.

O método de Keppel foi otimizado e validado por PIZZUTTI *et al.* (2004) para sete diferentes culturas: maçã, uva, morango, mamão, banana, tomate e pepino, na faixa de 0,02 a 2,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>. Os LODs determinados ficaram na faixa de 0,01 a 0,06 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> e os Limites de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) na faixa de 0,02 a 0,07 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>.

GARCINUÑO *et al.* (2004 b) estudaram o emprego de HPLC com detector por arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diodo Array Detector*) para determinação simultânea de manebe e dos metabólitos ETU e EU, em tomate. Os analitos foram extraídos com uma mistura 1:1:1 de acetonitrila:ditioclorometano:clorofórmio e a separação realizada em uma coluna C18. Os LOQs para manebe, ETU e EU foram, respectivamente, 0,45, 0,4 e 0,35 mg kg<sup>-1</sup>, com RSD na faixa de 3,8 a 6,2%.

Ainda em 2004, BLASCO *et al.* desenvolveram método para determinação dos ditiocarbamatos disulfuram, tiram e o metabólito ETU, em frutas e vegetais, por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*). As amostras de alface apresentaram recuperações para tiram de 66,6 e 65,4%, para os níveis 2,5 e 25 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Um método para determinação de resíduos de ziram e zinebe em amostras de água de cerração foi desenvolvido por AGARWAL *et al.* (2005), empregando AAS por chama.

Através da revisão da bibliografia, observa-se que métodos de determinação individual de ditiocarbamatos estão disponíveis, entretanto, a aplicabilidade destes métodos em programas de monitoramento em larga escala pode não ser prático, uma vez que a maioria dos países expressa os LMRs em termos de CS<sub>2</sub>. A Espectrofotometria ou a GC tem sido utilizadas para a análise destes compostos, no entanto, a origem do CS<sub>2</sub> não pode ser determinada por ambos os métodos (CALDAS *et al.*, 2004).

Na determinação de resíduos de ditiocarbamatos, além da escolha de métodos sensíveis, deve-se ter cuidados especiais durante o preparo da amostra, pois se sabe que a maioria dos ditiocarbamatos é instável a umidade, oxigênio e degradam-se facilmente em meio ácido (GARCINUÑO *et al.*, 2004 a).

HOWARD & YIP (1971) citados por HILL (1992) encontraram diferentes concentrações entre as duplicatas, variando de 10 a 20 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, na determinação de ditiocarbamatos em amostras de alface contendo 40 a 50 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>. Segundo os autores, isto se deve a possíveis falhas na amostragem e/ou no preparo da amostra.

Poucos trabalhos têm sido publicados em relação aos efeitos do preparo da amostra, e muitos autores são contrários ao excesso de destruição dos tecidos vegetais. HILL cita que MCLEOD & RITCEY (1973) verificaram que as folhas das amostras de alface quando processadas apresentavam menores valores na recuperação dos ditiocarbamatos do que as não processadas. Sendo assim, THIER & ZEUMER (1987) sugeriram que as amostras de frutas e vegetais sejam cortadas em forma de cubos, mas que amostras como a alface devem ter as folhas apenas separadas e cortadas. No entanto, VUIK *et al.* (1992) propõem analisar as folhas de alface cortadas em pequenos pedaços e não somente picadas e homogeneizadas, uma vez que a distribuição dos ditiocarbamatos nas folhas não é homogênea.

Outro cuidado importante que se deve ter na determinação de ditiocarbamatos é em relação à presença natural de CS<sub>2</sub> em algumas plantas, o que pode fornecer resultados errôneos (HILL, 1992). Um exemplo são os vegetais pertencentes à família das *Brassicaceae*, principalmente a couve-flor e o repolho, que, devido à presença de compostos contendo enxofre, podem gerar naturalmente CS<sub>2</sub>. Em estudos realizados por PERZ *et al.* (2000) foram encontradas concentrações entre 0,9 e 2,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> para as amostras de couve-flor e 0,8 a 2,3 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> para as amostras de repolho, ambas cultivadas sem o emprego de ditiocarbamatos.

## **2.6 Validação de métodos**

Após o desenvolvimento de um método analítico para determinação de resíduos de pesticidas, torna-se necessário validar o método a fim de avaliar seus resultados e permitir sua aplicação rotineira.

Assim, a validação de um método analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com a precisão e a exatidão consideradas, na prática, como satisfatórias. A variabilidade associada a um método analítico deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo aquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente (TOMLIN, 2004).

Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Dessa forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros analíticos envolvidos na validação de métodos geralmente são: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

### **2.6.1 Curva analítica e linearidade**

A obtenção da curva analítica é um dos estágios fundamentais na análise química. A curva analítica é o método de quantificação mais freqüentemente utilizado e consiste na determinação da resposta de determinado instrumento às várias concentrações da substância em estudo (CHASIN, *et al.*, 1998; PIMENTEL & BARROS NETO, 1996). Tanto o Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP) quanto a ANVISA sugerem um mínimo de cinco níveis de concentração, a serem analisadas em ordem crescente de concentração (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a maioria das técnicas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta medida ( $y$ ) – área do pico ou valor de absorvância – e a concentração ( $x$ ) do composto em estudo. A equação de



regressão linear  $y = ax + b$  relaciona as duas variáveis, onde **b** é a interseção da curva analítica com o eixo y (quando  $x = 0$ ) e **a** é a inclinação da curva. A regressão linear das curvas analíticas deve ter um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) > 0,99 (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996; CHASIN *et al.*, 1998).

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma determinada faixa de concentração (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996; CHASIN *et al.*, 1998). A linearidade é determinada através da análise de uma série de soluções analíticas, de diferentes concentrações, variando estas de acordo com a finalidade da análise (MISTURA, 2003).

Para verificar se uma determinada concentração encontra-se dentro da região linear da curva analítica faz-se o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), definida pela Equação 2:

$$(S/Q)_i \% = \left( \frac{S_i - b}{Q_i} \right) \times 100/a \quad (2)$$

Na ausência de erros indeterminados, isto é, com coeficiente de determinação igual a 1 ( $r^2 = 1$ ), e dentro da faixa linear, pode-se provar que  $(S/Q)_i = a$  para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na presença de erros indeterminados ( $r^2 < 1$ ), que é o que acontece na prática, e dentro da faixa linear,  $(S/Q)_i \approx a$ . Se  $(S/Q)_i \ll a$  ou  $(S/Q)_i \gg a$ , então o resultado pode ser considerado como fora da linearidade. Conforme normas da IUPAC, é considerada dentro da linearidade a concentração cuja razão sinal/concentração não ultrapassa 5% do coeficiente angular da reta (ETTRE, 1993).

### 2.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade de um método analítico como um todo é definida em termos de LOD e Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*).

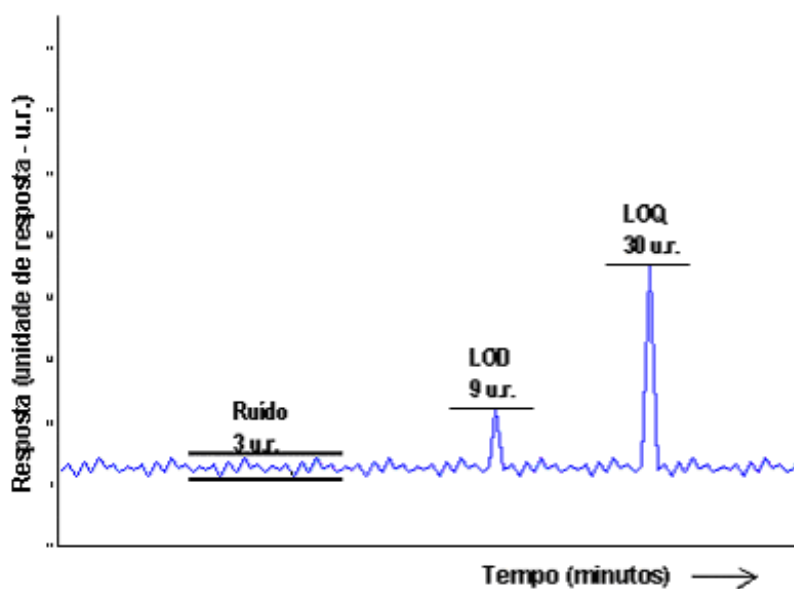
O LOD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LOQ é a menor

concentração da substância em análise que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (CHASIN, *et al.*, 1998; CLIFTON, 1996; RIBANI *et al.*, 2004).

Para determinar o LOD considera-se a concentração cujo sinal cromatográfico obtido for três vezes maior, em relação ao ruído da linha de base, no tempo de retenção dos picos de interesse.

Para determinar o LOQ considera-se a concentração cujo sinal cromatográfico obtido for dez vezes maior, em relação ao ruído da linha de base, no tempo de retenção dos picos de interesse.

A Figura 3 (MISTURA, 2003) demonstra de forma representativa como foi obtida a relação entre o sinal e o ruído da linha de base, e conseqüentemente, o LOD e o LOQ.



**Figura 3.** Diagrama demonstrando o ruído da linha base, e o sinal para LOD e LOQ para os métodos cromatográficos.

Nos métodos cromatográficos, entende-se por ruído a flutuação da linha base do cromatograma. É a diferença entre a maior altura e a maior profundidade dos picos, não relacionada a nenhum composto detectado (CLIFTON, 1996).

Nos estudos empregando Espectrofotometria, os valores de LOD e LOQ foram determinados a partir de seis leituras consecutivas das amostras branco e do respectivo desvio padrão dessas leituras, conforme apresentado na Equação 3:

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= B + 3 \times \text{SD} \\ \text{LOQ} &= B + 10 \times \text{SD} \end{aligned} \quad (3)$$

Onde:

B = médias das 6 análises da amostra branco

SD = desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*

### 2.6.3 Repetitividade e precisão intermediária

Precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, sob condições definidas. Normalmente, é determinada para circunstâncias específicas de medição e podem ser expressas por meio da repetitividade e da precisão intermediária.

Repetitividade ( $RSD_r$ ): grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuado sob as mesmas condições de medição, denominadas de condições de repetitividade, como: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. (RIBANI *et al.*, 2004).

Precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ): refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais condições a variar, tais como: diferentes dias de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável para usar (INMETRO, 2003).

O valor numérico usado para avaliar a precisão, em termos de RSD, para o método, pode ser calculado através da Equação 4 (CAUSON, 1997; GARP, 1999). Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até  $\pm 15\%$  (GARP, 1999).

$$RSD\% = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

$s$  = estimativa de desvio padrão absoluto =  $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = valores individuais;

$x_m$  = média das medidas em replicatas;

$N$  = número de medidas.

A precisão expressa a repetitividade do tempo de retenção/área do analito, sendo considerado um excelente resultado quando o RSD para o instrumento é menor que 5% (BAUGH, 1993; CAUSON, 1997).

#### 2.6.4 Recuperação

A recuperação avalia a exatidão do método empregado para análise de amostras fortificadas, sempre que não houver material de referência certificado disponível, e é geralmente expressa em termos de porcentagem.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos de pesticidas geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$  (GARP, 1999).

A recuperação ( $R$ ) é calculada através da Equação 5:

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

$C_1$  = concentração determinada na amostra fortificada

$C_2$  = concentração determinada na amostra não fortificada

$C_3$  = concentração usada para a fortificação

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas:

- a) Validação de três diferentes métodos cromatográficos (Método 1), empregando GC-ECD (Método 1A), GC-FPD (Método 1B) e GC-MS (Método 1C), para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface, realizada no *Food and Consumer Product Safety Authority, Inspectorate for Health Protection (VWA)*, em Amsterdã, Holanda;
- b) Validação do método espectrofotométrico (Método 2) para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface, realizada no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), da UFSM, em Santa Maria, Brasil;
- c) Comparação dos métodos estudados para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface.

#### 3.1 Instrumentação

Os seguintes equipamentos e materiais foram empregados no estudo:

- Sistema GC-ECD: cromatógrafo a gás 3800 (Varian, EUA) equipado com:
  - ✓ Amostrador automático (*autosampler* 8400 Varian);
  - ✓ Injetor 1079, modo *split/splitless*, com insersor de vidro silanizado, diâmetro interno de 3,4 mm;
  - ✓ Coluna capilar CP Sil 8 CB (95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1,2 µm de espessura de filme (Varian Chrompack, Holanda);
  - ✓ Controlador eletrônico de fluxo (EFC, do inglês *Electronic Flow Control*);

- ✓ Detector ECD contendo isótopo  $^{63}\text{Ni}$ ;
- ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software Atlas 2002* (Thermo Lab Systems, EUA);
- Sistema GC-FPD: cromatógrafo a gás 3800 (Varian, EUA) equipado com:
  - ✓ Amostrador automático (*autosampler* 8400 Varian);
  - ✓ Injetor 1177, modo *split/splitless*, com insersor de vidro silanizado, diâmetro interno de 3,4 mm;
  - ✓ Coluna capilar CP Sil 8 CB (95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1,2  $\mu\text{m}$  de espessura de filme (Varian Chrompack, Holanda);
  - ✓ Detector FPD, atuando no modo enxofre;
  - ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software Atlas 2002* (Thermo Lab Systems, EUA);
- Sistema GC-MS: cromatógrafo a gás 3800 (Varian, EUA) equipado com:
  - ✓ Amostrador automático (*autosampler* 8400 Varian);
  - ✓ Injetor 1079, modo *split/splitless*, com insersor de vidro silanizado, diâmetro interno de 3,4 mm;
  - ✓ Coluna capilar CP Sil 8 CB (95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil) de sílica fundida, 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1,2  $\mu\text{m}$  de espessura de filme (Varian Chrompack, Holanda);
  - ✓ Detector MS por trapemeamento de íons (ITD, do inglês *Ion Trap Detector*) Saturn 2000 (Varian, EUA);
  - ✓ Sistema de aquisição de dados através do *software GC-MS Saturn 2000* (Varian, EUA);
- Espectrofotômetro de absorção molecular UV-visível Lambda 16, operando na faixa de 190 a 800 nm (Perkin-Elmer, Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> - resistividade 18,2  $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  (MilliPore<sup>®</sup>, EUA);
- Balança analítica de precisão com 4 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Balança analítica de precisão com 2 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Micropipetadores automáticos de várias capacidades (Brand, Alemanha);
- Multiprocessador de alimentos (Walita Master, Brasil);
- Lavadora automática de vidrarias G 7883 CD (Miele, EUA) ;

- Banho termostatzado com agitação (Thermo Haake, Alemanha);
- Estufa (Heraus, Alemanha);
- Medidor de pH (Cole Parmer, EUA);
- Medidor de vazão (Varian, EUA);
- Chapa de aquecimento (Ika-Combimag, Alemanha);
- Manta de aquecimento (Fisatom, Brasil).

A vidraria utilizada para o preparo das amostras do Método 2 foi confeccionada no Laborat3rio de Hialotecnia do Departamento de Qu3mica da UFSM.

### 3.2 Gases utilizados

- G3s de arraste: H3lio 99,999% de pureza (Air Liquid, França);
- G3s *make up*: Nitrog3nio 99,999% de pureza (Air Liquid, França);
- Hidrog3nio 99,999% de pureza (Air Liquid, França);
- Ar sint3tico 99,999% de pureza (Air Liquid, França);
- Nitrog3nio comercial 99,9% para o amostrador autom3tico (Air Liquid, França);
- Nitrog3nio comercial 99,9% (White Martins, Brasil).

### 3.3 Reagentes e solventes

Os seguintes reagentes e solventes foram empregados no estudo:

- Acetato de chumbo p.a. (Vetec, Brasil);
- Acetato de cobre p.a. (Vetec, Brasil);
- Acetona p.a. (Vetec, Brasil);
- 3cido clor3drico p.a. (Nuclear, Brasil);
- Sal diss3dico do 3cido etilenodiaminotetrac3tico (EDTA) p.a. (Merck, Alemanha);
- 3cido n3trico p.a. (Synth, Brasil);



- Água destilada e deionizada;
- Água purificada (destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q®);
- Álcool etílico comum 92,8 °GL (Santa Cruz, Brasil);
- Álcool etílico p.a. 95% (Vetec, Brasil);
- Cloreto de estanho II diidratado p.a. (Nuclear, Brasil);
- Dietanolamina p.a. (Nuclear, Brasil);
- Extran® alcalino (Merck, Brasil);
- Hidróxido de sódio p.a. (Merck, Alemanha);
- Isoctano grau pesticida (Lab-scan Analytical Science, Irlanda);
- Tolueno grau pesticida (Mallinckrodt, EUA).

### **3.4 Fungicidas selecionados**

Os fungicidas da classe dos ditiocarbamatos e o produto de degradação CS<sub>2</sub> selecionados para este estudo estão listados na Tabela 5, com os respectivos fornecedores e grau de pureza.

**Tabela 5.** Fungicidas e produto de degradação utilizados nesse estudo com respectivos fornecedores e grau de pureza.

Fungicidas ou produto de degradação	Fornecedores	Purezas (%)
CS <sub>2</sub>	J. T. Baker Chemicals (EUA)	99,9
Mancozebe	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	74,5
Tiram	Dr. Ehrenstorfer (Alemanha)	99,0

### **3.5 Preparo das soluções**

#### **3.5.1 Preparo das soluções estoque de tiram**

Preparou-se 10 mL de solução estoque de tiram, em tolueno, com concentração de  $1 \text{ g L}^{-1}$  (solução A). Essa solução foi preparada através da dissolução do padrão sólido de referência no solvente mencionado. A partir da solução A preparou-se uma solução na concentração de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  (solução B), em tolueno. Empregaram-se ambas as soluções nos ensaios de fortificação e recuperação do analito. Estas soluções foram estocadas em frasco âmbar, em freezer, à  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para o mancozebe que apresentou teor de pureza inferior a 99%, efetuou-se a correção da pesagem, conforme recomenda a literatura (GARP, 1999).

#### **3.5.2 Preparo das soluções analíticas para os métodos cromatográficos**

Para o preparo das curvas analíticas para os métodos cromatográficos, primeiramente preparou-se uma solução de  $\text{CS}_2$ , em isoctano, na concentração de  $4 \text{ g L}^{-1}$  (solução estoque). A partir dessa solução, preparou-se uma solução  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (solução de trabalho), no mesmo solvente, a partir da qual fez-se as diluições para posterior obtenção das curvas analíticas. A Tabela 6 apresenta os dados referentes à obtenção das curvas analíticas, assunto que será discutido no item 3.15.1.

**Tabela 6.** Concentração das soluções de CS<sub>2</sub> da curva analítica e volumes medidos da solução de trabalho, para preparar 10 mL de cada solução em isoctano.

Concentração (mg CS <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	Volumes medidos da solução de trabalho* (μL)
0,08	20,0
0,1	25,0
0,2	50,0
0,8	200,0
2,0	500,0

\*Concentração da solução de trabalho: 40 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>

### 3.5.3 Preparo das soluções analíticas para o método espectrofotométrico

Para a confecção das curvas analíticas empregadas no Método 2, inicialmente preparou-se uma solução de CS<sub>2</sub> na concentração de 25 g L<sup>-1</sup>, em álcool etílico (solução 2A). A partir da diluição desta solução, fez-se a solução 2B na concentração de 2,5 g L<sup>-1</sup>, no mesmo solvente. Preparou-se então a solução, 2C na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>, a partir da qual prepararam-se soluções analíticas nas concentrações indicadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Concentração das soluções de CS<sub>2</sub> da curva analítica e volumes da solução 2C utilizados para preparar 25 mL de solução em álcool etílico e solução complexante\*.

Concentração (mg CS <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	Volumes medidos da solução 2C** (mL)
0,44	0,2
0,67	0,3
1,11	0,5
2,23	1,0
4,45	2,0
6,68	3,0
8,89	4,0

\*Volume da solução complexante: 15 mL

\*\*Concentração da solução 2C: 50 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>

Para os ensaios de fortificação e recuperação do analito, pelo Método 2, foi necessário o preparo das seguintes soluções:

- Solução aquosa de acetato de chumbo 30% (m/v);
- Solução aquosa de hidróxido de sódio 2,5 mol L<sup>-1</sup>;
- Solução de acetato de cobre II 1,6 g L<sup>-1</sup> em álcool etílico (solução 3A), a partir da qual preparou-se a solução 3B, na concentração de 0,4 g L<sup>-1</sup>, no mesmo solvente;
- Solução complexante: em balão volumétrico de 250 mL colocaram-se 30 mL da solução 3B, contendo 12 mg de acetato de cobre II, 25 g de dietanolamina e completou-se o volume com álcool etílico p.a.;
- Solução de cloreto de estanho II 40% em HCl concentrado (m/v).

### 3.6 Armazenamento das amostras branco de alface

As amostras branco de alface foram adquiridas no comércio da cidade de Amsterdã (Holanda) e em hortas residenciais da cidade de Santa Maria, RS, Brasil. As folhas de alface foram homogeneizadas em multiprocessador de alimentos e armazenadas em frascos de vidro os quais foram fechados com tampa de alumínio. Para que não houvesse contaminação, lavaram-se os frascos previamente com solução aquosa de Extran<sup>®</sup> alcalino 5% (v/v), enxaguando em água corrente, água deionizada e álcool etílico comum antes de serem levados à estufa, à temperatura de 250 °C.

Os frascos contendo as amostras branco foram rotulados de forma adequada e armazenados em freezer, à temperatura de -18 °C, por tempo indeterminado.

Os cuidados na coleta e armazenamento das amostras branco são imprescindíveis para evitar a contaminação das mesmas e, conseqüentemente, possíveis alterações nos valores de recuperação do analito. Sabe-se também, que os ditiocarbamatos interagem com produtos de origem plástica ou de borracha, por isso deve-se ter o máximo de cuidado no preparo e armazenamento das amostras branco, evitando o contato com estes materiais.

Para o procedimento de extração, uma quantidade de  $50,0 \pm 0,5$  g de alface foi descongelada e pesada.

### 3.7 Análise dos solventes e reagentes

Para a verificação da pureza dos solventes e reagentes utilizados, com relação aos níveis de ditiocarbamatos, realizou-se a análise dos mesmos através dos procedimentos de extração, discutidos no item 3.11, sem adicionar a amostra. No procedimento de extração do Método 1, além dos solventes e reagentes empregados, utilizaram-se 50 mL de água de torneira (n = 3) e/ou 50 mL de água purificada em Milli-Q<sup>®</sup> (n = 3) para avaliar a presença de interferências em relação à procedência da água. Já para o Método 2, utilizaram-se somente os solventes e reagentes comumente empregados.

### 3.8 Avaliação das amostras para uso como amostra branco

Na ausência de material de referência às amostras adquiridas foram avaliadas para uso como amostra branco, ou seja, amostra de alface sem presença de resíduos de ditiocarbamatos. Essas amostras foram submetidas aos procedimentos que serão descritos no item 3.11.

### 3.9 Avaliação da estabilidade de mancozebe em solução

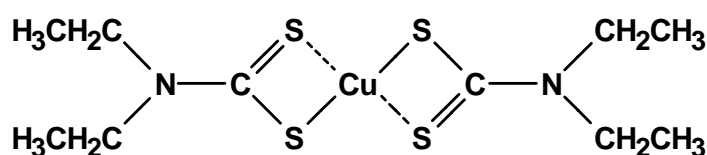
Para estudos de fortificação utilizando mancozebe geralmente prepara-se uma mistura deste princípio ativo em sílica gel conforme PIZZUTTI *et al.* (2004), pois é bem conhecido que o princípio ativo mancozebe é pouco solúvel em solventes orgânicos e apresenta baixa estabilidade em solução (TOMLIN, 2004).

Assim, para avaliar a estabilidade deste composto preparou-se uma solução 9 mg L<sup>-1</sup> de mancozebe, em solução aquosa de EDTA 2 mol L<sup>-1</sup> a pH 8, ajustado com solução de NaOH 8 mol L<sup>-1</sup>, segundo estudo de VRYZAS *et al.* (2002). A interação entre os metais zinco e manganês, presentes na estrutura do mancozebe, e o ligante EDTA (estrutura química no Apêndice 2) pode levar a formação de um complexo. A formação e a estabilidade deste é maior em pH alcalino, motivo pelo qual a solução de mancozebe em EDTA foi mantida a pH 8.

Amostras de 30 mL de água purificada em MilliQ<sup>®</sup> foram fortificadas com 20 mL da referida solução, obtendo-se a concentração final de 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> na amostra. Realizou-se o procedimento de extração para os métodos cromatográficos, no dia que foi preparada a solução (1<sup>o</sup> dia), em 6 réplicas, seguido de análise por GC-ECD e GC-FPD, nas condições que estão descritas no item 3.14. O mesmo procedimento foi realizado no 2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dia após o preparo da solução. A solução ficou armazenada em freezer a -18 °C, em frasco âmbar.

### 3.10 Avaliação da estabilidade do complexo CS<sub>2</sub>, cobre e dietanolamina

No procedimento de extração do Método 2, o CS<sub>2</sub>, após a quebra das moléculas dos princípios ativos pertencentes à classe dos ditiocarbamatos, complexa-se com solução que contém cobre e dietanolamina (KEPPEL, 1971), formando o complexo representado na Figura 4.



**Figura 4.** Complexo formado entre CS<sub>2</sub>, cobre e dietanolamina.

As propriedades físico-químicas da dietanolamina estão presentes no Apêndice 3.

Para verificar a estabilidade do complexo formado entre CS<sub>2</sub>, cobre e dietanolamina, foram preparadas 6 soluções analíticas, conforme item 3.5.3, nas seguintes concentrações: 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. As absorvâncias de cada solução foram medidas, 6 vezes a cada tempo, logo após o preparo, 1, 2 e 3 h após a primeira medida.

Os balões volumétricos contendo as soluções foram deixados na bancada, sob condições ambientes de temperatura e luminosidade.

### 3.11 Procedimento de fortificação e extração das amostras

As amostras adquiridas nos supermercados de Amsterdã (Holanda) e nas hortas residenciais de Santa Maria foram utilizadas como amostra branco nos procedimentos de extração dos Métodos 1 e 2, respectivamente.

Testaram-se duas maneiras diferentes para a homogeneização das amostras branco: a) cortaram-se as folhas de alface em pequenos pedaços, e b) as folhas de alface foram homogeneizadas em multiprocessador de alimentos.

Estes testes foram realizados a fim de avaliar possíveis diferenças nos percentuais de recuperação dependendo do tipo de preparo da amostra. Os testes foram realizados em duplicata e analisados por cromatografia (GC-ECD e GC-FPD) e por Espectrofotometria UV-visível.

### **3.11.1 Para os métodos cromatográficos**

Para o procedimento de extração do Método 1, pesaram-se 50,0 g  $\pm$  0,5 g de amostra branco em frasco de vidro de 250 mL, com tampa rosqueável. As fortificações foram efetuadas adicionando-se 32  $\mu$ L da solução estoque de tiram na concentração de 1,0 g L<sup>-1</sup> e 40  $\mu$ L da solução de concentração 0,1 g L<sup>-1</sup>, para os níveis 0,4 e 0,05 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> de amostra, respectivamente. Na seqüência do procedimento adicionaram-se 25 mL de isoctano e 150 mL de solução de ácido clorídrico 4 mol L<sup>-1</sup> contendo 2,25 g de cloreto de estanho II.

Os frascos foram fechados e colocados em banho de água à 80 °C durante 2 h, sob agitação correspondente a rotação de 40 rpm. Após este período, os frascos foram retirados e resfriados até a temperatura ambiente, em banho de água fria. Retirou-se uma alíquota de cerca de 1,5 mL da fase orgânica superior, onde o CS<sub>2</sub> fica particionado em isoctano e analisou-se por GC nos três diferentes detectores (ECD, FPD e MS).

Na Figura 5 está demonstrado um banho de água com capacidade para até 10 extrações simultâneas.





**Figura 5.** Banho termostatizado com agitação empregado no procedimento de extração do Método 1.

O procedimento de extração foi realizado em 6 réplicas, tanto para as amostras branco quanto para cada nível de fortificação.

É imprescindível que, após fortificar as amostras e adicionar os reagentes, o frasco de vidro seja imediatamente fechado, isto porque os princípios ativos da classe dos ditiocarbamatos quando expostos a condições que proporcionem a quebra das moléculas irão formar  $CS_2$ , que poderá ser perdido devido a sua alta volatilidade.

### **3.11.2 Para o método espectrofotométrico**

Para a análise espectrofotométrica, o sistema utilizado para o procedimento de extração está representado na Figura 6. O sistema é composto de um balão de três bocas, de 500 mL, funil de adição, entrada de nitrogênio e de três sistemas de trapeamento conectados em série.



**Figura 6.** Sistema utilizado para o procedimento de extração do Método 2.

No balão de fundo redondo de 3 bocas adicionaram-se  $50,0 \pm 0,5$  g de alface. Fortificaram-se as amostras branco com solução estoque de tiram ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ), conforme Tabela 8. Após, adicionaram-se 20 mL da solução de cloreto de estanho II a 40% em HCl concentrado (m/v) e 220 mL de solução aquosa de HCl a 10% (v/v) à quente, através de funil de adição (boca lateral do balão). Adicionaram-se no 1° *trap*: 10 mL da solução de acetato de chumbo a 30% (m/v), no 2° *trap*: 10 mL de solução de hidróxido de sódio  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  e no 3° *trap*: 15 mL de solução complexante (conforme item 3.5.3). O sistema foi conectado e vedado. O condutor do gás nitrogênio, utilizado para carrear o  $\text{CS}_2$  formado, foi fixado na outra abertura lateral do balão. Após a mistura entrar em ebulição, promovida por manta de aquecimento, esta permaneceu por 1 hora em reação, sob vazão contínua de nitrogênio. Em seguida, transferiu-se quantitativamente o conteúdo do 3° *trap* (solução contendo o complexo formado entre o  $\text{CS}_2$ , cobre e dietanolamina) para balão volumétrico certificado de 25 mL, completando-se o volume com álcool etílico p.a..

Realizou-se a medida espectrofotométrica do complexo em 435 nm, em até 15 min após o término do preparo da amostra.

**Tabela 8.** Volume adicionado de solução estoque de tiram, nos 3 níveis de fortificação do Método 2.

Níveis de fortificação (mg CS <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )	Volume adicionado de solução estoque de tiram* (μL)
0,4	32
0,8	64
2,0	160

\*Concentração da solução estoque de tiram: 1,0 g L<sup>-1</sup>

O procedimento de extração foi realizado em 6 réplicas, tanto para as amostras branco quanto para cada nível de fortificação.

Assim como ocorre com o Método 1, deve-se evitar a perda de CS<sub>2</sub>, após a adição dos reagentes, fechando-se imediatamente o balão.

Cabe ressaltar que os resíduos gerados durante os procedimentos de extração do Método 2 foram cuidadosamente tratados. Os procedimentos para o tratamento destes resíduos estão nos Apêndice 4.

### 3.12 Limpeza do material utilizado

Após o uso, toda a vidraria utilizada no procedimento de extração do Método 1 foi limpa em lavadora automática. Já as vidrarias empregadas no procedimento de extração do Método 2, foram seqüencialmente enxaguadas em água corrente, lavadas com solução aquosa de Extran<sup>®</sup> alcalino 5% (v/v), lavadas em água corrente novamente, enxaguadas com água destilada/deionizada e álcool etílico comercial. Então, foram levadas à estufa a 250 °C, até estarem completamente secas, exceto as vidrarias volumétricas, as quais foram secas a temperatura ambiente, conforme descrito por BUHR *et al.*, 2000. As vidrarias foram armazenadas em armário fechado, protegidas com papel alumínio.

### **3.13 Avaliação da separação cromatográfica**

Para determinar o tempo de retenção do CS<sub>2</sub> foram injetados vapores deste na forma de *headspace*. Posteriormente, injetou-se uma solução analítica de CS<sub>2</sub> na concentração de 4 mg L<sup>-1</sup>, nas mesmas condições cromatográficas, confirmando o tempo de retenção do composto.

### **3.14 Condições cromatográficas**

As condições cromatográficas utilizadas nesse estudo foram estabelecidas de acordo com o estudo de De KOK & Van BODEGRAVEN (2002), e estão descritas a seguir.

#### **3.14.1 Sistema GC-ECD**

- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Programação da válvula do *split* do injetor: *split* aberto com razão 1:10;
- Coluna capilar: CP Sil 8 CB;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C;
- Volume de injeção de 4 µL;
- Vazão da purga do septo: 3 mL min<sup>-1</sup>;
- Vazão do gás de *make up* (nitrogênio): 30 mL min<sup>-1</sup>;
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 2,0 mL min<sup>-1</sup>;
- Temperatura do detector: 300 °C.

#### **3.14.2 Sistema GC-FPD (modo enxofre)**

- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Programação da válvula do *split* do injetor: *split* na razão de 1:15;

- Coluna capilar: CP Sil 8 CB;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C;
- Volume de injeção de 4 µL;
- Vazão dos gases do detector:
  - Hidrogênio: 12 mL min<sup>-1</sup>;
  - Ar sintético: 12 mL min<sup>-1</sup> (ar 1) e 20 mL min<sup>-1</sup> (ar 2);
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 2,0 mL min<sup>-1</sup>;
- Temperatura do detector: 250 °C.

### 3.14.3 Sistema GC-MS

- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Programação da válvula do *split* do injetor: *split* na razão de 1:10
- Coluna capilar: CP Sil 8 CB;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C;
- Volume de injeção de 4 µL;
- Vazão do gás de arraste constante em 2,0 mL min<sup>-1</sup> na coluna;

As condições do ITD foram de 230 °C para o *transferline* e para o *trap*, e de 120 °C para o *manifold*. A voltagem aplicada ao *electron multiplier* foi de 1600 eV.

A quantificação foi efetuada pelo modo Impacto de Elétrons (EI, do inglês, *Electron Impact*), na faixa de interesse (m/z de 70 a 80) a fim de se ter os cromatogramas mais limpos. Para a quantificação utilizou-se o íon 76.

### 3.14.4 Sistema de injeção

O modo de injeção, efetuado com o auxílio de amostrador automático, consistiu na aspiração de 0,5 µL de isoctano, 0,5 µL de ar e 4,0 µL de extrato ou de solução analítica. A velocidade de injeção foi de 0,5 µL s<sup>-1</sup>.

### 3.15 Validação dos métodos cromatográficos (GC-ECD, GC-FPD e GC-MS)

Para o Método 1 os ditiocarbamatos foram determinados na forma de CS<sub>2</sub>, utilizando-se o método de padronização externa, empregando-se GC-ECD, GC-FPD e GC-MS nas condições citadas no item 3.14. A seguir estão descritas as informações referentes aos itens avaliados na validação dos métodos.

#### 3.15.1 Curva analítica e linearidade

Para a obtenção das curvas analíticas, diferentes volumes da solução de trabalho foram utilizados para preparar as soluções analíticas nas seguintes concentrações: 0,08; 0,1, 0,2; 0,8 e 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, conforme Tabela 6. Injetou-se no sistema cromatográfico um volume de 4 µL de cada solução analítica obtendo-se as áreas, no tempo de retenção pré-determinado, com o auxílio dos *softwares Atlas 2002*<sup>®</sup> (GC-ECD e GC-FPD) e *Saturn 2000*<sup>®</sup> (GC-MS).

As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração do CS<sub>2</sub> no eixo das abscissas e as áreas (raiz quadrada da área, no caso do FPD) obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft<sup>®</sup> Excel versão 7.0, o qual forneceu o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas. Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, na faixa de concentração apresentada na Tabela 6, verificou-se a linearidade de cada método cromatográfico.

#### 3.15.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o LOD e o LOQ do instrumento foram realizadas injeções em ordem decrescente de concentração (4,0; 2,0, 1,0; 0,4; 0,2; 0,1; 0,08; 0,04 e 0,02 mg L<sup>-1</sup>) até que o pico atingisse uma altura referente a três vezes o ruído da linha de base, nas proximidades do tempo de retenção do pico de interesse. Para

a determinação do LOQ, adotou-se a altura do pico dez vezes superior ao ruído da linha de base.

Para determinar o LOD e o LOQ do Método 1 as amostras foram fortificadas e analisadas cromatograficamente.

### 3.15.3 Repetitividade e precisão intermediária

A precisão, em termos de repetitividade da resposta dos instrumentos ( $RSD_{ri}$ ), empregados nos métodos cromatográficos, foi avaliada efetuando-se 6 injeções de cada concentração (0,1; 0,2 e 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), em cada sistema. Cada injeção efetuada foi retirada de um *vial* diferente, para que não ocorresse perda do CS<sub>2</sub> no tempo de espera entre uma injeção e outra.

A repetitividade do Método 1 ( $RSD_{rm}$ ) foi avaliada efetuando-se o procedimento de extração e análise das amostras branco fortificadas, em dois níveis de concentração, com  $n = 6$ , conforme descrito no item 3.11.1.

Para avaliar a precisão intermediária dos instrumentos, sistemas cromatográficos, utilizaram-se 3 dias diferentes ( $n = 6$ ), com intervalo de 10 dias, entre as análises. Verificou-se o  $RSD_{pii}$  injetando-se, em duplicata, as soluções analíticas nas concentrações 0,1; 0,2 e 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

### 3.15.4 Recuperação

Para os estudos de recuperação do CS<sub>2</sub> a partir do princípio ativo tiram (no Método 1), fortificaram-se as amostras branco de alface com as soluções estoque A e B, em dois diferentes níveis de concentração: 0,05 e 0,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>. Após a extração, o mesmo extrato foi analisado por GC-ECD, GC-FPD e GC-MS para a quantificação do composto em estudo.

Os resultados obtidos após a extração e análise foram denominados de valor obtido (C1), e o valor da fortificação da amostra foi o valor real (C3). Os valores de recuperação foram obtidos empregando-se a Equação 5.

### 3.16 Condições espectrofotométricas

O comprimento de onda selecionado para este estudo foi o mesmo adotado por KEPPEL (1971), isto é, medida de um complexo de coloração amarela em 435 nm, empregando cubeta de vidro com caminho ótico de 1 cm.

### 3.17 Validação do método espectrofotométrico

Os ditiocarbamatos foram determinados na forma de CS<sub>2</sub>, empregando espectrofotômetro de absorção molecular de duplo feixe. A seguir estão descritos os itens avaliados na validação do método.

#### 3.17.1 Curva analítica e linearidade

Para as análises espectrofotométricas, as soluções para a curva analítica de CS<sub>2</sub> foram preparadas a partir solução de trabalho 2C, conforme Tabela 7. Realizou-se a medida de absorbância de cada nível de concentração (0,44; 0,67; 1,11; 2,23; 4,45; 6,68 e 8,89 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) em espectrofotômetro UV-visível, a 435 nm.

As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração do CS<sub>2</sub> no eixo das abscissas e as absorbâncias obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft<sup>®</sup> Excel versão 7.0, o qual forneceu o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) da curva analítica. Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, nas concentrações apresentadas na Tabela 7 avaliou-se a linearidade do método.



### **3.17.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

A determinação do LOD e do LOQ do instrumento foi realizada através das medidas das absorbâncias das soluções analíticas em ordem decrescente (6,0 a 0,2 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). A determinação do LOD e LOQ do Método 2, foi realizada a partir da medida da amostra branco fortificada com solução de tiram, conforme Equação 3.

### **3.17.3 Repetitividade e precisão intermediária**

O estudo da precisão, em termos de repetitividade da resposta do espectrofotômetro (RSD<sub>ri</sub>), foi avaliado efetuando-se 6 medidas de cada concentração (0,6; 1,0 e 4,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>).

A repetitividade do Método 2 (RSD<sub>rm</sub>) foi avaliada efetuando-se o procedimento de extração e análise das amostras branco fortificadas, em três níveis de concentração, com n = 6, conforme descrito no item 3.11.2.

Para avaliar a precisão intermediária do instrumento, utilizaram-se 2 dias diferentes, para as medidas das absorbâncias. Testou-se a RSD<sub>pii</sub> medindo-se, em triplicata (n = 6), as soluções analíticas nas concentrações 0,6; 1,0 e 4,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

### **3.17.4 Recuperação**

Para verificar a recuperação obtida com o Método 2, as amostras de alface foram fortificadas em três diferentes níveis de concentração: próximo ao LOQ, duas e cinco vezes o LOQ, correspondendo às concentrações de 0,4, 0,8 e 2,0 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Após o preparo da amostra, realizou-se a medida da absorbância.

Para efeito de cálculo, os resultados obtidos na análise foram denominados de valor obtido (C1), e o valor da fortificação da amostra foi o valor real (C3). Os valores de recuperação foram obtidos empregando a Equação 5.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

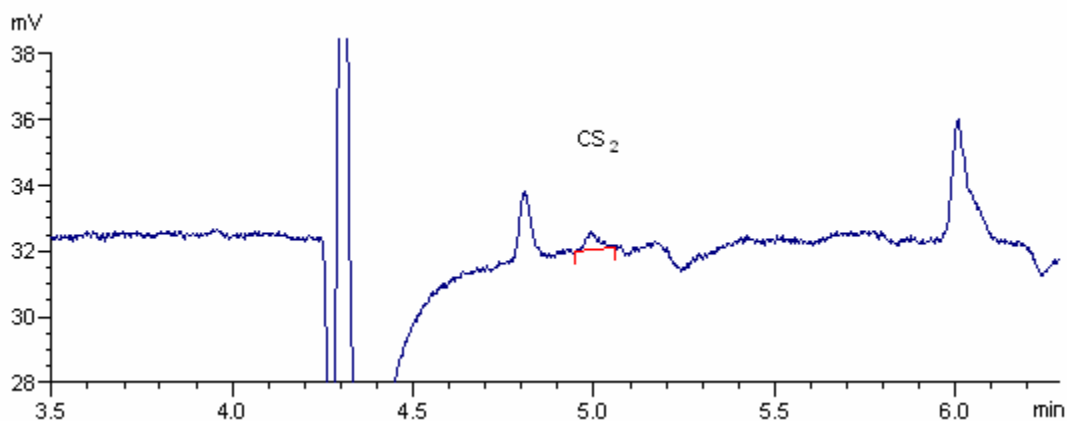
As condições, selecionadas para os métodos cromatográficos e espectrofotométrico, descritas nos itens 3.14 e 3.16, respectivamente, foram satisfatórias para determinar ditiocarbamatos na forma de CS<sub>2</sub>.

### **4.1 Avaliação da separação cromatográfica**

O tempo de retenção do CS<sub>2</sub> foi determinado conforme o item 3.13. Nos sistemas cromatográficos o tempo de retenção do CS<sub>2</sub> foi de 5,0 ± 0,02 min. Com tempo total de análise de 21,5 min, necessário para limpar o sistema.

### **4.2 Análise dos solventes e reagentes**

A análise dos solventes e reagentes foi realizada conforme o item 3.7. Para os sistemas GC-FPD e GC-MS, apesar da presença de outros picos nos cromatogramas, não se encontrou nenhum pico no tempo de retenção do CS<sub>2</sub>, independentemente de se utilizar água da torneira ou água do Milli-Q<sup>®</sup>. Entretanto, no sistema GC-ECD para ambas as análises (água da torneira e do Milli-Q<sup>®</sup>) pôde-se observar a presença de interferentes, no mesmo tempo de retenção do CS<sub>2</sub>, conforme apresentado na Figura 7. Assim, nos estudos de fortificação e recuperação do analito por GC-ECD teve-se que subtrair o valor obtido na análise dos solventes e reagentes.

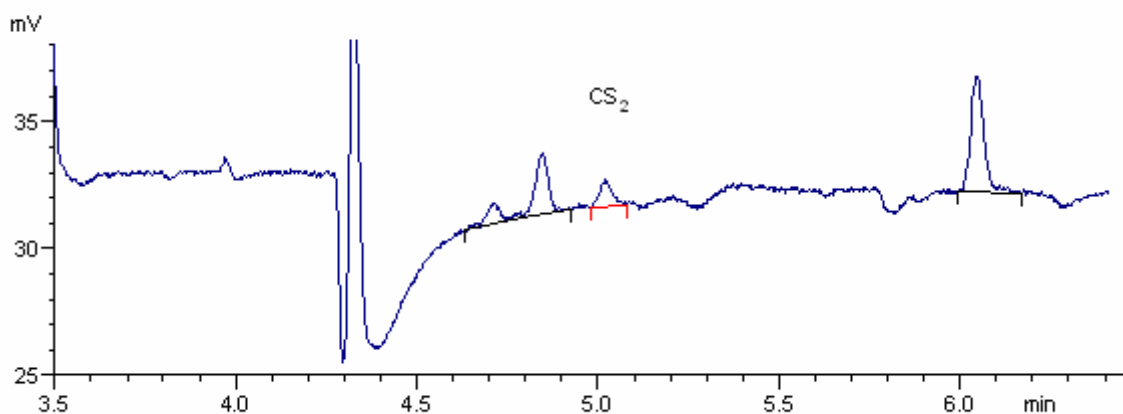


**Figura 7.** Cromatograma obtido por GC-ECD na análise do branco dos solventes e reagentes. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.1.

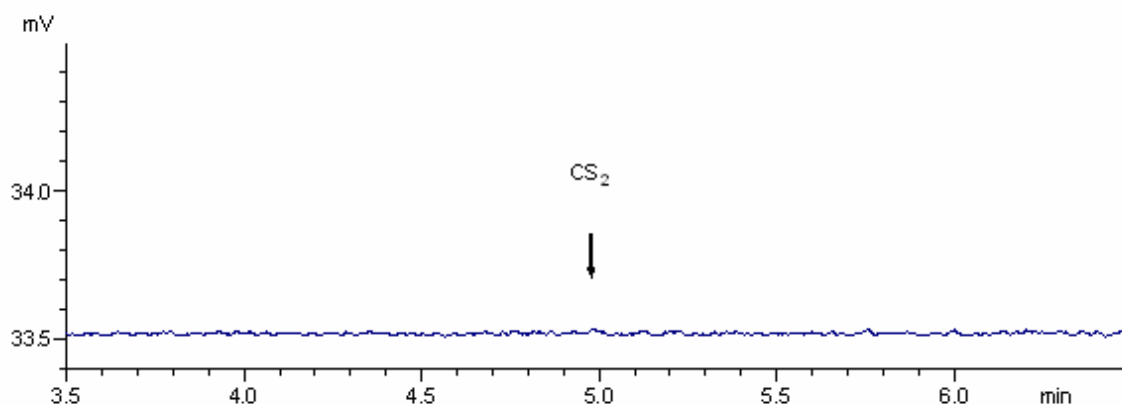
Os solventes e reagentes empregados no preparo da amostra do Método 2, apresentaram um valor de absorvância inferior ao LOD do método.

### 4.3 Avaliação das amostras para uso como amostra branco

As amostras de alface foram avaliadas para uso como amostra branco, conforme descrito no item 3.8. Os cromatogramas obtidos para as amostras branco dos sistemas GC-ECD e GC-FPD estão representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.



**Figura 8.** Cromatograma obtido por GC-ECD na análise da amostra branco. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.1.

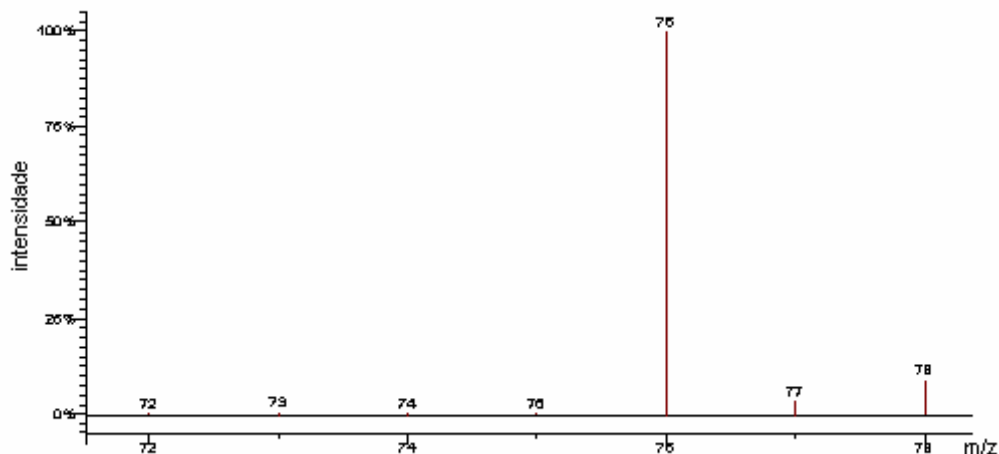


**Figura 9.** Cromatogramas obtido por GC-FPD na análise da amostra branco. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.2.

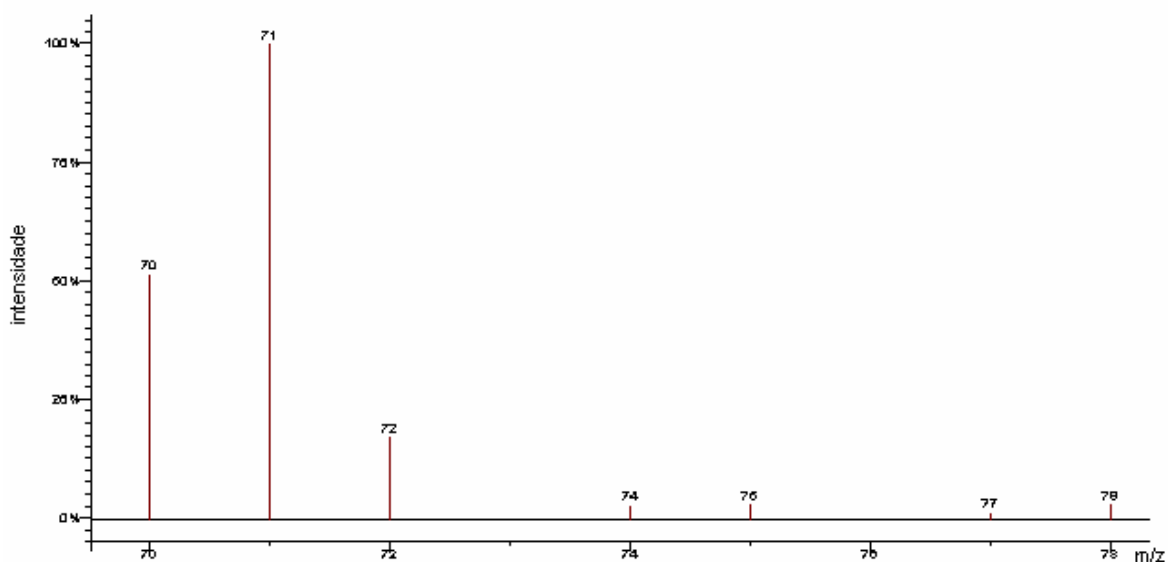
Observando a Figura 8, verifica-se que a amostra de alface utilizada como branco, apresentou picos em outros tempos de retenção bem como no tempo de retenção do  $\text{CS}_2$ , quando analisada por GC-ECD.

É interessante observar que o mesmo extrato quando analisado por GC-FPD (Figura 9) não apresentou nenhum sinal referente ao  $\text{CS}_2$ , o que levou a questionar a identidade do composto, ou seja, saber se o referido pico tratava-se realmente do  $\text{CS}_2$ . Assim, utilizou-se o sistema GC-MS na tentativa de determinar a identidade do composto interferente ou ao menos confirmar a identidade do pico presente no cromatograma da Figura 8 ( $t_R = 5,02$  min) como  $\text{CS}_2$ .

Nas Figuras 10 e 11 estão presentes os espectros de massas de uma solução analítica de CS<sub>2</sub> (4 mg L<sup>-1</sup>) e da amostra branco, respectivamente. A comparação entre essas duas figuras comprova que o pico com identidade questionada (Figura 8) realmente não se tratava do CS<sub>2</sub>, uma vez que não apresentou o íon m/z 76 (Figura 11) característico do CS<sub>2</sub> (Figura 10).



**Figura 10.** Espectro de massas obtido por GC-MS para solução analítica de CS<sub>2</sub> 4 mg L<sup>-1</sup>. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.3.



**Figura 11.** Espectro de massas obtido por GC-MS na análise da amostra branco. Condições cromatográficas descritas no item 3.14.3.

As amostras branco submetidas à análise espectrofotométrica, apresentaram valor médio de absorvância de 0,004, valor este inferior ao LOD do método. Assim, as amostras puderam ser utilizadas como branco, no presente estudo.

#### 4.4 Avaliação da estabilidade de mancozebe em solução

Na Tabela 9, tem-se a variação da concentração de CS<sub>2</sub> e o RSD% obtidos para a mesma solução, nos diferentes dias propostos pelo estudo, conforme item 3.9, e a resposta pelos sistemas GC-ECD e GC-FPD, na avaliação da estabilidade da referida solução.

**Tabela 9.** Variação da concentração média de CS<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>) e RSD% obtidos para a mesma solução analisada por GC-ECD e GC-FPD, nos diferentes dias do estudo. Preparo da amostra e condições cromatográficas descritas nos itens 3.11.1, 3.14.1 e 3.14.2, respectivamente.

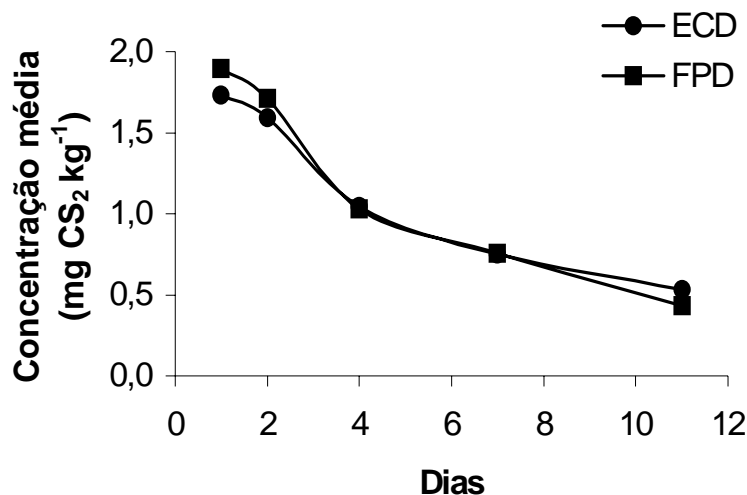
Dias	GC-ECD		GC-FPD	
	Concentração de CS <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	RSD%	Concentração de CS <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	RSD%
1°	1,73	4,2	1,90	1,5
2°	1,59	1,2	1,71	3,7
4°	1,05	0,9	1,03	2,2
7°	0,75	2,3	0,75	2,1
11°	0,53	7,2	0,43	3,6

Concentração teórica: 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>

n= 6 (6 procedimentos de extração realizados em cada dia do estudo)

Observou-se que a resposta nos dois detectores é bastante similar. Verificou-se que a solução de mancozebe do dia do preparo (1° dia) para o dia seguinte (2° dia) apresentou um decréscimo na concentração de aproximadamente 10%.

Na Figura 12, pode-se visualizar a resposta nos dois detectores utilizados, em relação à concentração, em cada dia do estudo.



**Figura 12.** Concentração média encontrada (n= 6) em cada dia do estudo da estabilidade da solução de mancozebe. Condições cromatográficas nos itens 3.13.1 e 3.13.2

Verificou-se que a maior parte da solução é degradada nos 4 primeiros dias após o preparo da solução, onde ocorre um decréscimo na concentração em torno de 45%. Observou-se, também, que em apenas 11 dias a solução apresentava somente 30% da concentração inicial.

Os resultados obtidos estão de acordo com as observações de VRYZAS *et al.* (2002), onde os princípios ativos mancozebe e ziram, da classe dos ditiocarbamatos, apresentam alta instabilidade em solução.

#### 4.5 Avaliação da estabilidade do complexo CS<sub>2</sub>, cobre e dietanolamina

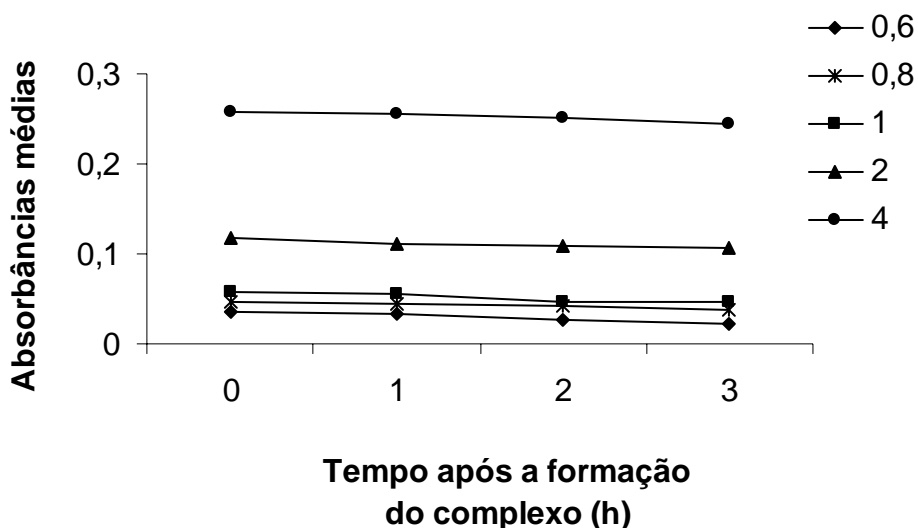
A estabilidade do complexo formado entre CS<sub>2</sub>, cobre e dietanolamina foi verificada conforme item 3.10. A média das absorvâncias de cada uma das 5 soluções analíticas em função do tempo, no estudo proposto, está destacada na Tabela 10.

**Tabela 10.** Valores das médias das absorvâncias para as diferentes concentrações das soluções analíticas, em relação ao tempo, após a formação do complexo, conforme item 3.10.

Concentração (mg CS <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	Absorvâncias médias			
	Logo após o preparo	Após 1 h	Após 2 h	Após 3 h
0,6	0,0356	0,0337	0,0261	0,0228
0,8	0,0468	0,0436	0,0418	0,0378
1,0	0,0577	0,0558	0,0467	0,0465
2,0	0,1173	0,1117	0,1098	0,1067
4,0	0,2578	0,2548	0,2502	0,2453

(n = 6)

A dispersão de todos os valores de absorvância obtidos em relação aos tempos, após a formação do complexo, para as 5 concentrações de CS<sub>2</sub> em estudo, está representada na Figura 13.



**Figura 13.** Dispersão de todos os valores de absorvâncias encontrados, para os 5 níveis de concentração, em mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, nos diferentes tempos após a formação do complexo.



Mesmo observando um suave decréscimo nos valores de absorvância de todas as soluções analíticas, percebe-se que o complexo formado é relativamente estável nos diferentes tempos estudados, mesmo quando conservado à temperatura ambiente e sob luminosidade.

#### **4.6 Comparação entre os procedimentos de extração dos métodos 1 e 2**

Conforme descrito no item 3.11 verifica-se que o procedimento de extração para o Método 1 é muito mais simples quando comparado com o do Método 2.

Através da Figura 6 observa-se que o sistema utilizado para o procedimento de extração do Método 2 é mais complexo, sendo necessário um prévio treinamento do analista para não ocorrer problemas durante o procedimento de extração. No Método 1, além da praticidade de utilizar somente um frasco de vidro para a extração da amostra, é possível a extração de várias amostras concomitantemente, pois o limitante é a quantidade de frascos que o banho de água permite. Este número é em geral de 8, 10, 12 e até 15 frascos ao mesmo tempo.

#### **4.7 Ensaio de recuperação de amostras fortificadas**

Para o preparo da amostra, testaram-se dois procedimentos, conforme item 3.11. A média dos percentuais de recuperação para as fortificações realizadas em duplicata, no nível de concentração de  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ , para cada um dos sistemas empregados estão na Tabela 11.

**Tabela 11.** Percentuais médios de recuperação para folhas de alface picadas ou processadas, no nível de fortificação de  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ , para cada um dos sistemas empregados, conforme o item 3.11 e condições nos itens 3.14 e 3.16.

Sistema empregado	Folhas picadas		Folhas processadas	
	Recuperação %	RSD%	Recuperação %	RSD%
GC-ECD	55,9	0,3	110,8	2,5
GC-FPD	58,5	5,0	92,8	1,3
Espectrofotometria UV-visível	78,7	1,0	87,0	2,5

(n= 2)

Verificou-se que os melhores percentuais de recuperação foram obtidos ao utilizar as folhas homogeneizadas (Tabela 11). Assim, todos os ensaios de fortificação e recuperação foram realizados utilizando as folhas homogeneizadas.

#### 4.8 Validação dos métodos cromatográficos

Empregando-se as condições cromatográficas citadas no item 3.14, avaliaram-se os métodos cromatográficos. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

##### 4.8.1 Curva analítica e linearidade

A Tabela 12 apresenta a inclinação (a), a interseção (b) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) das curvas analíticas, obtidas para as soluções analíticas de concentração 0,08; 0,1; 0,2; 0,8 e 2,0  $\text{mg CS}_2 \text{ L}^{-1}$  analisadas por GC-ECD, GC-FPD e GC-MS.

**Tabela 12.** Parâmetros das curvas analíticas obtidas na faixa de 0,08 a 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, nas condições cromatográficas do item 3.14.

Sistema cromatográfico	a	b	r <sup>2</sup>
GC-ECD	19,908	1,194	0,996
GC-FPD	20,207	0,228	1,000
GC-MS	9009,4	65,865	0,999

De acordo com as equações obtidas para as curvas analíticas, os métodos apresentaram resposta linear, pois o coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>) é maior que 0,99, considerado excelente para a análise de resíduos (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996).

No presente trabalho, considerou-se como faixa linear os pontos com valores de (S/Q)<sub>i</sub> no intervalo (1,0 ± 0,05 a), ou seja, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais de 5% do coeficiente angular (a) da reta. Os cálculos estão apresentados no Apêndice 5.

#### 4.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 13 apresenta os valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método. Os resultados foram obtidos segundo os procedimentos descritos no item 3.15.2.

**Tabela 13.** Resultados de LOD e LOQ, instrumental e do método, obtidos para o CS<sub>2</sub>, nos três sistemas cromatográficos, conforme condições descritas no item 3.14.

Sistema cromatográfico	Instrumental		Método	
	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )
GC-ECD	0,02	0,04	0,01	0,02
GC-FPD	0,02	0,04	0,01	0,02
GC-MS	0,02	0,04	0,01	0,02

Os valores de LOD e LOQ instrumentais foram considerados excelentes. Em virtude do método não apresentar nenhuma etapa de pré-concentração, os resultados encontrados para LOD e LOQ do método não puderam ser reduzidos. Mesmo assim, são considerados muito bons, levando-se em conta a complexidade da matriz analisada e os elevados valores de LMRs permitidos para ditiocarbamatos em alface pela União Européia (EU, 2005), *Codex Alimentarius* (FAO, 2005) e EUA (EPA, 2005) que são de 5, 10 e 9,2 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### **4.8.3 Repetitividade e precisão intermediária**

Os resultados dos estudos de precisão, em termos de repetitividade e precisão intermediária do instrumento e do método, estão descritos a seguir. A Tabela 14 apresenta a precisão em termos de repetitividade (RSD<sub>ri</sub>) e de precisão intermediária do instrumento (RSD<sub>pri</sub>) para a resposta, em termos de área, das soluções analíticas de CS<sub>2</sub> nas referidas concentrações. Os dados de repetitividade (RSD<sub>rm</sub>) do método estão na Tabela 15.

**Tabela 14.** Resultados de precisão, em termos de repetitividade ( $RSD_{ri}$ ) e de precisão intermediária do instrumento ( $RSD_{pii}$ ), baseado nas áreas obtidas para três níveis de concentração. Condições conforme item 3.14.

Sistema cromatográfico	Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$RSD_{ri}$ (%)	$RSD_{pii}$ (%)
GC-ECD	0,1	7,7	3,2
	0,2	7,6	3,3
	2,0	5,0	5,3
GC-FPD	0,1	14,6	11,2
	0,2	14,6	10,0
	2,0	11,9	3,1
GC-MS	0,1	1,2	3,2
	0,2	2,8	4,7
	2,0	6,7	4,2

Os resultados, em termos de repetitividade e precisão intermediária, obtidos para o instrumento e para o método são aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos (RIBANI, 2004), onde a precisão para valores de área deve ser  $\leq 15\%$ .

#### 4.8.4 Recuperação

A Tabela 15 apresenta os valores de recuperação, com o respectivo  $RSD_{rm}\%$ , para fortificações em dois diferentes níveis de concentração. Os resultados de recuperação do  $\text{CS}_2$ , empregando curva analítica, são satisfatórios para ambas concentrações, pois estão dentro dos valores aceitos, conforme descrito na literatura para métodos cromatográficos aplicados para determinação de pesticidas (GARP, 1999), os quais devem estar entre 70 e 120%, com valores de RSD de até  $\pm 20\%$ .

**Tabela 15.** Valores médios de recuperação e RSD%, em 2 níveis de fortificação, para os sistemas GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, conforme condições descritas no item 3.14.

Sistema cromatográfico	Fortificação (mg kg <sup>-1</sup> )	Recuperação média %	RSD <sub>m</sub> %
GC-ECD	0,05	88,9	15,9
	0,4	107,4	2,8
GC-FPD	0,05	93,9	9,6
	0,4	92,8	5,0
GC-MS	0,05	94,0	9,7
	0,4	94,7	8,1

n= 6 (6 extrações e 1 injeção cada)

#### 4.9 Validação do método espectrofotométrico

Além dos métodos cromatográficos, neste estudo validou-se também o método espectrofotométrico proposto por KEPPEL (1971) e otimizado por PIZZUTTI *et al.* (2002). Avaliou-se o método segundo os parâmetros descritos a seguir e os resultados obtidos estão apresentados neste item.

##### 4.9.1 Curva analítica e linearidade

A Tabela 16 apresenta a inclinação (a), a interseção (b) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) das curvas analíticas, obtidas para as soluções analíticas analisadas espectrofotometricamente (item 3.16), nas seguintes concentrações 0,44; 0,67; 1,11; 2,23; 4,45; 6,68 e 8,89 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

**Tabela 16.** Parâmetros das curvas analíticas obtidas para o CS<sub>2</sub> nas concentrações descritas na Tabela 7.

Intervalo linear (mg CS <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	a	b	r <sup>2</sup>
0,44 a 2,23	0,0511	-0,0191	0,9955
2,23 a 8,89	0,0716	0,0699	0,9995

Os coeficientes de determinação (r<sup>2</sup>) encontrados são maiores que 0,99, o qual é considerado excelente e permite a análise de resíduos (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996).

#### 4.9.2 Limite de detecção e limite de quantificação

A Tabela 17 apresenta os valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método. Os resultados foram obtidos segundo os procedimentos descritos no item 3.17.2.

**Tabela 17.** Resultados de LOD e LOQ, instrumental e do método, obtidos conforme condições descritas no item 3.16.

	LOD	LOQ
Instrumental (mg CS <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	0,44	0,67
Método (mg CS <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )	0,28	0,40

Os resultados encontrados para LOD e LOQ são excelentes e permitem a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface, por Espectrofotometria UV-visível, em níveis adequados.

#### 4.9.3 Repetitividade e precisão intermediária

Os resultados dos estudos de precisão, em termos de repetitividade e precisão intermediária do instrumento e do método, estão descritos no item 3.17.3. A Tabela 18 apresenta a precisão em termos de repetitividade ( $RSD_{ri}$ ) e de precisão intermediária do instrumento ( $RSD_{pii}$ ) para a resposta, em termos de absorvância, das soluções analíticas de  $CS_2$  nas referidas concentrações. Os dados de repetitividade ( $RSD_{rm}$ ) do método estão na Tabela 19.

**Tabela 18.** Resultados de precisão, em termos de repetitividade ( $RSD_{ri}$ ) e de precisão intermediária do instrumento ( $RSD_{pii}$ ), baseado nas absorvâncias obtidas para solução analítica. Condições conforme item 3.16.

Concentração (mg $CS_2$ L <sup>-1</sup> )	$RSD_{ri}$ (%)	$RSD_{pii}$ (%)
0,6	9,1	8,8
1,0	3,5	4,7
4,0	7,5	2,0

Os resultados, em termos de repetitividade e precisão intermediária, obtidos para o instrumento são aceitáveis, uma vez que estão dentro do limite recomendado pela literatura (GARP, 1999), onde a precisão deve apresentar valores  $\leq 15\%$ .

#### 4.9.4 Recuperação

A Tabela 19 apresenta os valores de recuperação, com o respectivo RSD%, para fortificações em três diferentes níveis de concentração.



**Tabela 19.** Valores médios de recuperação e  $RSD_{rm}\%$ , em 3 níveis de fortificação, por Espectrofotometria UV-visível, conforme condições descritas no item 3.16.

Fortificação (mg CS <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> )	Recuperação média %	RSD <sub>rm</sub> %
0,4	87,7	9,7
0,8	94,2	6,9
2,0	94,0	6,0

n= 6 (6 extrações cada nível)

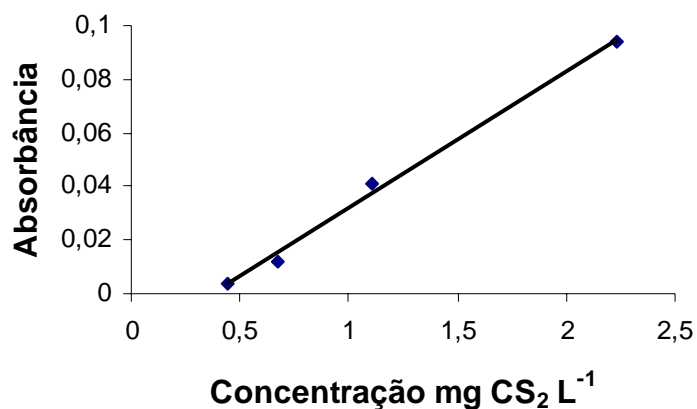
Os resultados de recuperação do CS<sub>2</sub> obtidos foram excelentes para os 3 níveis de concentração, pois estão dentro dos valores aceitos pela literatura (GARP, 1999), os quais devem estar entre 70 e 120%, com valores de RSD de  $\pm$  20%.

#### 4.10 Comparação entre os métodos cromatográficos e espectrofotométrico

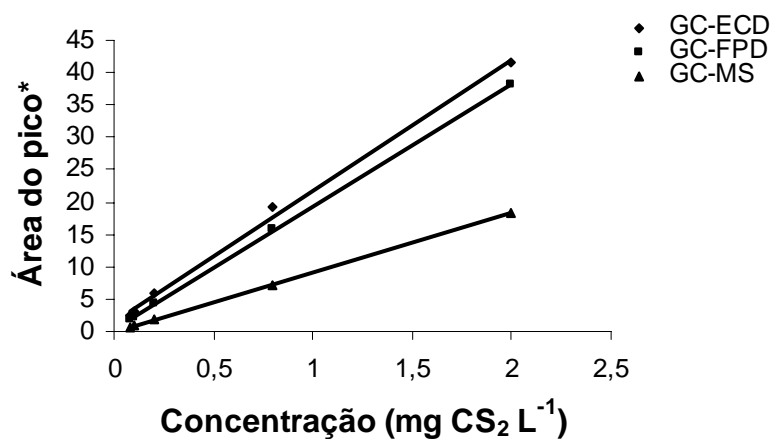
Através dos resultados expostos nesse trabalho podem-se comparar os métodos cromatográficos e espectrofotométricos baseado nos parâmetros seguintes.

##### 4.10.1 Curva analítica e linearidade

Todos os métodos estudados foram lineares nas faixas de concentração estudadas. Nas Figuras 14 e 15 têm-se a representação das curvas analíticas obtidas para o método espectrofotométrico e para os sistemas GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, respectivamente.



**Figura 14.** Curva analítica obtida por Espectrofotometria UV-vísivel para soluções analíticas na faixa de concentração de 0,44 a 2,23 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Condições do item 3.16.



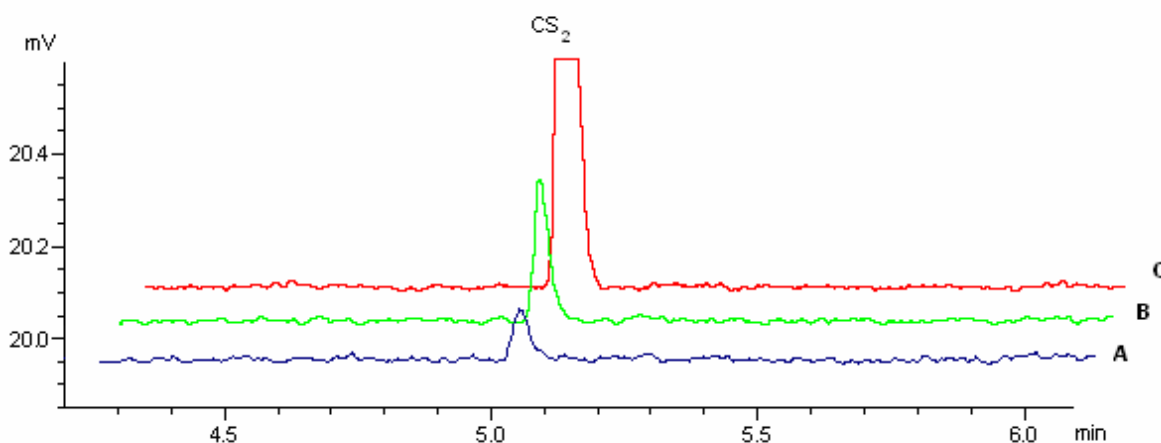
\* raiz quadrada da área para GC-FPD

**Figura 15.** Curva analítica obtida por GC-ECD, GC-FPD e GC-MS para soluções analíticas na faixa de concentração de 0,08 a 2,0 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Condições do item 3.14.

#### 4.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os LODs e LOQs determinados para os métodos estudados foram considerados excelentes. Os métodos cromatográficos mostraram-se 10 vezes mais sensíveis que o espectrofotométrico.

Na Figura 16 tem-se um cromatograma obtido por GC-FPD onde estão demonstrados os sinais obtidos nas análises das soluções analíticas de CS<sub>2</sub>, correspondentes ao LOD (A) e LOQ (B) do instrumento, e para o nível de concentração 0,1 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (C), da curva analítica.



**Figura 16.** Cromatograma obtido por GC-FPD nas análises das soluções analíticas de CS<sub>2</sub>, correspondentes ao LOD (A) e ao LOQ (B) do instrumento, e para o nível de concentração 0,1 mg CS<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (C). Condições cromatográficas descritas no item 3.14.2.

#### 4.10.3 Repetitividade

A precisão dos métodos propostos foi verificada em termos de repetitividade.

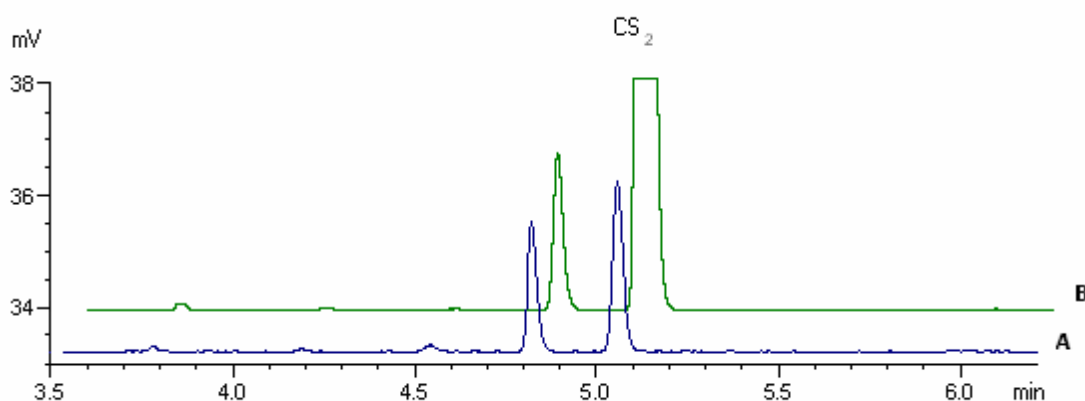
Todos os valores encontrados foram satisfatórios. Entre os métodos cromatográficos, o GC-ECD foi o que apresentou os resultados mais diferentes, isto é, o menor e o maior valor de RSD<sub>rm</sub>%.

Para o nível de fortificação  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  o método espectrofotométrico foi o que apresentou maior  $\text{RSD}_{\text{m}}\%$  (9,7), provavelmente devido ao fato desta concentração estar próxima ao LOQ do Método 2.

#### 4.10.4 Recuperação

Os percentuais de recuperação encontrados, para todos os níveis de fortificação estudados, foram excelentes e demonstram a exatidão dos métodos 1 e 2.

O cromatograma obtido por GC-FPD para as amostras fortificadas nos níveis de concentração  $0,05$  (A) e  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  (B) está apresentado na Figura 17.



**Figura 17.** Cromatograma obtido por GC-FPD para as amostras fortificadas nos níveis de concentração  $0,05$  (A) e  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  (B). Condições cromatográficas descritas no item 3.14.2.

Em relação as amostras fortificadas ao nível de  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ , o método espectrofotométrico apresentou valores médios de recuperação (87,7%) similares aos dos métodos cromatográficos, os quais ficaram na faixa de 92,8 a 107,4%.

Os resultados obtidos na validação dos métodos cromatográficos e espectrofotométrico foram comparados e avaliados através do teste t pareado, com nível de confiança de 95%, utilizando o software Minitab® Release 14

(Apêndice 6). Para os métodos cromatográficos, no nível de fortificação 0,05 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, verificou-se que os resultados foram concordantes. Observou-se ainda que não houve diferença significativa entre os resultados de todos os métodos no nível de fortificação de 0,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, com exceção do método que emprega GC-ECD.

## 4 CONCLUSÕES

O desenvolvimento e a validação de métodos para determinação de resíduos de pesticidas são de grande importância, a fim de garantir alimentos mais seguros para os consumidores.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que os métodos cromatográficos e espectrofotométrico estudados são eficientes e exatos, considerando-se os percentuais de recuperação obtidos (na faixa de 87,7 a 107,4%) e precisos, considerando-se os estudos de repetitividade e precisão intermediária (RSD inferior a 20%), para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface, por meio da quantificação na forma de CS<sub>2</sub>.

Os parâmetros avaliados durante a etapa de validação do método apresentaram valores muito bons, correspondendo aos valores sugeridos pela literatura específica para a análise de resíduos de pesticidas. É importante ressaltar que o processo de validação exige um envolvimento bastante intenso, mas a validade dos dados obtidos é proporcional à qualidade do processo de obtenção dos mesmos.

Os métodos cromatográficos apresentam pontos a serem destacados em relação ao método espectrofotométrico como:

- o fato de utilizar reagentes com menor toxicidade (para a determinação espectrofotométrica de ditiocarbamatos, emprega-se acetato de chumbo e acetato de cobre, dois metais reconhecidamente tóxicos);
- rapidez e baixo custo operacional, uma vez que é possível realizar, em média, 30 análises/dia, ao passo que pelo método espectrofotométrico, a média é em torno de 3 análises/dia;
- sensibilidade 20 vezes melhor que a do método espectrofotométrico, pois a partir de uma concentração de 0,02 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>, na amostra, já é possível a quantificação destes fungicidas. Em contrapartida, no método

espectrofotométrico somente valores acima de  $0,4 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$  podem ser quantificados.

Os métodos cromatográficos apresentaram os mesmos valores para LOD e LOQ quando comparados entre si. Em relação aos ensaios de fortificação e extração, os três métodos apresentaram excelentes percentuais de recuperação. Os valores encontrados pelo sistema GC-ECD apresentaram valores um pouco diferentes em comparação com os sistemas GC-FPD e GC-MS, que apresentaram praticamente os mesmos valores de recuperação. Além disso, os maiores valores de RSD% foram encontrados para o sistema GC-ECD.

Devido aos elevados custos de um equipamento GC-MS, a melhor opção para a determinação de ditiocarbamatos por GC seria o emprego de um sistema GC-FPD, o qual é altamente seletivo para compostos contendo enxofre. No entanto, se um laboratório precisa realizar a análise de diferentes pesticidas, empregando apenas um equipamento, o sistema GC-ECD seria a opção de escolha.

Considerando os Limites Máximos de Resíduos (LMR's) estabelecidos pela União Européia, *Codex Alimentarius* e EUA de 5, 10 e  $9,2 \text{ mg CS}_2 \text{ kg}^{-1}$ , respectivamente, observa-se que o método espectrofotométrico validado, permite a análise de resíduos de ditiocarbamatos em alface com sensibilidade suficiente para detectar e quantificar concentrações bem menores que as estabelecidas. Entretanto, segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), não é mais permitido o uso de ditiocarbamatos para alface no Brasil, assim sendo, faz-se necessário empregar métodos mais sensíveis, como a Cromatografia Gasosa, para tais análises.

Assim, a Cromatografia Gasosa surge como uma alternativa na determinação de resíduos de ditiocarbamatos, em diversas matrizes, justamente por apresentar os requisitos necessários para uma análise rápida e com recursos capazes de confirmar a identidade destes resíduos.

## 5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar os métodos estudados na determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface hidropônica e em amostras adquiridas em feiras-livres (convencionais e agroecológicas), supermercados e minimamente processadas, bem como, em diversas outras culturas, como maçã, uva e manga, de consumo amplo e de interesse para exportação.
- Validar os métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em mamão inteiro e nas diferentes partes como: casca, polpa e sementes (trabalho já iniciado);
- Realizar testes para o preparo da amostra do método 1 em relação a:
  - Redução da quantidade de amostra empregada, testando 10 e 25 g;
  - volume de solventes utilizados, testando volumes menores;
  - tempo de extração, como 30, 45 e 90 min;
- Desenvolvimento de método para determinação de metabólitos dos ditiocarbamatos altamente tóxicos, como ETU, em água, frutas e hortaliças (trabalho já iniciado).



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, S., AGGARWAL, S. G., SINGH, P., **Talanta**, v. 65, p. 104-110, 2005.

AMANTE, E. R., TEIXEIRA, E., MEINERT, E. M., *et al.*, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23 (3), p. 418-426, 2003.

AMBIENTE BRASIL. **Agrotóxicos.** Disponível em:  
<<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/agrotoxicos.html>> Acesso em: 18 jul. 2005.

ARAÚJO, W. A., **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em amostras de água empregando-se GC-ECD e HSA-SPME-GC-FPD**, Dissertação de Mestrado, São Carlos, USP, 2001., 109 p.

BAUGH, P. J., **Gas Chromatography: a Pratical Approach**, New York, Oxford University Press, EUA, 1993, 258 p.

BLASCO, C.FONT, G., PICÓ, Y., **J. Chromatogr. A**, v. 1028, p. 267-276, 2004.

BLISKA Jr, A., **Alface (*Lactuca Sativa L.*): distintos sistemas de produção, conservação e avaliação pós colheita**, Dissertação de Mestrado, Campinas, UNICAMP, 1998. 103 p.

BLUME, E.; REICHERT, J. M., Destino de pesticidas no ambiente agrícola. In: **IV Seminário de Produção Integrada de Frutas**, De MELO, G. W. B., SEBBEN, S. S. (Eds.), anais, 110 p, Bento Gonçalves, 2002.

BOHRER, D., NASCIMENTO, P. C., GOMES, H. M., **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 212-216, 1999.

BRASIL. **Resolução RE nº 165**, de 29 de agosto de 2003. ANVISA.

\_\_\_\_\_. **Decreto nº 4.074**, de janeiro de 2002. Sistema de Informações sobre Agrotóxicos. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa).

BUHR, A.; GENNING, C.; SALTHAMMER, T., **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 367, p. 73-78, 2000.

CALDAS, E. D., CONCEIÇÃO, M. H., MIRANDA, M. C. C., *et al.*, **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 10, p. 4521-4525, 2001.

CALDAS, E. D., De SOUZA, L. C. K. R., **J. Public Health**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CALDAS, E. D., MIRANDA, M. C. C., CONCEIÇÃO, M. H., *et al.*, **Food and Chem. Toxic.**, v. 42, p. 1877-1883, 2004.

CAUSON, R., **J. Chromatogr. B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CERESER, C., BOGET, S., PARVAZ, P., *et al.*, **Toxicology**, v. 162, p. 89-101, 2001.

CHASIN, A. A., NASCIMENTO, E. S., RIBEIRO-NETO, L.M., *et al.* **Rev. Brasil. Toxicol.**, v. 11, p. 1-6, 1998.

CLARKE, D. G., BAUM, H, STALEY, E. L., HESTER, W. F., **Anal. Chem.**, v. 23, n. 12, p. 1842-1846, 1951.

CLIFTON, E. M., In: **Pesticides Laboratory Training Manual**, MELOAN, C. E. (Ed.), AOAC International, Gaithersburg, Maryland, EUA, 484 p., 1996.

COLDWELL, M. R., PENGELLY, I., RIMMER, D. A., **J. Chromatogr. A**, v. 984, p. 81-88, 2003.

CULLEN, T. E., **Anal. Chem.**, v. 36, p. 221-224, 1964.

De KOK, A. & Van BODEGRAVEN, P., In: **4th European Pesticide Residues Workshop - Pesticides in Food and Drink**, anais, 319 p., Roma, 2002.

DGPC. **Resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal**. Direção Geral de Proteção das Culturas, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Portugal. Disponível em: <[http://www.dgpc.minagricultura.pt/fitofarmaceuticos/Residuos/residuos\\_de\\_pesticidas\\_95-97](http://www.dgpc.minagricultura.pt/fitofarmaceuticos/Residuos/residuos_de_pesticidas_95-97)>. Acesso em: 14 jul. 2005.

EMBRAPA. **Informativos**. Disponível em: <<http://cnpma.embrapa.br/informativo/index.php3>>. Acesso em: 07 jul. 2005.

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, 2001, 38 p.

EPA. **Pesticides**. Disponível em: <[http://www.acess.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_04/40cfr180\\_04.html](http://www.acess.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_04/40cfr180_04.html)>

ERICKSON, B., **Anal. Chem.**, suplemento, p. 101-124, 1999.

ETTRE, L. S. **Pure & Appl. Chem.**, v. 65, n. 4, p. 819-872, 1993.

EU. **Maximum Residue Limits of Pesticides in the European Union**. Disponível em: <[http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm)>. Acesso em: 06 jul. 2005.

FAO. **Maximum Residues in Food**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/pestdes/jsp/collections>>. Acesso em: 06 jul. 2005.

GARCINUÑO, R. M., RAMOS, L., FERNÁNDEZ-HERNANDO, P., *et al.*, **J. Chromatogr. A**, v. 1041, p. 35-41, 2004 a.

GARCINUÑO, R. M., FERNÁNDEZ-HERNANDO, P., CÁMARA, C., **J. Chromatogr. A**, v. 1043, p. 225-229, 2004 b.

GARP, **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**, 1999. p. 40-79.

GUSTAFSSON, K. H., THOMPSON, R. A., **J. Agric. Food Chem.**, v. 29, p. 729-732, 1981.

HILL, A. R. C., Headspace methods for dithiocarbamates. In: **Moderns Methods for Pesticides Analysis. Emerging Strategies for Pesticide Analysis**. CAIRNS, T., SHERNA, J. (Eds.), CRC Press, London, p. 213-231, 1992.

HOWARD, S. F., YIP, G., **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 54, p. 1371-1372, 1971.

INMETRO. **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. Revisão 01, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IRTH, H., JONG, G. J., FREI, R. W., *et al.*, **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 39, p. 129-139, 1990.

KEPPEL, G. E., **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 54, p. 528-532, 1971.

KESARI, R., GUPTA, V. K., **Talanta**, v. 45, p. 1097-1102, 1998.

KSHEERASAGAR, R. L., KALIWAL, B. B., **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 15, p. 9-17, 2003.

KUBO, H., TSUDA, Y., YOSHIMURA, Y., *et al.*, **Anal. Chim. Acta**, n. 494, p. 49-53, 2003.

LANÇAS, F. M., **Cromatografia em Fase Gasosa**, São Paulo: Ed. Acta, 254 p., 1993.

LARA, W. H., BATISTA, G. C., **Quím. Nova**, v. 15, n. 2, p. 161-166, 1992.

LARINI, L., **Toxicologia dos praguicidas**, São Paulo: Ed. Manole, 1999, 230 p.

LEE, A. W. M., CHAN, W. F., YUEN, F. S. Y., *et al.*, **Anal. Chim. Acta**, n. 339, p. 123-129, 1997.

LO, C., HO, M., HUNG, M., **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 2720-2723, 1996.

LOPES, S. J., **Modelos referentes à produção de sementes de alface sob hidroponia**, Tese de Doutorado, Piracicaba, USP, 2002. 129 p.

MALIK, A. K., SEIDEL, B. S., FAUBEL, W., **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 5808-5811, 2000.

MARQUES, P. A. A., BALDOTTO, P. V., SANTOS, A. C. P., *et al.*, **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 649-651, 2003.

MATHEW, L., REDDY, M. L. P., RAO, T. P., *et al.*, **Talanta**, v. 43, p. 73-76, 1996.

MCLEOD, H. A., RITCEY, W. R., **Analytical Methods for Pesticide Residues in Food**, Department of National Health and Welfare, Ottawa, Canadá, 1973.

MEDEIROS, L. A. M., **Influência da fertirrigação em substratos no crescimento e desenvolvimento da alface (*Lactuca Sativa*) conduzida em estufa plástica**, Dissertação de Mestrado, Santa Maria, UFSM, 1999. 59 p.

MILES, C. J., ZHOU, M., **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 74, n. 2, P. 384-388, 1991.

MISTURA, C. M., **Validação de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas organoclorados em sedimentos do lago da barragem do capingüí, RS, empregando GC-ECD e GC-MS**, Dissertação de Mestrado, Santa Maria, UFSM, 2003, 208 p.

NASH, R. G., BEALL JUNIOR, M. L., **J. Agric. Food Chem.**, v. 28, p. 322-330, 1980.

PENA, M. F., AMARAL, E. H., Von SPERLING, E., *et al.*, **Rev. Ecotox. Meio Amb.**, v. 13, p. 37-44, 2003.

PERZ, R. C., Van LISHAUT, H., SCHWACK, W., **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 3, p. 792-796, 2000.

PILAU, F. G., **Intervalos entre irrigações na produção de alface hidropônica**, Dissertação de Mestrado, Santa Maria, UFSM, 2002. 88 p.

PIMENTEL, M. F., BARROS NETO, B., **Quím. Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PIZZUTTI, I. R., Da SILVA, R. C., MARTINS, D. M., *et al.*, In: **25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, anais, Poços de Caldas, 2002.

PIZZUTTI, I. R., Da SILVA, R. C., VARELI, C. S., *et al.*, In: **5<sup>th</sup> European Pesticide Residues Workshop - Pesticides in Food and Drink**, anais, 234 p., Estocolmo, 2004.

PLANTAS MEDICINAIS. Disponível em:  
<<http://www.agroecologia.com.br/ervasanta/plantas.htm>> Acesso em: 14 jul.  
2005.

QUEFFELEC, A-L., BOISDÉ, F., LARUE, J. P., *et al.*, **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 3, p. 1675-1680, 2001.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., *et al.*, **Quím. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROYER, A., MÉNAND, M., GRIMAUULT, A., *et al.*, **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2152-2158, 2001.

SANCHES, S. M., Da SILVA, C. H. T. P., De CAMPOS, S. X., *et al.*, **Rev. Ecotox. Meio Amb.**, v. 13, p. 53-58, 2003.

SANTOS, C. M. R., **Tratamento pré-germinativos e produção de mudas de alface em cultivo hidropônico**, Dissertação de Mestrado, Santa Maria, UFSM, 2000, 71 p.

SANTOS, S., REZENDE, M. O. O, LANDGRAF, M. D., *et al.*, **Anais Assoc. Bras. Quím.**, v. 50, p. 50-58, 2001.

SILVA, J. J. O., ALVES, S. R., MEYER, A., *et al.*, **J. Public Health**, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.

STERTZ, S. C., FREITAS, R. J. S., **Rev. Ecotox. Meio Amb.**, v. 13, p. 45-52, 2003.

THIER, H. P., ZEUMER, H., **Manual of Pesticide Residues Analysis**, v. 1, Ed. Weinheim, Alemanha, 1987, 353 p.

THORN, G. D., LUDWIG, R. A., **The dithiocarbamates and related compounds**, Amsterdã, Elsevier, 1962, 298 p.

TOMLIN, C. D. S., **The e-Pesticide Manual**, The British Crop Protection Council, versão eletrônica 3,0, 2004.

VRYZAS, Z., PAPADAKIS, E. N., PAPADOPOULOU-MORKIDOU, E., **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2220-2226, 2002.

VUIK, J., DINTER, R. V., VOS, H., **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 604-606, 1992.

WARE, G. W., **The Pesticide Book**, Califórnia: Thomson Publications, 1994, 384 p.

WHO, **Dithiocarbamate pesticides, ethilenethiourea and propilenethiourea: a general introduction**, Geneva, World Health Organization, 1988, 140 p.

WOODROW, J. E., SEIBER, J. N., FITZELL, D., **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 1524-1529, 1995.

ZHOU, Y., SHIE, F. S., PICCARDO, P., *et al.*, **Neuroscience**, v. 128, p. 281-291, 2004.



## **8 APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

Dados técnicos dos princípios ativos pertencentes à classe dos ditiocarbamatos registrados no Brasil, dispostos em ordem alfabética

---

### Mancozebe

---

Nome químico (IUPAC).....	Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric) complex zinc salt
Sinonímia.....	Manzeb
Nº CAS.....	8018-01-7
Fórmula molecular.....	$[C_4H_6MnN_2S_4]_xZn_y$
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida, acaricida
Classificação toxicológica.....	III - mediamente tóxico
Massa molecular ( $g\ mol^{-1}$ ).....	271,2
Ponto de fusão ( $^{\circ}C$ ).....	137,8
Densidade a 22 $^{\circ}C$ ( $g\ cm^{-3}$ ).....	1,92
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 $^{\circ}C$ )...	6,2 $mg\ L^{-1}$
Solubilidade em solventes orgânicos....	Insolúvel na maioria dos solventes orgânicos; dissolve-se em solução com agentes quelantes
Estabilidade.....	Instável em ambientes úmidos
Formulações comerciais.....	Dithane M-45 (Dow AgroSciences); Manconex (Griffin); Sancozeb (Dow AgroSciences);
Persistência ambiental.....	Rápida degradação no meio ambiente por hidrólise, oxidação e fotólise

---

FONTES: TOMLIN (2004), BRASIL (2002)

---

## Manebe

---

Nome químico (IUPAC).....	Manganese ethylenebis (dithiocarbamate) (polymeric)
Nº CAS.....	12427-38-2
Fórmula molecular.....	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> MnN <sub>2</sub> S <sub>4</sub>
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	IV – pouco tóxico
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> ).....	265,3
Densidade a 22 °C (g cm <sup>-3</sup> ).....	1,92
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 °C)...	Insolúvel
Solubilidade em solventes orgânicos....	Insolúvel
Estabilidade.....	Estável à luz; instável a umidade e ar
Formulações comerciais.....	Dithane M-22 (Dow AgroSciences), Manzate (DuPont), Agroneb (AgroSan)
Persistência ambiental.....	Rapidamente degradado por hidrólise, oxidação e fotólise

---

FONTES: TOMLIN (2004), BRASIL (2002)

---

## Metiram

---

Nome químico (IUPAC).....	Polymeric zinc propylenebis (dithiocarbamate)
Sinonímia.....	Metirame zinc
Nº CAS.....	9006-42-2
Fórmula molecular.....	[C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> N <sub>11</sub> S <sub>16</sub> Zn <sub>3</sub> ] <sub>x</sub>
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	III – mediamente tóxico
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> ).....	1088,7
Ponto de fusão (°C).....	Não inflamável
Densidade a 22 °C (g cm <sup>-3</sup> ).....	1,860
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 °C)...	Insolúvel
Solubilidade em solventes orgânicos....	Praticamente insolúvel em solventes orgânicos; solúvel em piridina, mas com decomposição
Estabilidade.....	a 30 °C (decomposição pela luz)
Formulações comerciais.....	Polyram DF (BASF)
Persistência ambiental.....	DT <sub>50</sub> no solo de 2,7 dias

---

FONTES: TOMLIN (2004), BRASIL (2002)

---

## Propinebe

---

Nome químico (IUPAC).....	Polymeric zinc 1,2-propylenebis (dithiocarbamate)
Nº CAS.....	12071-83-9
Fórmula molecular.....	(C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Zn) <sub>x</sub>
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Etilenobisditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	III - Medianamente tóxico
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> ).....	289,8
Densidade a 22 °C (g cm <sup>-3</sup> ).....	1,813
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 °C)...	0,01 g L <sup>-1</sup>
Solubilidade em solventes orgânicos....	Tolueno, hexano e diclorometano < 0,1 g L <sup>-1</sup>
Estabilidade.....	Instável à umidade
Formulações comerciais.....	Antracol (Bayer CropScience)
Persistência ambiental.....	Degradação muito rápida

---

FONTES: TOMLIN (2004), BRASIL (2002)

---

## Tiram

---

Nome químico (IUPAC).....	Tetramethylthiuram disulfide
Sinonímia.....	Thirame, thiuram, TMTD, TMTDS
Nº CAS.....	137-26-8
Fórmula molecular.....	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub>
Grupo químico.....	Ditiocarbamato
Sub-grupo químico.....	Dimetilditiocarbamato
Classe.....	Fungicida
Classificação toxicológica.....	II - Altamente tóxico
Massa molecular (g mol <sup>-1</sup> ).....	240,4
Ponto de fusão (°C).....	Não inflamável
Densidade a 22 °C (g cm <sup>-3</sup> ).....	1,29
Solubilidade em água (pH 7,5; 25 °C)...	18 mg L <sup>-1</sup>
Solubilidade em solventes orgânicos....	À temperatura ambiente: etanol < 10; acetona: 80; clorofórmio: 230 A 20 °C: hexano: 0,04; diclorometano: 170; tolueno: 18
Estabilidade.....	Instável em meio ácido
Formulações comerciais.....	Ceku TMTD (Cequisa); Pomarsol (Bayer CropScience)
Persistência ambiental.....	Degradação e incorporação dos constituintes naturalmente pelas plantas

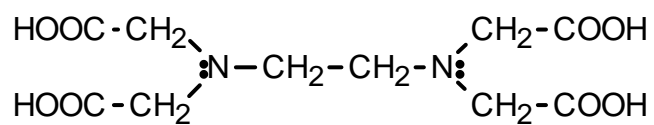
---

FONTES: TOMLIN (2004), BRASIL (2002)

## APÊNDICE 2

### Estrutura química do EDTA e formação de complexos

Etilenodiaminotetracético (EDTA) é um ligante hexadentado capaz de coordenar-se com íons metálicos através de dois átomos de nitrogênio e mais quatro grupos carboxílicos. Dependendo do pH do meio, o EDTA poderá perder até quatro hidrogênios. Para que isto ocorra o pH deve ser fortemente alcalino.



**Figura 1.** Estrutura química do EDTA.

### APÊNDICE 3

#### Dados técnicos da dietanolamina

---

<b>Dietanolamina</b>	
Sinóníma.....	2,2 dihidroxidietilamina
Fórmula molecular.....	$C_4H_{11}NO_2$
Grupo químico.....	Amina
Massa molecular ( $g\ mol^{-1}$ ).....	105,4
Ponto de fusão ( $^{\circ}C$ ).....	28
Ponto de ebulição ( $^{\circ}C$ ).....	264,4
Densidade a 28 $^{\circ}C$ ( $g\ cm^{-3}$ ).....	1,095
Solubilidade em água (20 $^{\circ}C$ ).....	solúvel
Persistência ambiental.....	Biodegradável
Uso.....	Adsorventes para gases e intermediários para resinas e plástico

---



## APÊNDICE 4

Tratamentos dos resíduos de laboratório gerados no trabalho

### Procedimento realizado para o tratamento dos resíduos do complexo formado entre CS<sub>2</sub>, cobre e dietanolamina

Em recipiente de plástico grosso colocaram-se os resíduos do complexo formado entre cobre, dietanolamina e CS<sub>2</sub>. Seguiu-se da adição de solução aquosa de KMnO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>, em capela, na proporção 1:1 (v/v).

Ocorre a formação de duas fases: a) uma massa pastosa marrom e b) um sobrenadante amarelo-escuro. Todo o volume presente no recipiente de plástico foi filtrado com papel filtro. O sólido que permaneceu no filtro ficou por 72 horas até secar completamente. Então, retirou-se o papel filtro juntamente com o sólido, enrolou-se em papel jornal e fechou-se com fita adesiva.

A solução líquida restante foi novamente tratada com solução aquosa de KMnO<sub>4</sub> 1 mol L<sup>-1</sup>. Este procedimento foi realizado até que, após a adição da solução, não ocorresse mais à formação da solução marrom, ficando apenas uma coloração violácea, indicativo do final das reações.

Verificou-se que à medida que o complexo do CS<sub>2</sub> foi sendo tratado, o líquido filtrado ficou cada vez mais claro, passando da tonalidade amarelo-escuro para amarelo-claro. O procedimento foi realizado em média 3 a 6 vezes, para cada litro de resíduo gerado.

Os filtros contendo o resíduo sólido foram devidamente rotulados e entregues no Departamento de Química da UFSM.

## Procedimento realizado para o tratamento dos resíduos de acetato de chumbo

Os resíduos de acetato de chumbo utilizados no procedimento de extração do Método 2 foram armazenados em frasco de vidro âmbar juntamente com  $\text{HNO}_3$  concentrado p.a..

Em béquer de vidro de 2 L foram colocados os resíduos de acetato de chumbo e adicionou-se pastilhas de NaOH comercial até que houvesse a formação de precipitados. Em seguida, agitou-se com bastão de vidro e filtrou-se a solução. O pH do filtrado foi corrigido a 7,0 com ácido muriático comercial.

Realizou-se este procedimento até que não ocorresse mais a formação de precipitados.

Então o filtrado foi neutralizado a pH 7,0 e descartado na pia. A parte sólida foi colocada em embalagem plástica, devidamente rotulada e entregue no Departamento de Química da UFSM.

## APÊNDICE 5

### Testes de linearidade das curvas analíticas

Resultados obtidos, expressos em unidade de área, para os testes de linearidade do item 4.7.1 para GC-ECD.

	Concentrações das soluções analíticas ( $\mu\text{g CS}_2 \text{ mL}^{-1}$ )				
	0,08	0,1	0,2	0,8	2,0
Injeção 1	1,752	2,284	4,927	18,272	41,143
Injeção 2	2,576	2,376	4,476	15,184	41,871
Injeção 3	2,320	1,876	6,391	17,824	41,538
Injeção 4	2,136	2,649	5,805	22,894	39,054
Injeção 5	1,660	2,190	5,481	17,310	39,198
Injeção 6	2,578	2,861	6,568	20,988	39,495
Média	2,170	2,373	5,608	18,745	40,383
SD	0,40	0,35	0,82	2,76	1,27
RSD (%)	18,3	14,6	14,6	14,7	3,1
S/Q (%)	136,6	119,2	140,8	117,7	104,4

Resultados obtidos, expressos em unidade de área, para os testes de linearidade do item 4.7.1 para GC-FPD.

	Concentrações das soluções analíticas ( $\mu\text{g CS}_2 \text{ mL}^{-1}$ )				
	0,08	0,1	0,2	0,8	2,0
Injeção 1	1,787	2,299	4,270	15,919	37,570
Injeção 2	1,752	2,118	4,296	15,068	40,653
Injeção 3	1,772	2,118	4,318	16,752	42,829
Injeção 4	1,907	2,182	4,261	16,189	36,653
Injeção 5	1,972	2,241	4,564	17,319	41,410
Injeção 6	1,838	2,180	4,563	16,752	42,829
Média	1,838	2,190	4,378	16,333	40,657
SD	0,09	0,07	0,14	0,79	2,17
RSD (%)	4,7	3,2	3,3	4,8	5,3
S/Q (%)	113,7	108,4	108,3	101,0	100,6

Resultados obtidos, expressos em unidade de área, para os testes de linearidade do item 4.7.1 para GC-MS.

	Concentrações das soluções analíticas ( $\mu\text{g CS}_2 \text{ mL}^{-1}$ )				
	0,08	0,1	0,2	0,8	2,0
Injeção 1	705	916	1831	7734	17564
Injeção 2	717	880	1871	7279	19314
Injeção 3	730	852	1779	7896	17786
Injeção 4	709	933	1631	7633	17158
Injeção 5	718	884	1805	7815	17675
Injeção 6	713	907	1751	7456	18236
Média	715	895	1778	7636	17955
SD	8,7	29,0	83,1	232,0	751,0
RSD (%)	1,2	3,2	4,7	3,0	4,2
S/Q (%)	99,2	99,4	98,7	105,9	99,6

## APÊNDICE 6

Teste t pareado aplicado para todos os métodos estudados empregando o software estatístico Minitab® Release 14

→ nível de fortificação de 0,05 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>

				Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev			
Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+-----+-----			
FPD_1	6	0,047000	0,004517	(-----*-----)			
ECD_1	6	0,044333	0,007062	(------*-----)			
ITD_1	6	0,047000	0,004604	(-----*-----)			
				-----+-----+-----+-----+-----+-----			
				0,0420	0,0455	0,0490	0,0525

Pooled StDev = 0,005522

→ nível de fortificação de 0,4 mg CS<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>

				Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev			
Level	N	Mean	StDev	-----+-----+-----+-----+-----+-----			
FPD	6	0,37100	0,01868	(-----*-----)			
ECD	6	0,42967	0,01196	(------*-----)			
ITD	6	0,37883	0,03097	(-----*-----)			
UVVis	6	0,34983	0,03573	(------*-----)			
				-----+-----+-----+-----+-----+-----			
				0,350	0,385	0,420	0,455

Pooled StDev = 0,02612