



ANÁLISE DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS NA CULTURA DE COUVE (*Brassica oleracea*): COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS ANALÍTICOS

Saldanha JT¹, Oliveira AC¹, Oliveira LB¹, Cardoso MHWM¹, Bastos LHP¹

¹INCQS/FIOCRUZ, Departamento de Química, Laboratório de Alimentos e Contaminantes

Introdução

O uso de agrotóxicos na agricultura e a consequente contaminação dos alimentos têm sido alvo de constante preocupação no âmbito da saúde pública, gerando a necessidade de realização da avaliação toxicológica e monitoramento dessas substâncias¹.

Os fungicidas Ditiocarbamatos (DTCs) representam uma importante classe extensivamente usada na agricultura. São caracterizados por um largo espectro de atividade contra vários patógenos e possuem baixos custos de produção².

Os DTCs podem ser classificados em três subclasses, dependendo da sua estrutura de carbono: dimetilditiocarbamatos (ziram, tiram e ferbame); etileno bis-ditiocarbamatos (mancozeb, maneb, zineb e metiram) e propilenobisditiocarbamatos (propinebe)³.

Para a matriz couve o ditiocarbamato recomendado é o mancozeb com um valor de limite máximo de resíduo permitido (LMR) de 1 mg kg⁻¹ de CS₂. Esse agrotóxico tem grande importância toxicológica a medida que seu produto de degradação é o ETU (etilenotiouréia), substância com atividade carcinogênica, mutagênica e teratogênica. Sendo assim, torna-se importante o monitoramento do produto para que esse esteja de acordo com o preconizado na legislação nacional^{4,5}.

Em 2001, a Anvisa iniciou o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) com o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos de origem vegetal que chegam aos consumidores. Apenas nos anos 2009 e 2010, o PARA acrescentou a couve aos alimentos analisados, entretanto o grupo químico dos DTCs não foi avaliado no período para a matriz couve⁴.

A couve (*Brassica oleracea*) é uma hortaliça rica em glucosinolatos e indóis, compostos antioxidantes que inibem a mutação do DNA e desta forma contribuem no combate ao câncer⁶. Essas são instáveis ao contato com a enzima mirosinase estocada no tecido vegetal⁷. A enzima é liberada da folha quando o vegetal é cortado, picado, congelado e descongelado⁸, convertendo glucosinolatos em isotiocionatos. Como essas substâncias são precursoras de



CS₂ fitogênico esses irão fornecer resultados falso positivo de resíduos de ditiocarbamato, quando avaliados pelo método espectrofotométrico.

Além da propriedade anticarcinogênica, a couve possui grande importância nutricional por apresentar altos teores de vitamina C, minerais e fibras⁹.

Devido a couve ser uma hortaliça de importante consumo em sucos, caldos e saladas cruas no Brasil, demonstrando muitos benefícios a saúde, torna-se importante a avaliação dos resíduos de agrotóxicos especialmente dos ditiocarbamatos.

Este trabalho teve o objetivo de comparar dois métodos analíticos para determinação de resíduos de ditiocarbamatos por espectrofotometria e o por cromatografia utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a detector por fotometria em chama (CG-DFC) na matriz couve permitindo assim identificar o método mais adequado para a análise desta matriz complexa.

Material e Métodos

Trata-se de um estudo comparativo entre dois métodos de análise de resíduos de ditiocarbamatos na matriz couve, o método por espectrofotometria (método 1) e o método empregando a CG-DFC (método 2).

As amostras de couve orgânica (amostras isentas de resíduos de agrotóxicos) foram obtidas na região de Nova Friburgo/RJ.

Método 1

O método empregado foi o de Keppel¹⁰, que consiste na digestão ácida da amostra por uma solução de HCl e SnCl₂ submetido a aquecimento. Em um *trap* inferior adiciona-se solução de NaOH para eliminar possíveis interferentes na análise, como por exemplo ácido sulfídrico (H₂S). No *trap* superior adiciona-se uma solução de reagente complexante de cobre, dietanolamina e etanol, que reage com o CS₂ formando um complexo de cor amarelada. Este complexo formado é analisado por Espectrofotometria UV-Visível a 435 nm.

As folhas da couve orgânica foram pesadas em porções de 50 g ± 0,5 g, previamente cortadas e homogeneizada, acondicionadas em sacolas plásticas identificadas e mantidas em congelador até o momento da análise.

A curva analítica foi feita com 5 pontos com concentrações distintas: 0,5; 1,0; 1,25; 1,50; 2,0; 2,5 mg CS₂/mL.

Posteriormente, foram testadas duas formas de armazenamento das amostras de folhas cortadas: congeladas e mantidas em geladeira.

Método 2

No método 2, utilizou-se como referência a metodologia empregada por De Kok; Van Bodegraven¹¹, o qual consiste em adicionar a amostra, a solução digestiva e o isoctano em frascos de vidros de 250 mL com tampa rosqueável e submete-los a aquecimento, no banho termostaticado com agitação, à



aproximadamente 80 °C por 45 minutos. Nesse método utilizou-se folhas inteiras de couve.

Para fortificação, utilizou-se alíquotas de solução intermediária de tiram na concentração 37,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1 mL, 2 mL e 3 mL, respectivamente para os níveis 1, 2 e 3, com concentrações de 0,75; 1,50; 2,25 mg de CS₂ por kg)

Após a digestão, os frascos foram resfriados no banho de gelo até que chegassem à temperatura ambiente. Retirou-se uma alíquota de aproximadamente 1 mL da fase orgânica superior límpida e analisou-se por CG-DFC.

Foi feito o teste da forma de preparo das folhas. Para isso, foi analisado a amostra branco picada e folhas inteiras, ambas refrigeradas.

As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna DB-1301 (6% cianopropilfenil e 94% metilpolisiloxano) (30 m x 0,32 mm x 1 μm). Programação da temperatura do forno: 60°C a 200°C (1 min) @120°C min⁻¹ e de 200°C a 45°C (0,10 min) @120°C min⁻¹; injetor *splitness* a 220°C; o volume de injeção foi de 3 μL . O tempo de retenção do CS₂ foi identificado em 1,4 min através da curva de calibração do CS₂. O fluxo do ar = 115 mL min⁻¹, N₂ = 90 mL min⁻¹, *Make up* = 20 mL min⁻¹. O tempo de corrida foi de 4,5 minutos.

A curva analítica foi construída com 5 diferentes concentrações variando de 0,5 a 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CS₂, A partir da resposta das áreas obtidas, foi plotado um gráfico de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) versus a área obtida.

Resultados e Discussão

Método 1: Espectrofotométrico

A Tabela 1 apresenta as concentrações de CS₂ obtidas e as taxas de recuperação (%) encontradas após as fortificações dos 3 níveis.

Tabela 1. Concentração de CS₂ obtida nos 3 níveis estudados de fortificação na matriz couve empregando o método 1.

Nível 1		Nível 2		Nível 3	
Concentração de CS ₂ (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração de CS ₂ (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Concentração de CS ₂ (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
0,5450	257 %	0,5105	121 %	1,1160	105 %
0,4508	212 %	0,4988	117 %	1,2657	119 %
0,4871	231 %	0,5106	120 %	1,1679	110 %
0,4268	201 %	0,4961	116 %	1,1583	109 %

No nível 1 verificou-se que as recuperações encontradas estavam acima do valor especificado pelo SANCO¹², 70 a 120 %, diante disto, buscou-se



verificar se a causa poderia ser armazenamento, refrigeração e ou preparo das amostras.

Para verificar essa condição foi avaliada a recuperação do método respectivamente para 2 replicatas fortificadas para cada tipo de condição, com concentração $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de CS_2 , conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos das recuperações de diferentes condições de couve estudada, condição de preparo da amostra e concentração de CS_2 empregando o método 1.

Condição de preparo da amostra	Concentração de CS_2 (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
Cortada e congelada (repetição 1)	0,5808	170 %
Cortada e congelada (repetição 2)	0,7390	216 %
Cortada e refrigerada (repetição 1)	0,4027	118 %
Cortada e refrigerada (repetição 2)	0,4176	122 %

Os resultados obtidos sugerem que o congelamento influencia na obtenção de resultados falso positivos para CS_2 . As amostras congeladas obtiveram valores de recuperação e concentração de CS_2 superiores às amostras refrigeradas.

Método 2: Cromatográfico

A Tabela 3 apresenta as concentrações de CS_2 obtidas e as taxas de recuperação (%) encontradas após as fortificações nos 3 níveis

Tabela 3. Concentração de CS_2 obtida nos 3 níveis estudados de fortificação na matriz couve empregando o método 2.

Nível 1		Nível 2		Nível 3	
Concentração de CS_2 (mg kg^{-1})	Recuperação (%)	Concentração de CS_2 (mg kg^{-1})	Recuperação (%)	Concentração de CS_2 (mg kg^{-1})	Recuperação (%)
0,3913	84 %	0,8539	90 %	2,0334	71 %
0,3537	74 %	0,8598	91 %	1,0729	76 %
0,3360	71 %	0,8177	86 %	1,3625	96 %
0,5639	118 %	0,7472	79 %	1,2798	90 %

Obteve-se recuperações adequadas para os 3 níveis de amostras fortificadas dentro do critério de aceitação para a taxa de recuperação, segundo o SANCO¹², 70 a 120 %.

O ato de picar não influenciou significativamente no resultado, pois a amostra branca de couve preparada com folhas inteiras e picadas não apresentaram sinal cromatográfico no tempo de retenção estipulado para o analito CS_2 nas duas condições estudadas.

CONCLUSÃO



Foi possível concluir que o método espectrofotométrico (método 1) não é seletivo para analisar resíduos de ditiocarbamatos em couve, pois os resultados obtidos forneceram valores fora do sistema da qualidade e inconstantes. O método 2 cromatográfico apresentou resultados adequados no processo de validação além de ser um método mais seletivo e mais prático que o método 1.

Com a validação do método cromatográfico será possível realizar o monitoramento de resíduos de ditiocarbamatos em amostras de couve cumprindo uma lacuna existente nos programas de monitoramento nacional.

REFERÊNCIAS

- 1- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Relatórios anuais do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). [Acesso em 11 jun 2015]; Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>
- 2- Crnogorac G., Wolfgang S. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. Trends Analyt Chem. 2009; 28 (1):40-50.
- 3- Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentação (2010). Análisis de Consumo Alimentario. [acesso em: 26 jun 2015] Disponível em: <http://www.mapa.es/es/alimentacion/pags/consumo/consumo.htm>
- 4- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Monografias de agrotóxicos autorizadas. [Acesso em 13 jun 2015]; Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>
- 5- Larini L. Toxicologia dos Praguicidas. 1 ed. São Paulo: Manole, 1999. 218 p.
- 6- Souza PHM, Souza Neto MH; Maia GA. Componentes funcionais nos alimentos. Boletim da SBCTA. 2003; 37 (2):127-135.
- 7- Song L, Thornalley PJ. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. Food Chem Toxicol. 2007; 216-224.
- 8- Kelly PJ, Bones A, Rossiter JT. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. Planta Med. 1998; 206:370-377.
- 9- Block G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. Am J Clin Nutr. New York, 1991; 53:270-282.



10- Keppel GE. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate. Residues by a modified carbon disulfide evolution method. J Assoc Off Anal Chem. 1971; 54:528-532.

11- De Kok A, Van Bodegraven P: The determination of dithiocarbamate pesticides in fruits, vegetables and cereals via isoctane extraction of carbondisulfide and subsequent GC-ECD. In: Anais do 4th European Pesticide Residues Workshop - Pesticides in Food and Drink; 2002; Roma, Itália. 2002. 319 p.

12- DG-SANCO, European Commission. Guidance document on analytical control and validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12571/2013; 01 Jan 2014:1-40.