

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Juliana Tinoco Saldanha

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS NA CULTURA DE
COUVE (*Brassica oleracea*)**

Rio de Janeiro

2016

Juliana Tinoco Saldanha

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO
DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS NA CULTURA DE COUVE**
(Brassica oleracea)

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Preceptores: Angélica Castanheira de Oliveira
Lucia Helena Pinto Bastos

Tutora: Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Saldanha, Juliana Tinoco

Validação e aplicação de método analítico para determinação de resíduos de ditiocarbamatos na cultura de couve (*Brassica oleracea*) / Juliana Tinoco Saldanha – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

54 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Preceptor: Angélica Castanheira de Oliveira e Lucia Helena Pinto Bastos.

Tutor: Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

1. Etilenobis (ditiocarbamatos). 2. Contaminação de Alimentos. 3. Agroquímicos. 4. Limite Máximo de Agrotóxico em Alimentos. 5. Estudos de Validação. 6. Brassica. I. Título

Juliana Tinoco Saldanha

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO
DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS NA CULTURA DE COUVE
(*Brassica oleracea*)**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 01/02/2016

BANCA EXAMINADORA

André Victor Sartori (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Armi Wanderley da Nóbrega (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Angélica Castanheira de Oliveira (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Aos meus pais Márcia e Walter que foram companheiros e sobretudo amigos.

Ao meu esposo Emilson por sua atenção, companhia e amor.

A minha família que sempre me apoiou.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu vida, força e capacidade.

A Lucia Helena, Maria Helena e Angélica que me orientaram muito bem e me auxiliaram em tudo na elaboração deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos que me acompanhou de perto durante todas etapas do desenvolvimento deste trabalho: Angélica, Ana Clara, Lucia Helena, Laiza, Maria Helena, Marina e Shaiene.

Ao Thomas e Alexandre que me auxiliaram na tradução e formatação.

A minha família pela confiança e motivação.

Aos professores e colegas de Curso.

*Como é feliz o homem que acha a sabedoria,
o homem que obtém entendimento.*

Provérbios 3:13

RESUMO

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 substâncias. Os fungicidas Ditiocarbamatos (DTCs) representam uma importante classe extensivamente usada na agricultura, devido ao largo espectro de atividade contra vários patógenos e pelo baixo custo de produção. Para a matriz couve o ditiocarbamato recomendado é o mancozebe com um valor de limite máximo de resíduo permitido (LMR) de 1 mg kg^{-1} de CS_2 . 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 câncer, essas substâncias são precursoras de CS_2 fitogênico e podem fornecer resultados falsos positivo de resíduos de ditiocarbamato, quando avaliados pelo método espectrofotométrico. 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 em vegetais consumidos pela população. Apenas nos anos 2009 e 2010, a couve foi acrescentada ao PARA, entretanto não foram analisados os DTCs nesta matriz. Devido a complexidade analítica da determinação de ditiocarbamatos pelo método espectrofotométrico na matriz couve, este trabalho teve o objetivo de comparar este método com método conduzido por cromatografia a gás acoplado ao detector por fotometria em chama (CG-DFC) visando a identificação do método mais adequado para esta matriz. As amostras isentas de resíduos de agrotóxicos (couve orgânica) foram obtidas na região de Nova Friburgo/RJ. O método 1 empregado foi o de Keppel, que consiste no tratamento ácido da amostra por uma solução digestiva de HCl e SnCl_2 submetido a aquecimento e posteriormente na leitura do complexo formado com CS_2 por espectrofotometria UV-Visível a 435 nm. No método 2, foi empregada a metodologia de De Kok e Van Bodegraven, 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 ao aquecimento, no banho termostaticado à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação por 45 minutos. Após a digestão, uma alíquota da fase orgânica límpida foi analisada por CG-DFC. Dentre as fortificações dos 3 níveis no método 1, verificou-se que no nível 1, as recuperações encontradas (257 %, 212 %, 231 % e 201 %) estavam acima do valor especificado pelo SANCO, 70 a 120 %. Desta forma, buscou-se verificar se a causa disto poderia ser o armazenamento, refrigeração e preparo. Os resultados demonstraram que a couve picada e congelada apresentou recuperações acima da faixa aceitável. Já o método 2 demonstrou seletividade, recuperações e precisão adequadas. O branco da couve não apresentou sinal cromatográfico detectável. A média das recuperações dos 3 níveis (82 %, 86 % e 84 %) encontram-se dentro do permitido pela literatura. Os limites de detecção ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) e de quantificação ($0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) estão adequados ao LMR (Limite Máximo de Resíduos) para a matriz de estudo.

Palavras chaves: Ditiocarbamatos. Couve. Validação de métodos analíticos.

ABSTRACT

The use of pesticides in agriculture and the consequent contamination of food have been a constant concern in the field of public health, generating the need of toxicological evaluation and monitoring of these substances. The dithiocarbamates (DTCs) represent an important class of fungicides extensively used in the agriculture. They are characterized by a broad spectrum of activity against various pathogens and have low production costs. The recommended dithiocarbamate for the matrix cabbage is mancozeb with an allowed maximum residue limit value (LMR) of 1 mg kg⁻¹ of CS₂. Cabbage (*Brassica oleracea*) is a vegetable rich in glucosinolates and indoles, antioxidant compounds that inhibit DNA mutation and thus contribute against the formation of cancer. These substances are also precursor of phytogetic CS₂ and may provide false positive results of dithiocarbamate residues, when measured by the spectrophotometric method. In 2001, ANVISA initiated the Pesticide Residue Analysis Program in Food (PARA) in order to evaluate pesticide residue levels in vegetables consumed by the population. Only in the years 2009 and 2010, cabbage was added to the analyzed foods, though DTCs has not been evaluated during that period in this matrix. Due to the analytical complexity of dithiocarbamate determination in cabbage by the spectrophotometric method, this study aimed to compare this method with the method conducted by gas chromatography coupled to a flame photometric detector (GC-FPD) in order to identify the more suitable method for this matrix. Samples free of pesticide residues (organic kale) were obtained in the region of Nova Friburgo/RJ. The first method used was reported by Keppel and consisted of acid sample digestion with a solution of HCl and SnCl₂ subjected to heating and formation of a chromophore complex. Quantification was performed by UV/Vis spectrophotometry at 435 nm. The second method, reported by De Kok and Van Bodegraven, consists of adding the digestive solution, isooctane and the sample to a glass bottles with screw cap and submitting it to heating at 80 °C while stirring for 45 minutes. After digestion, an aliquot of the clear organic phase was analyzed by GC-FPD. Among the three fortifications levels analyzed by the first method, it was observed that the recoveries found for level 1 (257 %, 212 %, 231 % and 201 %) were above the specified SANCO values (70 to 120 %). Therefore it was verified whether the cause could be storage, refrigeration or preparation. The results showed that the chopped and frozen cabbage presented a recovery above the acceptable range. The results showed that the chopped and frozen cabbage showed recoveries above the acceptable range. Method 2 already demonstrated adequate selectivity, recovery and precision. The sample of blank cabbage showed no detectable chromatographic signal. The average recoveries of 3 levels (82 %, 86 % and 84 %) are within the permitted in the literature. The limits of detection (0.1 mg.kg⁻¹) and quantification (0.4 mg.kg⁻¹) are appropriate to the MRL (Maximum Residue Limit) for the studied matrix.

Key words: Dithiocarbamates. Cabbage. Validation of analytical methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Couve-manteiga (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>).....	17
Figura 2	Conversão do glucosinolato em isotiocianato pela ação da mirosinase	18
Figura 3	Sistema de extração após modernização por Keppel.....	22
Figura 4	Procedimento de fortificação da amostra branco.....	25
Figura 5	Vidraria específica para determinação de ditiocarbamatos (A) e o espectrofotômetro (B) empregados no método 1.....	33
Figura 6	Fluxograma da extração de ditiocarbamatos pelo método 2	34
Figura 7	Banho termostaticado com agitação (A) e o CG-DFC (B) empregados no método 2.....	35
Figura 8	(A) Cromatograma da amostra de couve orgânica e (B) cromatograma da solução de CS ₂ na concentração de 2,0 µg.mL ⁻¹ , analisada por CG-DFC.....	40
Figura 9	Planilha para avaliação da curva analítica CS ₂ obtida através dos dados gerados pelo método 2 – CG-DFC.....	41
Figura 10	Cromatograma da amostra de couve A.....	47
Figura 11	Cromatograma da amostra de couve B.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da toxicidade dos agrotóxicos.....	19
Tabela 2	Classificação dos principais agrotóxicos de acordo com o tipo de praga e o grupo químico.....	19
Tabela 3	Classificação agrônômica, classe toxicológica, estrutura química e Fórmula bruta do mancozebe.....	21
Tabela 4	Padrões, reagentes e solventes utilizados no método 1 e no método 2	30
Tabela 5	Dados da preparação das soluções para fortificação no método 1.....	31
Tabela 6	Dados da preparação das soluções para fortificação no método 2.....	31
Tabela 7	Pontos da curva de calibração e as concentrações correspondentes de tiram em CS ₂ usados nas fortificações do método 1 (espectrofotométrico).....	38
Tabela 8	Pontos da curva de calibração e as concentrações correspondentes de tiram em CS ₂ usados nas fortificações do método 2 (cromatográfico)	38
Tabela 9	Resumo dos resultados obtidos na avaliação da linearidade pela Anova para o método por espectrofotometria UV-visível (método 1)	41
Tabela 10	Resumo dos resultados obtidos na avaliação da linearidade pela Anova para o método por CG-DFC (método 2).....	41
Tabela 11	Leitura das áreas de CS ₂ , correspondentes à concentração de 0,9570 µg.mL ⁻¹ , obtidas pelo CG-DFC para cálculo do LD e LQ utilizando a relação S/R.....	42
Tabela 12	Precisão e repetibilidade no método 1.....	43
Tabela 13	Precisão e repetibilidade no método 2.....	43
Tabela 14	Concentração de CS ₂ e recuperações no método 1.....	44

Tabela 15	Recuperações de dois diferentes modos de preparo da amostra de couve.....	45
Tabela 16	Relação das amostras fortificadas e a recuperação no método 2.....	46

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia a Gás
CG-DCE	Cromatografia a Gás com Detecção por Captura de Elétrons
CG-DFC	Cromatografia a Gás com Detecção por Fotometria em Chama
CG-EM	Cromatografia a Gás com detecção por Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPG	Cromatografia de Permeação de Gel
CV	Coefficiente de Variação
DMDC	Dimetilditiocarbamatos
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTCs	Ditiocarbamatos
EBDCs	Etilenobisditiocarbamatos
ETU	Etilenotiuréia
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS	<i>Headspace</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IEC	<i>International Engineering Consortium</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LD	Limite de Detecção
LDI	Limite de Detecção do Instrumento
LDM	Limite de Detecção do Método
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de Quantificação
LQM	Limite de Quantificação do Método
NBR	Norma Brasileira
PA	Para Análise
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
POP	Procedimento Operacional Padrão
Razão S/R	Razão Sinal Ruído

SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UV-Visível	Ultravioleta Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	A COUVE-MANTEIGA.....	17
1.2	AGROTÓXICOS.....	18
1.2.1	CLASSIFICAÇÃO.....	18
1.3	OS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS.....	20
1.4	MÉTODOS COMUMENTE EMPREGADOS EM ANÁLISE DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS.....	21
1.4.1	Método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS).....	21
1.4.2	Métodos cromatográficos.....	22
1.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO.....	23
1.5.1	Seletividade	24
1.5.2	Linearidade.....	24
1.5.2.1	Homocedasticidade/heterocedasticidade	24
1.5.3	Intervalo de trabalho ou faixa de trabalho ou faixa analítica.....	25
1.5.4	Exatidão (recuperação).....	25
1.5.5	Precisão (repetibilidade).....	26
1.5.6	Limite de Detecção (LD).....	26
1.5.7	Limite de Quantificação (LQ).....	26
2	OBJETIVO GERAL	27
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1	INSTRUMENTOS E CONDIÇÕES METODOLÓGICAS.....	28
3.1.1	Método 1 - Espectrofotometria de absorção no UV-VIS.....	28
3.1.2	Método 2 - CG-DFC, no modo enxofre.....	29
3.2	REAGENTES E SOLVENTES.....	29

3.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	30
3.3.1	Soluções para fortificação.....	30
3.3.2	Soluções para confecção da curva analítica.....	31
3.4	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FORTIFICAÇÃO.....	32
3.5	PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	32
3.5.1	Método 1 - Espectrofotometria de absorção no UV-VIS.....	32
3.5.2	Método 2 - CG-DFC, modo enxofre.....	34
3.6	DESCONTAMINAÇÃO E LAVAGEM DAS VIDRARIAS UTILIZADAS.....	35
3.7	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
3.7.1	Seletividade.....	36
3.7.2	Intervalo de trabalho e linearidade.....	36
3.7.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método (LDM e LQM).....	36
3.7.4	Precisão (repetibilidade).....	37
3.7.5	Exatidão (recuperação).....	39
3.8	IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1	SELETIVIDADE.....	40
4.2	INTERVALO DE TRABALHO E LINEARIDADE.....	40
4.3	LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO....	42
4.3.1	Limite de detecção e quantificação para o método por espectrofotometria de absorção no UV-VIS.....	42
4.3.2	Limite de detecção e de quantificação para o método por CG-DFC.....	42
4.4	PRECISÃO E REPETIBILIDADE	43
4.5	RECUPERAÇÃO E EXATIDÃO.....	43
4.6	COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS AVALIADOS.....	46

4.7	IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO.....	47
5	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS	49

1 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 dessas substâncias e o monitoramento dos seus resíduos na alimentação (BRASIL, 2015).

Até 1989, os agrotóxicos eram submetidos apenas às avaliações toxicológica e de eficácia agrônômica para obtenção de registro. Após a regulamentação da Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, pelo Decreto no 98.816, de 11 de janeiro de 1990, passaram a ser exigidas também a avaliação e a classificação do potencial de periculosidade ambiental (PERES et al., 2003), o que demonstrou avanços na preservação da saúde pública e do meio ambiente.

Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19 % do mercado global de agrotóxicos. Em 2011 houve um aumento de 16,3 % das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões (SINDAG, 2012).

Em 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (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. Destaca-se que apenas nos anos 2009 e 2010, o PARA acrescentou a couve aos alimentos analisados, entretanto o grupo químico dos ditiocarbamatos (DTCs) não foi avaliado nesse período para esta matriz (BRASIL, 2015).

Os ditiocarbamatos são um grupo de fungicidas organosulfurados caracterizado por um largo espectro de atividade contra vários patógenos de plantas, baixa toxicidade em mamífero e baixos custos de produção (CRNOGORAC; SCHWACK, 2009).

Devido a sua larga utilização, muitos métodos analíticos foram e estão sendo desenvolvidos para realizar tais análises. A maioria dos métodos de análise utilizados para determinação de ditiocarbamatos não são suficientemente seletivos para distinguir os diferentes fungicidas, baseando-se na quantificação de dissulfeto de carbono (CS₂) por espectrofotometria de absorção no UV-Visível e por cromatografia gasosa (CG) após digestão ácida das amostras (SILVA, 2005; CALDAS et al, 2001). Os DTCs possuem em comum, pouca solubilidade em solventes orgânicos extratores e baixa estabilidade, por isso os métodos comumente empregadas envolvem a digestão ácida (CALDAS et al, 2001).

A couve-manteiga (*Brassica oleracea*) é uma hortaliça de importante consumo no Brasil, em sucos, caldos e saladas cruas, demonstrando muitos benefícios a saúde, devido a isto,

torna-se importante a avaliação dos resíduos de agrotóxicos especialmente da classe dos ditiocarbamatos, não anteriormente avaliada em programas nacionais de monitoramento, dentre esses o PARA. Desta forma, a couve foi a matriz escolhida para esse estudo.

1.1 A COUVE-MANTEIGA

A couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*) (Figura 1) também conhecida como couve-de-folha é uma hortaliça rica em glicosinolatos e indóis, compostos antioxidantes que inibem a mutação do DNA e contribuem no combate ao câncer (SOUZA et al., 2003). Além da propriedade anticarcinogênica, a couve possui grande importância nutricional por apresentar altos teores de vitamina C, minerais e fibras (BLOCK, 1991).

Figura 1 - Couve-manteiga (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

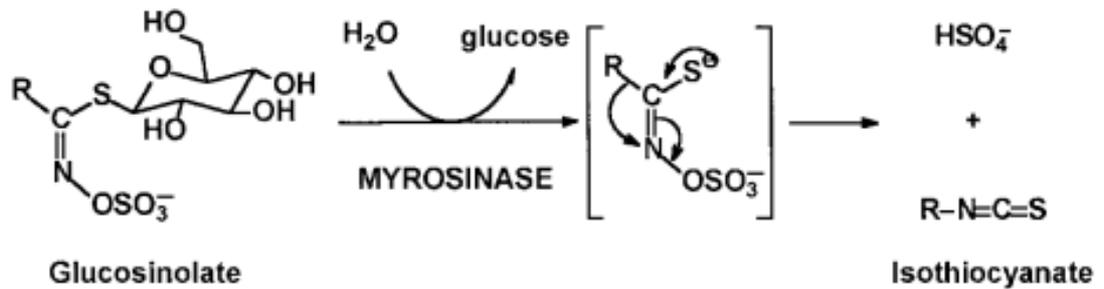


fonte: (<http://uenf.br/Uenf/Downloads/LMGV_5207_1316013859.pdf>, 2015)

Os glicosinolatos são convertidos, nas plantas, pela ação da enzima mirosinase em isotiocianatos, conforme reação apresentada na Figura 2. Essa pode estar presente no próprio vegetal ou na microflora do trato digestivo humano iniciando sua atividade quando o tecido vegetal sofre algum tipo de injúria tais como: ação de fungos, mastigação de insetos e humanos e ou quando o vegetal é congelado e descongelado (SONG; THORNALLEY, 2007, PERZ et al., 2000, BONES; ROSSITER, 1996).

Os isotiocianatos são substâncias precursoras de CS₂ fitogênico e podem dificultar a análise de resíduos de ditiocarbamatos e gerar resultados falsos positivos, devido a isto, deve ser grande o cuidado no preparo da amostra e a escolha do método analítico devendo ser considerado também a melhor sensibilidade do mesmo.

Figura 2 - Conversão do glucosinolato em isotiocianato pela ação da mirosinase.



fonte: (SHAPIRO et al., 2001)

1.2 AGROTÓXICOS

De acordo com o Decreto nº4074/02 que regulamenta a Lei nº 7.802/89 (rege o processo de registro de um produto agrotóxico), agrotóxicos são:

produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (BRASIL, 2015)

O termo agrotóxico, ao invés de defensivo agrícola, passou a ser utilizado no Brasil a partir da Constituição Federal de 1988, além da modificação na terminologia, este termo colocou em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e para a saúde. (BRASIL, 2010).

1.2.1 CLASSIFICAÇÃO

- Classificação conforme a toxicidade

Os agrotóxicos nem sempre são seletivos para as espécies-alvo, e os efeitos adversos à saúde podem ser observados em espécies não alvo e humanos.

Tabela 1- Classificação da toxicidade dos agrotóxicos.

Classe	Grau	Cor da Faixa
Classe I	Extremamente Tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente Tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente Tóxico	Azul
Classe IV	Pouco Tóxico	Verde

fonte: (BRASIL, 2011)

- Classificação conforme alvo e grupo químico

Os agrotóxicos são originados de uma gama de substâncias químicas e algumas de origem biológica e podem ser classificados de acordo com o tipo de praga que controlam, com a estrutura química das substâncias ativas e os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente (AGROFIT, 1998). A Tabela 2 a seguir, apresenta os principais agrotóxicos empregados mundialmente, de acordo com o tipo de praga e o grupo químico que pertence.

Tabela 2 - Classificação dos principais agrotóxicos de acordo com o tipo de praga e o grupo químico.

Classificação quanto à natureza da praga controlada	Classificação quanto ao grupo químico	Exemplos (produto/substâncias/agentes)
Inseticidas (controle de insetos)	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio
	Extratos vegetais	Óleos vegetais
	Organoclorados	Aldrin,* DDT,* BHC*
	Organofosforados	Fenitrothion, Paration, Malation, Metil-paration
	Carbamatos	Carbofuran, Aldicarb, Carbaril
	Piretróides sintéticos	Deltametrina, Permetrina
	Microbiais	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Fungicidas (combate aos fungos)	Inorgânicos	Calda Bordalesa, enxofre
	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
	Dinitrofenóis	Binapacril
	Organomercuriais	Acetato de fenilmercúrio
	Antibióticos	Estreptomicina, Ciclo-hexamida
	Trifenil estânico	Duter, Brestam
	Compostos Formilamina	Triforina, Cloraniformetam
Herbicidas (combate às plantas invasoras)	Fentalamidas	Captafol, Captam
	Inorgânicos	Arsenito de sódio, cloreto de sódio
	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Fenoxiacéticos	CMPP, 2,4-D, 2,4,5-T
	Carbamatos	Profam, Cloroprofam, Bendiocarb
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Difenzoquat
	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
Desfoliantes (combate às folhas indesejadas)	Benzonitrilas	Bromoxinil, Diclobenil
	Glifosato	Round-up
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
Fumigantes (combate às bactérias do solo)	Dinitrofenóis	Dinoseb, DNOC
	Hidrocarbonetos halogenados	Brometo de metila, cloropicrina
	Geradores de Metil-isocianato	Dazomet, Metam
	-	Formaldeídos

Fonte: (PERES et al., 2003)

1.3 OS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS

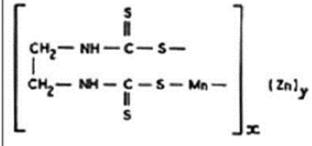
Os ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico e podem ser classificados em: dimetilditiocarbamatos (DMDC) - ferbam, ziram e tiram; etilenobisditiocarbamatos (EBDCs) - mancozebe, manebe, zinebe e metiram; monometildimetilcarbamato - metam sódico e propilenobisditiocarbamato – propinebe (LÓPES-FERNÁNDEZ et al., 2012; LEMES, 2007). Os compostos EBDCs são biotransformados com formação de etilenotiuréia (ETU), enquanto os DMDCs não produzem este composto. A etilenotiuréia em ratos e camundongos acarretou hipotireoidismo, hipertrofia da tireóide e em alguns casos tumores desta glândula por um mecanismo não genotóxico, que envolve a interferência com o funcionamento da tireóide peroxidase, resultando em uma redução nas concentrações de hormônio da tireóide em circulação e aumento da secreção de hormônio estimulante da tireóide (TSH) (WHO, 2016; AZEVEDO, 2010). Além disso, a estrutura química dos ditiocarbamatos assemelham-se ao dissulfiram, que inibe a aldeído desidrogenase e pode, após ingestão de etanol, produzir níveis elevados de acetaldeídos (KLAASSEN et al., 2012).

O ditiocarbamato indicado no Brasil para aplicação foliar em couve, é o mancozebe. O Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido para essa matriz é de 1,0 mg.kg⁻¹ de CS₂ (BRASIL, 2015).

Em 2013, o mancozebe ficou em 9º lugar no ranking dos dez agrotóxicos mais vendidos no Brasil e as vendas considerando a classificação agrônômica fungicida, representou cerca de 11 % da quantidade total comercializada, sendo a segunda classe mais comercializada, perdendo apenas para herbicidas (1º lugar em vendas) e inseticidas (2º lugar em vendas) (IBAMA, 2015).

O mancozebe - *manganese ethylenebis-(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt* - é um sólido de coloração amarelo-cinza, praticamente insolúvel em água e solúvel na maioria dos solventes orgânicos. É estável nas condições normais de armazenamento, decompondo-se em temperaturas elevadas ou na presença de ácidos (LARINI, 1999). A Tabela 3, apresenta a estrutura química e fórmula bruta do mancozebe, a classificação agrônômica e a classificação toxicológica.

Tabela 3 - Classificação agronômica, classe toxicológica, estrutura química e fórmula bruta do mancozebe.

Classificação agronômica	Classe Toxicológica	Estrutura Química e Fórmula bruta
Fungicida e acaricida	Classe III	 $\left[\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} - \\ \\ \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{S} - \text{Mn} - \\ \\ \text{S} \end{array} \right]_x (\text{Zn})_y$ $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Mn})_x (\text{Zn})_y$

fonte: (BRASIL, 2015)

1.4 MÉTODOS COMUMENTE EMPREGADOS EM ANÁLISE DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS

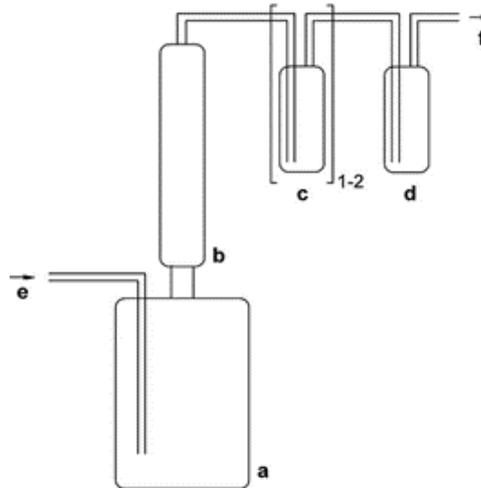
1.4.1 Método por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS)

Crnogorac e Schwack (2009) apresentaram em seu trabalho o método da digestão ácida seguido da determinação do CS_2 gerado na mistura de dietanolamina, acetato de cobre, trietanolamina e etanol, resultando em um complexo amarelado, mensurado a 430 nm no UV-VIS previamente estudado por outros pesquisadores. A primeira modificação foi introduzida por Cullen (1964) que simplificou a mistura complexante, removendo a trietanolamina, deixando apenas etanol, dietanolamina e acetato de cobre.

Diante dos erros constatados nas recuperações de algumas culturas, especialmente naquelas que contém alta quantidade de compostos orgânicos sulfurosos – que interferem na determinação do CS_2 , Keppel (1969) modificou o método empregando uma solução aquosa de hidróxido de potássio 6,5 %. A modificação foi eficiente na remoção de sulfeto de hidrogênio e outros interferentes com o gás de CS_2 . Além desta modificação, empregou HCl (1,6 M) e SnCl_2 (CRNOGORAC; SCHWACK, 2009).

A Figura 3 representa de forma generalizada o sistema de extração após modificação por Keppel (1969). A amostra é digerida sob ação da solução ácida de HCl e SnCl_2 enquanto é aquecida. O CS_2 é empurrado pelo condensador (b) sob ação contínua do fluxo de nitrogênio (e) ou vácuo (f) e passa por uma solução de limpeza (NaOH) para eliminar possíveis interferentes (c) e por último reage com uma solução complexante de acetato de cobre, dietanolamina e etanol.

Figura 3 – Sistema de extração após modernização por Keppel.



fonte: (CRNOGORAC; SCHWACK, 2009)

O procedimento é utilizado atualmente no laboratório de resíduos de agrotóxicos do INCQS para a determinação de resíduos de ditiocarbamatos em hortifrutigranjeiros, indicado no POP 65.3120.079 (2014a). No método utilizado o ditiocarbamato é avaliado em consonância a legislação como CS_2 , esse é liberado na hidrólise ácida dos DTCs e absorvido em uma mistura de acetato cúprico, dietanolamina e etanol. O complexo formado, dimetilditiocarbamato cúprico, de cor amarela, apresenta um espectro de absorção na faixa do visível ($\lambda_{\text{max}} = 435 \text{ nm}$) possibilitando a quantificação do CS_2 liberado, através de curva de calibração de concentrações conhecidas do padrão da substância.

1.4.2 Métodos cromatográficos

A cromatografia gasosa (CG) pode ser utilizada para substituir o método por espectrofotometria UV-VIS na determinação de resíduos de ditiocarbamatos. Outros métodos analíticos foram implementados para a determinação de resíduos de agrotóxicos por CG utilizando diferentes tipos de detecção. Estudos relatam a utilização da CG com detecção por captura de elétrons (CG-DCE), por fotometria em chama (CG-DFC) e por espectrometria de massas (CG-EM).

McLeod e McCully (1969) foram os primeiros a relatar o emprego da cromatografia com o método por *headspace* (HS), na determinação de etilenobisditiocarbamatos, usando hidrólise, ácida a 60°C , porém obtiveram recuperações insatisfatórias. Utilizando o mesmo

método, porém introduzindo os frascos aquecidos a 80°C *overnight* Van Haver e Gordts (1977) obtiveram boa correlação do método de Keppel. No método por HS, deve-se considerar que não é somente o CS₂ volátil que é injetado no cromatógrafo, mas também compostos sulfurosos voláteis, por isso um espectrômetro de massas é de grande valia para detecção seletiva (CRNOGORAC; SCHWACK, 2009).

Em 2002, De Kok e Bondegraven reportaram um método que substituí o HS utilizando 50 g de amostra incubada em 150 mL de ácido clorídrico 5,6 M mais 25 mL de trimetilpentano, e volume do extrato de isooctano submerso injetado de 5 µL no CG-DFC ou CG-EM. 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 Desvio Padrão Relativo (DPR) na faixa de 3,4 a 7,0 %.

Pfugmacher e colaboradores (1980), partiram do princípio que os DTCs são fungicidas não sistêmicos e publicaram uma técnica de cromatografia de permeação de gel (CPG), método para a determinação de manebe, zinebe, mancozebe e propinebe em frutas e legumes, e a extração realizada com solução aquosa de EDTA. As médias das recuperação apresentaram-se na faixa de 78-106 %. A faixa de trabalho utilizada foi de 0,25-2,0 mg.kg⁻¹. E o limite de quantificação (LQ) foi 0,05 mg.kg⁻¹ para diferentes culturas, exetuando o alface com LQ de 0,5 mg.kg⁻¹.

Segundo Coldwell e colaboradores (2003) a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a análise de ditiocarbamatos porém a CG apresenta melhor sensibilidade na determinação dessa classe de resíduos de agrotóxicos.

1.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. É uma avaliação importante para a qualidade das medições, rastreabilidade e confiabilidade (RIBANI et al., 2004).

O principal objetivo da validação é demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (WALSH, 1999). A validação também deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em métodos já validados, inclusão de novas técnicas ou uso de novos equipamentos (BRITO et al., 2003).

Na análise de resíduos de agrotóxicos, a validação do método geralmente ocorre, por meio de ensaios de recuperação pois o processo gera informações necessárias para avaliação do método analítico (AMARANTE JR. et al., 2001; THIER; ZEUMER, 1987).

Para a determinação dos parâmetros da validação são necessárias amostras contendo o analito de interesse em concentrações conhecidas e a amostra branco. As amostras com o analito podem ser chamadas de controle ou testemunha (BRITO et al., 2002) e a amostra branco é a amostra da matriz que será analisada não submetida ao tratamento com o ingrediente ativo a ser determinado.

Os parâmetros de desempenho normalmente avaliados na validação são: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão (AMARANTE JR. et al., 2001).

1.5.1 Seletividade

A seletividade analítica representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito em estudo em misturas complexas, sem a interferência de outros componentes que possam interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que a resposta encontrada seja exclusivamente da substância de interesse (INCQS, 2015b; CARDOSO et al., 2010; VESSMAN et al., 2001).

1.5.2 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, na faixa analítica especificada. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação da curva analítica (BRITO et al., 2003).

1.5.2.1 Homocedasticidade/heterocedasticidade

Independência/dependência da variância dos resíduos gerados após emprego do método dos mínimos quadrados às respostas do método, versus as concentrações das amostras analisadas. Pode ser avaliado através do teste de Cochran (INCQS, 2015b; CARDOSO et al., 2010).

1.5.3 Intervalo de trabalho ou faixa de trabalho ou faixa analítica

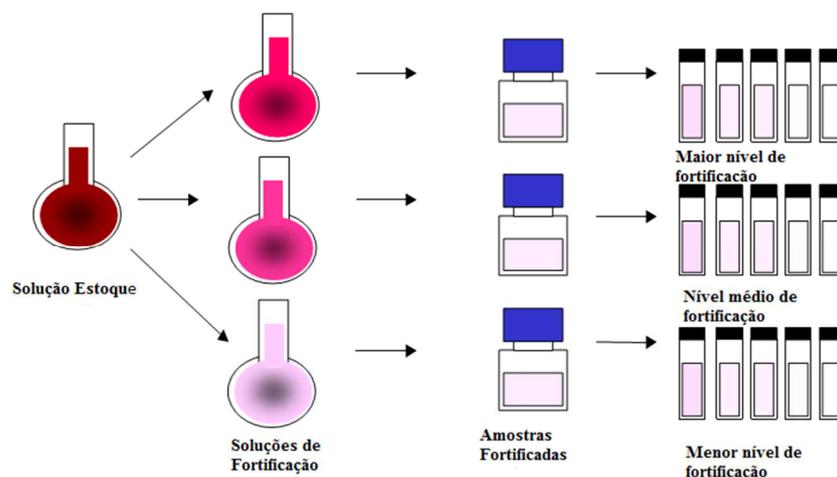
O intervalo de trabalho envolve as concentrações que serão utilizadas para a construção da curva analítica utilizada na quantificação das amostras (INCQS, 2015b; CARDOSO et al., 2010).

1.5.4 Exatidão (recuperação)

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico sendo expressa como erro sistemático percentual ao processo. Esse pode ocorrer pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou presença de substâncias interferentes na amostra (INCQS, 2015b; CARDOSO et al., 2010; BRITO et al, 2003).

Pode-se estimar a exatidão pela taxa de recuperação ou através de estudos interlaboratorias. A recuperação é estudada a partir da fortificação da amostra branco. Fortificar significa adicionar uma concentração conhecida do analito estudado na amostra branco (INCQS, 2015b). A recuperação avalia a exatidão do método para análise de amostras fortificadas, sempre que não houver material de referencia certificado disponível, e é expressa em porcentagem (DA SILVA, 2005). O intervalo de recuperação aceitável nas determinações de resíduos de agrotóxicos está entre 70 a 120 % (DG-SANCO, 2014). A Figura 4 ilustra um exemplo de como pode ser realizado o procedimento de fortificação.

Figura 4 - Procedimento de fortificação da amostra branco.



fonte: (BRITO, 2001)

1.5.5 Precisão (repetibilidade)

A precisão de medição representa o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas no mesmo objeto ou similares, sob condições especificadas - condições de repetibilidade ou de reproduzibilidade. A repetibilidade consiste na precisão da medição, sob condições de repetibilidade, com o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição e as mesmas condições de operação (INCQS, 2015b).

1.5.6 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a mais baixa concentração mensurável do analito em exame que pode ser detectado com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento analítico. Seu valor pode ser apresentado como Limite de Detecção do Instrumento (LDI) ou Limite de Detecção do Método (LDM) (INCQS, 2015b). Nesse trabalho, para o método estudado por CG-DFC, optou-se por utilizar o método da relação sinal ruído (S/R).

A relação S/R é a expressão do limite de detecção quando o valor do sinal se aproxima do nível de ruído característico do sistema. A razão S/R aceita como estimativa do LD pode ser na proporção de 3:1 (INCQS, 2015b; CARDOSO et al., 2010).

1.5.7 Limite de Quantificação (LQ)

O LQ representa a mais baixa concentração do analito em exame podendo ser determinado de forma quantitativa com precisão e exatidão adequadas, utilizando um determinado procedimento analítico (INCQS, 2015b; INMETRO, 2011).

Para este parâmetro adotou-se os mesmos critérios utilizados para o LD com uma relação da razão S/R de 10:1 (INCQS, 2015b; CARDOSO et al., 2010).

2 OBJETIVO GERAL

Validar e aplicar método de determinação de resíduos de ditiocarbamatos na matriz couve utilizando as técnicas analíticas por espectrofotometria de absorção no UV-VIS e por CG-DFC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar dois métodos de determinação de fungicidas ditiocarbamatos na matriz couve (por espectrofotometria de absorção no UV-VIS e por CG-DFC) no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ).
- Comparar os métodos avaliados e validar o escolhido para uso no laboratório de Resíduos de Agrotóxicos, de acordo com os critérios de aceitação dos parâmetros de validação.
- Aplicar o método analisando em amostras de couve provenientes do estado do Rio de Janeiro.

3 PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos em alimentos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; em 4 diferentes etapas:

1ª etapa – Avaliação do método por espectrofotometria de absorção UV-VIS;

2ª etapa - Avaliação do método por CG-DFC;

3ª etapa - Comparação dos dois métodos e escolha do método mais adequado de acordo com os critérios propostos da validação;

4ª etapa – Aplicação do método escolhido.

3.1 INSTRUMENTOS E CONDIÇÕES METODOLÓGICAS

Os equipamentos e vidrarias empregadas para a validação dos métodos estudados estão apresentados nos itens 3.1.1 e 3.1.2.

Todos os equipamentos utilizados estão calibrados e qualificados de acordo com o exigido pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (2005).

Para a avaliação dos métodos 1 e 2 foi utilizado o ditiocarbamato tiram, em função de sua grande solubilidade em solventes orgânicos e estabilidade em solução. Após hidrólise ácida a reação gera CS₂, o qual é quantificado através de uma curva analítica.

3.1.1 Método 1 – Espectrofotometria de absorção no UV-VIS

- Espectrofotômetro com luz visível modelo UV-1601PC (Shimadzu) operando a 435 nm, modo de leitura em absorvância;
- Mantas de aquecimento capacidade 250 mL;
- Cubetas de vidro para uso no espectrofotômetro
- Vidraria específica para determinação de ditiocarbamatos, apresentada na Figura 4;
- Balança analítica, modelo XP205 e modelo AG245, de 5 casa decimais (Mettler Toledo);
- Balança analítica, modelo LP620P, de 4 casas decimais (Sartorius);
- Pipetas volumétricas e becheres de volumes variados;
- Balões volumétricos com capacidade de 25 mL, 50 mL, 250 mL e 1000 mL;

3.1.2 Método 2 - CG-DFC, no modo enxofre

- Cromatógrafo a gás modelo TRACE CG Ultra com detector por fotometria de chama da Thermo Scientific, equipado com amostrador automático, injetor no modo *split*; temperatura do injetor de 220 °C, volume de injeção: 4 µL, Coluna cromatográfica DB-1301 (6 % cianopropilfenil e 94 % metilpolisiloxano) de 30 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 1 µm de espessura de filme, programação da temperatura do forno: 60 °C a 200 °C (1 min) e de 200 °C a 45 °C (0,10 min). Gases: Ar sintético = 115 mL min⁻¹, N₂ = 90 mL min⁻¹, e gás de *Make up* = 20 mL min⁻¹. Temperatura do detector DFC: base (300 °C) e chama (150 °C). O Tempo de corrida foi de 4,5 minutos. O equipamento foi ligado à uma estação de trabalho com o software ChromoQuest.
- Banho termostaticado, modelo DUBNOFF Metabolic Shaking, fabricante Precision Scientific;
- Frascos de vidro de 250 mL com tampa rosqueável;
- Pipetas volumétricas e balões volumétricos de diferentes volumes;
- Sistema de purificação de água, modelo Mili-Q Direct 8.

3.2 REAGENTES E SOLVENTES

Para este estudo, foram utilizados os padrões, reagentes e solventes listados na Tabela 4.

Tabela 4 – Padrões, reagentes e solventes utilizados no método 1 e no método 2.

Método 1 - Espectrofotometria de absorção no UV-VIS		Método 2 - CG-DFC, no modo enxofre	
Solvente/reagente/padrão	Fabricante	Solvente/reagente/padrão	Fabricante
Padrão de DTC - tiram	AccuStandard	Padrão de DTC - tiram	AccuStandard
Padrão de dissulfeto de carbono (CS ₂)/SPECTRO	Tedia	Padrão de dissulfeto de carbono (CS ₂)/SPECTRO	Tedia
Etanol, grau HPLC	Merck	Isooctano	Sigma Aldrich
Ácido Clorídrico 32 % P.A	Emsure	Ácido Clorídrico 32 % PA	Merck
Cloreto Estanoso PA	Emsure	Cloreto Estanoso PA	Merck
Hidróxido de sódio PA	Merck	Hidróxido de sódio PA	Merck
Dietanolamina	Emsure	Acetona grau resíduos de pesticidas	Merck
Acetato de Chumbo	JTBaker	Acetona PA	Tedia
Acetona PA	Tedia	Extran® Alcalino	Merck
Acetona, grau resíduos de pesticidas	Merck	Água Milli-Q®	Milipore
Água destilada e deionizada	Milipore		
Extran® Alcalino	Merck		
Extran® Neutro para lavagem das	Merck		

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.3.1 Soluções para fortificação

- Método 1 - Espectrofotometria de absorção no UV-VIS

Foi preparada uma solução estoque de tiram com concentração de 84,2 µg.mL⁻¹ em etanol, de acordo com o POP 65.3120.096 (INCQS, 2014b). A partir desta solução, preparou-se uma solução intermediária na concentração de 33,68 µg.mL⁻¹ em 25 mL de etanol de acordo com a Tabela 5. Estas soluções foram estocadas em freezer, em frascos de vidro âmbar, até o momento de uso. A validade da solução intermediária é de 1 ano.

Tabela 5 - Dados da preparação das soluções para fortificação no método 1.

Concentração solução estoque de tiram ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Alíquota de diluição (mL)	Volume final de diluição em etanol (mL)	Concentração final da solução intermediária tiram ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
84,2	10	25	33,68

- Método 2 - CG-DFC, modo enxofre

Foi preparada uma solução estoque de tiram com concentração de $94,3812 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em isooctano. A partir desta solução, preparou-se uma solução intermediária na concentração de $37,75248 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de tiram em 50 mL de isooctano, conforme a Tabela 6 abaixo. Essas soluções foram estocadas no freezer em frascos de vidro âmbar, até o momento de uso. A validade da solução intermediária é de 1 ano.

Tabela 6 - Dados da preparação das soluções para fortificação no método 2.

Concentração da solução estoque de tiram ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Alíquota de diluição (mL)	Volume final de diluição em isooctano (mL)	Concentração final da solução intermediária tiram ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
94,3812	20	50	37,75248

3.3.2 Soluções para confecção da curva analítica

- Soluções para confecção da curva analítica no Método 1 - Espectrofotometria de absorção no UV-VIS

Uma solução inicial (solução 1) foi preparada pesando 1 mL de CS_2 em balão volumétrico de 50 mL e avolumado com etanol. A partir da solução 1, fez-se duas subsequentes diluições obtendo-se a solução 3 com concentração nominal de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para o preparo da curva analítica, adicionou-se 15 mL de reagente complexante a cada balão volumétrico e diferentes alíquotas da solução 3. As concentrações nominais da curva analítica de CS_2 foram: $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A leitura da absorbância de cada nível de concentração da curva analítica foi realizada no espectrofotômetro de absorção no UV-VIS a 435 nm, A curva foi plotada em uma planilha,

construída no programa Microsoft® Excel 2013, com a inserção dos valores de concentração do CS₂ no eixo das abscissas e as absorvâncias obtidas no eixo das ordenadas.

- Soluções para confecção da curva analítica do Método 2 - CG-DFC.

A solução inicial (solução 1) foi preparada pesando-se 1 mL de CS₂ em balão volumétrico de 50 mL e avolumado com isoctano. A partir da solução 1, fez-se duas diluições subsequentes obtendo-se a solução 3 com concentração nominal de 50 µg.mL⁻¹.

A solução 3 foi utilizada para o preparo de diferentes concentrações nominais da curva analítica de CS₂: 1,0 µg.mL⁻¹; 1,5 µg.mL⁻¹; 2,0 µg.mL⁻¹, 2,5 µg.mL⁻¹ e 3,0 µg.mL⁻¹. A análise de cada nível de concentração da curva analítica foi realizada no CG-DFC. A curva foi plotada em uma planilha, construída no programa Microsoft® Excel 2013 com a inserção dos valores de concentração do CS₂ no eixo das abscissas e as áreas obtidas no eixo das ordenadas.

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA FORTIFICAÇÃO

Todas as amostras de couve orgânica usadas na fortificação do método 1 e 2 foram adquiridas de um mesmo fornecedor e mesma plantação em Nova Friburgo, RJ.

Testou-se dois procedimentos de preparo e armazenamento das folhas no método 1 e 2 (espectrofotométrico-UV-VIS): (a) picadas, homogeneizadas e congeladas e (b) picadas, homogeneizadas e mantidas sob refrigeração por no máximo 2 dias. Foram pesadas porções de 50 g +/- 0,5 g de couve orgânica dos meios de preparo (a) e (b) e armazenadas em sacolas plásticas no freezer ou em geladeira.

3.5 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.5.1 Método 1 - Espectrofotometria de absorção no UV-VIS

Para o procedimento de extração neste método, as amostras (a) picadas, homogeneizadas e congeladas ou (b) picadas, homogeneizadas e mantidas sob refrigeração foram transferidas para balões de fundo redondo com duas bocas, posicionado em uma manta de aquecimento. Em uma das bocas do balão foi encaixada uma mangueira de fluxo de

nitrogênio enquanto na outra boca alocou-se um condensador de vidro encaixado à outras duas peças de vidro, conforme mostra a Figura 5.

Figura 5 - Vidraria específica para determinação de ditiocarbamatos (A) e o espectrofotômetro (B) empregados no método 1.

(A)



(B)



A peça inferior adicionou-se 20 mL de uma solução de NaOH (10%) e na peça superior, 15 mL de uma solução complexante feita de acetato de chumbo, dietanolamina e etanol. Ao balão de fundo redondo contendo a amostra, foi adicionado 175 mL de uma solução digestiva, preparada com HCl 32% PA, SnCl_2 e água destilada.

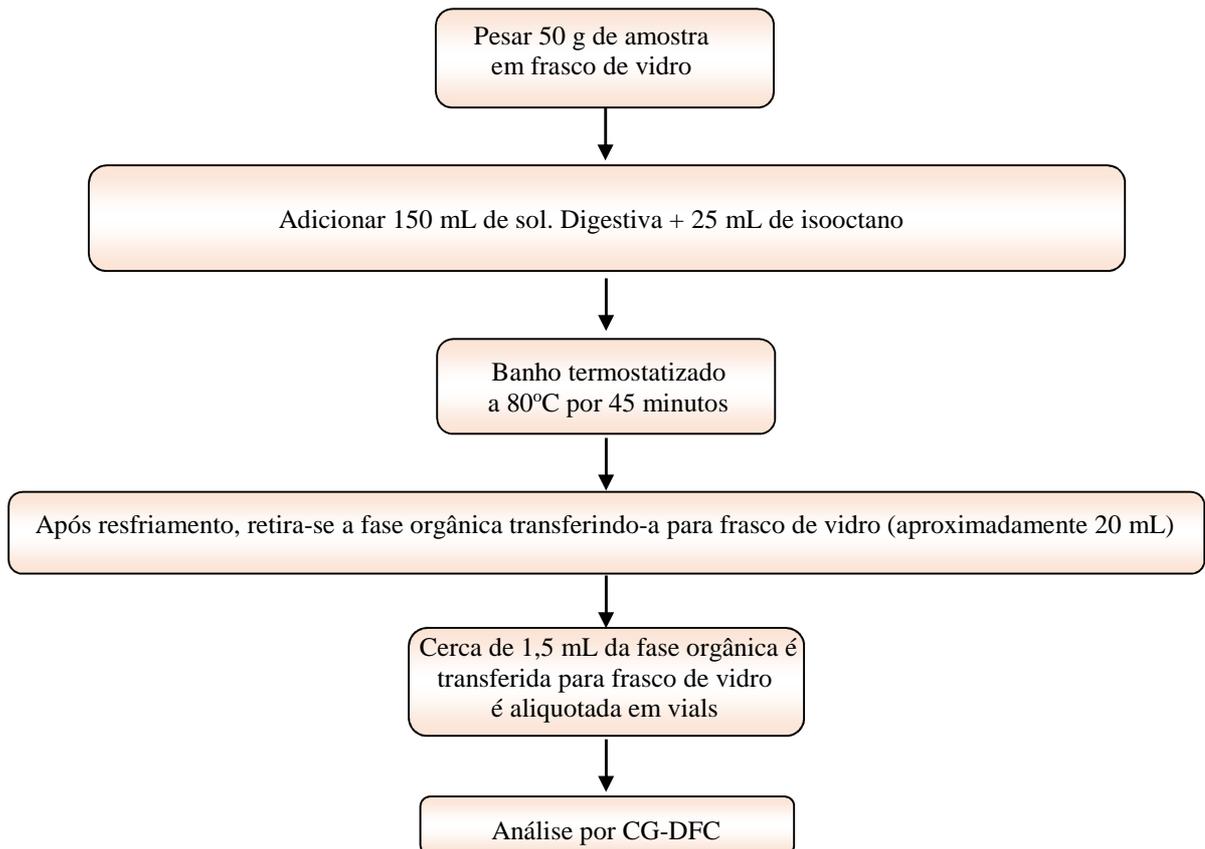
As amostras fortificadas, excetuando-se o branco, foram fortificadas com concentrações de tiram correspondendo respectivamente em CS_2 : $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ (nível 1); $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ (nível 2); $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (nível 3) de CS_2 . Para cada nível foram feitas 4 replicatas. Após a estabilização do fluxo de nitrogênio, a manta de aquecimento foi ligada e depois da visualização da condensação na boca do condensador, iniciou-se a contagem de 45 minutos. Ao finalizar esta contagem, o conteúdo da parte superior do sistema, foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e avolumado com etanol.

Procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 435 nm do produto complexado contido no balão de 25 mL.

3.5.2 Método 2 - CG-DFC, modo enxofre

Na Figura 6 é apresentado o fluxograma do método 2 (CG-DFC).

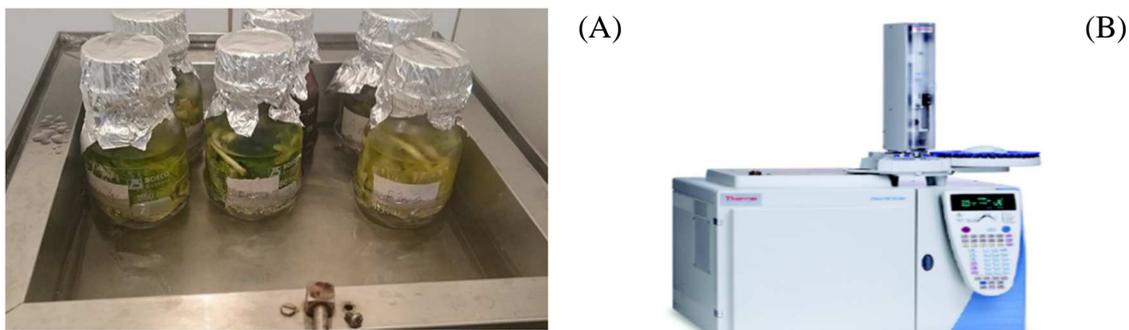
Figura 6 - Fluxograma da extração de ditiocarbamatos pelo método 2.



As amostras (a) picadas, homogeneizadas e congeladas ou (b) picadas, homogeneizadas e mantidas sob refrigeração foram transferidas para frascos de vidro de 250 mL. A cada frasco, foi adicionado 150 mL de solução digestiva (a mesma utilizada no método 1) mais 25 mL de isooctano e, para as amostras à fortificação, excetuando o branco, foram fortificadas com tiram em quantidade nominais de CS₂: 0,5 mg.kg⁻¹, 1,0 mg.kg⁻¹; 1,5 mg.kg⁻¹. Os vidros foram rapidamente vedados com tampas rosqueáveis, evitando desta maneira a evaporação de substâncias voláteis e precursoras de CS₂, e mantidas em banho termostáticos com agitação (Figura 7) à temperatura de 80 °C por 45 minutos. Finalizado o tempo no banho à quente, os frascos foram retirados e resfriados em água fria até atingir a temperatura ambiente.

Aproximadamente 1,5 mL da fase orgânica sobrenadante, cuja o CS_2 fica particionado, foi aliquoteada em vials e posteriormente, analisada em CG-DFC.

Figura 7 - Banho termostatzado com agitação (A) e o CG-DFC (B) empregados no método 2.



3.6 DESCONTAMINAÇÃO E LAVAGEM DAS VIDRARIAS UTILIZADAS

Todas as vidrarias utilizadas no método 1 e método 2 seguiram os procedimentos relatados no POP 65.3120.014 (INCQS, 2015a). As vidrarias do sistema digestor (método 1) foram lavadas com Extran[®] alcalino 5% (v/v) e rinsadas com água deionizada/destilada e postas a secar à temperatura ambiente.

Os frascos de vidro utilizados no método 2, assim como todas outras vidrarias contaminadas, foram descontaminados com acetona PA e depois lavados em água corrente e submetidos a molho de Extran[®] alcalino 5% (v/v) por no mínimo 4 horas. Após isto, as vidrarias foram lavadas em água corrente; lavadas com água destilada/deionizada; lavadas com acetona grau resíduos de pesticidas e por último colocada para secar à temperatura ambiente. As bordas dos materiais secos foram revestidas com papel alumínio e em seguida guardados.

As cubetas de vidro utilizadas no espectrofotômetro foram lavadas com solução de Extran neutro e rinsadas com água destilada/deionizada e depois com etanol grau HPLC e secas a temperatura ambiente

3.7 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Seletividade

As couves orgânicas (branco) adquiridas, homogeneizadas manualmente e pesadas, foram previamente analisadas no espectrofotômetro UV-VIS (método 1) e CG-DFC (método 2) para observação de possíveis interferentes da matriz na determinação de resíduos de ditiocarbamatos como CS₂.

3.7.2 Intervalo de trabalho e linearidade

Este parâmetro foi avaliado através da curva analítica de CS₂. A avaliação da linearidade foi feita utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários de acordo com a equação: $y = bx + a$. Para tal, utilizou-se uma planilha construída no Excel® na qual é verificada a existência de valores aberrantes, homogeneidade na variância dos resíduos da regressão e a significância da regressão.

No método 1, espectrofotométrico, utilizou-se 5 concentrações nominais de CS₂ preparadas em solvente etanol: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 µg.mL⁻¹ (faixa de trabalho). Cada ponto da curva foi lido 2 vezes.

Foi preparada, para o método 2, uma curva analítica de CS₂ em solvente isooctano, em 5 diferentes concentrações nominais: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3 µg.mL⁻¹ (faixa de trabalho). Cada uma das 5 soluções foi injetada 3 vezes no CG-DFC.

3.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação do Método (LDM e LQM)

Os Limites de Detecção e de Quantificação não foram avaliados para o método 1 pois o mesmo não apresentou seletividade.

O LDM ou LD, foi calculado para o método 2, a partir do conceito da relação sinal ruído (S/R) para o CS₂ avaliado (CARDOSO et al., 2010) O valor teórico do LD foi a concentração que produziu uma razão S/R de aproximadamente 3 ao se injetar três vezes 4 µL uma amostra de couve fortificada com a concentração de 0,9570 µg.mL⁻¹ de CS₂ correspondendo a uma

concentração nominal média na amostra de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, correspondendo ao primeiro ponto da curva analítica.

O LQ no método 2, foi calculado a partir do conceito da relação S/R para o CS_2 avaliado. O valor teórico do LQ foi a concentração que produziu uma razão S/R aproximadamente de 10 ao se injetar três vezes $4 \mu\text{L}$ uma amostra de couve fortificada com a concentração de $0,9570 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CS_2 correspondendo a uma concentração nominal média na amostra de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$, correspondendo ao primeiro ponto da curva analítica.

As Equações 1 e 2 utilizadas para cálculo desses valores são apresentadas a seguir:

$$\text{LDM} = \frac{\text{concentração correspondente ao S/R: } 3:1 \times 3 \times \text{DP das leituras}}{\text{Média das respostas}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{LQM} = \frac{\text{concentração correspondente ao S/R: } 3:1 \times 10 \times \text{DP das leituras}}{\text{Média das respostas}} \quad (\text{Eq. 2})$$

DP = Desvio Padrão

3.7.4 Precisão (repetibilidade)

No método 1, para fortificação, foram utilizados, respectivamente, alíquotas de: $0,8 \text{ mL}$ (nível 1), $1,0 \text{ mL}$ (nível 2), $2,5 \text{ mL}$ (nível 3) da solução intermediária de tiram (concentração $33,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de tiram).

No método 2, foram utilizados, respectivamente, alíquotas de: 1 mL (nível 1), 2 mL (nível 2) e 3 mL (nível 3) da solução intermediária de tiram ($37,7525 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de tiram).

Para o cálculo da quantidade nominal de tiram adicionado na amostra em mg.kg^{-1} dividiu-se a quantidade real de tiram adicionada em μg , por 50 g da amostra fortificada.

$$\text{mg.kg}^{-1} \text{ de tiram nominal} = \frac{\mu\text{g de tiram}}{50\text{g}} \quad (\text{Eq.3})$$

No cálculo da quantidade adicionada correspondente de CS₂ em µg.mL⁻¹ nominal utilizou-se a Equação 4.

$$\mu\text{g.mL}^{-1} \text{CS}_2 \text{Nominal} = \frac{\mu\text{g de tiram adicionada real}}{\text{Adicionada correspondente [vol. do balão de diluição (25 mL) x fator do tiram (1,578)]}} \quad (\text{Eq.4})$$

Para calcular a quantidade adicionada correspondente de CS₂ em mg.kg⁻¹ nominal utilizou-se a Equação 5.

$$\text{mg.kg}^{-1} \text{CS}_2 \text{ adicionado} = \frac{\mu\text{g.mL}^{-1} \text{CS}_2 \text{ adicionado} \times \text{vol. do balão de diluição (25 mL)}}{\text{massa da amostra (g)}} \quad (\text{Eq.5})$$

As tabelas 7 e 8 descrevem os pontos da curva analítica utilizados na validação e as concentrações correspondentes de tiram usados nas fortificações.

Tabela 7 - Pontos da curva de calibração e as concentrações correspondentes de tiram em CS₂ usados nas fortificações do método 1 (espectrofotométrico).

Pontos da Curva de Calibração CS ₂ (µg.mL ⁻¹) Nominais	Alíquota (mL)	Quantidade Adicionada Tiram (µg) Real	Quantidade Adicionada Tiram (mg.kg ⁻¹) Nominal	Quantidade Adicionada Correspondente CS ₂ (mg.kg ⁻¹) Nominal	Quantidade Adicionada Correspondente CS ₂ (µg.mL ⁻¹) Nominal
0,5	0,8	26,94	0,5	0,3	0,70
1,0	1,0	33,68	0,7	0,4	0,80
2,0	2,5	84,20	1,7	1,0	2,13

Tabela 8 - Pontos da curva de calibração e as concentrações correspondentes de tiram em CS₂ usados nas fortificações do método 2 (cromatográfico).

Pontos da Curva de Calibração CS ₂ (µg.mL ⁻¹) Nominais	Alíquota (mL)	Quantidade Adicionada Tiram (µg) Real	Quantidade Adicionada tiram (mg.kg ⁻¹) Nominal	Quantidade Adicionada Correspondente CS ₂ (mg.kg ⁻¹) Nominal	Quantidade Adicionada Correspondente CS ₂ (µg.mL ⁻¹) Nominal
1,0	1	37,7525	0,7471	0,4734	0,9570
2,0	2	75,5050	1,4998	0,9504	1,9139
3,0	3	113,2575	2,2550	1,4290	2,8709

A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo (% DPR) ou coeficiente de variação (% CV) dos resultados entre as quadruplicatas em cada um dos 3 níveis de concentração das amostras branco fortificadas com o ditiocarbamato tiram. O CV deve ser

inferior a 20 %. Este valor é especificado pela comunidade europeia segundo guia internacional (SANCO, 2014). O CV é calculado a partir da Equação 6.

$$CV\% = \frac{s}{M} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde:

CV= Coeficiente de Variação

s = Desvio padrão das recuperações

M = Média das recuperações

3.7.5 Exatidão (recuperação)

Este parâmetro foi avaliado através da avaliação da média das recuperações obtidas nos resultados entre as quadruplicatas em cada um dos 3 níveis de concentração das amostras branco fortificadas com o ditio-carbamato tiram. A Equação 8 expressa como é calculada a taxa de recuperação.

$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{valor real} \times 100}{\text{Valor real}} \quad (\text{Eq. 7})$$

3.8 IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO

A implementação deste método seguiu a norma ISO/IEC 17025:2005 que é a norma internacional que trata dos requisitos de qualidade, ensaios e calibração em laboratórios.

Assim para implementar o método foram adquiridas 12 amostras de couve diferentes produtores no comércio do Rio de Janeiro. Cada mole de folhas de couve obtidas pesava aproximadamente 1 kg. As folhas foram cortadas manualmente, homogeneizadas e pesadas em porções de 50 g +/- 0,5 g que em seguida foram armazenadas em freezer.

Estas amostras de couve foram analisadas pelo método escolhido após avaliação dos dois métodos e escolha do mais apropriado e que melhor atendesse os critérios pré-estabelecidos.

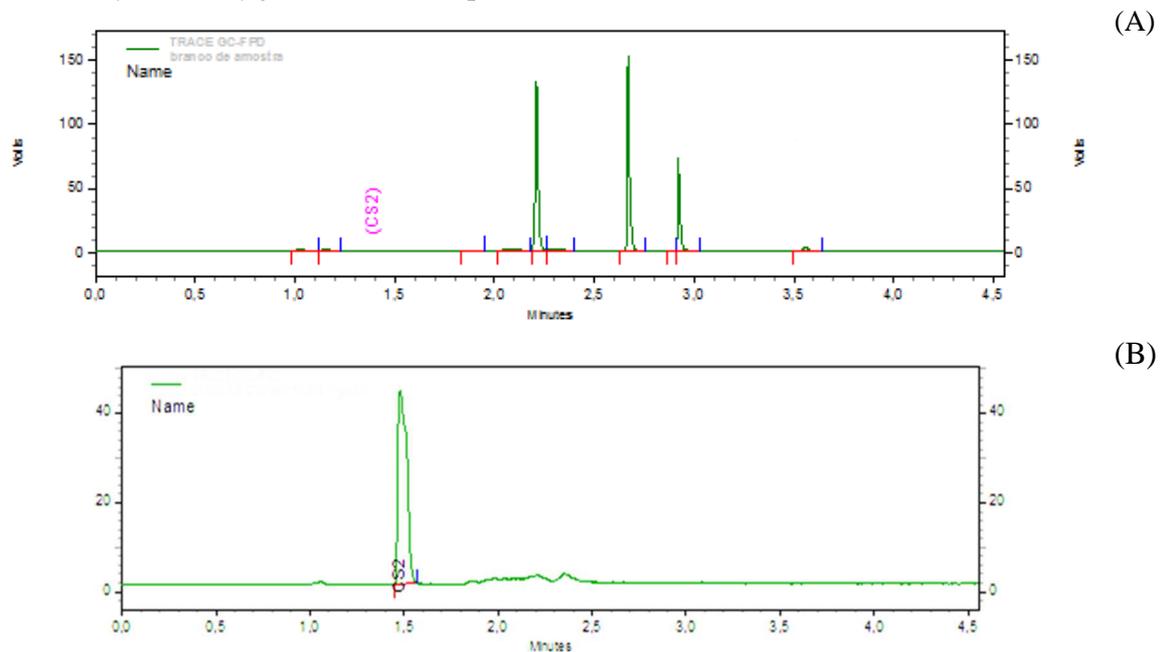
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SELETIVIDADE

O método 1 não demonstrou seletividade para a matriz testada pois apresentou interferentes no branco de couve, com absorvância de 0,011.

A amostra de couve orgânica utilizada como branco nas fortificações não apresentou interferência no tempo de retenção do CS₂ (1,5 min), demonstrando seletividade adequada no método 2, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - (A) Cromatograma da amostra de couve orgânica e (B) cromatograma da solução de CS₂ na concentração de 2,0 µg.mL⁻¹, analisada por CG-DFC.



4.2 INTERVALO DE TRABALHO E LINEARIDADE

As curvas analíticas no método 1 e 2 apresentaram-se linear e com variância dos resíduos homocedásticos na faixa de concentração expressa µg.mL⁻¹ de CS₂ (0,5 µg.mL⁻¹ a 2,0 µg.mL⁻¹ no método 1 e de 1,0 µg.mL⁻¹ a 3,0 µg.mL⁻¹ no método 2). Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados os respectivos resumos dos resultados obtidos para esse parâmetro. Na Figura 9 é apresentada a planilha com os dados obtidos através do método 2 para formulação da curva analítica.

Tabela 9 - Resumo dos resultados obtidos na avaliação da linearidade pela Anova para o método por espectrofotometria UV-visível (método 1).

Data de análise	Significância da regressão	Coef. de correlação (r)	Variância dos resíduos	Regressão
08/12/14	Linear	0,997397	Homocedástico	Significativa

Figura 9 - Planilha para avaliação da curva analítica CS₂, obtida através dos dados gerados pelo método 2 – CG-DFC.

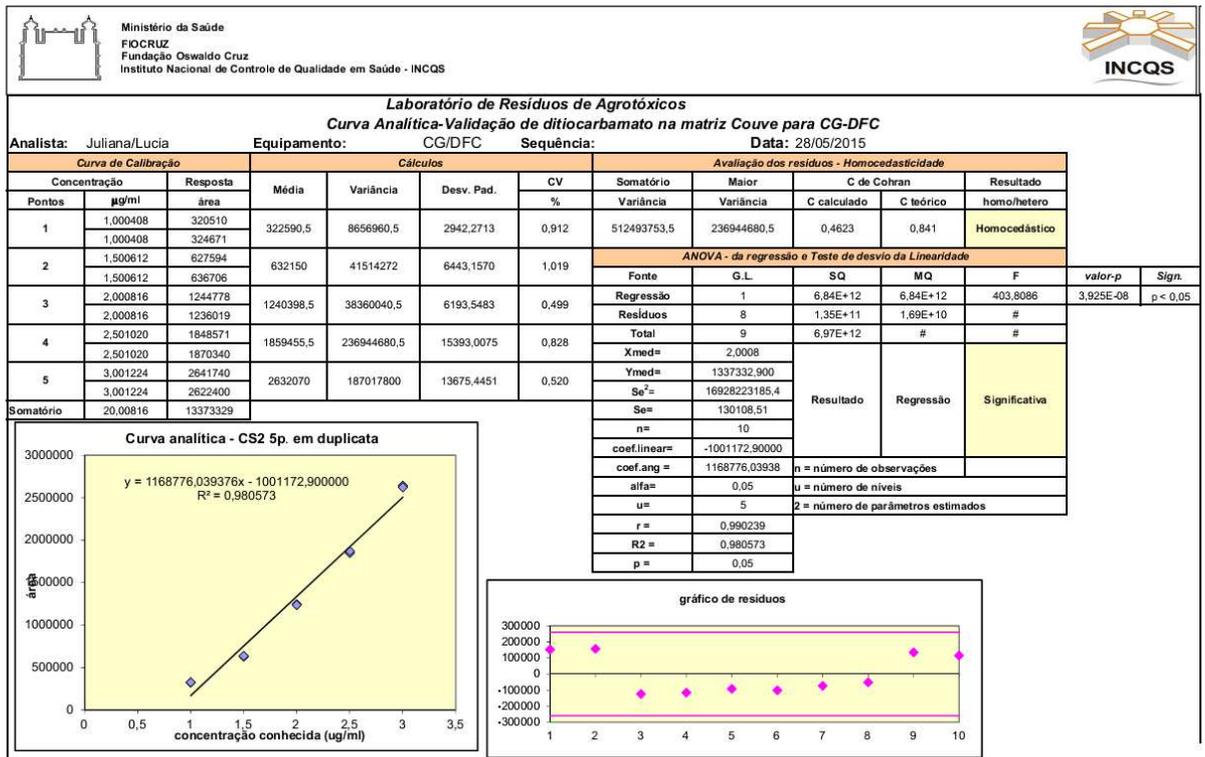


Tabela 10 – Resumo dos resultados obtidos na avaliação da linearidade pela Anova para o método por CG-DFC (método 2).

Data da análise	Significância da regressão	Coef. de correlação (r)	Variância dos resíduos	Regressão
28/05/15	Linear	0,990239	Homocedástico	Significativa

4.3 LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO

4.3.1 Limite de detecção e quantificação para o método por espectrofotometria de absorção no UV-VIS

O LD e o LQ não foram estabelecidos para este método visto que as recuperações das amostras fortificadas ficaram acima do estabelecido pelo SANCO (2014) que é entre 70 a 120 %.

4.3.2 Limite de detecção e quantificação para o método por CG-DFC

Para o cálculo do LDM e LQM foi considerado que a concentração de $0,9570 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (concentração referente ao primeiro nível de fortificação) apresentou a relação S/R de 3 e de 10. Na tabela 11, são apresentadas as áreas correspondentes à concentração utilizada para avaliação dos LD e LQ do método e seus referidos valores calculados a partir das Equações 1 e 2.

Tabela 11 - Leitura das áreas de CS_2 , correspondentes à concentração de $0,9570 \mu\text{g.mL}^{-1}$, obtidas pelo CG-DFC para cálculo do LD e LQ utilizando a relação S/R.

Conc. $0,9570 \mu\text{g.mL}^{-1}$		Limite de Detecção (LD) Relação (S/R de 3)	Limite de Quantificação (LQ) Relação (S/R de 10)
	áreas - CS_2		
injeção 1	273714	$= \frac{0,9570 \times 3 \times 28124,17103}{304754,6667}$ $= 0,264949128 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$= \frac{0,9570 \times 10 \times 28124,17103}{304754,6667}$ $= 0,883163761 \mu\text{g.mL}^{-1}$
injeção 2	312009		
injeção 3	328541		
média	304754,6667	$= \frac{0,2649 \times 25 \text{ mL}}{50,13 \text{ g}} = \mathbf{0,1324 \text{ mg.kg}^{-1}}$	$= \frac{0,8831 \times 25 \text{ mL}}{50,13 \text{ g}} = \mathbf{0,4404 \text{ mg.kg}^{-1}}$
desvio padrão	28124,17103		

O valor de LD de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ e LQ de $0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ foram confirmados a partir da fortificação em quadruplicata da concentração testada, apresentando precisão e recuperação adequadas. Os valores dos limites de detecção e de quantificação do método calculados estão de acordo com a faixa linear adotada e o LMR para matriz couve.

4.4 PRECISÃO E REPETIBILIDADE

Na Tabela 12 e Tabela 13 são apresentados os valores de concentrações encontradas e respectivos CV para os métodos 1 e 2 estudados.

Tabela 12 - Precisão e repetibilidade no método 1.

Couve - Concentração de CS₂ encontrada (µg.mL⁻¹)			
	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3
Repetição 1	1,4020	1,0320	2,2360
Repetição 2	1,8000	1,0030	2,5360
Repetição 3	1,6250	1,0220	2,320
Repetição 4	1,6160	0,9930	2,3170
Média (µg.mL⁻¹)	1,6205	1,0125	2,3185
Desvio Padrão	0,162914	0,017711	0,128531
Coefficiente de Variação (%)	10,05331	1,749199	5,543719

Tabela 13 - Precisão e repetibilidade no método 2.

Couve - Concentração de CS₂ encontrada (µg.mL⁻¹)			
	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3
Repetição 1	0,7913	1,7273	2,5287
Repetição 2	0,7252	1,7347	2,6948
Repetição 3	0,7154	1,6449	2,4749
Repetição 4	0,9245	1,5049	1,9733
Média (µg.mL⁻¹)	0,7891	1,65295	2,417925
Desvio Padrão	0,096355073	0,106762337	0,310842086
Coefficiente de Variação (%)	12,21075561	6,45889696	12,8557373

Nos métodos 1 e 2 os CV foram inferiores a 20 %, conforme especificado pelo SANCO (2014).

4.5 RECUPERAÇÃO E EXATIDÃO

Na Tabela 14 são apresentadas as taxas de recuperação encontradas para o método 1.

Tabela 14 - Concentração de CS₂ e recuperações no método 1.

Identificação	Massa (g)	Concentração de CS ₂ encontrado (µg.mL ⁻¹)	Concentração de CS ₂ encontrado (mg.kg ⁻¹)	Recuperação (%)	Média
1º Nível de Fortificação – 1ª Replicata	50,3870	1,4020	0,6956	205	236
1º Nível de Fortificação – 2ª Replicata	50,4510	1,8000	0,8920	264	
1º Nível de Fortificação – 3ª Replicata	50,2260	1,6250	0,8088	238	
1º Nível de Fortificação – 4ª Replicata	50,2310	1,6160	0,8043	237	
2º Nível de Fortificação – 1ª Replicata	50,5400	1,0320	0,5105	121	119
2º Nível de Fortificação – 2ª Replicata	50,2730	1,0030	0,4988	117	
2º Nível de Fortificação – 3ª Replicata	50,0370	1,0220	0,5106	120	
2º Nível de Fortificação – 4ª Replicata	50,0400	0,9930	0,4961	116	
3º Nível de Fortificação – 1ª Replicata	50,0910	2,2360	1,1160	105	110
3º Nível de Fortificação – 2ª Replicata	50,0920	2,5360	1,2657	119	
3º Nível de Fortificação – 3ª Replicata	50,1320	2,320	1,1679	110	
3º Nível de Fortificação – 4ª Replicata	50,088	2,3170	1,1583	109	

As recuperações para o método espectrofotométrico (método 1) no nível 1, ficaram fora do permitido pelo documento de orientação SANCO de validação de análises de resíduos de pesticidas em alimentação humana e animal, que indica a faixa aceitável de 70 a 120 % (SANCO, 2014). Para entender o que poderia ter levado essa alta recuperação, estudamos duas diferentes formas de preparo e armazenamento das amostras: picada e congeladas e picadas não congelada, os resultados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 15 - Recuperações de dois diferentes modos de preparo da amostra de couve.

Condição de preparo da amostra	Concentração de CS₂ encontrado mg.kg⁻¹	Recuperação (%)
Picadas e congelada (repetição 1)	1,1630	170
Picadas e congelada (repetição 2)	1,4780	216
Picadas e não congelada (repetição1)	0,8060	118
Picadas e não congelada (repetição 2)	0,8360	122

Os resultados demonstraram que a couve picada e congelada apresentaram uma recuperação acima da faixa aceitável pelo SANCO (2014). Pôde-se constatar com isso que o congelamento e descongelamento estão relacionados com o aumento de substâncias precursoras de CS₂ fitogênico (isotiocianatos), levando a obtenção de resultados falsos positivos no método 1. O mesmo procedimento de picar e congelar foi aplicado ao método 2 porém não houve alteração significativa na resposta, não sendo identificado sinal no tempo de retenção do CS₂.

Na tabela 16 são apresentados os resultados obtidos nas recuperações do método 2. As recuperações para o método 2 estão dentro da faixa aceitável pelo SANCO (2014).

Tabela 16 - Relação das amostras fortificadas e a recuperação no método 2.

Identificação	Massa (g)	Concentração encontrada $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CS ₂	Concentração encontrada $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ CS ₂	Recuperação (%)	Média
1º Nível de Fortificação – 1^a Replicata	51,254	0,7913	0,3860	83	82
1º Nível de Fortificação – 2^a Replicata	50,354	0,7252	0,3601	76	
1º Nível de Fortificação – 3^a Replicata	50,523	0,7154	0,3540	75	
1º Nível de Fortificação – 4^a Replicata	50,008	0,9245	0,4622	97	
2º Nível de Fortificação – 1^a Replicata	50,550	1,7273	0,8543	83	86
2º Nível de Fortificação – 2^a Replicata	50,270	1,7347	0,8627	90	
2º Nível de Fortificação – 3^a Replicata	50,330	1,6449	0,8171	91	
2º Nível de Fortificação – 4^a Replicata	50,230	1,5049	0,7490	86	
3º Nível de Fortificação – 1^a Replicata	50,509	2,5287	1,2516	79	84
3º Nível de Fortificação – 2^a Replicata	50,031	2,6948	1,3466	88	
3º Nível de Fortificação – 3^a Replicata	50,030	2,4749	1,2367	94	
3º Nível de Fortificação – 4^a Replicata	50,334	1,9733	0,9801	86	

4.6 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS AVALIADOS

Após avaliação dos dois métodos desse estudo, verificou-se que o método 1, espectrofotométrico, não atendeu os requisitos específicos da validação na matriz couve-manteiga. Apesar de ser um método que requer baixo investimento para ser implementado por apresentar equipamentos e vidrarias mais acessíveis, apresentou baixa seletividade com absorbância de 0,011 na amostra branco e baixa exatidão com média de recuperações no primeiro nível de 236 %, acima da faixa indicada pela literatura. Além disso, este método apresentou maior consumo de solventes e tempo, requerendo apenas duas amostras extraídas

por 45 minutos, ou seja, no máximo 8 análises por dia. Já o método 2, CG-DFC, um sistema com alta seletividade para compostos sulfurados, apresentou excelente seletividade para a matriz couve que contém vários compostos contendo enxofre, que pôde ser confirmada por não configurar nenhum sinal de CS₂ na matriz branco. Demonstrou bons resultados no parâmetro exatidão com todas as recuperações dos 3 níveis dentro da faixa especificada pela literatura. Comprovou praticidade e economia, consumindo menos solventes e dispondo de maior quantidade de amostras extraídas (6 frascos contendo as amostras) por 45 minutos, totalizando em média 12 análises por dia, levando em consideração o número de frascos de vidro disponíveis no laboratório para este fim.

4.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO

Das doze amostras de couve analisadas pela CG-DFC, apenas duas apresentaram sinal no tempo de retenção do CS₂, com valores de resíduos de ditiocarbamatos expressos em mg.kg⁻¹ de CS₂. Ambas as respostas obtidas destas duas amostras encontraram-se abaixo do limite máximo permitido para a matriz couve pela literatura (1 mg.kg⁻¹). A seguir, são apresentados os cromatogramas das duas amostras de couve A e B (Figura 10 e Figura 11).

Figura 10 – Cromatograma da amostra de couve A

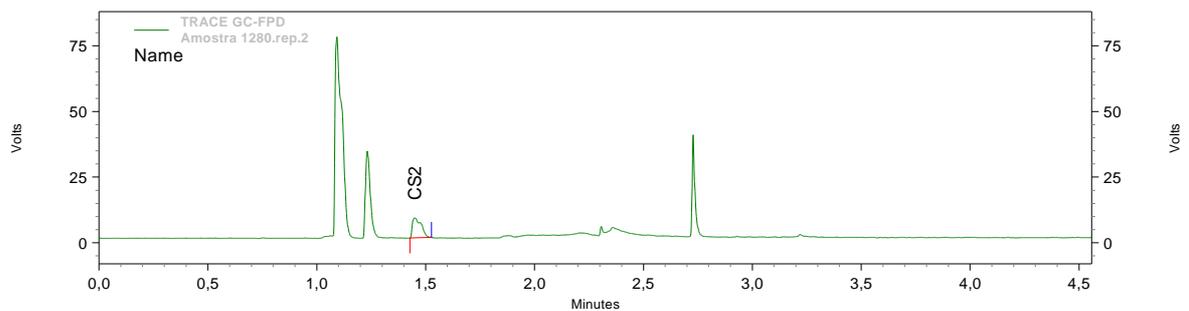
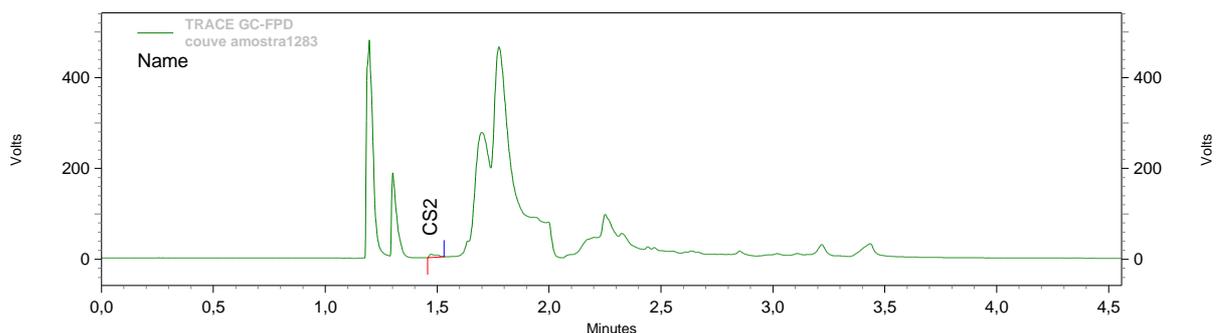


Figura 11 – Cromatograma da amostra de couve B.



5 CONCLUSÃO

A validação de métodos analíticos é de grande importância para determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos, garantindo a confiabilidade dos resultados e a segurança dos consumidores.

Através deste estudo pode-se inferir que o método 1 (espectrofotometria UV-Visível) não é adequado para determinar resíduos de ditiocarbamatos na matriz couve, apresentando resultados insatisfatórios dentre os parâmetros especificados na validação.

Foi possível validar e implementar um segundo método, utilizando a CG-DFC, o qual atendeu todos os parâmetros da validação, além de demonstrar maior praticidade e economia de solventes e mão de obra. Foram analisadas amostras de couve e cerca de 15 % apresentaram ditiocarbamatos como CS₂ dentro do LMR especificado na legislação.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

AGROFIT (Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários). Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária/Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1988.

AMARANTE JR., O. P.; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de Pesquisa**, São Luis, v. 12, p. 116-131, 2001.

AZEVEDO, M. F. A. Abordagem inicial no atendimento ambulatorial em distúrbios neurotoxicológicos. Parte II – agrotóxicos. **Revista Brasileira de Neurologia**, Rio de Janeiro, v.46 (4), p.21-28, 2010.

BLOCK, G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 53, p. 270-282, 1991.

BONES, M. A.; ROSSITER, B. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p. 194-208, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância do câncer ocupacional e ambiental. Rio de Janeiro: INCA, 2010

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Cartilha sobre Agrotóxicos. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias de agrotóxicos autorizadas. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: 13 jun. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatórios anuais do programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 11 jun. 2015.

BRASIL. Presidência da República – Casa Civil. Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Publicado no **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 de janeiro de 2002. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 11 jun. 2015.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2001.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de método analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR, O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da Exatidão e da Precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

CALDAS, E. D.; CONCEIÇÃO, M. H.; MIRANDA, M. C. C.; De SOUZA, L. C. K. R.; LIMA, J. F. Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by a spectrophotometric method using a vertical disulfidated reaction system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4521-4525, 2001.

CARNEIRO, F. F.; ALMEIDA, V. E. S. Os riscos socioambientais no contexto da modernização conservadora da agricultura. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 22-3, 2007.

CARDOSO, M. H. W. M; GOUVÊA, A. V; NÓBREGA, A. W; ABRANTES, S. M. P. Validação de Método para determinação de resíduo de agrotóxico em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.63-72, 2010.

COLDWELL, M. R.; PENGELLY, I.; RIMMER, D. A. Determination of dithiocarbamate pesticides in occupational hygiene sampling devices using the isooctane method and comparison with an automatic thermal desorption (ATD) method. **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 81-88, 2003.

CRNOGORAC, G.; SCHWACK, W. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. **Trends in Analytical Chemistry**, p. 40-50, 2009.

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

DA SILVA, R. C. Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface. **Dissertação de Mestrado em Química - Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, p. 118f, 2005.

De KOK, A.; VAN BODEGRAVEN, P. **The determination of dithiocarbamate pesticides in fruits, vegetables and cereals via isooctane extraction of carbondisulfide and subsequent GC-ECD**. Roma: [s.n.]. 2002. p. 319.

DG-SANCO. **European Commission. Guidance document on analytical control and validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. Document No SANCO/12571/2013**. [S.l.], p. 1-40. 2014.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION. Agricultura database, 2003. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: outubro 2015.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O.; RIAL-OTERO, R.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; SIMA-GÁNDARA, J. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 366-374, 2012.

HAIŠLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatography analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, n. 2, p. 283-295, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008**. Rev. 04, jul 2011. 19f.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.014**: Lavagem de material para análise de resíduo de agrotóxico. Rev. 06. Rio de Janeiro, 2015a. 4p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.082**: Parâmetros estatísticos para validação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2015b. 26 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.079**: Determinação de resíduos de ditiocarbamatos em hortifrutigranjeiros. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2014a. 14 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3120.096**: Especificação, manuseio, armazenamento, preparo e registro do material de referência de agrotóxicos. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2014b. 9 p. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Relatório de agrotóxicos. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em 16 de dez. 2015.

KELLY, P. J.; BONES, A.; ROSSITER, J. T. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. **Planta Medica**, v. 206, p. 370-377, 1998.

KEPPEL, G. E. Collaborative study of determination of dithiocarbamate. Residues by a modified carbon disulfides evolution method. **Journal of Association Official Analytical Chemists**, v. 54, p. 528-532, 1971.

KLAASSEN, C.; WATKINS, B.J. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. 2ª ed, Porto Alegre: AMGH, 2012, 460 p.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. 1ed. São Paulo: Manole, 1999. 218 p.

LEMES, V. R. R.; BARRETO, H. H. C.; KUSSUMI, T. A.; COLACIOPPO, S. Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiuréia (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 64, n. 1, p. 50-7, 2005.

MC LEOD, H. A.; MC CULLY, K. A. Head space procedure for screening food samples for dithiocarbamate residues. **Journal of Association Official Analytical Chemists**, v. 52, 1969.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E MEIO AMBIENTE. Agrotóxicos. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acesso em: 21 out. 2015.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F. E. A. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo/RJ. **Saúde Coletiva**, p. 299-311, 2002.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Orgs.). **É veneno ou é remédio?:** agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 21-41.

PFLUGMACHER, J.; EBING, W.; Eine neue Schnellmethode zur Bestimmung von Alkylen-bis-dithiocarbamat-Fungicid-Rückständen. **Z Lebensm Unters Forch**, v. 170, p. 349-354, 1980.

PERZ, C. R.; VAN LISHAUT; SHWACH, W. CS₂ Blinds in Brassica Crops: False Positive Results in the Dithiocarbamate Residue Analysis by the Acid Digestion Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.792-796, 2000

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforeticos. **Quimica Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SINDAG – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. Investimento em tecnologia produziu safra recorde. Conexão Sindag Especial, ano 8, n. 42, 2013. Disponível em: <www.sindiveg.org.br/conexao/antiores/conexao_42.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2015.

SONG, L.; THORNALLEY, P. J. Effect of storage, processing and cooking on glucosionolate content of Brassica vegetables. **Food Chemical Toxicology**, p. 216-224, 2007.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA, M. H. N.; MAIA, G. A. Componentes Funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 37, p. 127-135, 2003.

SHAPIRO, A.T.; FAHEY, J. W.; WADE, K. L.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts: Metabolism and Excretion in Humans. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v.10, p. 501-508, 2001.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide analysis**. New York: Chemie Verlag, 1987. p. 37-41.

VAN HAVER, W.; GORDTS, L. Analysis of dithiocarbamate pesticide residues a comparison of the head space and the colorimetric method.

Z Lebensm Unters Forch, v. 165, n. 1, p. 28-29, 1977

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 616-623, 1999.

WHO. International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risks to Humans. Geneva, Switzerland. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol79/mono79-23.pdf>>. Acesso em 04 de jan. 2016.