

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

Nathália Ferreira Soares

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS EM  
ALIMENTOS INFANTIS À BASE DE CEREAIS**

Rio de Janeiro

2020

Nathália Ferreira Soares

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS EM  
ALIMENTOS INFANTIS À BASE DE CEREAIS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Silvana do Couto Jacob  
Co-orientadora: Maria Helena W. M. Cardoso

Rio de Janeiro

2020

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

Soares, Nathalia Ferreira

Avaliação da ocorrência de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos infantis à base de cereais . / Nathalia Ferreira Soares. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.  
63 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

Orientadora: Silvana Do Couto Jacob.  
Co-orientadora: Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso.

1. Ditiocarbamatos . 2. Cereal infantil . 3. CG-EM . I. Título.

Dithiocarbamates residues occurrence assessment in cereal-based infant foods.

Nathália Ferreira Soares

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE DITIOCARBAMATOS EM  
ALIMENTOS INFANTIS À BASE DE CEREAIS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora) – Presidente  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Izabela Miranda de Castro (Doutora)  
Embrapa Agroindústria de Alimentos

---

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

**ORIENTADOR(ES)**

---

Silvana do Couto Jacob (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutora) – Co-orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado saúde e sabedoria para saber lidar com todas as situações. Sem Ele nada disso teria sido possível.

Ao programa de pós-graduação do INCQS/Fiocruz e ao CNPq pela oportunidade.

Às minhas orientadoras, Maria Helena e Silvana Jacob, assim como Lucia Helena Bastos e Angelica C. Oliveira do setor de resíduos de agrotóxicos, pela ótima orientação, paciência, confiança no meu trabalho e pelo apoio durante os inúmeros percalços que apareceram durante esses dois anos.

Ao Marcelo Tappin do Departamento de Métodos Analíticos de Farmanguinhos por possibilitar o uso do equipamento CG-EM e Rafaella Cruz pelo auxílio durante as análises instrumentais; sua ajuda foi de grande importância para elaboração deste trabalho.

À minha mãe, Rosângela, pelo amor, incentivo e por apoiar minhas decisões e me amparar sempre que pensei em desistir.

Aos meus amigos Jorginho, Santos, Gleyce e Luiza pelo companheirismo desde o processo seletivo e aos que ganharam o meu carinho durante o caminho, Daniel, Robert e Mayssa. Não poderia imaginar ter passado por essa jornada sem vocês. A “turma da merenda” pela leveza e divertimento nesse segundo ano tão tenso e cheio de preocupações. A Thaiz por ser minha companheira dentro e fora do laboratório, pelos conselhos, paciência e por trazer mais luz para os meus dias com seu bom humor e sorriso.

Ao Gladson pela amizade que surgiu aos poucos, mas que foi um importante amparo em muitos momentos, inclusive secando muitas das minhas lágrimas. Sou extremamente grata por todos os conselhos e ensinamentos.

A professora Ana Cláudia que sempre foi uma grande amiga e mesmo de longe sempre me incentivou a perseguir meus sonhos e com muito carinho dividiu comigo minhas maiores realizações atuais.

E, por fim, a todos os familiares e amigos que também sempre me apoiaram e me deram força para continuar caminhando firme e forte!

“I cannot remember the books I've read any more than the meals I have eaten; even so, they have made me.”

Ralph Waldo Emerson

## RESUMO

A escolha adequada do alimento consumido pela criança durante os primeiros anos de vida está relacionada ao bom desenvolvimento do indivíduo, contudo a alimentação é uma importante fonte de exposição à resíduos e contaminantes químicos. Os ditiocarbamatos (DTC) são uma classe de agrotóxicos amplamente utilizada no Brasil, sendo o mancozebe o terceiro ingrediente ativo mais vendido no país em 2018. Segundo o *Codex Alimentarius* os resíduos não devem permanecer no produto acabado ou serem reduzidos ao menor limite possível e para a Comunidade Europeia (CE) o LMR máximo permitido é de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para grande número de agrotóxicos, entre eles os DTCs. Entretanto, o Brasil não possui uma regulamentação específica para alimentos infantis e não realiza o seu monitoramento. Desta forma, o objetivo do trabalho é validar o método de determinação de DTCs por cromatografia à gás com espectrometria de massas (CG-EM) em cereais infantis e avaliar quantitativamente amostras comercializados no município do Rio de Janeiro. O método foi validado segundo os critérios do documento SANTE e do *Codex Alimentarius* levando em conta os parâmetros: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão. Quanto a seletividade, a amostra de cereal usada na validação não apresentou interferentes e o intervalo de trabalho de  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  mostrou-se linear. O LQ  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{CS}_2$  foi considerado adequado aos documentos internacionais usados como parâmetro para avaliação dos resultados. As análises apresentaram coeficiente de variação  $\leq 20\%$  e taxa de recuperação entre 70-120%, assim para precisão e exatidão os resultados foram considerados satisfatórios. Além disso, foram analisadas 25 amostras de produtos infantis à base de cereais, com 11 apresentando leitura para  $\text{CS}_2$ , e destas, 4 com concentração maior que  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo assim, elas seriam consideradas insatisfatórias segundo o *Codex Alimentarius* e CE. O estudo pode fornecer dados sobre resíduos de agrotóxicos da classe dos ditiocarbamatos em cereais de uso infantil, inexistentes até o momento, possibilitando a discussão sobre a importância do monitoramento destes produtos visando minimizar os riscos a população infantil.

Palavras-chave: Ditiocarbamatos. Cereal infantil. CG-EM. Validação.

## ABSTRACT

The adequate choice of the food consumed by the child during the first years of life is related to the individual's good development, however food is an important source of exposure to residues and chemical contaminants. Dithiocarbamates (DTC) are a class of pesticides widely used in Brazil, with mancozebe being the third best-selling active ingredient in the country in 2018. According to *Codex Alimentarius*, residues must not remain in the finished product or be reduced to the lowest limit possible and for the European Community (EC) the maximum allowed MRL is  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  for a large number of pesticides, including DTCs. However, Brazil does not have specific regulations for infant foods and does not monitor them. Thus, the objective of this article is to validate the method of determination of DTCs by gas chromatography with mass spectrometry (GC-EM) in children's cereals and to quantitatively evaluate samples sold in the city of Rio de Janeiro. The method was validated according to the criteria of the document SANTE and *Codex Alimentarius* taking into account the parameters: selectivity, linearity, working range, detection limit (LD) and quantification (LQ), precision and accuracy. As for selectivity, the cereal sample used in the validation showed no interferences and the working range of  $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  was linear. The LQ  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  of  $\text{CS}_2$  was considered adequate to the international documents used as a parameter to evaluate the results. The analyzes showed a coefficient of variation  $\leq 20\%$  and a recovery rate between 70-120%, so for precision and accuracy the results were considered satisfactory. In addition, 25 samples of infant cereal-based products were analyzed, with 11 showing a reading for  $\text{CS}_2$ , and of these, 4 with a concentration greater than  $0.01 \text{ mg kg}^{-1}$ , therefore, they would be considered unsatisfactory according to *Codex Alimentarius* and CE. The study can provide data on pesticide residues of the class of dithiocarbamates in children's cereals, which didn't exist until now, enabling the discussion on the importance of monitoring these products in order to minimize the risks to the child population.

Key words: Dithiocarbamates. Cereals. GC-MS. Validation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cardápio da merenda escolar oferecido pelas creches no município do Rio de Janeiro para o período de outubro a dezembro de 2019.....	17
Figura 2	Quadro com os ingredientes ativos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e perfil de uso no país.....	22
Figura 3	Esquema representando a degradação dos EBDCs e posterior formação do ETU.....	24
Figura 4	Reação de hidrólise ácida do tiram formando dimetilditiocarbamato cúprico.....	26
Figura 5	(A) Sistema de determinação de ditiocarbamatos pelo método espectrofotométrico; (B) em detalhe a vidraria específica com a discriminação dos seus principais componentes.....	27
Figura 6	Equação para determinação da concentração de ditiocarbamatos (DTC) a partir do CS <sub>2</sub> liberado pela hidrólise ácida da amostra.....	36
Figura 7	Cromatograma da (a) solução de CS <sub>2</sub> na concentração de 0,05 µg mL <sup>-1</sup> , analisada por CG-EM e (b) amostra de cereal infantil.....	42
Figura 8	Planilha para avaliação da curva analítica da análise utilizando amostras de cereal infantil fortificadas com tiram.....	44
Figura 9	Planilha para determinação do LD e LQ.....	45
Figura 10	Concentrações de CS <sub>2</sub> adicionados e recuperados nas amostras com suas respectivas taxas de recuperação e CV.....	47
Figura 11	Planilha para avaliação da curva analítica da análise das amostras comerciais de cereal infantil.....	48
Figura 12	Cromatograma dos íons de m/z 76 e m/z 78 referente ao ponto da curva de concentração 0,05 µg mL <sup>-1</sup> de CS <sub>2</sub> .....	49
Figura 13	Planilha para cálculo da recuperação das amostras controle utilizadas na análise dos cereais infantis.....	50
Figura 14	Esquema de processamento industrial do milho a seco.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2017.....	21
Tabela 2	Comparativo entre a LMR e os ingredientes ativos da classe dos ditiocarbamatos permitidos no Brasil, União Europeia, <i>Codex Alimentarius</i> e FDA.....	23
Tabela 3	Relação das amostras de cereal infantil analisadas, elencando os cereais presentes, lote e estado de coleta de cada uma delas.....	39
Tabela 4	Tabela com informações referentes as amostras que apresentaram leitura para CS <sub>2</sub> .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ-ALA-D	δ-aminolevulinato desidratase
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Comunidade Europeia
CG-DFC	Cromatografia a gás com detector fotométrico por chama
CG-ECD	Cromatografia a gás com detector por captura de elétrons
CG-EM	Cromatografia a gás com espectrometria de massas
CODEX	<i>Codex alimentarius</i>
CV	Coeficiente de variação
DMDC	Dimetilditiocarbamato
DPR	Desvio padrão relativo
DTC	Ditiocarbamato
EBDC	Etilenobisditiocarbamato
ETU	Etilenotiuréia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC - DAD	Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodo
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
IA	Ingrediente ativo
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDMT	Ingestão Diária Máxima Teórica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LD	Limite de detecção
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PNAE	Programa Nacional de Alimentação e Nutrição
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PROMAC	Programa Nacional de Contaminantes em Alimentos
SANTE	<i>European Commission Directorate-General For Health and Food Safety</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
S/N	Razão sinal ruído
<i>u</i>	Unidade de massa atômica unificada
UNICEF	Fundo das Nações Unidas
VISA	Vigilância Sanitária

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	Alimentação infantil.....	15
1.2	Perfil de consumo de cereais infantis no município de Rio de Janeiro.....	16
1.3	Registro de agrotóxicos no Brasil.....	17
1.4	Resíduos de agrotóxicos em alimentos .....	18
1.5	Dados sobre o uso de agrotóxicos no Brasil .....	21
1.6	Ditiocarbamatos.....	22
1.6.1	Etilenotiouréia (ETU).....	24
1.6.2	Toxicologia dos DTCs.....	25
1.7	Métodos para análise de ditiocarbamatos.....	26
1.8	Regulamentação sobre o uso de agrotóxicos em alimentos infantis .....	28
1.9	Validação de método analítico.....	29
1.9.1	Seletividade .....	30
1.9.2	Linearidade e intervalo de trabalho.....	30
1.9.3	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	31
1.9.4	Exatidão e precisão .....	31
1.10	O papel da vigilância sanitária no monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos .....	32
1.11	Justificativa .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>33</b>
2.1	Objetivo Geral .....	33
2.2	Objetivos específicos .....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
3.1	Preparo e extração da amostra.....	34
3.1.1	Preparo de soluções estoque e intermediária.....	34
3.1.2	Equipamento.....	34
3.1.3	Condições operacionais do equipamento .....	35
3.1.4	Otimização do método de extração .....	35
3.2	Determinação quantitativa da concentração de DTCs .....	35
3.3	Validação do método analítico .....	36
3.3.1	Seletividade .....	36
3.3.2	Estudo da faixa linear de trabalho.....	37

3.3.3 Limites de Detecção e de Quantificação do Instrumento e do Método .....	37
3.3.4 Recuperação e repetibilidade .....	38
<b>3.4 Descrição das amostras.....</b>	<b>39</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Otimização do método de extração.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Validação do método analítico .....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Seletividade .....	41
4.2.2 Linearidade, faixa de trabalho e efeito matriz .....	43
4.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação .....	44
4.2.4 Precisão.....	46
4.2.5 Exatidão.....	47
<b>4.3 Análises de amostras comerciais de cereal infantil ou produtos contendo cereal.....</b>	<b>48</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO A – MONOGRAFIA DO INGREDIENTE ATIVO MANCOZEBE .....</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Alimentação infantil

A alimentação infantil principalmente nos primeiros anos de vida é muito importante, pois pode influenciar diretamente no desenvolvimento físico, psicossocial e emocional do indivíduo. Assim, a escolha adequada dos tipos de alimentos que a criança irá consumir é essencial. Nos primeiros 6 meses de vida, considera-se o aleitamento materno exclusivo à livre demanda a prática ideal, entretanto, o aleitamento materno deve persistir até a idade mínima de dois anos (WHO, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas (UNICEF) orientam o “início precoce da amamentação”, ou seja, iniciar a amamentação uma hora após o nascimento, visto que estudos apontam que bebês que iniciaram a amamentação entre 2-23 horas após o nascimento tiveram 33% mais risco de mortalidade neonatal comparado a lactentes que iniciaram a amamentação dentro de uma hora após o nascimento (SMITH *et al.*, 2017). Após 6 meses de idade recomenda-se a adição gradual de alimentos complementares.

Segundo a Sociedade Brasileira de Pediatria (2006), a papinha salgada deve ser adicionada à alimentação a partir dos 6 meses de vida e é recomendável que estejam presentes os seguintes grupos alimentares: cereais ou tubérculos, leguminosas, proteína animal e hortaliças. O consumo desses alimentos pode representar uma importante fonte de exposição a resíduos e contaminantes químicos dentre esses os agrotóxicos.

Na primeira infância as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos não estão completamente desenvolvidas, podendo resultar na menor capacidade de metabolização, tornando as crianças mais suscetíveis aos efeitos tóxicos de agentes químicos. Além disso, a menor capacidade de ligação à proteínas plasmáticas pode resultar em maior porcentagem da substância livre capaz de se distribuir pelo organismo, levando a efeitos tóxicos mais intensos, porém com menor duração (BRUCKNER, 2000).

Estudos sugerem que a exposição a agrotóxicos durante os primeiros anos de vida pode estar relacionada ao desenvolvimento de tumores, como leucemia, linfoma não-Hodgkin e doença de Hodgkin, bem como câncer cerebral e de tecidos moles (MILLS; ZAHM, 2001). Costa (2013) relatou que a exposição a doses tóxicas

de ditiocarbamatos (DTCs) e seu metabólito etilenotiouréia (ETU) resultaram em problemas no desenvolvimento fetal e teratogenicidade principalmente devido ao efeito do ETU na tireoide. Esse fato é de grande importância visto que os hormônios tireoidianos têm papel essencial no desenvolvimento do cérebro, ressaltando que esta classe de agrotóxicos pode estar envolvida no surgimento de efeitos neurotóxicos em neonatos.

Sanborn e colaboradores (2007) descrevem que a exposição materna à agrotóxicos está associada ao baixo peso ao nascer, prematuridade e restrição do crescimento intrauterino determinantes importantes durante a primeira infância. Além da preocupação com a questão alimentar, Chen *et al.* (2015) ressaltam que crianças expostas a agrotóxicos de uso domiciliar nos primeiros anos de vida tem maior risco de desenvolver câncer hematopoiético na infância.

## **1.2 Perfil de consumo de cereais infantis no município de Rio de Janeiro**

Calcula-se que a necessidade energética para uma criança de 1-3 anos de idade é de 1.300 kcal por dia (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989) e a alimentação deve ser capaz de fornecer os micro e macronutrientes essenciais para o desenvolvimento do indivíduo. De acordo com a pirâmide alimentar infantil, entre os 6 e 11 meses de idade a porção diária recomendada de cereais, tubérculos, pães e raízes é 3 porções e aumenta para 5 entre 1 e 3 anos de idade (PHILIPPI, 1999).

Devido à praticidade no preparo, o mingau e o leite com mucilagem são muito utilizados na alimentação de crianças, principalmente durante os primeiros anos de vida visto que podem fornecer a quantidade de cereais recomendada para esta faixa etária e estão presentes no desjejum e lanche tanto em âmbito domiciliar quanto nas escolas e creches.

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) tem como diretrizes, entre outras coisas, “fornecer alimentação saudável e adequada, que compreende o uso de alimentos variados e seguros, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento dos alunos” (BRASIL, 2009). O plano alimentar das escolas e creches do município do Rio de Janeiro baseia-se nessas diretrizes e é elaborado pelo Instituto Annes Dias e visa promover os hábitos alimentares saudáveis. A figura 1 apresenta o cardápio proposto para uma semana durante o período de outubro a dezembro de 2019.



Figura 1 – Cardápio da merenda escolar oferecido pelas creches no município do Rio de Janeiro para o período de outubro a dezembro de 2019.

Plano Alimentar Creches/EDI – 2019						
Semana A						
Período: outubro a dezembro de 2019						
Refeição	2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira	Sábado
Desjejum 6 a 12 meses	Mingau de tapioca	Leite Banana	Leite Maçã e mamão	Leite com mucilagem de arroz e mamão	Leite Biscoito doce	Mingau de Maisena
Desjejum 1 a 4 anos	Leite Biscoito salgado	Leite Banana	Leite Maçã e mamão	Leite Biscoito salgado	Leite Biscoito doce	Mingau de Maisena
Desjejum 4 a 5 anos	Leite Biscoito salgado	Leite Banana	Leite Maçã e mamão	Leite Biscoito salgado	Leite Biscoito doce	Mingau de Chocolate
Lanche 6 a 12 meses	Leite Mamão e banana	Leite com mucilagem de milho e maçã	Mingau de Aveia	Iogurte, aveia e Banana	Leite Maçã e mamão	Leite com mucilagem de milho e maçã
Lanche 1 a 4 anos	Leite Mamão e banana	Leite Maçã e mamão	Mingau de Maisena com Farinha Láctea	Iogurte, aveia e Banana	Leite Biscoito salgado	Leite Maçã e mamão
Lanche 4 a 5 anos	Leite Mamão e banana	Leite Maçã e mamão	Mingau de Maisena com Farinha Láctea	Iogurte, aveia e Banana	Leite Biscoito salgado	Leite Maçã e mamão
Lanche IV	Leite Mamão e banana Biscoito doce	Leite Maçã e mamão Biscoito doce	Mingau de Maisena com Farinha Láctea Banana	Iogurte, aveia e Banana Biscoito doce	Leite Biscoito salgado Banana e mamão	Leite Maçã e mamão Biscoito doce

Fonte: (BRASIL, 2009).

No cardápio apresentado é possível observar que os cereais infantis estão presentes em pelo menos uma das refeições diárias oferecidas aos alunos. É importante ressaltar que isso leva em consideração apenas a alimentação ofertada pela unidade de ensino, assim esse tipo de alimento pode ser ingerido com uma frequência ainda maior se fosse considerada também a alimentação domiciliar. Assim, é imprescindível o monitoramento da presença de resíduos de agrotóxicos não apenas nos alimentos frescos, mas também nos industrializados, como os cereais infantis.

### 1.3 Registro de agrotóxicos no Brasil

Para que novos agrotóxicos possam ser comercializados no Brasil é necessário que eles sejam registrados e que estejam em conformidade com as exigências dos órgãos federais competentes responsáveis pelos setores de saúde, meio ambiente e agricultura (BRASIL, 1989). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) irá avaliar a relevância agrônômica do produto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ponderar sobre os riscos dos agrotóxicos à saúde humana, além de realizar o monitoramento do uso dos mesmos em

alimentos e, por fim, o Ministério do Meio Ambiente os avaliará quanto ao potencial de periculosidade ambiental (BRASIL, 2002).

O registro de agrotóxicos no Brasil possui validade indeterminada, sem previsão legal para renovação. No entanto, o conhecimento técnico-científico sobre esses produtos está em permanente evolução e, mesmo após o registro, novas informações sobre toxicidade e riscos à saúde podem ser identificados, sendo necessária a reavaliação do ingrediente ativo de agrotóxico.

A Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989 no artigo 2º parágrafo 5º versa que:

Quando organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o Brasil seja membro integrante ou signatário de acordos e convênios, alertarem para riscos ou desaconselhem o uso de agrotóxicos, seus componentes e afins, caberá à autoridade competente tomar imediatas providências, sob pena de responsabilidade (BRASIL, 1989).

Além disso, o parágrafo 6º da mesma lei determina que é “proibido o registro de agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica” ou “que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica” (BRASIL, 1989).

Desta forma, quando há comprovação científica de que um ingrediente ativo já registrado no país pode causar danos aos indivíduos expostos, quer direta ou indiretamente, este deve passar por uma reavaliação toxicológica, a partir da qual a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pode decidir pela manutenção do registro do ingrediente ativo sem alterações; pela alteração da formulação, da dose ou do método de aplicação; pela restrição da produção, da importação, da comercialização ou do uso; pela proibição ou suspensão da produção, importação ou uso; ou pelo cancelamento do registro (BRASIL, 2017).

#### **1.4 Resíduos de agrotóxicos em alimentos**

A lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 define agrotóxico como:

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

A classificação está relacionada tanto à natureza da praga combatida quanto ao modo de ação do ingrediente ativo. No primeiro caso, destacam-se as classes: 1) Inseticidas que combatem insetos, larvas e formigas, 2) fungicidas que combatem doenças causadas por fungos, 3) herbicidas que combatem ervas daninhas e 4) raticidas, acaricidas, nematocidas e molusquicidas (ANDREI, 2005).

Além disso, considerando o modo de ação os IAs podem ser classificados em sistêmicos quando, após a aplicação, o agrotóxico é absorvido pela planta e distribuído uniformemente a outros tecidos vegetais através da seiva e de contato quando ficam depositados na parte externa da planta e tem ação pelo contato direto com o alvo biológico (MIDIO, 1997). Entretanto, ressalta-se que o tecido vegetal pode possuir porosidades que possibilitem a penetração de substâncias podendo levar a absorção mesmo de agrotóxicos de contato (BRASIL, 2019b).

Os agrotóxicos são largamente utilizados com a finalidade de evitar ou minimizar os danos às lavouras causados por pragas e, conseqüentemente melhorar a produtividade. Sua aplicação não se restringe ao período durante o cultivo, mas também antes e após a colheita para prevenir a deterioração dos produtos durante a estocagem e transporte.

Segundo o decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002:

Resíduo é qualquer substância ou mistura de substâncias remanescente ou existente em alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive, quaisquer derivados específicos, tais como produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas, consideradas toxicológica e ambientalmente importantes (BRASIL, 2002).

Em alimentos produzidos seguindo as Boas Práticas Agrícolas a concentração do agrotóxico encontrado no produto final deverá estar em conformidade com Limite Máximo de Resíduos (LMR) estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O LMR não é utilizado como indicador do impacto da exposição humana aos agrotóxicos sendo necessário o cálculo da ingesta.

Para avaliação da ingesta a ANVISA aplica o cálculo da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) que consiste no somatório dos produtos do consumo médio per capita diário de cada alimento e o respectivo LMR / peso corpóreo. Desta forma, o LMR calculado para uma determinada cultura é considerado seguro para a saúde humana quando a IDMT não ultrapassa a Ingestão Diária Aceitável (IDA) (BRASIL, 2016).

No Brasil atualmente existem dois programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos: o programa PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) da ANVISA que tem como objetivo conhecer o potencial de exposição da população aos contaminantes nocivos à saúde e garantir a segurança do consumidor (BRASIL, 2019d) e o PNCRC (Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) do MAPA com enfoque principal no monitoramento da qualidade dos produtos vegetais de origem nacional tanto os destinados ao mercado interno quanto à importação (BRASIL, 2019e).

No período entre 2017 e 2018 o PARA analisou 4.616 amostras de todo o país e os DTCs estão em quinto lugar no ranking dos resíduos de agrotóxicos com maior número de detecções, sendo 464 no total. O único alimento da categoria dos cereais contemplado neste relatório foi o arroz, com 329 amostras analisadas sendo 314 satisfatórias e destas 220 sem resíduos de agrotóxicos e 94 com resíduo em concentração igual ou inferior ao LMR (BRASIL, 2019c).

O programa avaliou também o Risco Crônico referente aos 271 IAs pesquisados de 2013-2018, assumindo que o risco é inaceitável quando a exposição crônica resultar em valor superior a 100% da IDA. Nenhum dos IAs investigados apresentou resultado insatisfatório, no entanto é necessário cautela ao avaliar esses números, pois a análise de risco foi baseada nos dados da POF/IBGE 2008-2009 a qual contempla o consumo de indivíduos acima de 10 anos de idade e desta forma desconsidera os segmentos mais susceptíveis aos possíveis efeitos adversos do consumo de resíduos de agrotóxicos que são os bebês e idosos (BRASIL, 2019c).

Entre o segundo semestre de 2015 e 2018, o programa PNCRC vegetal analisou 45 amostras de milho, 34 de arroz integral, 99 de arroz polido e 132 de trigo, encontrando 36, 31, 95 e 110 satisfatórias, respectivamente. Entretanto, a publicação do programa em Diário Oficial não especifica quais IAs foram avaliados, apenas define que a quantidade de resíduos de agrotóxicos a ser monitorada dependerá do escopo do laboratório que estiver responsável por cada cultura. Assim, não é possível afirmar se os ditiocarbamatos foram incluídos nesse relatório (BRASIL, 2019d).

## 1.5 Dados sobre o uso de agrotóxicos no Brasil

No ano de 2018, a comercialização de agrotóxicos e afins no Brasil foi de 549.280,44 toneladas, sendo 33,07% na região Centro-Oeste. Além disso, entre os dez IAs mais vendidos no mesmo ano, o mancozebe da classe dos ditiocarbamatos (DTC) figura em terceiro lugar respondendo por 40.549,92 toneladas (IBAMA, 2019), conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2018.

Posição	Ingrediente Ativo	Vendas (toneladas)
1º	Glifosato e seus sais	195.056,02
2º	2,4-D	48.921,25
3º	Mancozebe	40.549,92
4º	Atrazina	28.799,34
5º	Acefato	24.656,79
6º	Dicloreto de paraquate	13.199,97
7º	Enxofre	10.409,69
8º	Imidacloprido	10.021,22
9º	Óleo mineral	9.112,53
10º	Oxicloreto de cobre	8.018,65

Fonte: IBAMA, 2019

No ano de 2015 o Brasil plantou 71,2 milhões de hectares de lavouras e a soja representou 42% de toda área plantada no país (32.206.787 hectares), seguido do milho com 21 % (15.846.517 hectares) e da cana-de-açúcar com 13% (10.161.622 hectares). Essas três culturas sozinhas respondem por 76% da área plantada com o consumo de 82% do consumo de agrotóxico no Brasil (PIGNATI, 2017). Isso indica que a área com maior utilização de agrotóxicos coincide com regiões em que há cultivo majoritário de monoculturas como soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz.

Em 2019 a área plantada de soja foi de 35.821.377 hectares, representando um aumento de 10,09%, e para o milho o aumento foi de 12,09% quando comparado ao ano de 2015 (IBGE, 2019). Assim, o cultivo de monoculturas respondendo pela maior fração de agrotóxicos consumidos nacionalmente, alinhado ao crescimento na produção dos mesmos indica que a contaminação por agrotóxicos nos alimentos que já atinge níveis preocupantes tende a ser ampliada

nos próximos anos, ressaltando a importância dos estudos de monitoramento do uso destas substâncias realizados pela ANVISA e MAPA com o intuito garantir a qualidade dos produtos de origem vegetal visando a segurança e inocuidade dos alimentos disponibilizados ao consumidor.

## 1.6 Ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico ( $\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$ ), caracterizados por monoaminas secundárias que reagem com dissulfeto de carbono, obtendo-se dialquil ditiocarbamatos: os dimetilditiocarbamatos (DMDC) e os etilenobisditiocarbamatos (EBDCs) (LEMES, 2007). O IAs permitidos no Brasil estão apresentados na figura 2.

Figura 2 – Quadro com os ingredientes ativos de ditiocarbamatos permitidos no Brasil e perfil de uso no país.

Ditiocarbamato	Estrutura	Uso no Brasil	Solubilidade
<b>Mancozebe</b> ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}_4\text{Mn}$ )( $\text{Zn}$ ) <sub>y</sub> x/y = 11 271,2 g/mol		Aplicação foliar em 49 culturas <sup>1</sup>	Praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes;
<b>Metiram</b> ( $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_{11}\text{S}_{16}\text{Zn}_3$ ) <sub>x</sub> 1088,6 g/mol		Aplicação foliar em 17 culturas <sup>1</sup>	Água: 2,1 - 4 mg/L (20 °C) Praticamente insolúvel em solventes orgânicos
<b>Propinebe</b> ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_4\text{Zn}$ ) <sub>x</sub> 289,8 g/mol		Aplicação foliar em 8 culturas <sup>1</sup>	Água: < 0,01 mg/L (20 °C) Solventes orgânicos: < 0,01 mg/L
<b>Metam-sódico</b> $\text{C}_2\text{H}_4\text{NNaS}_2$ 129,17 g/mol		Aplicação no solo em 05 culturas <sup>1</sup>	Água: 722 g/L Solúvel em metanol
<b>Tiram</b> $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_4$ 240,4 g/mol		Tratamento de sementes (12 culturas) e solo (1 cultura) <sup>1</sup>	Água: 30 mg/L (25 °C) Solúvel em acetona, clorofórmio e outros solventes orgânicos

Esta classe de agrotóxicos de contato é muito utilizada nacionalmente por agir contra um extenso espectro de doenças causadas por fungos com aplicação em diversas culturas agrícolas, de frutas e hortaliças a cereais (SILVA, 2005) conforme apresentado na figura 2. O mancozebe tem mecanismo de ação multissítio e pode ser utilizado em associação com fungicidas sistêmicos em coformulação, promovendo aumento no espectro de ação e gestão da resistência microbiana (BALARDIN, 2017).

No Brasil, o LMR para ditiocarbamatos como CS<sub>2</sub> (mg kg<sup>-1</sup>) é calculada em função dos ingredientes ativos da classe dos EBDCs. A lista completa com os ingredientes ativos permitidos, os limites para cada cultura, bem com outros detalhes relevantes pode ser encontrado no site da ANVISA. Em cereais, como arroz, milho e trigo, o LMR é 0,5; 0,3 e 1,0 mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub>, respectivamente, para os IA Mancozebe e Tiram (BRASIL, 2019a).

A Tabela 2 apresenta um comparativo entre o LMR para os ditiocarbamatos em milho, arroz, trigo e aveia conforme determinado pela legislação brasileira, pela União Europeia, *Codex Alimentarius* e FDA. Observa-se que nem no *Codex Alimentarius* nem no documento da União Europeia são especificados os agrotóxicos permitidos, visto que a análise para determinação destes resíduos de agrotóxicos é baseada na liberação de CS<sub>2</sub> que é uma característica comum a todos os IAs desta classe.

Tabela 2 - Comparativo entre a LMR e os ingredientes ativos da classe dos ditiocarbamatos permitidos no Brasil, União Europeia, *Codex Alimentarius* e FDA. (Acesso em 16/09/2019).

Cereais	Brasil		Codex Alimentarius		União Europeia		FDA	
	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	IA permitidos	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	IA permitidos	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	IA permitidos	LMR (mg kg <sup>-1</sup> )	IA permitidos
Milho	0,3	Mancozebe Tiram	0,1	ND	0,05	ND	0,06	Mancozebe
Arroz	0,5	Mancozebe Tiram	NP	ND	0,05	ND	NP	NP
Trigo	1,0	Mancozebe Tiram	1,0	ND	1,0	ND	1,0	Mancozebe
Aveia	0,3	Tiram	NP	ND	0,05	ND	1,0	Mancozebe

NP – Não permitido; ND – Não determinado

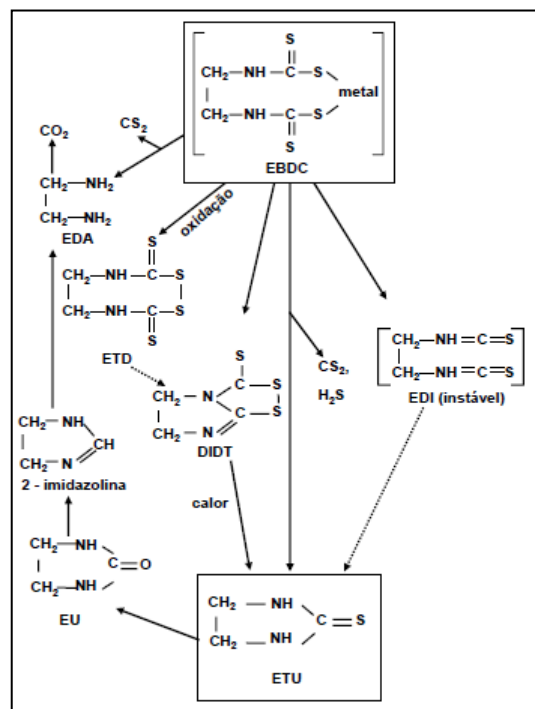
Fonte: 1 – BRASIL, 2019a; 2 - CODEX ALIMENTARIUS, 2017; 3 – COMUNIDADE EUROPEIA, 2005; 4 – BRYANT CHRISTIE INC, 2019.

Embora o uso dos ditiocarbamatos seja muito útil no manejo de doenças relacionadas a fungos, seu uso deve ser feito com cautela respeitando as boas práticas, tempo de carência de cada cultura e na dose recomendada, pois os EBDCs têm toxicidade aguda alta para algumas espécies de organismos aquáticos e, além disso, sua decomposição metabólica pode resultar na formação de substâncias potencialmente tóxicas, como a etilenotiouréia (ETU) (WHO, 1988).

### 1.6.1 Etilenotiouréia (ETU)

Os etilenobisditiocarbamatos são instáveis tanto em meio ácido como em meio alcalino e decompõem-se em dissulfeto de carbono com maior rendimento na presença de ácidos fortes e sulfeto de hidrogênio dependendo do meio onde ocorre a hidrólise (WHO, 1988). Além disso, a biotransformação desses IAs pode resultar na formação de outros produtos, como a etilenotiouréia (ETU). Em micro-organismos, sua produção ocorre após a redução da ligação S-S do ditiocarbamato, seguida pela ligação com o dissulfeto de carbono ( $\text{CS}_2$ ), conforme apresentado na figura 3.

Figura 3 - Esquema representando a degradação dos EBDCs e posterior formação do ETU.





A degradação dos EBDCs pode ocorrer em várias etapas da produção dos alimentos, sendo após a aplicação dos agrotóxicos ainda no período de cultivo, no armazenamento do produto, principalmente se o mesmo for estocado sob condições inadequadas, sendo o tempo, umidade e temperatura os parâmetros que mais influenciam nesta reação, e durante o processamento do alimento. Porém vale ressaltar que nesta última etapa a quantidade de EBDCs encontrados tende a diminuir com o aumento de ETU (LEMES, 2007).

### 1.6.2 Toxicologia dos DTCs

A exposição aos ditiocarbamatos pode resultar no surgimento de neuropatologia, toxicidade ao tecido tireoidiano e problemas no desenvolvimento do sistema nervoso central de animais de laboratório (CALDAS; TRESSOU; BOON, 2006). O efeito neurotóxico do DMDC pode ser atribuído à sua capacidade de quelar metais essenciais, como o zinco (Zn). No cérebro, o Zn é frequentemente encontrado ligado a proteínas e, assim, as biomoléculas dependentes de Zn são alvos potenciais do DMDC. Um exemplo é a  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), uma enzima chave na via biossintética do heme que é modulada por Zn. Além disso, há uma reserva de Zn (Zn quelatável ou reativo) no sistema nervoso central (SNC), suscetível ao DMDC.

O Zn reativo, localizado abundantemente nas vesículas pré-sinápticas dos neurônios glutamatérgicos do hipocampo, é liberado na fenda sináptica e atua como um neuromodulador dos receptores excitatórios e dos transportadores do glutamato glial. Portanto, o DMDC, quando usado, pode se acumular no SNC resultando em perturbação da homeostase do Zn cerebral (PAOLETTI, 2009; BRAGA *et al.*, 2015). Com relação aos estudos de teratogenicidade, os DTCs induziram o surgimento de malformações somáticas e esqueléticas em cobaias (RUBINO; MREMA; COLOSIO, 2014).

Os EBDCs formam etilenotiuréia (ETU) após sua biotransformação hepática ou como produto de degradação se os vegetais tratados com os agrotóxicos desta subclasse forem armazenados em condições inadequadas, como expostos ao oxigênio ou à umidade. Esses possuem atividade carcinogênica, mutagênica e teratogênica (LARINI, 1999).

Conforme salientado por estudos, ratos expostos ao ETU durante o desenvolvimento perinatal e até dois anos de vida apresentaram maior incidência de neoplasias da tireoide e hepatocelulares, bem como adenomas da glândula pituitária (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1992). Corroborando este resultado, Belpoggi e colaboradores (2002) demonstraram que ratos tratados com mancozebe a partir de 8 semanas de vida até 104 semanas apresentaram um aumento significativo na ocorrência de tumores malignos, indicando ser este agrotóxico um agente carcinogênico multipotente capaz de induzir o desenvolvimento de tumores em diferentes locais.

### 1.7 Métodos para análise de ditiocarbamatos

A maioria dos métodos para a determinação de ditiocarbamatos baseia-se na hidrólise ácida da matriz na presença de cloreto estanooso ( $\text{SnCl}_2$ ), atuando como agente redutor, resultando na formação de dissulfeto de carbono ( $\text{CS}_2$ ) (KEPPEL, 1971). Para a identificação espectrofotométrica o  $\text{CS}_2$  formado reage com uma mistura de acetato cúprico, dietanolamina e etanol formando um complexo de cor amarela, dimetilditiocarbamato cúprico, com espectro de absorção na faixa do visível o que possibilita sua quantificação (Figura 4). Além disso, a extração ainda requer a utilização de uma solução de NaOH com a finalidade de retirar possíveis interferentes, como o ácido sulfídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (CALDAS *et al.* 2001; KEPPEL, 1971).

Figura 4 - Reação de hidrólise ácida do tiram formando dimetilditiocarbamato cúprico.

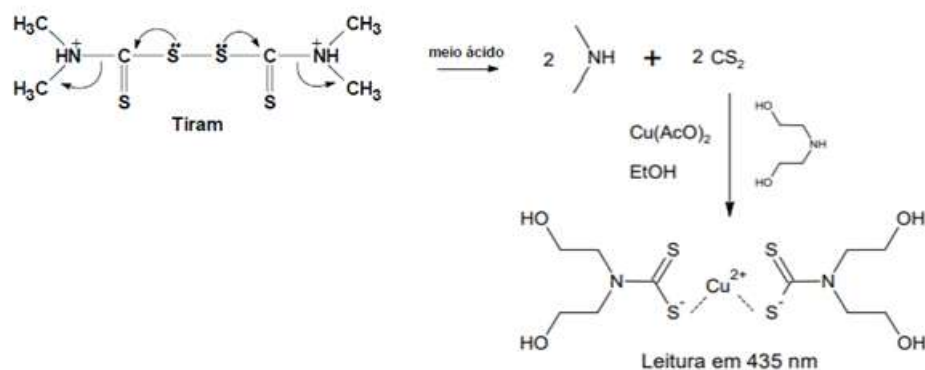
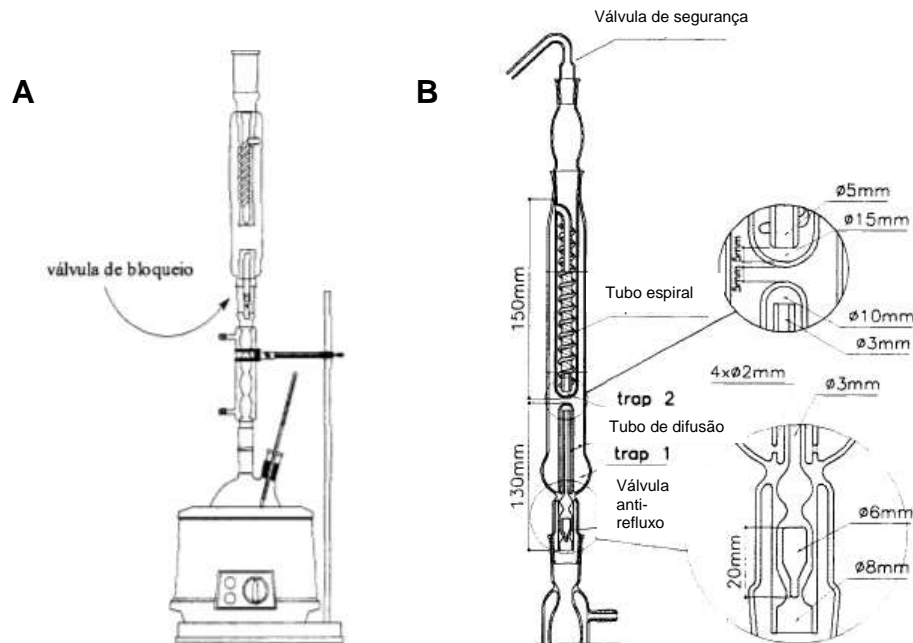


Figura 5 - (A) Sistema de determinação de ditiocarbamatos pelo método espectrofotométrico; (B) em detalhe a vidraria específica com a discriminação dos seus principais componentes.



Fonte: Adaptado de CALDAS *et al.* 2001

Para a execução do que o método espectrofotométrico é imprescindível o uso de vidraria específica composta por balão de fundo redondo com duas bocas onde será colocada a amostra e a solução digestiva, tubo de difusão contendo válvula antirreflux, tubo espiral onde ficará a solução complexante e válvula de segurança (Figura 5). A mistura reacional contendo a matriz em análise precisa estar a 80°C e mantida em temperatura constante, fazendo-se necessário o uso de mantas de aquecimento e o CS<sub>2</sub> produzido é carregado até a solução complexante pelo gás nitrogênio para que haja a formação do dimetilditiocarbamato cúprico (Figura 4) que será quantificado.

Embora o método seja eficaz para indicar a presença de resíduos de ditiocarbamatos em matrizes alimentares sua aplicação fica limitada a um número pequeno de amostras visto ser de difícil execução, exigir um grande aparato de materiais e longo tempo de análise.

Devido a isso, diversos métodos cromatográficos têm sido propostos com o objetivo de quantificar concentrações cada vez menores de ditiocarbamatos em alimentos de forma mais rápida e eficaz. Para este tipo de análise, a extração é realizada pela digestão ácida dos componentes da matriz levando a formação de

CS<sub>2</sub> de forma bastante similar a reação apresentada na figura 4. No entanto, a determinação dos resíduos de agrotóxicos será feita pela quantificação do dissulfeto de carbono particionado na fase orgânica da mistura reacional (De KOK; Van BODEGRAVEN, 2002).

Silva (2005) analisou resíduos de DTCs em alface por cromatografia gasosa comparando a utilização de três detectores diferentes: cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (CG-ECD) e cromatografia gasosa com detector fotométrico por chama (CG-DFC). A autora concluiu que o método cromatográfico foi 20 vezes mais sensível que o espectrofotométrico, além de ser mais rápido e com baixo custo operacional.

A literatura ainda relata alguns métodos para determinação individual de alguns ingredientes ativos desta classe, como Blasco e colaboradores (2004) que desenvolveram um método para quantificação de disulfuram, tiram e o metabólito ETU por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) em frutas e vegetais e Garcinuño *et al.* (2004) utilizou HPLC com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD) para determinação de maneb e ETU em tomate.

Embora os métodos por cromatografia líquida sejam mais seletivos, a maioria das principais legislações mundiais baseia-se na análise de resíduos de DTCs expressa em termos de CS<sub>2</sub>, assim o emprego destes em programas de monitoramento poderia não ser tão prático.

## **1.8 Regulamentação sobre o uso de agrotóxicos em alimentos infantis**

O *Codex Alimentarius*, na legislação específica infantil referente a resíduos de agrotóxicos, informa que produtos para consumo infantil devem ser elaborados considerando as boas práticas de fabricação, de modo que os resíduos não permaneçam no produto acabado ou sejam reduzidos ao menor limite possível (CODEX, 2013).

O Regulamento CE nº 396/2005 define que resíduos de agrotóxicos não podem estar presentes no alimento de forma a representar um risco inaceitável para a saúde do consumidor. Assim, o LMR deve ser fixado a fim de proteger grupos vulneráveis, como crianças. Desta forma, para produtos destinados ao uso infantil o LMR máximo permitido é de 10 µg mL<sup>-1</sup> para grande número de agrotóxicos,

entretanto para alguns IAs cujo valor da IDA (Ingestão Diária Aceitável) é baixo, somente poderá estar presente em níveis mais baixos e ou estar ausente. A legislação da comunidade europeia também estabelece que algumas substâncias não podem ser utilizadas em produtos agrícolas destinados à produção de alimentos à base de cereais ou alimentos para bebês (COMUNIDADE EUROPEIA, 2005).

O documento regulatório do *Food and Drug Administration* (FDA) também não determina LMR específico para alimentos infantis, porém, a agência realiza o monitoramento tanto em alimentos *in natura* quanto de produtos industrializados derivados, levando em consideração os que estão mais frequentemente presentes na mesa da população, entre os alimentos analisados estão os cereais. Além disso, os *commodities* importados também são inspecionados, visto que a taxa de violação nestes é de 3-5 vezes maior do que nas amostras domésticas. Ressalta-se ainda que são monitorados mais de 700 resíduos utilizando métodos multirresíduos e métodos seletivos para IAs específicos, entretanto, os ditiocarbamatos não são contemplados no escopo de análise (FDA, 2019).

A legislação brasileira não estabelece o LMR para resíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas destinados a alimentação infanti, em vez disso determina que os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos processados para crianças na primeira infância devem estar em conformidade com o LMR estabelecido para a matéria prima que lhe deu origem (BRASIL, 1998). Além disso, não foram encontrados no Brasil estudos avaliando a ocorrência de resíduos de agrotóxicos na maioria dos alimentos consumidos por crianças, nem a inclusão dos cereais e produtos infantis relativos a esses.

## 1.9 Validação de método analítico

A validação do método analítico tem como objetivo assegurar que o mesmo seja exato, reprodutível e flexível respeitando um intervalo específico no qual a substância será avaliada. Esta pode ser assegurada quando são usados métodos e equipamentos validados, o trabalho fica sob responsabilidade de pessoal qualificado e competente, há rastreabilidade e incerteza de medição calculada, são empregados procedimentos de controle de qualidade e garantia da qualidade bem definidos e há evidência independente do desempenho (INMETRO, 2018).

Os critérios para análise de agrotóxicos em alimentos são especificados pela União Europeia no documento SANTE e no *Codex Alimentarius* e inclui as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão (CODEX, 2017; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

#### 1.9.1 Seletividade

É a capacidade do método de identificar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz (EUROPEAN COMMISSION, 2018). Entretanto, substâncias diferentes podem apresentar respostas similares dependendo da condição utilizada no método, assim deve-se proceder à análise, seguida por outras técnicas comprobatórias (BRITO, 2001; INMETRO, 2018).

Para resíduos de agrotóxicos a determinação da seletividade é realizada pela análise de uma amostra livre dos ingredientes ativos que se deseja avaliar, e é observado se a mesma não possui interferentes com o mesmo tempo de retenção da substância de interesse. A verificação da seletividade é realizada pela injeção de uma solução padrão do agrotóxico para confirmação do tempo de retenção de cada substância (EUROPEAN COMMISSION, 2018).

#### 1.9.2 Linearidade e intervalo de trabalho

É a capacidade do método de fornecer resultados proporcionais à concentração de analito em uma faixa analítica específica, gerando uma correlação linear entre as variáveis analisadas.

Assim, primeiro é determinada uma faixa de trabalho compatível com a sensibilidade do método e do LMR dos agrotóxicos avaliados, e por fim é construída uma curva analítica através da qual a linearidade da faixa de trabalho será determinada pelo método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) para caso de dados homocedásticos e a relação linear será representada pela equação de primeiro grau  $y = bx + a$  (CARDOSO, *et al.*, 2010).

### 1.9.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração ou massa do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais. O limite de quantificação é a menor concentração do analito que foi validado com precisão e exatidão aceitáveis aplicando o método analítico completo (ICH, 2005).

O LQ e o LD podem ser determinados pela relação sinal/ruído, no caso de métodos analíticos que exibem linha de base. De acordo com o guia do INMETRO (INMETRO, 2018), o LD pode ser estimado como a concentração correspondente à razão S/R 3:1 e o LQ como a concentração S/R 10:1.

### 1.9.4 Exatidão e precisão

A exatidão é a concordância entre o valor real do analito e o estimado pelo processo analítico. O ensaio de recuperação é o método mais utilizado para validação deste parâmetro em métodos analíticos, pois expressa a concentração do analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO, 2001).

Para análise de resíduos de agrotóxicos, uma amostra branco (amostra isenta de agrotóxicos) é fortificada, ou seja, é adicionada à matriz uma solução com o ingrediente ativo de interesse e a recuperação é determinada pela razão entre a concentração média obtida experimentalmente e a concentração adicionada à amostra e para valores percentuais o valor é multiplicado por 100 (CARDOSO, *et al.*, 2010, INMETRO, 2018).

A precisão foi avaliada através da repetibilidade dos experimentos de recuperação e expressa pelo coeficiente de variação (CV) ou pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) calculado pela razão entre o desvio padrão das leituras para cada nível de concentração e a média dos resultados das replicatas.

De acordo com o guia SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2018), o intervalo de recuperação deve ser de 70 a 120 % e os coeficientes de variação (CV) devem ser  $\leq 20\%$ .

### **1.10 O papel da vigilância sanitária no monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos**

A Vigilância Sanitária (VISA) está inserida no Sistema Único de Saúde (SUS) e desta forma tem participação ativa na promoção da proteção à saúde da população através da realização do controle sanitário da produção e comercialização de produtos e serviços submetidos à VISA, bem como pelo controle de portos, aeroportos e fronteiras (BRASIL, 1999).

A Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, define também que alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares, limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários são considerados produtos submetidos a controle e fiscalização sanitária pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1999).

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) atua em cooperação com a ANVISA, as secretarias municipais e estaduais realizando análises relativas ao controle da qualidade de insumos, ambientes e serviços, podendo ser divididas em três categorias: análise prévia, de controle e fiscal. Além disso, o instituto atua em ensino e pesquisa, com o objetivo de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças e agravos (INCQS, 2019).

### **1.11 Justificativa**

Diante da total ausência de dados sobre resíduos de agrotóxicos em produtos cereais nacionais relativos à classe dos ditiocarbamatos e considerando a toxicidade e os possíveis efeitos adversos do consumo infantil desses resíduos, torna-se importante a validação e implementação de um método analítico sensível e seletivo para monitorar a presença destes em produtos para consumo infantil, visando a identificação de ingredientes ativos tóxicos e minimização dos possíveis riscos à saúde.



## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos da classe dos ditiocarbamatos em alimentos infantis à base de cereais.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Otimizar o método para extração e determinação de ditiocarbamatos em cereais para alimentação infantil;
- Validar e implementar método analítico para a determinação de resíduos de agrotóxicos da classe dos ditiocarbamatos em cereais e alimentação infantil à base de cereais utilizando cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) utilizando requisitos de qualidade analítica estabelecidos por órgãos acreditadores nacionais e normas internacionais para a validação do método;
- Avaliar quantitativamente amostras de produtos de consumo infantil à base de cereais tais como: aveia, milho, trigo e arroz para determinação de resíduos de ditiocarbamatos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Preparo e extração da amostra

Os cereais infantis avaliados foram coletados de diferentes estados do Brasil pelo projeto do Programa Nacional de Contaminantes em Alimentos (PROMAC). As amostras foram homogeneizadas em liquidificador industrial por 5 minutos e posteriormente pesadas em balança analítica. Para a validação utilizou-se cereal infantil do tipo Multicereais (composto por arroz, milho, trigo e aveia).

Para a digestão da amostra adicionou-se 100 mL de solução digestiva contendo  $0,0065 \text{ mol L}^{-1}$  de HCl e 1,25 g de cloreto de estanho II a 20 g da amostra de cereais livre de ditiocarbamatos em frasco de vidro de 250 mL. Posteriormente, adicionou-se 25 mL de isooctano, onde o  $\text{CS}_2$  fica particionado após a digestão ácida. Os frascos foram fechados utilizando uma tampa contendo um septo com o objetivo de impedir a volatilização do  $\text{CS}_2$  e colocados em banho a  $80^\circ\text{C}$  ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) por 1 hora e 30 minutos, sob agitação. Os frascos foram retirados e após a mistura alcançar temperatura ambiente, uma alíquota de 1,5 mL da fase orgânica foi utilizada para injeção em CG-EM (Adaptado de SILVA, 2005).

##### 3.1.1 Preparo de soluções estoque e intermediária

A solução estoque de Tiram com concentração nominal de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada a partir de material de referência certificado AccuStandard® em solvente etanol, condicionada em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ .

A solução intermediária foi preparada a partir da soluções estoque e condicionada da mesma forma, com concentração de  $9,7121 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

##### 3.1.2 Equipamento

Nas análises foi empregado o cromatógrafo à gás com espectrômetro de massas (CG-EM) modelo 6890N, detector modelo 5973N Agilent Technologies. O equipamento está ligado à uma estação de trabalho com o software ChromoQuest.

### 3.1.3 Condições operacionais do equipamento

Foi utilizado um volume de injeção de 4  $\mu\text{L}$  do extrato, com injetor no modo *Pulsed Split* com pressão de 10 psi por 0,02 min, temperatura de 220°C e com fluxo constante de 1,5 mL por minuto. A temperatura inicial foi de 60°C por 5 minutos, após esse tempo houve um aumento de 50°C por minuto até alcançar 200°C, mantido por 2 minutos. Utilizou-se o espectrômetro de massas em modo de Monitoramento Seletivo de Íons (SIM), ionização por impacto de elétrons com energia de 70 elétron-volts e monitorou-se duas transições:  $m/z$  76, íon molecular referente ao isótopo mais abundante do enxofre, com massa molecular de 32  $u$ , e  $m/z$  78, referente ao isótopo com massa molecular 34  $u$ , que é o segundo mais abundante na natureza.

### 3.1.4 Otimização do método de extração

Para determinar a massa que seria utilizada na validação a extração foi realizada utilizando 10 g, 20 g e 30 g do cereal infantil multicereais. O preparo e extração das amostras estão descritos no item 3.1.

## 3.2 Determinação quantitativa da concentração de DTCs

A concentração de ditiocarbamatos foi calculada em função do  $\text{CS}_2$  particionado na fase orgânica da mistura reacional após a digestão ácida do alimento. Porém, essa é uma característica comum a todos os ingredientes ativos desta classe. Assim, em uma amostra contaminada com um resíduo de DTCs desconhecido não é possível, utilizando este tipo de análise, determinar qual IA foi utilizado.

Na validação, as amostras de cereais foram fortificadas com tiram, por apresentar melhor solubilidade em solventes orgânicos, e quando o IA presente é conhecido é possível determinar a concentração do resíduo de ditiocarbamato utilizando a equação descrita na figura 6.

Figura 6 - Equação para determinação da concentração de ditiocarbamatos (DTC) a partir do CS<sub>2</sub> liberado pela hidrólise ácida da amostra.

$\text{mg kg}^{-1} \text{ de DTC} = \frac{\mu\text{g mL}^{-1} \text{ de CS}_2 \times \text{Volume do bal\~ao de dilu\~ao (mL)} \times f}{\text{Massa da amostra (g)}}$	
Onde: $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CS <sub>2</sub>	= $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CS <sub>2</sub> calculada através da curva de calibração.
Volume do balão de diluição (mL)	= utilizar normalmente balão de 25 mL.
f (fator do DTC)	= fator do ditiocarbamato específico. Este fator é utilizado quando se deseja expressar o resultado como um ditiocarbamato.
Massa da amostra (g)	= Quantidade pesada de amostra.

Adaptado de CALDAS *et al.* 2001

Para a determinação quantitativa desses IAs foi preparada uma curva analítica a partir da solução-intermediária de CS<sub>2</sub> (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com as concentrações 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,5 e 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A equação obtida permitiu determinar a concentração de CS<sub>2</sub> na amostra e posteriormente a concentração de DTC tiram.

### 3.3 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada observando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação do método, precisão como repetibilidade e exatidão como recuperação, avaliando os resultados obtidos pela comparação com os critérios de aceitação definidos no *Codex Alimentarius* e no SANTE (CODEX, 2017; EUROPEAN COMMISSION, 2018).

#### 3.3.1 Seletividade

Para determinar a seletividade foi injetado 4  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra branco e 4  $\mu\text{L}$  do padrão com o ingrediente ativo de interesse para comprovar se a amostra não possuía interferentes com o mesmo tempo de retenção das substâncias em estudo.

### 3.3.2 Estudo da faixa linear de trabalho

Para o estudo da linearidade foi utilizada uma curva analítica preparada em solvente nas concentrações nominais de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{CS}_2$ , foram injetadas no CG-EM três vezes para cada “vial”.

A faixa linear de trabalho para o método de ensaio foi verificada através da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). As premissas para verificação da linearidade da curva analítica obtida pelo MMQO foram: homogeneidade da variância dos resíduos (Teste de Cochran), significância da regressão (Teste F/ANOVA), existência de valores discrepantes (Teste de Grubbs) e se há desvio na linearidade (Teste da falta de ajuste/ANOVA) (CARDOSO, *et al.*, 2010; MILLER; MILLER, 1984).

### 3.3.3 Limites de Detecção e de Quantificação do Instrumento e do Método

O limite de detecção e quantificação foram determinados utilizando o aplicativo desenvolvido para Microsoft Excel Calwer 2.2 modificado (FIGUEIRA, 2000). O mesmo foi validado conforme descrito no POP 65.3120.084 revisão 00 (Anexo A) e desta forma está apto para atender as especificações do documento SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2018), descritas anteriormente. Abaixo são descritas as equações utilizadas pelo aplicativo para a determinação dos limites que estão de acordo com o descrito por FUNK (1995).

Para o cálculo do LD utilizou-se a equação 3.1 descrita abaixo:

$$LD = 2 \cdot S_{x,y} \cdot \frac{t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2}} = \quad (\text{Equação 3.1})$$

m = número de análise em replicatas

n= níveis de concentrações

t = “t-Student” a 95% (considerando distribuição bilateral)

$x_c$  = x crítico (erro  $\alpha$  e  $\beta$  de 5%)

$y_c$  = y crítico (erro  $\alpha$  e  $\beta$  de 5%)

Sendo  $x_c$  e  $y_c$  calculados usando as equações 3.2 e 3.3, respectivamente, apresentadas a seguir:

$$x_c = \frac{y_c - a}{b} \quad (\text{Equação 3.2})$$

$$y_{\text{crit}} = a + s_y t_{f,\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Sendo,  $S_x, y$  considerado como a estimativa do desvio padrão residual e calculado conforme a equação 3.4.

$$S_{x,y} = \sqrt{\frac{\sum (y - Y)^2}{n - 2}} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Por fim, para o cálculo do LQ utilizou-se a equação 3.5 referente à planilha do aplicativo Calwer:

$$LQ = 3 \cdot S_{x,y} \cdot \frac{t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2}} \quad (\text{Equação 3.5})$$

### 3.3.4 Recuperação e repetibilidade

O ensaio de recuperação foi realizado pela adição de uma concentração conhecida do agrotóxico de interesse a uma amostra branco antes do procedimento de extração e o resultado obtido pela comparação entre a concentração real e aquela encontrada após análise (CARDOSO, *et al.*, 2010).

Para tal, a amostra de cereal infantil foi homogeneizada conforme descrito no item 3.1 e pesou-se aproximadamente 20 g em quintuplicata para três níveis diferentes de fortificação utilizando uma solução intermediária de tiram preparada em isoocetano com concentração de 9,71  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para a fortificação das amostras de cereal infantil nas concentrações de 0,12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Nível 2) e 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Nível 3) de CS<sub>2</sub>, a solução com concentração de 9,71  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi utilizada diretamente utilizando o volume de 0,5 mL e 1,0 mL,

respectivamente. Entretanto, para a fortificação no nível 1 ( $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a solução precisou ser diluída na proporção de 1:10 no solvente isoctano. O volume utilizado foi 0,5 mL que corresponde a concentração final de  $0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{CS}_2$ .

O cálculo da taxa de recuperação e repetibilidade dos analitos e os critérios de aceitação foram os indicados pelo *Codex Alimentarius* (CODEX, 2017) e SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2018).

### 3.4 Descrição das amostras

A relação das amostras analisadas está descrita na tabela 3.

Tabela 3 - Relação das amostras de cereal infantil analisadas, elencando os cereais presentes, lote e estado de coleta de cada uma delas.

Produto	Marca	Cereais presentes	Estado da coleta
Cereal infantil multicereais	A	Arroz, milho, aveia, trigo	PE
Cereal infantil arroz e aveia	A	Arroz e aveia	PE
Cereal infantil milho	B	Milho	PE
Cereal infantil multicereais	A	Arroz, milho, aveia, trigo	PE
Cereal infantil arroz e aveia	B	Arroz e aveia	PE
Cereal infantil arroz e aveia	A	Arroz e aveia	PE
Cereal infantil milho	B	Milho	PE
Cereal infantil arroz	A	Arroz	PE
Cereal infantil multicereais	B	Arroz, milho, aveia, trigo	PE
Cereal infantil milho	A	Milho	PE
Flocos de cereais	A	Trigo, cevada e aveia	RJ
Cereal à base de milho para alimentação infantil	C	Milho	RJ
Cereal à base de aveia para alimentação infantil	C	Aveia	RJ
Cereal para alimentação infantil com probiótico - Multicereais	A	Arroz, milho, trigo	RJ

Tabela 3 - Relação das amostras de cereal infantil analisadas, elencando os cereais presentes, lote e estado de coleta de cada uma delas (Continuação).

<b>Cereal infantil Multicereais</b>	A	Arroz, milho, aveia, trigo	RS
<b>Cereal infantil arroz e aveia</b>	A	Arroz e aveia	RS
<b>Cereal infantil Multicereais</b>	A	Arroz, milho, aveia, trigo	RS
<b>Cereal infantil 5 cereais com quinoa</b>	A	Arroz, milho, cevada, aveia e quinoa	RS
<b>Fórmula infantil para lactentes ou crianças na primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas</b>	E	Arroz	RJ
<b>Pó para preparo de bebida a base de arroz</b>	F	Arroz	RJ
<b>Cereal para alimentação infantil banana e maçã - arroz, milho e cevada</b>	A	Arroz, milho e cevada	RJ
<b>Cereal para alimentação infantil com probiótico - arroz e aveia</b>	A	Arroz e aveia	RJ
<b>Pó para preparo de bebida à base de arroz e aveia - sabor baunilha</b>	A	Arroz e aveia	RJ
<b>Farinha láctea com farinha de cereais</b>	A	Trigo, cevada e centeio	RJ
<b>Cereal para alimentação infantil arroz e aveia</b>	B	Arroz e aveia	RJ

Fonte: Próprio autor

A extração foi realizada conforme descrito no item 3.1 e os resultados foram avaliados de acordo com as recomendações descritas no documento SANTE (EUROPEAN COMMISSION, 2018), a saber:

1. A variação do tempo de retenção da amostra comparado à substância padrão de interesse pode ser de  $\pm 0,1$  minuto.
2. Os íons utilizados na identificação devem ser suficientemente seletivos para o analito a ser analisado e na faixa de concentração relevante.
3. Os cromatogramas derivados de extratos de amostras devem ter tempo de retenção, forma do pico e razão de resposta semelhante aos obtidos na solução padrão em concentrações comparáveis
4. A razão entre os íons deve ser de menor que 30%.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Otimização do método de extração

Inicialmente foram realizados testes para determinar se a presença da água seria um ponto crítico no método de extração dos resíduos de agrotóxicos escolhidos para a análise dos cereais.

O primeiro teste foi a adição de um volume pequeno de água ultrapura a amostra, antes do início da extração, de modo a formar produto pastoso (“*slurry*”). Desta forma, 60 mL de água foram adicionados a 10 g de amostra.

Tanto a amostra de cereal infantil seca quanto aquela na qual foi adicionada água apresentaram recuperações semelhantes, porém abaixo da faixa desejada, que é 70% a 120%, indicando que a presença de água não era um fator crítico para a extração.

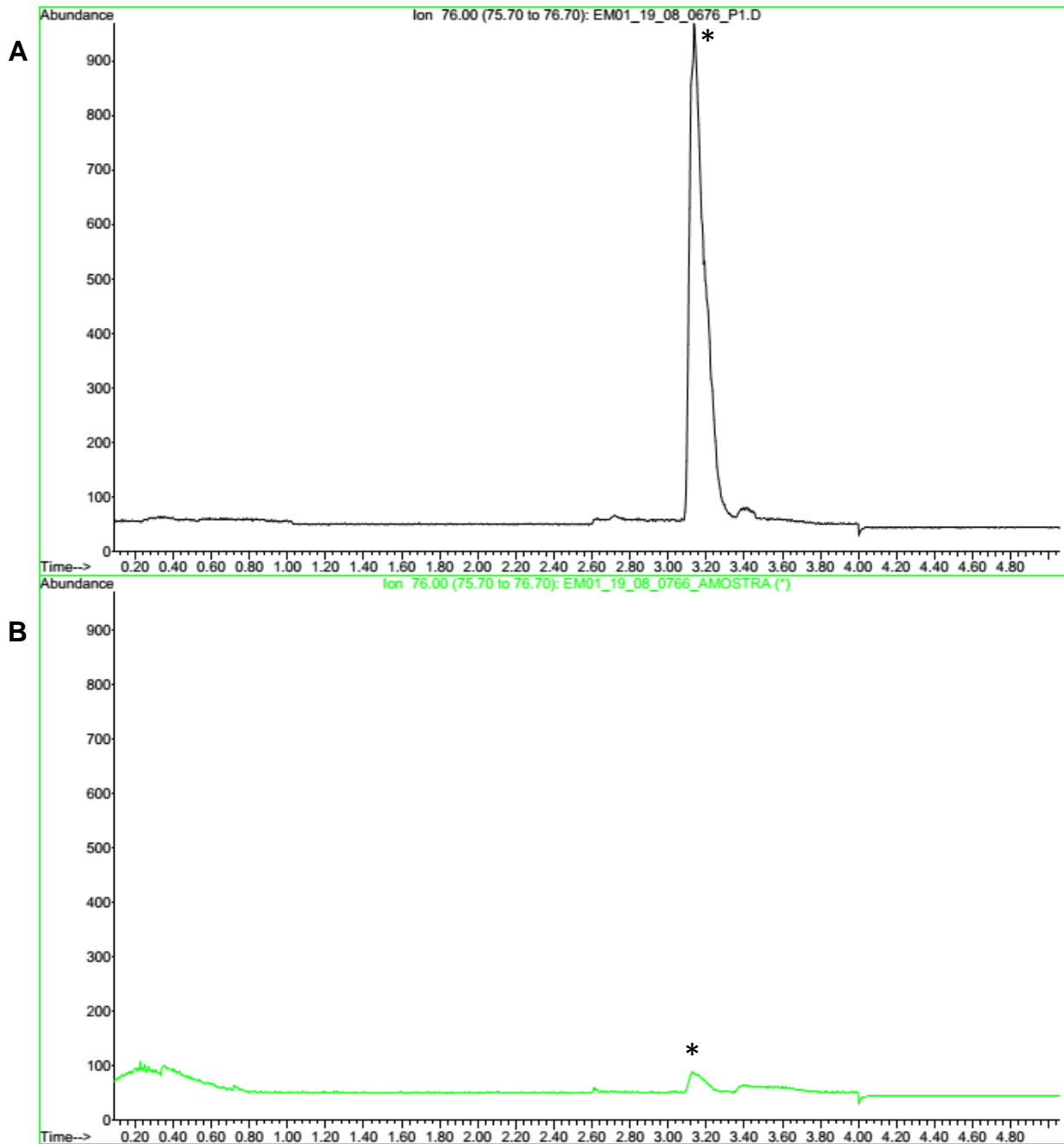
Diante disso foi avaliado se a redução da massa de amostra usada na extração poderia melhorar a reação com a solução digestiva resultando em um aumento na recuperação. O ensaio foi realizado utilizando uma amostra seca e outra na qual foi adicionada água nas seguintes massas: 30 g, 20 g e 10 g. Os melhores resultados foram obtidos nos experimentos usando 10 e 20 g de amostra, novamente com valores de recuperação semelhantes entre as amostras secas e as com água. Assim, para a validação optou-se pela utilização de 20 g de cereal infantil seco nas análises com o objetivo de melhorar a detecção dos ditiocarbamatos nas amostras comerciais.

### 4.2 Validação do método analítico

#### 4.2.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade a amostra de cereal infantil foi extraída e o extrato injetado em CG-EM e os resultados foram comparados com a solução padrão de CS<sub>2</sub> conforme apresentado na figura 7.

Figura 7 - Cromatograma da (a) solução de CS<sub>2</sub> na concentração de 0,05 µg.mL<sup>-1</sup>, analisada por CG-EM e (b) amostra de cereal infantil. (\* tempo de retenção do CS<sub>2</sub>)



Fonte: Próprio autor

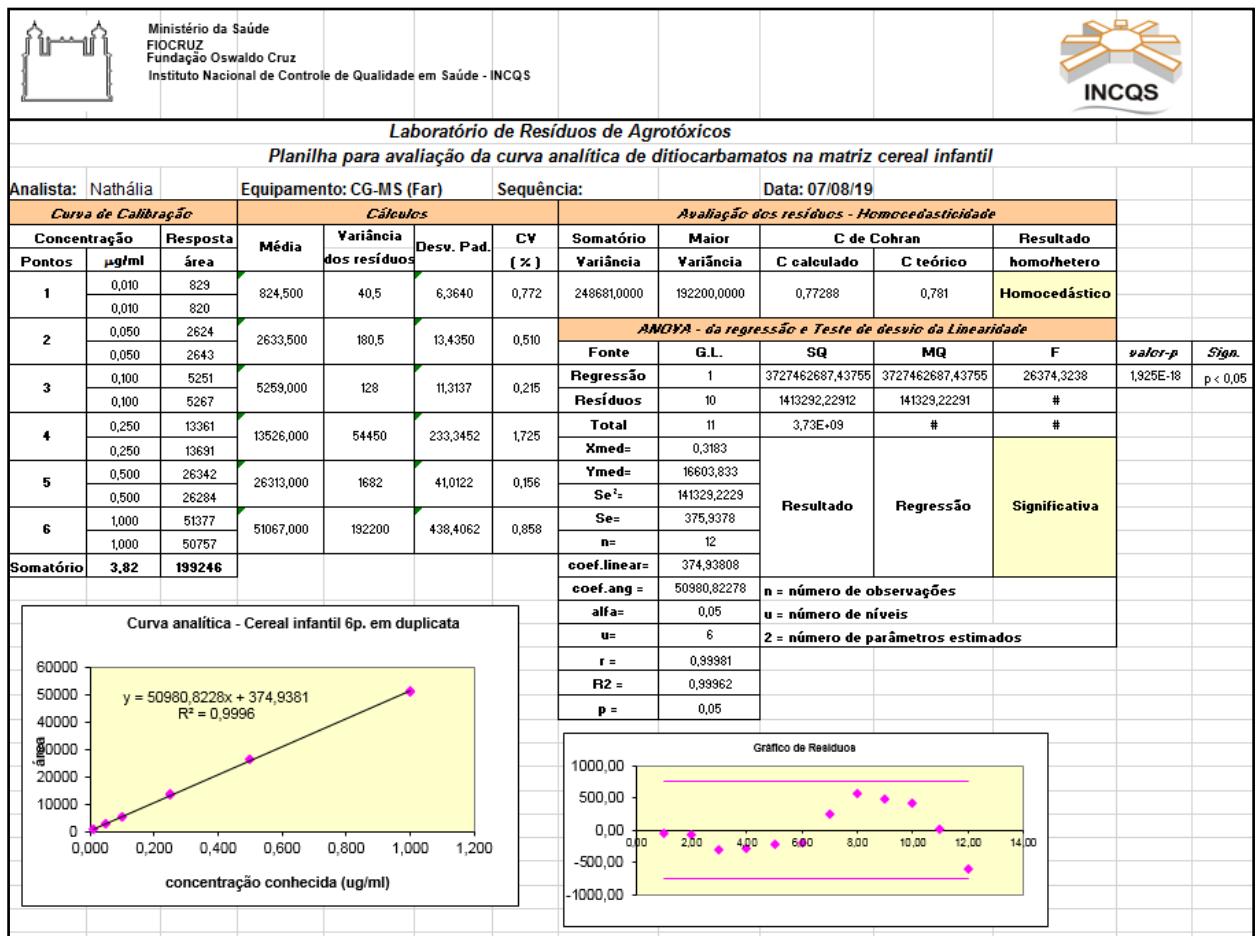
O primeiro ponto da curva analítica, correspondente a concentração de 0,05 µg.mL<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> (Figura 8a) apresentou área 17 vezes maior que a amostra em análise (Figura 8b). Desta forma, embora a amostra não esteja completamente livre de ditiocarbamatos (Figura 8b) foi considerada apta para ser utilizada como branco na validação.

A amostra de cereal infantil do tipo multicereais não apresentou interferentes no tempo de retenção do CS<sub>2</sub> que pudessem levar a um resultado falso positivo; demonstrando ser a amostra selecionada apta ao uso na validação e o método seletivo.

#### 4.2.2 Linearidade, faixa de trabalho e efeito matriz

Para avaliação da linearidade e da faixa de trabalho preparou-se uma curva analítica de CS<sub>2</sub> em solvente isooctano, em 6 diferentes concentrações nominais: 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 µg mL<sup>-1</sup> (faixa de trabalho). Cada uma das 6 soluções foi injetada 3 vezes no CG-EM. A regressão linear foi verificada através do MMQO de acordo com a equação tipo:  $y = bx + a$ , verificado também a existência de valores aberrantes (teste de Grubbs), a homogeneidade na variância dos resíduos da regressão (teste de Cochran) e a significância da regressão (ANOVA), conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Planilha para avaliação da curva analítica da análise utilizando amostras de cereal infantil fortificadas com tiram.



Fonte: CARDOSO, *et al.*, 2010

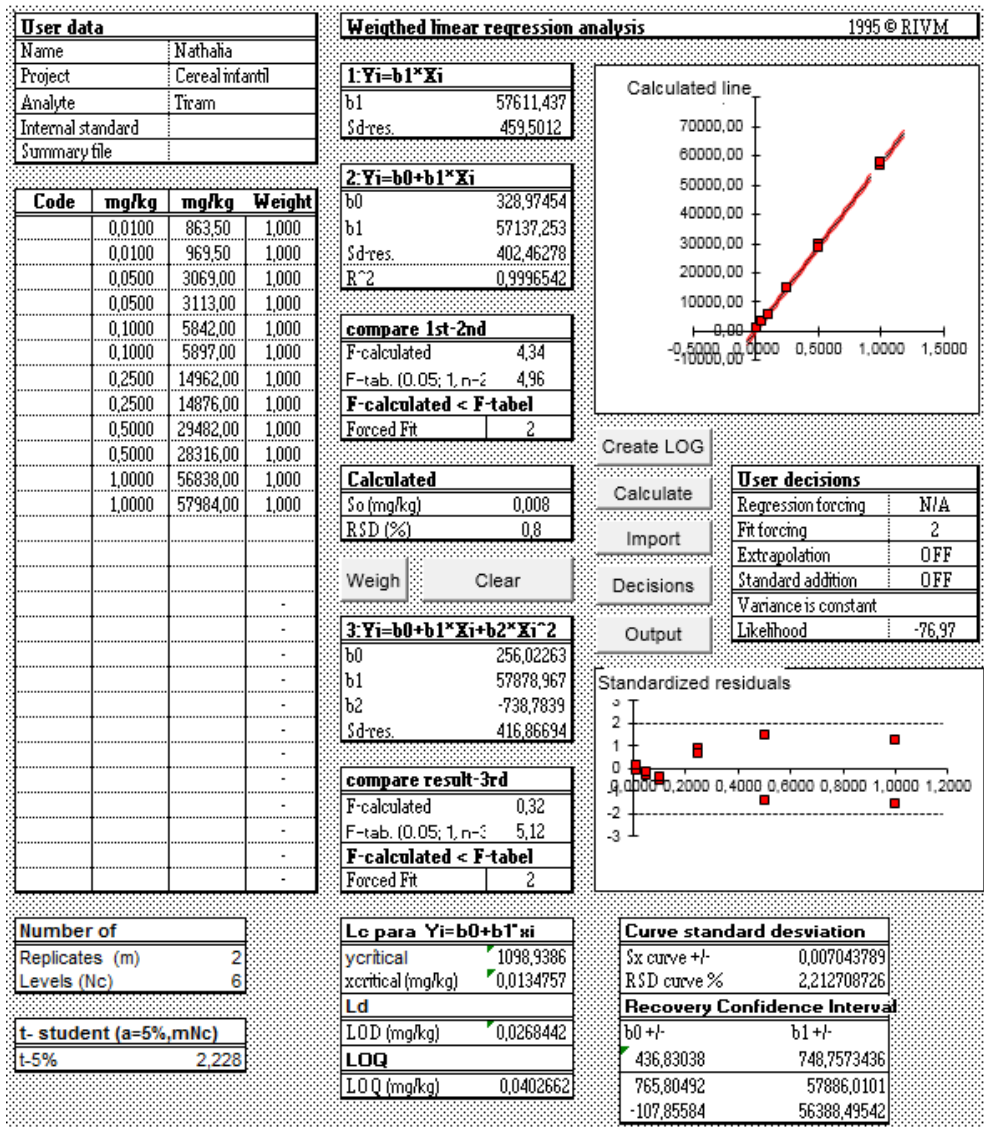
A regressão foi considerada significativa, com resíduos homocedásticos na faixa de concentração estudada entre 0,01 a 1,0 µg mL<sup>-1</sup> expressa como CS<sub>2</sub> (faixa de trabalho) e não foram encontrados valores aberrantes, assim a curva analítica atendeu às premissas para linearidade. Além disso, os valores de  $r = 0,99981$  e  $R^2 = 0,9996$  indicam que é satisfatório o ajuste dos dados obtidos para a curva.

#### 4.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e quantificação foi determinado utilizando o aplicativo desenvolvido para Microsoft Excel Calwer 2.2 modificado (FIGUEIRA, 2000). Para o cálculo utilizou-se a curva analítica de 6 pontos em duplicata com concentração entre 0,01 e 1,0 µg mL<sup>-1</sup> lida em duplicata e o valor de “t de student” de 2,228

considerando uma distribuição bilateral e nível de significância de 5%. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 9.

Figura 9 - Planilha para determinação do LD e LQ.



Fonte: FIGUEIRA, 2000.

O valor de LD de 0,03 mg kg<sup>-1</sup> e LQ de 0,04 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 9) foram confirmados a partir da fortificação em quintuplicata da concentração testada, apresentando precisão e recuperação adequadas.

Visto que nos alimentos infantis há preocupação de que os resíduos de agrotóxicos sejam reduzidos ao mínimo possível ou mesmo não estejam presentes (COMUNIDADE EUROPEIA, 2005; CODEX, 2017), quanto menores forem os limites

de detecção e quantificação do método melhor também será a capacidade de monitorar a presença dessas substâncias potencialmente tóxicas ao indivíduo em desenvolvimento, minimizando os riscos.

#### 4.2.4 Precisão

É a avaliação do desvio padrão relativo (% DPR) ou coeficiente de variação (% CV) dos resultados entre as quintuplicatas em cada um dos 3 níveis de concentração das amostras branco fortificadas com o ditiocarbamato tiram. A repetibilidade será expressa pela dispersão dos resultados entre todas as replicatas em cada nível de concentração estudado - desvio padrão relativo (% DPR), o valor aceitável é de  $\leq 20\%$  (EUROPEAN COMMISSION, 2018).

$$\text{DPR ou CV (\%)} = (s_j * 100) / y$$

Onde: CV (%) = coeficiente de variação para cada nível i de concentração,

$s_j$  = desvio padrão das leituras j no nível de concentração estudado

y = média dos resultados obtidos

A massa pesada das amostras, bem como as concentrações correspondentes de tiram usados nas fortificações encontram-se na figura 10.

Figura 10 - Concentrações de CS<sub>2</sub> adicionados e recuperados nas amostras com suas respectivas taxas de recuperação e CV.

Ministério da Saúde FIDCruz		Fundação Oswaldo Cruz		Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		INCQS						
Planilha de Cálculo da Concentração da Amostra - Ditiocarbamatos												
DQ - Resíduos de Agrotóxicos												
Validação do Ditiocarbamato:		Tiram										
Matriz:		Cereal Infantil										
Período de Execução:		ago/19										
Nº de Níveis:		2										
Nº de Replicatas:		5										
Analista Responsável:		Nathália										
Cálculos:												
Concentração da Solução Adicionada de Padrão	Aliquota Adicionada da Solução de Padrão	Quantidade de Padrão Adicionado	Massa da Amostra Fortificada	Concentração de Padrão Adicionado na Amostra	Concentração de CS <sub>2</sub> Adicionado Correspondente	Concentração de CS <sub>2</sub> Adicionado Correspondente	Concentração de CS <sub>2</sub> Encontrado	Concentração de CS <sub>2</sub> Encontrado	Recuperação	Média	DP	CV
µg mL <sup>-1</sup>	mL	µg	g	mg kg <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	µg mL <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	%	mg kg <sup>-1</sup>	-	%
0,9712	0,50	0,4856	20,0939	0,0242	0,0123	0,0153	0,0072	0,0090	59	73	1,4E+01	20
	0,50	0,4856	20,0374	0,0242	0,0123	0,0154	0,0075	0,0094	61			
	0,50	0,4856	20,3183	0,0239	0,0123	0,0151	0,0088	0,0109	72			
	0,50	0,4856	20,1402	0,0241	0,0123	0,0153	0,0096	0,0119	78			
	0,50	0,4856	20,4016	0,0238	0,0123	0,0151	0,0117	0,0143	95			
9,7121	0,50	4,8561	20,0149	0,2426	0,1231	0,1538	0,0970	0,1211	79	93	1,1E+01	11
	0,50	4,8561	20,0349	0,2424	0,1231	0,1528	0,1237	0,1543	101			
	0,50	4,8561	20,0061	0,2427	0,1231	0,1538	0,1269	0,1586	103			
	0,50	4,8561	20,0118	0,2427	0,1231	0,1538	0,1052	0,1314	85			
	0,50	4,8561	20,0122	0,2427	0,1231	0,1538	0,1199	0,1498	97			
9,7121	1,00	9,7121	20,0349	0,4848	0,2462	0,3072	0,1926	0,2404	78	82	3,2E+00	4
	1,00	9,7121	20,0063	0,4855	0,2462	0,3076	0,2045	0,2555	83			
	1,00	9,7121	20,0376	0,4847	0,2462	0,3072	0,1996	0,2491	81			
	1,00	9,7121	20,0082	0,4854	0,2462	0,3076	0,1949	0,2436	79			
	1,00	9,7121	20,0098	0,4854	0,2462	0,3076	0,2128	0,2657	86			

Fonte: CARDOSO, *et al.*, 2010

As concentrações selecionadas na fortificação encontram-se dentro da faixa de linearidade da curva analítica estudada e foram escolhidas de acordo com o LD e o LQ teóricos calculados (Figura 9).

De acordo com os resultados obtidos, todos os coeficientes de variação nos diferentes níveis de concentração mostraram-se dentro dos limites especificados pelo SANTE que é  $\leq 20\%$  (EUROPEAN COMMISSION, 2018). Além disso, foi possível determinar a concentração de  $0,0153 \text{ mg kg}^{-1}$  como o LQ do método.

#### 4.2.5 Exatidão

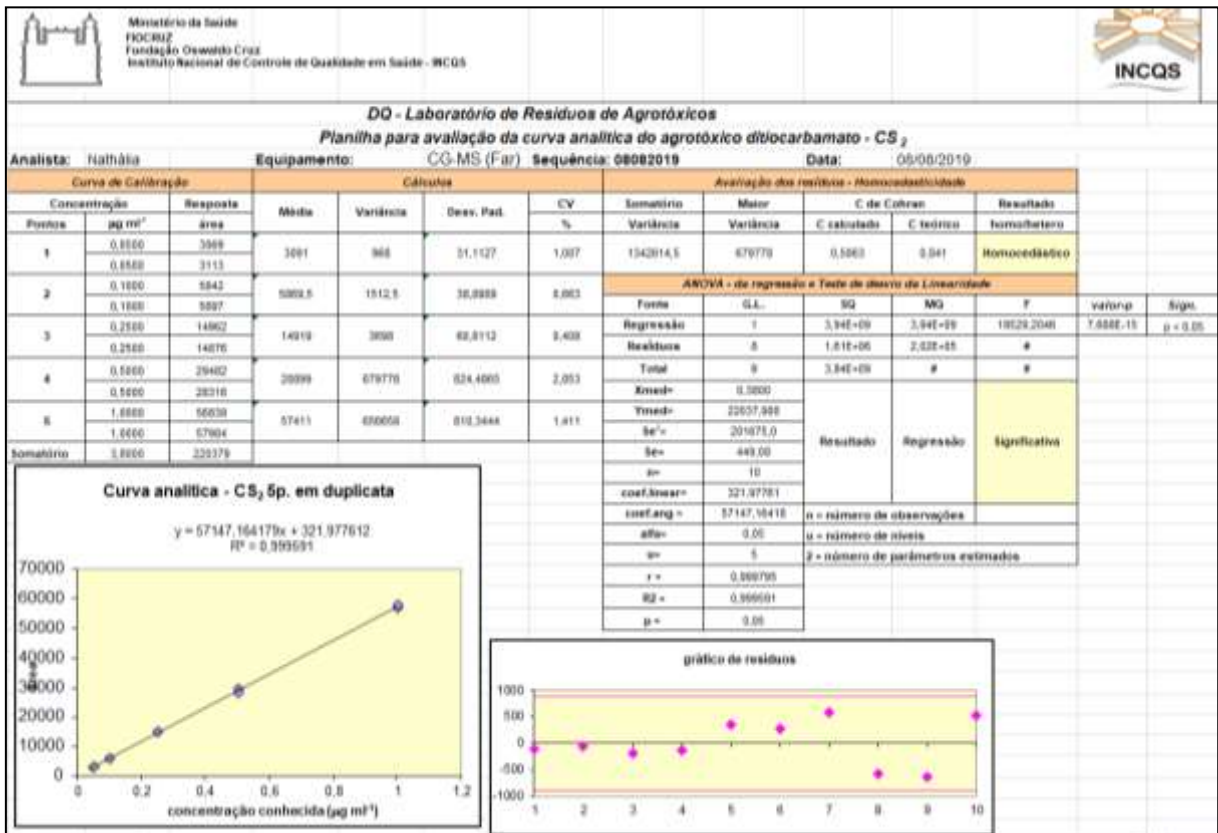
É a avaliação da média das recuperações obtidas nos resultados entre as quintuplicatas em cada um dos três níveis de concentração das amostras branco fortificadas com o ditiocarbamato tiram. Os resultados obtidos desta avaliação encontram-se na figura 10.

A faixa estabelecida para a taxa de recuperação deve ser de 70 a 120% (EUROPEAN COMMISSION, 2018) sendo assim, os resultados de três níveis encontrados estão dentro dos limites especificados.

### 4.3 Análises de amostras comerciais de cereal infantil ou produtos contendo cereal

Primeiramente foi elaborada uma curva analítica para possibilitar a quantificação dos resultados, conforme demonstrado na figura 11, a partir dela foi possível calcular a concentração média de CS<sub>2</sub> presente nas amostras, bem como a razão entre íons característica desta substância, visto que a regressão foi significativa e os resíduos foram homocedásticos.

Figura 11 – Planilha para avaliação da curva analítica da análise das amostras comerciais de cereal infantil.

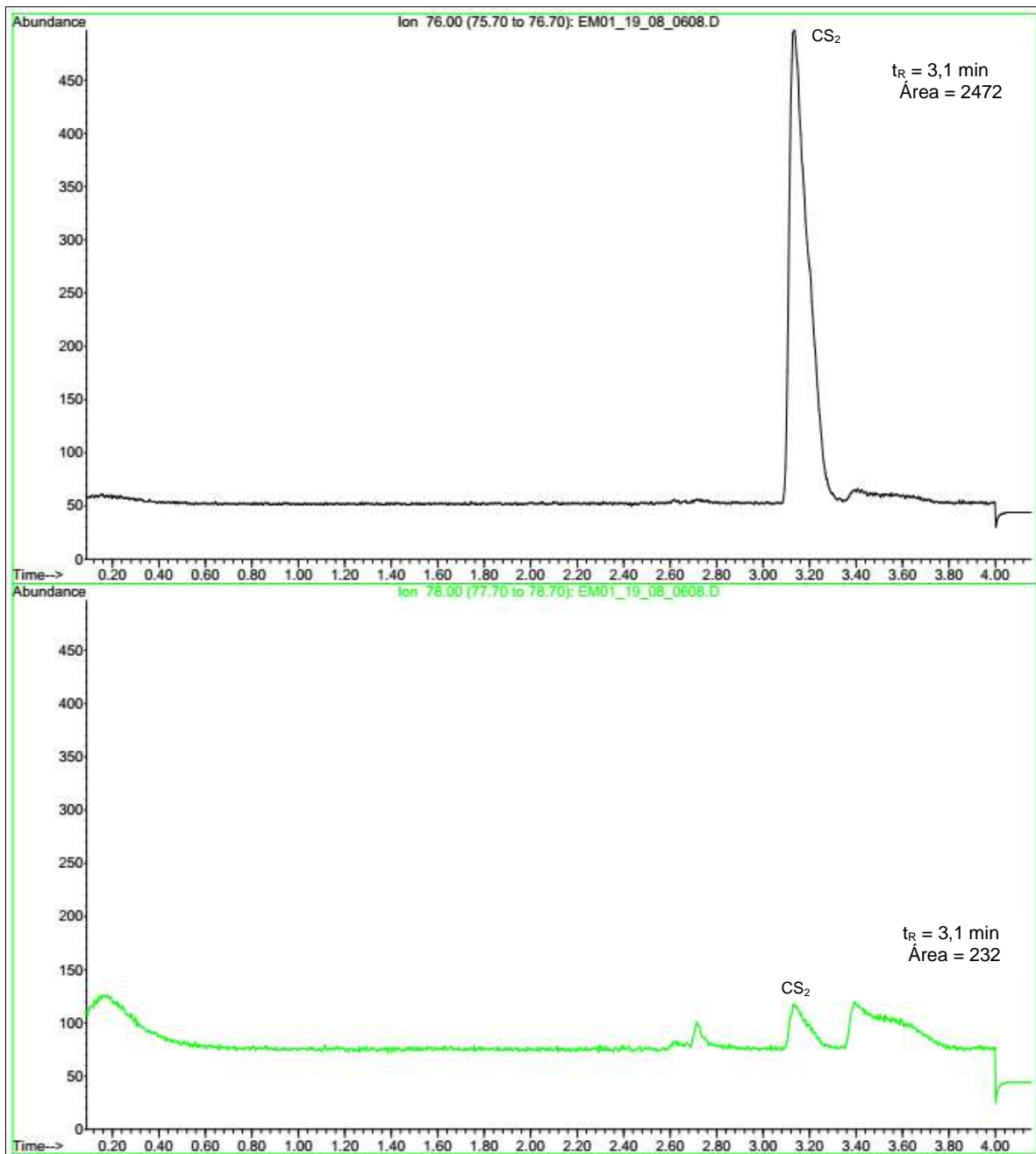


(Fonte: CARDOSO, et al., 2010)



De acordo com a figura 12 a razão de intensidade entre os íons, expressa como área, de  $m/z$  76 e 78 é de  $\pm 10\%$ , assim estão expostos apenas os resultados para as amostras nas quais foi identificada leitura no tempo de retenção do  $\text{CS}_2$  (aproximadamente 3,1 minutos) e com razão entre íons  $\pm 10\%$ .

Figura 12 – Cromatograma dos íons de  $m/z$  76 e  $m/z$  78 referente ao ponto da curva de concentração  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{CS}_2$ .



Fonte: Próprio autor

Além disso, foi feita uma amostra controle, que consiste em uma amostra branco fortificada com uma concentração conhecida de agrotóxico, para garantir a confiabilidade do resultado obtido. Conforme apresentado na figura 13 as duas apresentaram recuperação entre 70-120% indicando que o processo de extração ocorreu adequadamente.

Figura 13 – Planilha para cálculo da recuperação das amostras controle utilizadas na análise dos cereais infantis.

Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		INCQS										
DQ - Resíduos de Agrotóxicos												
Validação do Ditiocarbamato:	Tiram											
Matriz:	Cereal Infantil											
Período de Execução:	ago/19											
Nº de Níveis:	2											
Nº de Replicatas:	5											
Analista Responsável:	Nathália											
<b>Cálculos:</b>												
Concentração da Solução Adicionada de Padrão $\mu\text{g mL}^{-1}$	Alquota Adicionada da Solução de Padrão mL	Quantidade de Padrão Adicionado $\mu\text{g}$	Massa da Amostra Fortificada g	Concentração de Padrão Adicionado na Amostra $\text{mg kg}^{-1}$	Concentração de $\text{CS}_2$ Adicionado Correspondente $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração de $\text{CS}_2$ Adicionado Correspondente $\text{mg kg}^{-1}$	Concentração de $\text{CS}_2$ Encontrado $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração de $\text{CS}_2$ Encontrado $\text{mg kg}^{-1}$	Recuperação %	Media $\text{mg kg}^{-1}$	DP	CV %
9,7121	0,50	4,8561	20,0343	0,2424	0,1231	0,1536	0,0906	0,1131	74			
	0,50	4,8561	20,0099	0,2427	0,1231	0,1538	0,0988	0,1234	80			

Fonte: CARDOSO, *et al.*, 2010

Por fim foram analisadas 25 amostras de cereal infantil ou produtos infantis contendo cereal em sua composição e os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Tabela com informações referentes às amostras que apresentaram leitura para  $\text{CS}_2$ .

Identificação da amostra	Marca	Massa pesada (g)	Concentração média $(\text{mg kg}^{-1})$	Razão de área entre íons (76/78)	Tempo de retenção (min)
Cereal infantil arroz e aveia	A	20,0040	< LQ	10,71	3,13
Cereal infantil arroz e aveia	B	20,0022	0,0188	10,00	3,13

<b>Cereal infantil arroz e aveia</b>	A	20,0041	< LQ	9,60	3,13
Tabela 4 – Tabela com informações referentes às amostras que apresentaram leitura para CS <sub>2</sub> (Continuação).					
<b>Cereal infantil milho</b>	A	20,0082	< LQ	10,50	3,13
<b>Cereal a base de milho para alimentação infantil</b>	C	20,0242	0,0332	12,3	3,13
<b>Cereal para alimentação infantil com probiótico</b>	A	20,0003	< LQ	10,6	3,14
<b>Cereal para alimentação infantil arroz e aveia</b>	B	20,0014	0,0182	10,4	3,13
<b>Cereal infantil multicereais</b>	A	20,0078	0,0270	9,7	3,14
<b>Cereal infantil arroz e aveia</b>	A	20,0280	< LQ	9,8	3,13
<b>Farinha láctea com farinha de cereais</b>	A	20,0159	< LQ	9,9	3,13
<b>Cereal infantil arroz</b>	A	20,0462	< LQ	10,10	3,13

Fonte: Próprio autor

A Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), que rege a respeito do registro e uso de agrotóxicos no Brasil não exige que haja limites máximos de resíduos específicos para produtos infantis e tão pouco para produtos industrializados, assim ao analisar tais produtos utiliza-se como base a LMR estabelecida para o alimento *in natura* que lhe deu origem (BRASIL, 1998). Assim, não é possível avaliar se as amostras em estudo foram satisfatórias ou não. Diante disso, utilizou-se os parâmetros de documentos internacionais para análise dos resultados.

Segundo o *Codex Alimentarius* resíduos de agrotóxicos não devem ser detectados em alimentos para consumo infantil ou ser reduzidos ao menor limite possível (CODEX, 2013). Deste modo, as 11 amostras apresentadas na tabela 4 seriam consideradas insatisfatórias

A Comunidade Europeia também possui uma norma direcionada a alimentos destinados a lactentes e bebês, a Diretiva 2006/125/CE de 5 de Dezembro de 2006

(COMUNIDADE EUROPEIA, 2006), que estipula que “os alimentos à base de cereais e os alimentos para bebês não podem conter resíduos de pesticidas específicos em teores superiores a 0,01 mg/kg” , exceção aos IAs disulfotom, fensulfotiom, fentim, haloxifope, heptacloro, hexaclorobenzeno, nitrofenol, ometoato e turbufós que não podem ser utilizados. Assim, quatro amostras do estudo seriam consideradas insatisfatórias (Tabela 4).

Além disso, ressalta-se que o trigo, o arroz e a aveia possuem casca e para a elaboração da farinha, a qual posteriormente será incorporada ao cereal infantil, é necessário um processo inicial de descascamento para remoção das porções externas do grão (KLAJN, 2011), onde estão localizados os IAs de ação por contato. A figura 14 apresenta um esquema de processamento do milho exemplificando a cadeia de produção seguida pelo cereais até a obtenção do produto acabado.

Entretanto, mesmo depois de todo o processamento resíduos podem ser encontrados, visto que os IAs sistêmicos distribuem-se uniformemente por todos os tecidos vegetais e mesmo os que agem por contato podem penetrar no tecido através de porosidades e assim ser detectado mesmo após o descascamento (BRASIL, 2019b) conforme foi observado nas amostras analisadas para os DTCs.

Figura 14 – Esquema de processamento industrial do milho a seco.



## 5 CONCLUSÃO

O método foi otimizado e validado de forma satisfatória segundo os compêndios oficiais utilizados como referência, levando em conta os parâmetros: linearidade, seletividade, LD, LQ, precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação) para a determinação de ditiocarbamatos em cereais infantis.

Os resultados das análises de resíduos das amostras comerciais foram avaliados segundo os LMRs de documentos internacionais específicos para esse tipo de alimento, visto que o Brasil não possui legislação para alimentos infantis. Observou-se que onze seriam insatisfatórias segundo o *Codex Alimentarius* e quatro segundo a legislação específica para produtos infantis da CE.

Esses resultados alertam para a necessidade de uma legislação sobre agrotóxicos direcionada para alimentos infantis e também de um maior monitoramento daqueles consumidos durante a primeira infância visando à oferta de alimentos mais seguros para bebês e crianças.

## REFERÊNCIAS

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 7.ed. São Paulo: Andrei, 2005.

BALARDIN, R. S. et al. **Mancozebe – Muito além de um fungicida**. 1. ed. [s.l.]: Bookman Editora, 2017.

BELPOGGI, Fiorella et al. Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis-Dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 982, n. 1, p. 123-136, 2002.

BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 2, p. 267-276, 2004.

BRAGA, M. M. *et al.* Modulation of the chelatable Zn pool in the brain by diethyldithiocarbamate is associated with behavioral impairment in adult zebrafish. **Toxicology Research**, v. 4, n. 2, p. 317-325, 2015

BRASIL. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989. Lei federal dos agrotóxicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm)>. Acesso em: 27 nov. 2018.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 34, de 13 de janeiro de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 jan. 1998. Disponível em: <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/prt0034\\_13\\_01\\_1998\\_rep.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1998/prt0034_13_01_1998_rep.html)> Acesso em: 12/07/2018.

\_\_\_\_\_. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 jan. 1999. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L9782.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9782.htm)>. Acesso em: 17/10/2019.

\_\_\_\_\_. Decreto nº 4074 de 04 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 jan. 2002. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/D4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm). Acesso em: 02 out. 2019.

\_\_\_\_\_. Lei n. 11.947, de 16 de junho de 2009. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 jun. 2009. Disponível em:

<https://www.fn-de.gov.br/index.php/programas/pnae/pnae-sobre-o-programa/pnae-legislacao>. Acesso em: 12/11/2019.

\_\_\_\_\_. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Agenda Regulatória 2017-2020**. Brasília: Anvisa, 2017. Disponível em: <  
<http://portal.anvisa.gov.br/2017-2020/temas>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

\_\_\_\_\_. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Monografia do Mancozebe**. Brasília: Anvisa, 2019a. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M02%2B%2BMancozebe.pdf/975fdd18-65fd-477c-ab85-217bcb9a0110>. Acesso em: 20 set. 2018.

\_\_\_\_\_. **Perguntas frequentes sobre alimentos**. Brasília: ANVISA, 2019b.

Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Perguntas+e+respostas.pdf/bc84279b-eff0-4edb-ad3a-0598d07d8e2f>. Acesso em: 05/12/2019.

\_\_\_\_\_. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA)**, dados da coleta e análise de alimentos de 2017 a 2018. Brasília: Anvisa, 2019c. Disponível em: <

[http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+PARA+2017-2018\\_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9)>. Acesso em: 26/12/2019.

\_\_\_\_\_. MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal – PNCRC/Vegetal** referente ao 2º semestre de 2015, ano de 2016, 2017 e 2018. Brasília. Diário Oficial da União, n. 243 de 17 de dezembro de 2019. 2019d. Disponível em:

[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy\\_of\\_pncrc-vegetal](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/copy_of_pncrc-vegetal)> Acesso em: 26/12/2019.

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

BRUCKNER, J. V. Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: the NAS panel report. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 280-285, 2000.

BRYANT CHRISTIE INC. BC Global Subscription. **Pesticides MRLS**. United States, 2019. Disponível em: <https://www.bryantchristie.com/BCGlobal-Subscriptions/Pesticide-MRLs>. Acesso em: 18/01/2020.

CALDAS, E. D. et al. Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by a spectrophotometric method using a vertical disulfide reaction system. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4521-4525, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599982>. Acesso em: 01 out. 2019.

CALDAS, E. D.; TRESSOU, J.; BOON, P. E. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides—a probabilistic approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 9, p. 1562-1571, 2006.

CARDOSO, M. H. W. M., GOUVÊA, A. V., NÓBREGA, A. W. D., & ABRANTES, S. D. M. P. Method validation for determination of pesticide residues in tomatoes: a laboratorial experience. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 63-72, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on formulated complementary foods for older infants and young children - **CAC/GL 8-1991**. Rev. 01. Germany:FAO/WHO, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues – **CAC/GL 90-2017**. Rev. 01. Rome: FAO/WHO, 2017.

COMUNIDADE EUROPEIA. **Regulamento (CE) N.º 396/2005 de 23 de fevereiro de 2005 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas no interior e à superfície dos gêneros alimentícios e dos alimentos para animais, de origem vegetal ou animal**. União Europeia, 2005. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32005R0396>> Acesso em: 28/10/2017.

COMUNIDADE EUROPEIA. **DIRECTIVA 2006/125/CE DA COMISSÃO de 5 de Dezembro de 2006 relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens**. União Europeia, 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0125&from=EN>> Acesso em: 12/12/2019.

COSTA, L. G. Toxic Effects os pesticidas. *In*: KLAASSEN, C. D. *et al.* (Ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2013. p. 883-930.



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

EUROPEAN COMMISSION. **Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed** - Document n<sup>o</sup> SANTE/11813/2017. Rev. 0. Europe, 01 jan. 2018. 46 f.

FIGUEIRA, E. C. S. **Determinação de Halofenóis em Café Torrado**. 2000. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

FUNK, W. V. Dammann, G. Donnevert. **Quality Assurance in Analytical Chemistry**. VCH: Weinheim, 1995.

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

GERMANI R. **Árvore do conhecimento – Moagem. Agência Embrapa de Informação Tecnológica (Ageitec)**, Brasília, 2020. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000fid5sgie02wyiv80z4s473y1hai57.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgie02wyiv80z4s473y1hai57.html). Acesso em: 27/05/2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Sidra: sistema IBGE de recuperação automática. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>>. Acesso em: 19/12/2019.

ICH, Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In: **International conference on harmonization, Geneva, Switzerland**. 2005. p. 11-12. Disponível: < [https://pacificbiolabs.com/wp-content/uploads/2017/12/Q2\\_R1\\_\\_Guideline-4.pdf](https://pacificbiolabs.com/wp-content/uploads/2017/12/Q2_R1__Guideline-4.pdf) > Acesso em: 09/01/2019.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e venda de agrotóxicos no Brasil**. 2019. Disponível: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>> Acesso em: 20/05/2019.

INCQS – INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE.

**Apresentação do INCQS.** INCQS, 2019. Disponível em:

<[https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=61&Itemid=57](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57)> Acesso em: 17/10/2019.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008:** Orientação sobre validação de métodos analíticos. [s.l.]. 2018. Disponível em:

[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=5&cod\\_uo\\_numeracao=00774&num\\_documento=008](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008). Acesso em: 07/10/2019.

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

KLAJN, V. M. **Efeitos do processamento hidrotérmico em escala industrial sobre parâmetros de composição química, estabilidade conservativa e atividade antioxidante em aveia.** 2011. 98f. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

LARINI, L. Fungicidas. In: LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas.** São Paulo: Manole LTDA, 1999. p. 99-103.

LEMES, V. R. R. **Avaliação de resíduos de etilenotioréia (ETU) em frutas comercializadas na cidade de São Paulo.** 2007. 111f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MIDIO, A. F. **Herbicidas em alimentos: aspectos gerais, toxicológicos e analíticos.** 1. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 1997, cap. 1, p. 7-8.

MILLER, J. C. and MILLER, J. N. **Statistic for Analytical Chemistry.** Ellis Horwood Limited: New York, 1984.

MILLS, P. K. & ZAHM, S. H. Organophosphate pesticide residues in urine of farmworkers and their children in Fresno County, California. **American Journal of Industrial Medicine**, 40(5): 571-577, nov. 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances.** National Academies Press, 1989.

PAOLETTI, P. *et al.* Zinc at glutamatergic synapses. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 126-136, 2009.

PHILIPPI, S. T. *et al.* Pirâmide alimentar adaptada: Guia para escolha dos alimentos adapted food pyramid: A guide for a right food choice. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 65-80, 1999.

PIGNATI, Wanderlei Antonio *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

RUBINO, F. M.; MREMA, E. J.; COLOSIO, C. Pesticide Residues: Dithiocarbamates. **Encyclopedia of food Safety**, Itália, v.3, p. 5-10. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128002407?via%3Dihub>. Acesso em: 01 out. 2019.

SANBORN, M. *et al.* Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. **Canadian Family Physician**, v. 53, n. 10, p. 1712-1720, 2007.

SILVA, R. **Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface**. 2005. 142f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SMITH, E. R. *et al.* Delayed breastfeeding initiation and infant survival: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180722, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Departamento Científico de Nutrologia**. Manual de Orientação para Alimentação do Lactente do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: [http://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/img/manuais/manual\\_alim\\_dc\\_nutrologia.pdf](http://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/img/manuais/manual_alim_dc_nutrologia.pdf) Acesso em: 22/10/2017.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Pesticide residue monitoring program fiscal year 2017 pesticide report**. 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/pesticides/pesticide-residue-monitoring-program-reports-and-data>. Acesso em: 21/11/2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Implementation guidance: protecting, promoting and supporting breastfeeding in facilities providing maternity and newborn services: the revised baby-friendly hospital initiative. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/breastfeeding-facilities-maternity-newborn/en/> Acesso em: 06/09/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health Criteria 78 – Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction.** Geneva; 1988.

## ANEXO A – MONOGRAFIA DO INGREDIENTE ATIVO MANCOZEBE

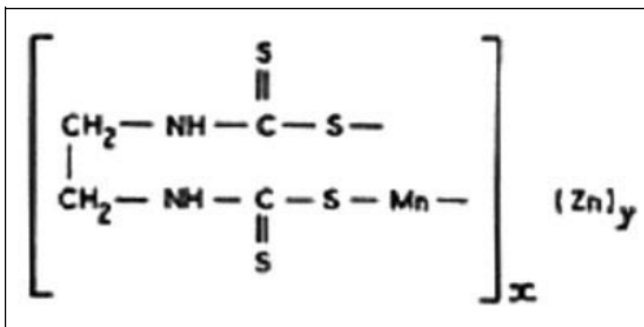
Fonte: Site da Anvisa

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M02%2B%2BMancozebe.pdf/975fdd18-65fd-477c-ab85-217bcb9a0110> (Consulta ao site da Anvisa em 19/11/2019)

ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
M02	MANCOZEBE

### M02 – Mancozebe

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: MANCOZEBE (mancozeb)
- b) Sinonímia: Manzeb
- c) Nº CAS: 8018-01-7
- d) Nome químico: manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt
- e) Fórmula bruta:  $(C_4H_6N_2S_4Mn)_x (Zn)_y$
- f) Fórmula estrutural:



- g) Grupo químico: Alquilenobis(ditiocarbamato)
- h) Classe: Fungicida e acaricida
- i) Classificação toxicológica: Classe III
- j) Uso agrícola: autorizado conforme indicado.

Modalidade de emprego: aplicação foliar nas culturas de abacate, abóbora, algodão, alho, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, beterraba, brócolis, café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, cevada, citros, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, dália, ervilha, eucalipto, feijão, feijão-vagem, figo, fumo, gladiolo, hortênsia, maçã, mamão, manga, melancia, melão, milho, orquídeas, pepino, pêra, pêssego, pimentão, repolho, rosa, seringueira, soja, tomate, trigo, uva e vagem.

Culturas	Modalidade de Emprego (Aplicação)	Intervalo de Segurança
Abacate	Foliar	21 dias
Abóbora	Foliar	14 dias
Algodão	Foliar	30 dias
Alho	Foliar	7 dias
Amendoim	Foliar	14 dias
Arroz	Foliar	32 dias
Banana	Foliar	7 dias
Batata	Foliar	7 dias
Berinjela	Foliar	7 dias

Beterraba	Foliar	7 dias
Brócolis	Foliar	7 dias
Café	Foliar	21 dias
Cana-de-açúcar	Foliar	60 dias
Cebola	Foliar	7 dias
Cenoura	Foliar	7 dias
Cevada	Foliar	21 dias
Citros	Foliar	14 dias
Couve	Foliar	14 dias
Couve-flor	Foliar	7 dias
Cravo	Foliar	UNA
Crisântemo	Foliar	UNA
Dália	Foliar	UNA
Ervilha	Foliar	7 dias
Eucalipto	Foliar	UNA
Feijão	Foliar	14 dias
Feijão-vagem	Foliar	7 dias
Figo	Foliar	21 dias
Fumo	Foliar	UNA
Gadíolo	Foliar	UNA
Hortênsia	Foliar	UNA
Maçã	Foliar	7 dias
Mamão	Foliar	3 dias
Manga	Foliar	20 dias
Melancia	Foliar	7 dias
Melão	Foliar	14 dias
Milho	Foliar	30 dias
Orquídeas	Foliar	UNA
Pepino	Foliar	7 dias
Pêra	Foliar	14 dias
Pêssego	Foliar	21 dias
Pimentão	Foliar	7 dias
Repolho	Foliar	14 dias
Rosa	Foliar	UNA
Seringueira	Foliar	UNA
Soja	Foliar	30 dias
Tomate	Foliar	7 dias
Trigo	Foliar	32 dias
Uva	Foliar	7 dias

UNA = Uso Não Alimentar

Obs: os LMRs para as culturas acima descritas encontram-se elencados na tabela geral de ditiocarbamatos (\*)

k) Ingestão Diária Aceitável (IDA) = 0,03 mg/kg p.c.

(\*) Ditiocarbamatos:

<b>Cultura</b>	<b>CS<sub>2</sub> (mg/kg)</b>	<b>Ingrediente Ativo</b>
Abacate	1,0	Mancozebe
Abacaxi	1,0	Metiram
Abóbora	1,0	Mancozebe
Algodão	1,0	Mancozebe, Metiram e Tiram
Alface	3,0	Metiram
Alho	0,1	Mancozebe e Metiram
Amendoim	0,3	Mancozebe e Tiram
Arroz*	0,5	Mancozebe e Tiram
Aveia	0,3	Tiram
Banana	1,0	Mancozebe
Batata	1,0	Mancozebe, Metam, Metiram, Propinebe e Tiram
Berinjela	0,5	Mancozebe
Beterraba	0,3	Mancozebe e Metiram
Brócolis	0,5	Mancozebe
Café	0,3	Mancozebe
Cana-de-açúcar	0,07	Mancozebe
Cebola	1,0	Mancozebe, Metiram e Propinebe
Cenoura	0,3	Mancozebe, Metam e Metiram
Cevada	1,0	Mancozebe e Tiram
Citros	2,0	Mancozebe
Couve	1,0	Mancozebe
Couve-flor	0,5	Mancozebe
Cravo	UNA	Mancozebe
Crisântemo	UNA	Mancozebe, Metam e Metiram
Dália	UNA	Mancozebe
Ervilha	0,3	Mancozebe e Tiram
Eucalipto	UNA	Mancozebe
Feijão	0,3	Mancozebe, Metam, Propinebe e Tiram
Feijão-Vagem	0,3	Mancozebe
Fumo	UNA	Mancozebe, Metam e Propinebe
Figo	2,0	Mancozebe
Gadíolo	UNA	Mancozebe
Hortênsia	UNA	Mancozebe
Maçã	2,0	Metiram, Mancozebe e Propinebe
Mamão	3,0	Mancozebe
Manga	1,0	Mancozebe
Maracujá	1,0	Metiram
Melancia	0,3	Mancozebe e Metiram
Melão	1,0	Mancozebe, Metiram e Propinebe
Milho	0,3	Mancozebe e Tiram
Morango	0,2	Metam
Orquídeas	UNA	Mancozebe
Pastagens	1,0	Tiram
Pepino	0,3	Mancozebe e Metiram
Pêra	3,0	Mancozebe
Pêssego	4,0	Mancozebe e Metiram

Pimentão	3,0	Mancozebe, Metiram e Propinebe
Repolho	1,0	Mancozebe
Rosa	UNA	Mancozebe e Metiram
Seringueira	UNA	Mancozebe
Soja	0,3	Mancozebe e Tiram
Sorgo	0,3	Tiram
Tomate	2,0	Mancozebe, Metam, Metiram e Propinebe
Trigo	1,0	Mancozebe e Tiram
Uva	3,0	Mancozebe, Metiram e Propinebe

\* LMR estabelecido para arroz sem casca

Resolução RE nº 2.250 de 18/05/10 (DOU de 19/05/10)

Resolução RE nº 3.744 de 19/09/14 (DOU de 22/09/14)

Resolução RE nº 2.390 de 02/09/16 (DOU de 05/09/16)

Resolução RE nº 2.037 de 28/07/17 (DOU de 31/07/17)