

**LEANDRO AUGUSTO FERREIRA DE SOUSA**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS EM TOMATE  
POR ESPECTROFOTOMETRIA.**

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2009

**LEANDRO AUGUSTO FERREIRA DE SOUSA**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA  
PARA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS EM TOMATE  
POR ESPECTROFOTOMETRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira

Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2009

S725v Sousa, Leandro Augusto Ferreira de.  
Validação de metodologia analítica para determinação de  
resíduos de fungicidas ditiocarbamatos em tomate por  
espectrofotometria / Leandro Augusto Ferreira de Sousa. – 2009.  
88 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência  
de Alimentos.

1. Alimentos – Contaminação – Teses. 2. Agrotóxicos – Teses.  
3. Tomate – Qualidade - Teses. 4. Validação de métodos – Teses. I.  
Junqueira, Roberto Gonçalves. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD 664.07



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

LEANDRO AUGUSTO FERREIRA DE SOUSA

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO  
DE RESÍDUOS DE FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS EM TOMATE POR  
ESPECTROFOTOMETRIA

APROVADA EM 29 DE DEZEMBRO DE 2009

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. DAVID LEE NELSON

Prof. Dr. JOSÉ VIRGÍLIO COELHO

Profa. Dra. SCHEILLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA

Prof. Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA  
Orientador

*Para todos aqueles que acreditaram e acreditam...*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Roberto Gonçalves Junqueira, pela paciência, dedicação e orientação. Pela presença em todas as etapas decisivas de minha formação: da graduação à pós-graduação. Obrigado pela música do conhecimento.

À Faculdade de Farmácia da UFMG e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelo eterno ensinamento.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA cuja nova visão de gestão tem permitido que seus funcionários busquem o conhecimento e a qualificação profissional.

À direção do Laboratório de Química Agrícola, José Marques Neto e Ilka Altoé Fioravante, que assumiram as responsabilidades e acreditaram no potencial dos laboratórios e dos servidores.

À Eliane Hooper Amaral, supervisora do Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos – IMA, por compartilhar seu conhecimento e sua experiência profissional, pelo dinamismo e paixão pela profissão.

Aos colegas Alexandre Augusto Soares, Dilma Borges, Regina Duque Estrada de Carvalho e Isis Rosiclaire de Carvalho do Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos, pelas sugestões, pela dedicação, pela parceria e pela alegria do trabalho em equipe.

À Flávia Beatriz Custódio, pelo incentivo para ingressar no PGCA e por abrir as portas do Laboratório de Química Agropecuária - IMA.

Aos colegas do Laboratório de Química Agropecuária - IMA pelo apoio no dia a dia.

À Vanessa, Márcia, Heloisa e Tânia da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pela amizade, pelo apoio técnico, pela ajuda nas análises, pelos treinamentos, pelas palavras de força.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos Marilene e Úrsula pela competência, atenção e convivência.

Aos colegas do mestrado pela convivência, ajuda nos trabalhos e partilha das amarguras.

Aos amigos por respeitarem e compreenderem minha ausência.

Aos meus pais, minhas irmãs e minha companheira sempre presentes.

A todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE TABELAS   | 7  |
| LISTA DE FIGURAS   | 8  |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS   | 9  |
| RESUMO   | 10 |
| ABSTRACT   | 11 |
| 1 – INTRODUÇÃO   | 12 |
| 2 – REVISÃO DA LITERATURA  | 14 |
| 2.1 – AGROTÓXICOS  | 14 |
| 2.2 – FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS   | 16 |
| 2.3 – METODOLOGIA ANALÍTICA  | 21 |
| 2.3.1 – Métodos Espectrofotométricos   | 23 |
| 2.3.2 – Cromatografia a Gás  | 24 |
| 2.3.3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                             | 27 |
| 2.4 – MATRIZES REPRESENTATIVAS   | 30 |
| 2.4.1 – Tomate   | 31 |
| 2.5 – EFEITO DAS MATRIZES  | 32 |
| 2.6 – VALIDAÇÃO  | 33 |
| 3 – MATERIAL E MÉTODOS   | 39 |
| 3.1 – AMOSTRAS DE TOMATE: MATRIZ ESCOLHIDA                                   | 39 |
| 3.2 – REAGENTES, SOLUÇÕES, PADRÕES E EQUIPAMENTOS                            | 39 |
| 3.3 – MÉTODOS  | 40 |
| 3.4 – PADRÕES: TIRAM E DISSULFETO DE CARBONO                                 | 41 |
| 3.4.1 – Tiram  | 41 |
| 3.4.2 – Dissulfeto de Carbono (CS <sub>2</sub> )                             | 42 |
| 3.5 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E VALIDAÇÃO                                  | 43 |
| 3.5.1 – Linearidade  | 43 |
| 3.5.2 – Efeito do dia  | 45 |
| 3.5.3 – Efeitos de matriz  | 47 |
| 3.5.4 – Seletividade, Inexatidão e Precisão                                  | 48 |
| 3.5.5 – Limites de Detecção, Quantificação, Decisão e Capacidade de Detecção | 50 |
| 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 51 |
| 4.1 – AMOSTRAS DE TOMATE   | 51 |
| 4.2 – PADRÕES  | 53 |
| 4.3 – LINEARIDADE E FAIXA DE CONCENTRAÇÃO                                    | 55 |
| 4.4 – EFEITO DO DIA  | 63 |
| 4.5 – EFEITO DE MATRIZ   | 66 |
| 4.6 – SELETIVIDADE   | 68 |
| 4.7 – INEXATIDÃO E PRECISÃO  | 69 |
| 4.8 – LIMITES DE DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO, DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO   | 71 |
| 5 – CONCLUSÕES   | 72 |
| 6 – SUGESTÕES  | 72 |
| 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 73 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1. Estrutura dos ditiocarbamatos de uso autorizado no Brasil .....  | 18 |
| TABELA 2. Relação das culturas associadas aos LMR e a cada ingrediente ativo de uso autorizado no Brasil .....                           | 19 |
| TABELA 3. Perfil da produção de tomate no Brasil e em Minas Gerais, nos anos de 2008 e 2009.....   | 32 |
| TABELA 4. Delineamento para a linearidade. ....  | 44 |
| TABELA 5. Delineamento para o efeito do dia. ....  | 47 |
| TABELA 6. Delineamento para o efeito matriz. ....  | 48 |
| TABELA 7: Delineamento para avaliação da recuperação e precisão em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.....          | 49 |
| TABELA 8. Estatística descritiva dos resultados das amostras brancas de 2007 e 2008. ....  | 52 |
| TABELA 9. Estatística descritiva dos resultados das amostras utilizadas como brancos para a validação. ....                              | 52 |
| TABELA 10. Absorbâncias das replicatas das soluções e a estatística descritiva. ....   | 54 |
| TABELA 11. Estatística descritiva das soluções intermediárias em 2007 e 2008. ....   | 54 |
| TABELA 12. Resultados da avaliação da linearidade para as quatro curvas de calibração em solvente, já excluídos os outliers. ....        | 57 |
| TABELA 13. Comparações das inclinações e interseções obtidas em diferentes dias. ....  | 63 |
| TABELA 14. Comparações entre as inclinações e interseções das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz.....               | 67 |
| TABELA 15. Resultados das premissas relativas à recuperação em 3 níveis e conclusão dos testes para inexatidão e precisão do método..... | 69 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Reação do CS <sub>2</sub> com a amina (dietanolamina) e com o cobre (acetato de cobre (II) monohidratado) proposta por CULLEN (1964). .....  | 24 |
| Figura 2 – Faixas de concentração em µg mL <sup>-1</sup> das curvas de calibração preparadas nos dias 1, 2, 3 e 4. ....   | 55 |
| Figura 3 – Avaliação da normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner das quatro curvas em solvente. ....  | 58 |
| Figura 4 – Avaliação de autocorrelação dos resíduos pelo teste Durbin-Watson das curvas em solvente. ....   | 59 |
| Figura 5– Avaliação da homogeneidade da variância pelo teste de Levene modificado das quatro curvas em solvente. ....   | 60 |
| Figura 6– Curvas de regressão linear dos quatros dias em solvente. ....   | 61 |
| Figura 7 – Gráficos dos resíduos da regressão (e <sub>i</sub> ) das quatro curvas em solventes com destaque para os <i>outliers</i> diagnosticados e retirados pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife. .... | 62 |
| Figura 8 – Cartas controle para inclinação (b) das curvas de calibração referentes aos anos de 2007 e 2008. ....  | 64 |
| Figura 9 – Cartas controle para interseção (a) das curvas de calibração de 2007 e 2008. ....  | 65 |
| Figura 10 - Gráfico final das curvas de calibração preparadas em solvente e matriz. ...   | 68 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE: Comunidade Europeia

CG: Cromatógrafo à gás

CS<sub>2</sub>: dissulfeto de carbono

DCE: detector de captura de elétrons

DFCP: Detector fotométrico de chama pulsado

DTC: ditiocarbamato

EBDC: etilenobisditiocarbamato

EM: Espectrômetro de massas

ETU: Etilenodiuréia

FDA: Food and Drugs Administration

IDA: Ingestão diária aceitável

LMR: Limite máximo de resíduo

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

p.c.: peso corpóreo

PARA: Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos

PTU: Propilenotiuréia

## RESUMO

Para determinação de resíduos de fungicidas ditiocarbamatos em tomate foi realizada a validação intralaboratorial do método espectrofotométrico utilizando o sistema de reação vertical para dissulfeto de carbono, atendendo os requisitos exigidos pela ABNT NBR ISO/IEC 17025 e a legislação brasileira vigente. Foram realizados ensaios com curvas de calibração em solventes e em matriz, em amostras brancas e em amostras adicionadas de padrão. As premissas relacionadas às estatísticas empregadas foram avaliadas e confirmadas. Nos estudos realizados, a linearidade do método foi demonstrada na faixa de 0,62 a 5,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com confirmação do efeito do dia e ausência do efeito de matriz. O limite de detecção foi de 0,15  $\text{mg kg}^{-1}$  e o limite de quantificação de 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$ . Para o limite de quantificação a média de recuperação foi de 115,2 %, confirmando a não inexatidão. Neste nível, o método apresentou precisão aceitável, com desvios padrão relativos de 11,82%, sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial. Foram determinados o limite de decisão de 2,4  $\text{mg kg}^{-1}$  e a capacidade de detecção de 3,0  $\text{mg kg}^{-1}$ . Os resultados obtidos confirmaram que o método espectrofotométrico para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em tomate atende os requisitos exigidos.

palavras chave: ditiocarbamatos, validação, espectrofotometria, dissulfeto de carbono.

## ABSTRACT

Single-laboratory validation of a spectrophotometric method using the system of vertical reaction for carbon disulfide for determination of fungicides dithiocarbamate residues in tomato, according to ISO/IEC 17025 requirements and the Brazilian legislation was accomplished. Experiments with solvent and matrix-matched calibration curves, blanks and spiked samples were performed. The assumptions related to the employed statistics were appraised and confirmed. The method linearity was obtained between 0.62 to 5.26 mg mL<sup>-1</sup>, with confirmation of the effect of the day and absence of matrix effects. The detection limit was 0.15 mg kg<sup>-1</sup> and the limit of quantification 0.5 mg kg<sup>-1</sup>. On the quantification limit, the recovery average was 115.2%, confirming the trueness. In this level the method presented acceptable precision, with relative standard deviations of 11.82% under repeatability and partial reproducibility conditions. The limit of decision was 2.4 mg kg<sup>-1</sup> and the capacity of detection was 3.0 mg kg<sup>-1</sup>. The results by spectrophotometric method for determination of dithiocarbamate residues in tomato confirmed the fitness to purpose.

Keywords: dithiocarbamate, in-house validation, spectrophotometry, carbon disulfide.

# 1 – INTRODUÇÃO

Há mais de 2 mil anos os agricultores utilizam substâncias que previnem os danos causados por pragas, relatos indicam que o enxofre foi um dos primeiros recursos utilizados. No século XV foram incorporados ao combate às pragas substâncias tóxicas como arsênio, mercúrio e chumbo. Já no século XVII, o sulfato de nicotina, extraído das folhas de tabaco, passou a ser adotada como arma contra insetos (ANVISA, 2006).

A necessidade do aumento da produção de alimentos em todo mundo, devido ao aumento da população mundial implicou em inovações tecnológicas, que permitiram a introdução na agricultura de substâncias químicas mais eficazes, os agrotóxicos (ANVISA, 2006).

No Brasil, o uso de agrotóxicos industrializados foi incorporado na década de 50, sendo o diclorodifeniltricloroetano (DDT) uma das primeiras substâncias utilizadas nas lavouras (ANVISA, 2006).

Na década de 60 até início da década de 90, as vendas chegaram a 950 milhões de dólares e o consumo de agrotóxicos aumentou 276,2% neste período, enquanto as áreas ocupadas por lavoura cresceram apenas 76%. Este fato colocou o Brasil como o quarto maior consumidor de agrotóxicos no mundo, mas também sinalizou o aumento dos riscos de danos ao meio ambiente e à saúde humana (CAMPANHOLA et al., 2001).

Os riscos para o meio ambiente são principalmente devido à presença de resíduos de agrotóxicos em todo ecossistema. O solo é o reservatório final para muitos agrotóxicos e representa uma fonte constante de resíduos que podem ser liberados para a atmosfera, águas subterrâneas e organismos vivos. Estes resíduos são encontrados tanto em matrizes ambientais quanto em alimentos, que muitas vezes são consumidos *in natura* pela população (LUCHINI et al., 2001).

O consumo de alimentos é apenas uma forma de exposição a qual a população está sujeita. A exposição também ocorre pelo contato direto dos aplicadores rurais e ou manipuladores, e pelo contato indireto das populações residentes em áreas endêmicas quando há aplicação de agrotóxicos para controle de vetores de endemias (MACHADO, 2004).

No Brasil há uma preocupação constante dos órgãos reguladores quanto ao uso de agrotóxicos. O monitoramento e a avaliação dos níveis residuais de agrotóxicos presentes nos alimentos, identificando os resultados que indiquem a presença de resíduos em quantidades superiores ao Limites Máximo de Resíduos (LMR) e o uso de agrotóxicos não autorizados para determinadas culturas, evidencia a ausência de boas práticas agrícolas e o uso abusivo (ANVISA, 2007a).

Por estes motivos, é necessário, a realização de programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos, para que ações de vigilância sejam realizadas com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana e ao meio ambiente (CAMPANHOLA et al., 2001; ANVISA, 2007a).

Numerosos programas de análises de resíduos têm sido implantados pelo mundo. Nos Estados Unidos, existem os programas do USDA (2007), da NFPA e do FDA (1999). Na Europa, existe um programa comum de monitoramento de resíduos de agrotóxicos realizado pelos países membros da União Européia, porém cada país possui o seu órgão responsável e programas de monitoramento específicos. No Brasil, para realizar o monitoramento de resíduos foi criado o Programa Análises de Resíduos de Agrotóxico em Alimentos (PARA) realizado pela ANVISA e o Programa Nacional de Controle de Resíduos (PNCR) realizado pelo MAPA (STOPPELLI et al., 2005; ANVISA, 2007a; BRASIL; 2009).

Nos monitoramentos realizados pelo PARA os fungicidas ditiocarbamatos são encontrados com freqüência (ANVISA, 2007d), pois são largamente empregados na agricultura devido ao seu baixo custo, amplo espectro de ação, baixa toxicidade aguda e baixa persistência no meio ambiente (PEREIRA, 1988).

O grupo dos ditiocarbamatos pode ser definido como o grupo dos dimetilditiocarbamatos (DTC) e dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC), sendo que apesar de todos liberarem  $CS_2$ , após hidrólise, os EBDC oferecem maior preocupação porque podem se decompor em etilenotiouréia e propilenotiouréia, ambos metabólitos associados ao surgimento de câncer na tiróide, além de provocar mutações e ter efeitos teratogênicos (LEME, 2003).

A legislação brasileira em vigor determina que a quantidade de resíduos de ditiocarbamatos encontrada deve ser expressa em função da quantidade de  $CS_2$  produzido em miligramas por quilo de cultura, sem especificar qual o ditiocarbamato responsável pelo  $CS_2$  gerado (ANVISA, 2007b).

Para realizar análises desta importância, é imprescindível que o laboratório disponha de metodologias analíticas inseridas em um sistema de gestão da qualidade e que atendam a legislação vigente; apresentando evidências objetivas que comprovem que os parâmetros que indicam a adequação ao uso pretendido estão sendo atendidos (ISO/IEC 17025, 2005).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é validar uma metodologia para a determinação de fungicidas ditiocarbamatos com quantificação de CS<sub>2</sub> por espectrofotometria em acordo com os requisitos exigidos pela legislação vigente e a Norma ISO/IEC 17025.

## **2 – REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 – AGROTÓXICOS**

No Brasil é a Lei N° 7802 de 11 de julho de 1989, que define toda atividade relacionada aos agrotóxicos, estabelecendo os conceitos sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e seus componentes e afins (BRASIL, 1989).

Já o Decreto N° 4074, de 04 de janeiro de 2002 vem regulamentar esta lei e define como agrotóxicos e afins, os produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e



produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002b).

Para regular este setor, o capítulo II do Decreto Nº 4074, de 04 de janeiro de 2002 estabelece os órgãos responsáveis e suas competências. Compete ao MAPA realizar avaliação da eficácia agronômica dos agrotóxicos (produtos formulados); ao Ministério da Saúde executar a avaliação e classificação toxicológica; e ao Ministério do Meio Ambiente, por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental (BRASIL, 2002b).

Em 2001 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária instituiu o Programa de Análise de Agrotóxico em Alimentos (PARA). O PARA é o programa brasileiro para monitorar resíduos de agrotóxicos em alimentos, visando à criação de ações de vigilância sanitária, com foco na prevenção e controle dos riscos à saúde humana decorrentes do consumo de alimentos contaminados. Os dados obtidos têm possibilitado avaliar a qualidade e a segurança dos alimentos consumidos pela população, caracterizar as fontes de contaminação, proporcionar uma avaliação quanto ao uso inadequado e não autorizado de agrotóxicos, estimular a adoção de Boas Práticas Agrícolas (BPA), além de fornecer subsídios para a reavaliação dos estudos de resíduos para fins de registro de agrotóxicos no Brasil (ANVISA, 2007e).

O MAPA também possui um programa de monitoramento denominado Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal, regulamentada pela Instrução Normativa Nº 42, de 31 de dezembro de 2008. O objetivo do programa é monitorar não apenas a presença de resíduos de agrotóxicos, mas também de outros contaminantes em diferentes culturas. O PNCRC avalia os produtos vegetais quanto à presença de contaminantes microbiológicos, como a salmonela na pimenta-do-reino, e quanto aos níveis de aflatoxinas no arroz, castanha-do-brasil e milho, além de outros contaminantes nocivos ao consumo humano (BRASIL, 2009).

A preocupação dos órgãos responsáveis é justificada pela dimensão do mercado de agrotóxicos no Brasil. No período de 1964 a 1991, o consumo de agrotóxicos no Brasil aumentou de 16 mil toneladas para 60,2 mil toneladas, um crescimento de 276,2%, enquanto as áreas ocupadas por lavoura cresceram de 28,4 milhões de hectares para 50,0 milhões no mesmo período, um crescimento de apenas 76%. (CAMPANHOLA et al., 2001).

Segundo dados fornecidos pela Associação Brasileira da Indústria Química, as vendas de defensivos agrícolas no Brasil em 1992 foram de 950 milhões de dólares passando para 4,2 bilhões de dólares em 2005, neste contexto considerando o consumo em dez países que representam 70% do mercado mundial de agrotóxicos, o Brasil aparece em 4º lugar (SINDAG, 2007).

## **2.2 – FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS**

Conhecidos também como Alquilenois, os ditiocarbamatos são derivados do ácido carbâmico, que existem sob a forma de um pó branco ou amarelo-claro, de baixa toxicidade aguda, baixa volatilidade e solubilidade em solventes orgânicos. O grupo pode ser dividido em DTC cujos representantes são o ferbam, metam, tiram e ziram, e os EBDC representados pelo maneb, mancozeb, metiram, propinebe e zineb. (SEIZIOGA, 2003). A TABELA 1 apresenta as estruturas químicas dos ditiocarbamatos de uso autorizado no Brasil.

Os ditiocarbamatos são usados contra várias fitopatologias, com uso expressivo na agricultura brasileira, nas mais diversas culturas, como hortaliças, frutas e leguminosas. Estes fungicidas são indicados para o uso contra doenças de folhagem, no tratamento de sementes e bulbos, contra patógenos de solo e de madeira, apresentando também uma ação de repelência contra insetos (ANVISA, 2007c).

Tais fungicidas podem ser absorvidos pelas vias oral, dérmica e respiratória, apresentando dermatite de contato ou uma sensibilidade ocasional, mas não há registros de casos sistêmicos, devido à baixa absorção. Os sinais clínicos por ingestão de grandes doses são náuseas, vômitos, dores abdominais, alteração nas provas de função hepática e insuficiência renal (SEIZIOGA, 2003; ANVISA, 2007a).

Quando ocorre exposição intensa por via respiratória, o paciente pode apresentar rinite, faringite, bronquite, cefaléia, confusão mental e problemas neurológicos. Também há evidências de síndrome parkinsoniana devido à intoxicação por manganês presente nas moléculas de maneb e mancozeb, e efeito antabuse na exposição ao tiram. Em casos de intoxicação, não há antídoto, por não serem inibidores de colinesterase como a maioria dos agrotóxicos e sim inibidores de enzimas essenciais das células fúngicas, assim o uso de atropina é contra indicado. Não é

recomendado provocar vômitos, mas pode-se administrar EDTA cálcio-sódico para acelerar a eliminação do manganês (SEIZIOGA, 2003; ANVISA, 2007a).

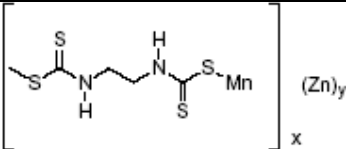
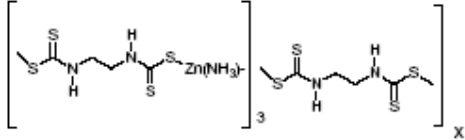
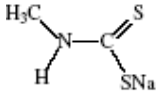
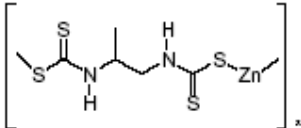
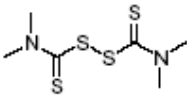
Apesar de todos compostos liberarem  $CS_2$ , os EBDC ainda oferecem o risco de se decomporem em etilenotiouréia e propilenotiouréia, ambos metabólitos associados ao surgimento de câncer na tiróide, além de serem suspeitos de provocar mutações e terem efeitos teratogênicos (LEME, 2003).

O tiram (tetrametiltiuram) é dos principais fungicidas deste grupo; foi introduzido em 1934 e é recomendado até hoje como protetor de partes aéreas e, principalmente, de sementes. É recomendado, também como repelente de pássaros. O mancozeb (etilenobisditiocarbamato de manganês e zinco) é uma mistura contendo 20% de manganês e 2,5% de zinco. O espectro antifúngico e demais propriedades são muito semelhantes aos do maneb, porém a presença do zinco diminui a fitotoxicidade. Introduzido em 1961, é indicado no controle de doenças de hortaliças e frutíferas em geral e no controle do ácaro da falsa ferrugem dos citrus. Apresenta efeito tônico em muitas culturas como, por exemplo, alho e cebola, aumentando substancialmente a produção, mesmo na ausência de doenças (SANTOS 2007).

A IDA (ingestão diária aceitável) para o tiram é de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$ , para o propinebe é de  $0,005 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$  e para os demais autorizados, mancozeb, metiram e metam sódico é de  $0,03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$  (ANVISA, 2007b).

Segundo CALDAS et al. (2004) no trabalho no qual a presença de resíduos de ditiocarbamatos em alimentos e os riscos potenciais da população brasileira são avaliados, a ingestão crônica de alimentos contendo resíduos de ditiocarbamatos no Brasil não excede a IDA estabelecida, exceto para o metam sódico. No entanto, os dados de ingestão foram superestimados, uma vez que não foi levado em consideração o processamento dos alimentos, como cozimento ou a retirada das cascas e sementes, e os possíveis falsos positivos.

TABELA 1. Estrutura dos ditiocarbamatos de uso autorizado no Brasil

| Ditiocarbamato                         | Estrutura   | Grupo Químico                 |
|--|---|-------------------------------|
| Mancozeb<br>(2,5% zinco +20% manganês) |    | Etileno bis ditiocarbamato    |
| Metiram                                |   | Etileno bis ditiocarbamato    |
| Metam sódico                           |    | Metil ditiocarbamato de sódio |
| Propinebe                              |    | Propileno bis ditiocarbamato  |
| Tiram                                  |  | Dimetil ditiocarbamato        |

Fonte: ANVISA (2007b)

Os LMRs, no Brasil, variam de 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> para culturas de alho até 3,0 mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> para culturas de uva, arroz e pimentão (ANVISA, 2007b). Conforme a cultura, os ditiocarbamatos, quando autorizados, são determinados quanto ao tipo, o LMR e o intervalo para a colheita. Na TABELA 2 encontram-se a relação da cultura, o LMR e o respectivo ingrediente ativo autorizado (ANVISA, 2007b).

TABELA 2. Relação das culturas associadas aos LMR e a cada ingrediente ativo de uso autorizado no Brasil

| Culturas     | LMR CS <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) | Ingrediente ativo          |
|--------------|--|----------------------------|
| Abacate      | 1,0  | Mancozebe                  |
| Abóbora      | 1,0  | Mancozebe                  |
| Algodão      | 1,0  | Metiram                    |
| Alho         | 0,1  | Mancozebe                  |
| Amendoim     | 0,3  | Tiram                      |
| Arroz        | 3,0  | Mancozebe                  |
| Aveia        | 0,3  | Tiram                      |
| Banana       | 1,0  | Mancozebe                  |
| Batata       | 1,0  | Tiram                      |
| Berinjela    | 0,5  | Mancozebe                  |
| Beterraba    | 0,3  | Mancozebe                  |
| Brócolis     | 0,5  | Mancozebe                  |
| Café         | 0,3  | Mancozebe                  |
| Cebola       | 1,0  | Metiram                    |
| Cenoura      | 0,3  | Mancozebe                  |
| Cevada       | 1,0  | Mancozebe                  |
| Citros       | 2,0  | Mancozebe                  |
| Couve        | 1,0  | Mancozebe                  |
| Couve-flor   | 0,5  | Mancozebe                  |
| Cravo        | UNA  | Mancozebe                  |
| Crisântemo   | UNA  | Mancozebe Metam            |
| Dália        | UNA  | Mancozebe                  |
| Ervilha      | 0,3  | Mancozebe Tiram            |
| Feijão       | 0,3  | Mancozebe Tiram            |
| Feijão-Vagem | 0,3  | Mancozebe                  |
| Fumo         | UNA  | Mancozebe, Metam Propinebe |
| Figo         | 2,0  | Mancozebe                  |
| Gadíolo      | UNA  | Mancozebe                  |
| Hortênsia    | UNA  | Mancozebe                  |
| Maçã         | 2,0  | Metiram Mancozebe          |
| Mamão        | 3,0  | Mancozebe                  |
| Manga        | 1,0  | Mancozebe                  |
| Melancia     | 0,3  | Mancozebe                  |
| Melão        | 1,0  | Mancozebe                  |

(continua)

TABELA 2: Relação das culturas associadas aos LMR e a cada ingrediente ativo de uso autorizado no Brasil (Continuação)

| Culturas    | LMR CS <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) | Ingrediente ativo |
|-------------|--|-------------------|
| Milho       | 0,3  | Tiram             |
| Morango     | 0,2  | Metam             |
| Orquídeas   | UNA  | Mancozebe         |
| Pastagens   | 1,0  | Tiram             |
| Pepino      | 0,3  | Mancozebe         |
| Pêra        | 3,0  | Mancozebe         |
| Pêssego     | 2,0  | Mancozebe         |
| Pimentão    | 3,0  | Metiram           |
| Repolho     | 1,0  | Mancozebe         |
| Rosa        | UNA  | Mancozebe Metiram |
| Seringueira | UNA  | Mancozebe         |
| Soja        | 0,3  | Tiram             |
| Sorgo       | 0,3  | Tiram             |
| Tomate      | 2,0  | Mancozebe         |
| Trigo       | 1,0  | Mancozebe         |
| Uva         | 3,0  | Mancozebe         |

UNA: uso não autorizado; LMR: limite máximo de resíduo

Fonte: ANVISA (2007b)

A União Européia pela DIRECTIVA 2007/57/CE de 17 de setembro de 2007, estabelece os LMR para várias culturas, que variam de 0,05 mg kg<sup>-1</sup> a 25 mg kg<sup>-1</sup> (lúpulo em pó). Apesar de estabelecê-los em mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub>, a distinção entre os ditiocarbamatos responsáveis pelo resíduo não é possível pelos métodos usuais. Assim quando o CS<sub>2</sub> é encontrado, em casos específicos, a Comunidade Européia determina o uso de métodos capazes de identificar o ditiocarbamato responsável, expressando o resultado de acordo com o fungicida encontrado. No caso do propineb o resultado é expresso mg kg<sup>-1</sup> de propilenodiamina, e para o tiram e o ziram o resultado é expresso em mg kg<sup>-1</sup> de tiram e de ziram, respectivamente (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Entre os grupos de agrotóxicos monitorados pelo PARA o grupo dos fungicidas ditiocarbamatos é freqüentemente encontrado e são constantemente reavaliados. Maneb, zineb e ziram já foram autorizados, porém hoje após reavaliações não são mais autorizados, tendo sido retirados do mercado. Outros representantes, como o ferbam, não estão no mercado brasileiro (ANVISA, 2007d). Dos representantes

autorizados no país, apenas o tiram é classificado como altamente tóxico (classe II), sendo os demais considerados moderadamente tóxicos (classe III) (BRASIL, 2002a).

Para o estado de Minas Gerais, o Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) realiza anualmente o monitoramento em amostras de água, alface, banana, batata, cenoura, chuchu, jiló, morango, pepino, pimentão e tomate, coletados em todo estado. O laboratório é referência em análises de resíduos de agrotóxicos no país, seus dados obtidos pelo monitoramento evidenciaram que em 2005 das 347 amostras analisadas, 113 foram tomates, dos quais 73 (64,6%) foram detectados resíduos de ditiocarbamatos; em 2006, foram 359 amostras analisadas, 120 tomates e 40 (33,3%) detectadas; em 2007, das 296 amostras, 65 foram tomate e 13 (20,0%) detectadas, em 2008 foram 247 amostras, 49 tomates sendo 10 (20,4%) detectadas e em 2009 foram 395 amostras, 151 tomates, sendo 40 (26,5%) detectados com resíduos de ditiocarbamatos.

## **2.3 – METODOLOGIA ANALÍTICA**

A primeira revisão de métodos de análises para ditiocarbamatos ocorreu em 1973, desde então já ocorreram revisões de análises de ditiocarbamatos que abordaram métodos por eletroforese capilar e fotometria direta, métodos polarográficos e cromatográficos, métodos colorimétricos de análise direta e por degradação no caso do tiram, alguns tiveram impacto significativo na rotina de análises de ditiocarbamatos outros não tiveram o mesmo êxito (CRNOGORAC et al., 2009).

Para a determinação de ditiocarbamatos em frutas e vegetais o método comumente utilizado baseia-se na hidrólise ácida de ditiocarbamatos liberando CS<sub>2</sub>, seguido de complexação com dietanolamina e Cobre (II), seguida por determinação em espectrofotometria na região do visível a 435 nm (KEPPEL, 1971).

O método espectrofotométrico é recomendado pelo CODEX (2003) e pela União Européia, porém não é um método específico, uma vez que não é possível determinar qual fungicida foi usado, assim os limites máximos de resíduos (LMR) são baseados na quantidade total de CS<sub>2</sub> atribuído a contribuição de um ou mais membros do grupo (CODEX, 2003; EUROPEAN COMMISSION, 2007).

ARAÚJO et al. (2004) realizaram um estudo comparativo entre o método espectrofotométrico de KEPPEL (1971) e a cromatografia a gás com detector fotométrico de chama (DFC) operando com filtro de enxofre e concluíram que além dos limites de quantificação serem satisfatórios, a cromatografia apresentou vantagens, pois permitiu a análise de maior número de amostras e gerou menos resíduos de solventes.

SILVA (2005) empregando GC-DFC, GC com detector de captura de elétrons (DCE), GC-EM e espectrofotometria para determinação de ditiocarbamatos em alface comparou os métodos, encontrando limites de detecção para CS<sub>2</sub> de 0,01 e 0,28 mg kg<sup>-1</sup>, e os limites de quantificação de 0,02 e 0,4 mg kg<sup>-1</sup> para os métodos cromatográficos e espectrofotométrico, respectivamente. Concluiu que ambos são apropriados para determinação de resíduos de ditiocarbamatos em alface.

PIZZUTTI et al. (2007) validaram e compararam dois métodos para a determinação de ditiocarbamatos em soja, quantificando o CS<sub>2</sub> obtido por hidrólise utilizando CG - DFCP e CG acoplado ao espectrômetro de massas (EM). O limite de detecção para CS<sub>2</sub> foi de 0,02 mg kg<sup>-1</sup> e o limite de quantificação foi de 0,05 para ambos os métodos. Eles concluíram que ambos métodos são apropriados para determinação de ditiocarbamatos em matrizes complexas, como a soja.

No Brasil os laboratórios que participam do PARA utilizam tanto métodos espectrofotométricos como KEPPEL (1971) e CALDAS (2001), quanto cromatográficos com detecção por EM, ECD e FPD (ANVISA, 2007d).

A necessidade de um método mais específico tem levado os pesquisadores a buscar alternativas para a determinação e identificação destes compostos separadamente, e suas respectivas contribuições na quantidade de CS<sub>2</sub> e metabólicos tóxicos (GARCINUÑO et al., 2004).

Novas técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas somado ao desenvolvimento de novos materiais para colunas cromatográficas permitirão a separação e a determinação direta do resíduo de ditiocarbamato presente na amostra (CRNOGORAC et al., 2009).



### 2.3.1 – Métodos Espectrofotométricos

Apesar das vantagens da cromatografia, a espectrofotometria continua sendo utilizada por ser um método de baixo custo e com resultados satisfatórios para os atuais limites estabelecidos pela legislação brasileira (CALDAS et al., 2004).

Por ser simples e de baixo custo, o método inicialmente proposto por CULLEN (1964), apresentava interferentes que influenciavam no resultado. KEPPEL (1969) apresentou um sistema aperfeiçoado que continua sendo usado nos dias atuais. O método é baseado na determinação espectrofotométrica do complexo cúprico formado pelo CS<sub>2</sub> liberado após a decomposição do ditiocarbamato em meio ácido na presença de cloreto estânico. As substâncias voláteis passam por dois sistemas de reação para remover os interferentes e captar o CS<sub>2</sub>. O CS<sub>2</sub> reage com a amina (dietanolamina) e com o cobre (acetato de cobre (II) monoidratado) formando um complexo cromóforo capaz de absorver energia no comprimento de onda máximo de 435 nm (Figura 1). Este sistema pode ser horizontal, baseado na técnica de KEPPEL (1969), ou vertical proposto por CALDAS et al. (2001), sendo 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> o limite de quantificação.

No relatório de métodos recomendados para análises de resíduos de pesticidas do CODEX (2003), o método proposto por KEPPEL (1971) é recomendado. Porém por este método não é possível a identificação do ditiocarbamato encontrado. Para determinar especificamente o ditiocarbamato usado, as alternativas como a pesquisa de metabólitos como etilenotiouréia ou métodos específicos apenas para um tipo de ditiocarbamato e sua estrutura foram propostos (PEASE, 1977).

MATHEW et al. (1995) propuseram um método para a identificação do ziram. O método baseia na digestão ácida da amostra, seguida da dissociação do complexo de zinco na presença de tiocianato de potássio e rodamina (6G), que em pH 4,0 forma um complexo rosa que é estabilizado por gelatina e mensurado a 570 nm. O método é livre de interferentes como Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup>, não necessitando a remoção de H<sub>2</sub>S.

KESARI (1998) sugeriu um método para a determinação de tiram, ziram e zineb, no qual, após a hidrólise ácida, o CS<sub>2</sub> liberado reage com uma solução de NaOH em metanol formando uma xantana, que após tratamento com iodeto de potássio e N-clorosuccinimida libera iodo (I<sub>2</sub>), formando um cristal violeta pela oxidação de um leucocristal que absorve em 595 nm. O método é específico para estes fungicidas.

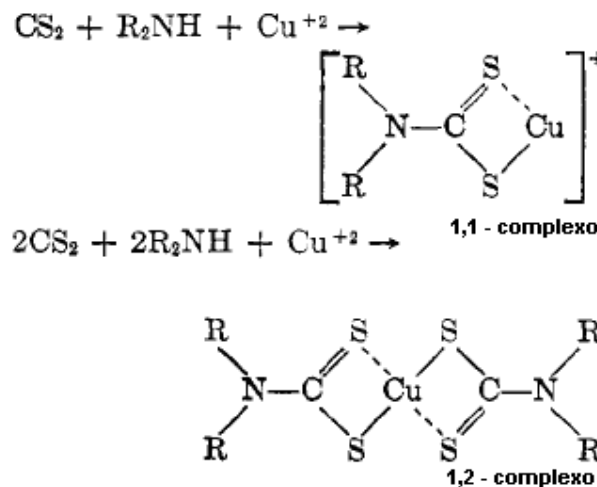


Figura 1 – Reação do CS<sub>2</sub> com a amina (dietanolamina) e com o cobre (acetato de cobre (II) monoidratado) proposta por CULLEN (1964).

A determinação de ferbam proposta por MALIK (2000) é uma conversão da molécula de ferro III para ferro II, um complexo de batofenantrolina, que é então dissolvido em acetona:água (1:1, v/v) e medida a absorbância a 534 nm. Este método permite determinar o ferbam em mistura com outros ditiocarbamato

O ziram pode ser determinado pelo método proposto por SHARMA (2004), através da formação de um complexo verde com molibdato de sódio, que é extraído com solventes orgânicos sendo então analisado por espectrofotometria a 360 nm.

Os métodos espectrofotométricos são usados na rotina dos laboratórios devido ao baixo custo e simplicidade, porém a baixa especificidade, o baixo poder de detecção e a presença de interferentes que podem apresentar falsos positivos são fatores limitantes. (CALDAS et al., 2001; GARCINUÑO, 2004).

### 2.3.2 – Cromatografia a Gás

CG é uma técnica de grande resolução e sensibilidade, na qual os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro de uma coluna. Para determinação de ditiocarbamatos várias técnicas foram propostas,

desde o uso de colunas recheadas, capilares e megabore ao uso de detectores universais, seletivos como DCE até os mais sensíveis como o EM (SKOOG et al., 2006).

Há métodos para determinação de ditiocarbamatos para matrizes ambientais como água e ar (WOODROW & SEIBER, 1995, KAZOS, 2007) porém a aplicação destes métodos para amostras de vegetais deve ser validado (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Recomendado para análises de ditiocarbamato pelo CODEX (2003), o método desenvolvido por NEWSOME (1974) propõe a determinação de etilenodiamina resultante da hidrólise do ditiocarbamato, por CG, usando uma coluna recheada e DCE. Primeiramente, a amostra sofre uma hidrólise ácida na presença de cloreto estanoso, sob calor e refluxo. Depois ela é resfriada, e em seguida, filtrada. O filtrado é então transferido para uma coluna com uma resina catiônica previamente tratada com solução de NaOH. A etilenodiamina presente na amostra é adsorvida pela resina, sendo depois lavada com uma solução de NaCl e eluída com uma solução de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ). Uma alíquota é transferida para um frasco, no qual a etilenodiamina presente sofrerá uma trifluoracetilação. O composto formado é eluído com benzeno e injetado no cromatógrafo.

A coluna de vidro de 180 cm com diâmetro interno de 4 mm, recheada com 5% de butanodiol succinato em Chromosorb W de 100 a 120 mesh, é condicionada por 48 horas a 190°C. As condições cromatográficas são: injetor a 190°C; coluna a 180°C; fluxo de nitrogênio a 90 mL min<sup>-1</sup>. O método é específico para EBDC.

FRIEDERICH (1995) desenvolveu para um fabricante de equipamentos um método baseado em extração, seguida de injeção por *headspace* em um cromatógrafo a gás com detector fotométrico de chama.

O *headspace* é uma técnica de injeção onde a amostra é contida em um frasco fechado com uma solução ou solvente puro, sob aquecimento. Com aquecimento os componentes voláteis serão transferidos para a fase gasosa dentro do frasco, sendo esta fase gasosa coletada pela injeção (SKOOG et al., 2006).

No caso do ditiocarbamato, uma solução acidificada de cloreto estanoso junto com a amostra é aquecida, liberando CS<sub>2</sub> para a fase gasosa que é coletada e injetada. As condições para o *headspace* são: 80°C de temperatura de condicionamento por 60 minutos; temperatura de injeção de 220°C; temperatura do forno de 80°C, constante; volume de injeção de 0,8 mL em *split*; detector a 280°C; hélio

como gás de arraste e uma coluna capilar CB-OV-1701 de 25 m, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,5 micrometros. Nestas condições os pesquisadores conseguiram detectar 0,04 mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub> (com padrão de zineb). Este método também é universal, não diferenciando o ditio-carbamato presente, porém o processo de extração do analito requer menor número de etapas, otimizando o processo. A perda por vazamento, que pode ocorrer no sistema tradicional é amenizado pelo *headspace*, a técnica exige maior número de equipamentos e maior habilidade do analista (FRIEDERICH, 1995).

Outro método utilizando *headspace* foi proposto por ROYER (2001) comparando duas técnicas de *headspace*: manual e automática. Para técnica manual 20 g de amostra, 56 mL de solução ácida de cloreto estanoso e 37,5 mL de dietanolamina são colocados em um frasco fechado, que é aquecido e mantido em banho maria a 90°C por 1 h com agitação manual. Com uma seringa aquecida a 50°C a amostra é coletada (200 µL) e injetada. Para a técnica automática, repete-se o procedimento utilizando 2 g de amostra, 6 mL de solução ácida de cloreto estanoso e mais 4 mL de dietanolamina, com tempo de reação de 30 minutos, temperatura de 90°C, agitação automática e injeção de 200 µL. O equipamento controla todo o processo. As condições cromatográficas de trabalho são: injetor a 200°C; detector de DCE a 300°C; uma coluna DB-WAX de 30 m, 0,53 mm de diâmetro interno com filme de 1 micrômetro de polietilenoglicol; e nitrogênio como gás de arraste, a 3 psi. A programação do forno foi 30°C por 7 minutos, seguida por 20°C por minuto até atingir 220°C por 7 minutos. As duas técnicas de *headspace* otimizaram a análise, mas a técnica utilizando injeção automática apresentou menor variação entre seus resultados. (ROYER, 2001)

VRYZAS (2002) propôs um método de extração de ditio-carbamatos por microondas no qual em um frasco adiciona-se amostra, solução ácida de cloreto estanoso e isooctano, sendo este frasco fechado, agitado e submetido ao microondas por 100°C entre 10 e 15 minutos. O frasco é resfriado a 40°C sob agitação, em seguida é retirado uma alíquota de 1 mL da fase orgânica (isooctano). Para este método utiliza-se um CG equipado com um detector fotométrico de chama operando no modo enxofre. A coluna utilizada foi do tipo megabore (coluna capilar com partículas maiores, que suportam quantidades maiores de amostra) de 0,53 mm de diâmetro interno e 10 m de comprimento (Poraplot Q - Chromopack BV) conectada a uma pré-coluna de sílica, o hélio foi o gás de arraste a 47 cm s<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi de 120°C e do detector 200°C. A injeção foi de 6 microlitros diretamente na coluna (*on-column*). O forno da coluna seguiu a seguinte programação: 40°C por 1 minuto, seguido por 100°C

a 7°C por minuto (mantido a 1 minuto), depois, com 30°C por minuto até 150°C, mantido por 2 minutos. O método foi validado para tabaco e pêssego, com um limite de detecção de 0,04 mg kg<sup>-1</sup> de CS<sub>2</sub>. O método é rápido, sensível e robusto, apresentando a vantagem da injeção direta e amostra solubilizada em isooctano, o que ameniza a perda de CS<sub>2</sub>, porém não é específico para diferenciar o ditiocarbamato usado.

DE KOK (2000 e 2002) para determinação de ditiocarbamatos em frutas, vegetais e cereais, utilizou os fundamentos deste processo de extração porém substituindo as microondas por banho maria a 80°C por 1 hora, seguida por detecção por CG-DCE.

O uso de GC-EM passou a ser uma boa alternativa, uma vez que o espectrômetro de massas permitiu maior sensibilidade. Em 1999, o Instituto de Agricultura da Eslováquia, implantou uma metodologia por CG-EM para a determinação de ditiocarbamatos em maçã, alface, batata, morango e tomate, sendo validado em 2006 para estas culturas. O método consiste na extração de 50 g de amostra, por 40 mL de isooctano e 100 mL de solução ácida de cloreto estano (II) em um frasco fechado. O frasco é colocado em banho maria de 80°C por 60 minutos, resfriada, e o sobrenadante é coletado e injetado no cromatógrafo. As condições foram: temperatura do injetor 250°C, *splitless*; coluna HP 5 MS, 30 m x 0,25 mm; filme 0,25 µm; gradiente de temperatura 50°C por 2,2 min, 35°C por minuto; de 50°C a 270°C, mantendo 270°C por 2 min, hélio como gás de arraste e fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 1 µL (CESNIK, 2006).

### 2.3.3 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais versátil das cromatografias. Nesta cromatografia a fase móvel é um solvente líquido, que contém a amostra na forma de uma mistura de solutos, passando por uma coluna (suporte sólido com fase estacionária). As condições cromatográficas permitem o equilíbrio do analito entre as duas fases, determinando sua separação (COLLINS, 1993).

Para análises de ditiocarbamatos foi possível o desenvolvimento de métodos capazes de diferenciá-los, além da possibilidade de se trabalhar com outras reações que não fossem baseadas na liberação de CS<sub>2</sub>, uma vez que os analitos ficam

dissolvidos em um líquido. Pode-se citar BRANDIMAGETETEROVÁ et al. (1986) que desenvolveram um método rápido e simples por CLAE, para milho, morango e tabaco; LISHAUT et al. (2000) que propuseram o uso de CLAE de fase reversa e par iônico com detecção por ultravioleta e detecção eletroquímica para determinação em frutas e vegetais e NAKAZAW et al. (2004) que propuseram um método por CLAE com par iônico e derivação para detecção por quimioluminescência.

GUSTAFSSON e THOMPSON (1981) desenvolveram um método para CLAE para a determinação de ditiocarbamatos em formulações por metilação com iodeto de metila. O método mostrou-se seletivo para alguns dos diferentes ditiocarbamatos, uma vez que cada composto forma um derivado que elui da coluna em tempos específicos. Por este método é possível determinar o propineb, entretanto não é possível a separação dos outros EBDC, pois formam o mesmo composto derivado.

O sistema possui um detector espectrofotométrico de UV, coluna de 250 x 4 mm de diâmetro interno Lichorspher 60 RP – B, operando nas seguintes condições cromatográficas: temperatura ambiente para a coluna; fase móvel composta por água:tetrahidrofurano (99,95:0,05 v/v); fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; comprimento de onda de 233 nm. O método não foi estendido a matrizes complexas, porém é um método pioneiro para a seletividade de ditiocarbamatos. Em 1983, GUSTAFSSON e THOMPSON aperfeiçoaram o método e estenderam a outras matrizes.

Este método foi utilizado por LO et al. (1996) para determinar os ditiocarbamatos existentes nas amostras, e para diferenciar o maneb, mancozebe e zineb (EBDCs) utilizaram a absorção atômica, baseando nas diferentes quantidades de zinco e manganês existentes em cada um.

Uma determinação rápida e sensível de tiram em frutas e vegetais por CLAE - UV foi proposta por EKROTH et al. (1998). O método baseou-se na extração com uma mistura de acetato de etila e ciclohexano, em um banho de ultrassom por 15 minutos, com separação através de uma coluna de fase normal, Apex II diol, 3 µm, 150 x 4,6 mm, e detecção por ultravioleta. A fase móvel usada foi (A) ciclohexano, (B) ciclohexano/2-propanol/metanol/1 gota (10 µL) de amônia 25% por 250 mL de solução (80:15:5:0.01, v/v/v/v), e (C) 2-propanol. O gradiente programado se iniciava com 95% de A e 5% de B, mudando para 54% de A, 20% de B, e 26% de C depois de 18 minutos. Com o volume de injeção de 15 µL, o tempo de retenção do tiram era de 10 min, a corrida de 40 min, em um fluxo de 0,65 mL min<sup>-1</sup>, e a detecção por UV no

comprimento de 225, 240, 283 e 300 nm. O método é específico, sensível e rápido, com limites de quantificação de 0,1 a 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de tiram.

Utilizando um cromatógrafo líquido e detector de arranjo de diodo (DAD) com absorvância no UV, GARCINUÑO (2004) propôs uma análise simultânea de maneb e seus metabólitos (etilenodiuréia – ETU, etileno bis-isotiociano de enxofre – EBIS e etilenodiuréia – EU). A identificação de EBIS foi verificada por DAD-UV e detecção por EM. Tanto o EM quanto o detector DAD-UV são específicos, o primeiro opera com a relação massa/carga e o segundo realiza uma varredura espectral, onde é possível determinar o comprimento de onda máximo absorvido pelo analito, e trabalhar apenas com este comprimento de onda. (COLLINS,1993; SKOOG et al., 2006). Os analitos foram extraídos com 3 eluições com 3 mL de acetonitrila–diclorometano–clorofórmio 1:1:1 v/v/v com 2 min de agitação e separado com coluna C-18 com gradiente de eluição com acetonitrila–metanol– solução aquosa de 100 mM de sódio dodecilsulfato (SDS). Os limites de quantificação em matrizes de tomate foram de 0,45, 0,40, e 0,35 mg kg<sup>-1</sup> para maneb, ETU, e EU, respectivamente. A coluna usada foi a LiChrosorb RP-18 5 µm, de 25 cm x 9,6 mm diâmetro interno, volume de injeção de 20 µL, e fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, começando por 95% da solução aquosa de SDS 100 mM e 5% acetonitrila por 5 min seguida por um gradiente linear de 1 min com 30% da solução aquosa de SDS 100mM, 33% metanol e 37% de acetonitrila por 5 min. As leituras eram realizadas a 232 nm (ETU, EBIS, EU) e 280 nm (maneb) (GARCINUÑO, 2004).

Com a evolução de técnicas de ionização à pressão atmosférica foi possível o acoplamento da cromatografia líquida com o EM. O EM é um detector universal, em que átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados (geralmente positivamente), e separados de acordo com suas relações m/z (massa/carga) para então serem detectados e quantificados (SKOOG et al., 2006).

HAYAMA et al. (2007) desenvolveram um método simples e sensível para determinação de ditiocarbamatos em amostras de água usando CLAE-EM. Os DTCs são decompostos em solução alcalina e depois derivado com dimetil sulfato em dimetil-ditiocarbamato (DMDC) e dimetil-etilenobisditiocarbamato (EBDC). Após uma extração em fase sólida, eles foram analisados utilizando uma coluna C18 de 150 mm x 4,6 de diâmetro interno e partículas de 3 µm, a fase móvel de metanol:água (3:2 v/v), com eluição isocrática; fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 40°C. Os limites de detecção foram 0,061 µg L<sup>-1</sup> para DMDC, e 0,032 µg L<sup>-1</sup> para EBDC.

Os métodos por CLAE para determinação de ditiocarbamatos em amostras de vegetais representaram uma pequena parte da aplicação, sendo a maior parte dos métodos voltada para os metabólitos tóxicos dos ditiocarbamatos, como a etilenodiuréia (ETU) e para matrizes como plasma, medicamentos e ambientais como água (SZOLAR, 2007).

WEISSMAHR (1998) propõe uma técnica para determinação de ditiocarbamatos em água, utilizando CLAE por par iônico; LO (1996), propõe o uso de CLAE para determinação de ETU em formulações, KONTOU (2001) usa a CLAE para determinação de ETU em tomate.

Existe uma tendência ao uso da CLAE-EM devido ao desenvolvimento de novas técnicas que aumentam a sensibilidade e a seletividade no que concerne a separação e detecção dos ditiocarbamatos, seguindo esta tendência, vários trabalhos vem sido relatados na literatura. Porém a complexidade dos equipamentos e o custo operacional elevado limitam seu uso (CRNOGORAC et al., 2009).

## **2.4 – MATRIZES REPRESENTATIVAS**

Em análises químicas as matrizes podem influenciar nos resultados, porém melhorar o processo de extração aumentaria o número de etapas e o custo da análise, acarretando perda do analito e inviabilidade financeira das análises. Por sua vez, em uma rotina no qual o laboratório trabalha com vários tipos de matrizes é difícil avaliar o efeito da matriz em cada analito, assim uma alternativa recomendada por diversos autores é usar uma matriz que seja representativa (POOLE, 2007).

Matriz representativa é um material de uma amostra ou um extrato de uma cultura usada como indicador de uma performance de um método analítico, ou usada no preparo de curvas de calibração para minimizar os efeitos de matriz, ou usada amplamente como representante de um grupo de culturas similares (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Quando os experimentos mostram que culturas similares possuem performance de extração e purificação semelhantes, deve-se escolher um único representante para simplificar o processo de validação. Uma cultura é considerada como representativa, quando ela possui as mesmas propriedades de um grupo como teor de água, óleos,



gorduras, acidez, açúcares, clorofilas, características biológicas, etc. O Codex Alimentarius (2003) classifica as matrizes vegetais em 6 grandes grupos com suas respectivas matrizes representativas e, quando não há representante, o Codex sugere testes individuais para prosseguir a validação (CODEX, 2003).

Pela SANCO/825/00 revisão 67 de 2004, a Comissão Europeia estabelecia um critério menos rigoroso, agrupando os produtos vegetais em apenas 4 grupos: cereais e culturas secas; produtos com alto teor de água, produtos com alto teor de gordura; e frutas com alto conteúdo ácido (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Já a SANCO/2007/3131 agrupa as culturas em 5 grandes grupos: grande conteúdo de água, grande conteúdo de óleo, grande conteúdo de proteína e amido, grande acidez e culturas difíceis ou únicas. Dentro de cada grupo estão especificadas as culturas que estão incluídas no grupo e ainda qual matriz que representa aquelas culturas: (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

### **2.4.1 – Tomate**

Pelo Codex Alimentarius o tomate pertence ao grupo II, grupo de produtos com alto teor de água e baixo ou nenhum conteúdo de clorofila (CODEX, 2003). Entretanto, segundo a SANCO/825/00 revisão 67 de 2004, o tomate continuou pertencendo ao grupo de produtos com alto teor de água porém representando os grupo das “fruiting vegetables” e das Curcubitáceas, aos quais pertencem também o pimentão, o melão e pepino . (EUROPEAN COMMISSION, 2007)

Em 2007, pela SANCO/2007/3131, o tomate continuou pertencendo ao grupo dos vegetais com alto teor de água, porém nesta categoria foram incluídas várias culturas, assim o tomate passou a representar o grupo de vegetais com alto teor de água, mas apenas o grupo das “fruiting vegetables” e das Curcubitáceas (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Segundo levantamento anual da produção agrícola no Brasil realizado pelo IBGE em agosto de 2009, o Brasil produziu cerca de 3,9 milhões de toneladas de tomate em 2008 e em 2009, a produção já chegou a 4,2 milhões. Minas Gerais ocupa o 3º lugar na produção de tomate, atrás apenas de Goiás e São Paulo, sendo responsável por

12% da produção nacional. Na TABELA 3 encontra-se o os dados do IBGE, mostrando o perfil da produção de tomate no Brasil e em Minas Gerais. (IBGE, 2009).

TABELA 3. Perfil da produção de tomate no Brasil e em Minas Gerais, nos anos de 2008 e 2009.

|        | Área plantada (ha) |        |        | Produção (toneladas) |           |        | Rendimento médio (kg/ha) |        |        |
|--------|--------------------|--------|--------|----------------------|-----------|--------|--------------------------|--------|--------|
|        | 2008               | 2009   | Var(%) | 2008                 | 2009      | Var(%) | 2008                     | 2009   | Var(%) |
| BRASIL | 61.726             | 64.578 | 3,0    | 3.931.205            | 4.214.372 | 5,3    | 63.758                   | 65.180 | 2.2    |
| MG     | 7.384              | 7.334  | -0,6   | 463.571              | 478.505   | 3.2    | 62.849                   | 65.271 | 3.9    |

Os dados de 2009 foram estimados baseados em levantamentos realizados até agosto do mesmo ano (Fonte: IBGE, 2009).

## 2.5 – EFEITO DAS MATRIZES

Remover os possíveis contaminantes e isolar (separar) o(s) analito(s) da matriz é o objetivo de todo processo de extração. Mas as matrizes, quando muito complexas podem influir no resultado da análise, aumentando ou diminuindo a resposta (POOLE, 2007).

O maior problema em análises de ditiocarbamatos em vegetais é a formação fitogênica de CS<sub>2</sub> oriundo de compostos contendo enxofre. Plantas do gênero Brassicaceae possuem uma oxima contendo enxofre que se degrada em isotiocianato, esta reação também ocorrem em outras espécies (ROODMAN, 1998). O isotiociano por sua vez pode degradar em CS<sub>2</sub> que será detectado como oriundo de um fungicida ditiocarbamato (PECHÁCEK et al., 1997).

ABAKERLI et al. (2006) concluíram que os métodos cromatográficos e espectrofotométricos forneceram resultados falso positivos de CS<sub>2</sub> para mamão, independentemente da variedade avaliada, devido ao CS<sub>2</sub> fitogênico.

Foram obtidas por cultivo orgânico, convencional e hidropônico, 18 amostras de agrião d'água, que analisadas pelo método de KEPPEL (1971) foram todas positivas para o CS<sub>2</sub> (STERTZ et al, 2003).

## **2.6 – VALIDAÇÃO**

Segundo o item 5.4.5.1 da ISO/IEC 17025, a validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso são atendidos (ISO/IEC 17025, 2005).

O guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, proposto pela Resolução nº 899/2003 da ANVISA, determina que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Os estudos de validação devem ser representativos, devem cobrir as faixas de concentração e abranger os diferentes tipos de amostras dentro do escopo do método (THOMPSON et al., 2002). É imprescindível que no processo de validação os estudos para determinação dos parâmetros de desempenho sejam realizados utilizando equipamentos dentro das especificações e adequadamente calibrados. Da mesma forma, o analista envolvido nos estudos deve ser competente na área em questão e ter conhecimento suficiente para ser capaz de tomar decisões apropriadas a partir de suas observações (EURACHEM, 1998; ISO/IEC 17025, 2005).

Os parâmetros a serem avaliados em um validação são propostos por diversos autores (SOUZA, 2007). Segundo THOMPSON (2002) os parâmetros típicos a serem abordados em uma validação são a aplicabilidade, a seletividade, calibração, exatidão, precisão, recuperação, faixa de trabalho, limites de quantificação e detecção, sensibilidade e robutez. Linearidade, seletividade ou especificidade, exatidão, precisão, recuperação, limite de decisão, capacidade de detecção, aplicabilidade, estabilidade e robutez são os parâmetros propostos pela EUROPEAN COMMISSION (2002). Para ANVISA (2003) a validação deve avaliar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão.

A aplicabilidade inclui especificações sobre a faixa de concentração coberta pela validação, tipos de matriz, equipamentos, reagentes e procedimentos analíticos, protocolos de calibração e precauções com a segurança (THOMPSON et al., 2002).

A seletividade é a capacidade do método em determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes na matriz sob condições de teste determinadas (ANVISA, 2003; EURACHEM, 2002). Os termos seletividade e especificidade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (EURACHEM, 2002; EUROPEAN COMMISSION, 2002; THOMPSON et al., 2002). Um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo (INMETRO, 2007).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). É habilidade de extrair resultados que sejam diretamente, ou por meio de transformações matemáticas bem definidas, proporcionais à concentração de analitos em amostras dentro de uma dada faixa (HUBER, 1998). O ideal é que a relação entre a resposta do instrumento e a concentração seja linear, mas não é obrigatório, o importante é haver repetitividade da curva em dias diferentes (EURACHEM, 2002). O método de avaliação da linearidade proposto por SOUZA & JUNQUEIRA (2005) estabelece: (i) definição da faixa de interesse, considerando que a concentração esperada na amostra deve estar no centro da faixa; (ii) preparação de soluções de calibração em solvente ou matriz, dependendo dos resultados dos estudos de efeitos de matriz, em pelo menos seis níveis de concentração, igualmente espaçados, em três replicatas independentes e um nível zero, preparado como uma ferramenta de controle para ajuste do zero instrumental; (iii) medida da resposta das soluções de calibração em uma ordem aleatória (THOMPSON et al., 2002).

A faixa de aplicação de um método analítico é o intervalo entre os maiores e os menores níveis (incluindo estes níveis) que tenham demonstrado precisão, exatidão e linearidade usando o método como descrito. É normalmente expressa dentro das mesmas unidades dos resultados dos testes obtidos pelo método analítico (HUBER, 1998). Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito

no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os limites de detecção e de quantificação e no limite superior, os fatores dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de aplicação, pode existir uma faixa de resposta linear, onde a resposta do sinal tem uma relação linear com a concentração do analito. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa linear de aplicação (INMETRO, 2007).

Os efeitos de matriz não significativos simplificam enormemente o processo de validação, visto que os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente. Para que esta estratégia seja adotada, o efeito de matriz deve ser avaliado na validação (THOMPSON et al., 2002). Uma matriz representativa pode ser usada para calibrar vários tipos de amostras (BRUCE et al., 1998; EUROPEAN COMMISSION, 2006, POOLE, 2007).

A exatidão é o grau de concordância entre o valor médio de uma grande série de resultados de ensaios e o valor de referência aceito, sendo geralmente expressa como erro sistemático ou tendência (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Pode também ser definida como a extensão na qual os resultados gerados por um método e os valores verdadeiros concordam (HUBER, 1998). É declarada quantitativamente em termos de tendência (*bias*) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando exatidão (THOMPSON et al, 2002; INMETRO, 2007). A exatidão pode ser estudada comparando os resultados de um método com outro previamente validado; por análise de materiais de referência certificados, uso do método de referência de incerteza conhecida ou por testes de recuperação com adição de padrões, quando materiais certificados não estiverem disponíveis (BRUCE et al., 1998, ANVISA, 2003). Na ausência de materiais de referência, a exatidão pode ser investigada por meio de experimentos de adição de padrões, mas esta técnica pode ser fortemente influenciada por erros de observação, nesta situação é avaliada a inexatidão ou a falta de exatidão do método. Embora uma boa recuperação não seja uma garantia absoluta de exatidão, certamente uma recuperação pobre é uma indicação de falta de exatidão (THOMPSON et al, 2002).

A precisão indica o grau de dispersão de diversos valores individuais em torno do valor mais provável. Depende somente da distribuição de erros aleatórios e não é relacionada ao valor verdadeiro ou valor específico, sendo usualmente representada em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação). As

duas medidas de precisão mais comuns são a repetitividade e a reprodutibilidade (SOUZA, 2007).

A repetitividade representa a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. Tanto a repetitividade quanto a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito (EURACHEM, 2002). Há o termo precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial para definir a avaliação da precisão sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, quando se definem exatamente quais as condições avaliar, como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). É a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero (THOMPSON et al., 2002). O limite de detecção pode ser definido como a menor concentração detectada em amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada, distinguida de zero, cuja relação sinal/ruído  $\geq 3$  (SOUZA, 2007). Segundo a AOAC (1998), é a média das leituras de amostras brancas ( $n \geq 20$ ) mais 3 vezes o desvio padrão, expresso em concentração do analito. Por HUBER (1998), é a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Para sistemas cromatográficos, é a quantidade injetada que resulta em um pico com altura pelo menos 2 ou 3 vezes a linha de base do ruído, podendo ainda ser descrito como a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser separada do *background* do instrumento utilizado para a medição (BRUCE et al., 1998).

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão (repetitividade) e exatidão sob as condições estabelecidas no teste (EURACHEM, 2002; ANVISA, 2003). É a menor quantidade do analito na amostra que pode quantitativamente determinado com precisão e exatidão apropriadas para o analito e matriz considerados (AOAC, 1998). Pode também ser descrito como a menor concentração do analito medida com níveis aceitáveis de exatidão e precisão

(BRUCE et al., 1998) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (THOMPSON et al., 2002).

O limite de decisão ( $CC\alpha$ ) é o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não-conforme com uma probabilidade de erro  $\alpha$ , que mede a taxa de resultados falsos não-conformes (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Quando os resultados obtidos forem menores que  $CC\alpha$ , a amostra pode ser declarada como conforme, o que significa ausência do analito ou presença do analito em uma concentração menor que o LMR, com um nível de confiança de  $(1 - \alpha)$  (ANTIGNAC et al., 2003).

A capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) é o teor mais baixo da substância que pode ser detectado, identificado ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro  $\beta$ , que mede a taxa de resultados falsos conformes (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido,  $CC\beta$  é a concentração mais baixa que o método é capaz de detectar em amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ . No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração que o método é capaz de detectar, na faixa de concentração do limite permitido, com uma certeza estatística de  $1 - \beta$  (VAN OVERMEIRE, 2004). Quando o resultado obtido é maior ou igual a  $CC\beta$ , com um limite de confiança de  $(1 - \beta)$ , a amostra pode ser declarada como não-conforme, indicando a presença do analito ou em uma concentração maior que o LMR. Quando o resultado estiver entre  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  há suspeita sobre a conformidade da amostra, mas, sob o ponto de vista estatístico, o resultado não pode ser classificado e a aplicação prática destes parâmetros depende de decisões políticas que envolvem a proteção do consumidor e do produtor de alimentos (ANTIGNAC et al., 2003).

A sensibilidade é a medida da mudança na resposta do equipamento correspondente à mudança na concentração do analito. Quando a resposta é linear com respeito à concentração, a sensibilidade corresponde ao gradiente da resposta da curva (WILLETTS & WOOD, 2000). A sensibilidade, sendo o gradiente da função de calibração, é usualmente arbitrária, dependente de ajustes instrumentais. Portanto, não é útil em validações, podendo ser útil em procedimentos de garantia de qualidade (THOMPSON et al., 2002).

A robustez de um método analítico é a medida da sua capacidade de manter-se inalterado, com pequenas variações nos parâmetros do método (THOMPSON, 2002).

A determinação da robustez consiste em fazer variações deliberadas no método e investigar seus efeitos. É possível, então, identificar as variáveis que têm um efeito mais significativo e garantir que, quando o método for utilizado, estas sejam controladas (EURACHEM, 2002). Testes de robustez examinam o efeito dos parâmetros operacionais nos resultados de análise. Se a influência do parâmetro estiver dentro de uma tolerância previamente especificada, é dito que o parâmetro está dentro da robustez do método. Dados obtidos nestes efeitos permitirão avaliar se um método precisa ser revalidado quando um ou mais destes parâmetros são alterados (HUBER, 1998). Durante o desenvolvimento da metodologia deve-se constatar a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, e estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento, a robustez de um método analítico indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003). As variações podem ser avaliadas utilizando a abordagem de YOUNG (1975), que é de concepção fatorial fracionária (EUROPEAN COMMISSION, 2002). De acordo com EURACHEM (2002), a robustez deve ser tratada como parte do desenvolvimento e de otimização do método. THOMPSON et al. (2002) defendem que os estudos de robustez em processos de validação devem somente ser conduzidos quando os parâmetros experimentais e seus respectivos limites não forem estabelecidos previamente.

A avaliação de todos parâmetros de uma validação de um método para todas as matrizes e todos os analitos nos alimentos é praticamente impossível. Então, a escolha dos analitos, as concentrações, e as matrizes representativas no estudo devem ser feitas criteriosamente para fornecer diversas faixas de combinações para demonstrar a capacidade analítica do método (LEHOTAY, 2000).



## **3 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 – AMOSTRAS DE TOMATE: MATRIZ ESCOLHIDA**

Para análises de efeitos de matriz e recuperação foram usados tomates de produtores rurais do estado de Minas Gerais, que declararam o uso ou não de agrotóxicos aplicados na cultura e respeitaram o período de carência para colheita. A coleta de amostras seguiu as recomendações do CODEX ALIMENTARIUS (2003), coletando-se nas propriedades rurais o mínimo de 10 frutos e 1 kg de tomates já colhidos e prontos para o comércio. Após acondicionadas em sacos plásticos devidamente lacradas com lacres numerados, as amostras foram enviadas ao laboratório em caixas de isopor respeitando o prazo máximo de 24 horas entre a coleta e a entrada no laboratório. Ao chegarem ao laboratório eram imediatamente trituradas e congeladas, sendo que aquelas que não atenderam às recomendações do CODEX ALIMENTARIUS, descartadas.

As amostras eram previamente analisadas pelo método espectrofotométrico e aquelas que não apresentaram absorvância maiores que 0,0250 e não apresentavam coloração amarela foram consideradas amostras brancas. As amostras eram das variedades Longa Vida, Santa Cruz e Débora, em diferentes estágios de maturação. As amostras consideradas brancas eram então misturadas de forma aleatória e trituradas novamente para garantir a uniformidade da matriz. Em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezers, entre -15°C e -25°C.

### **3.2 – REAGENTES, SOLUÇÕES, PADRÕES E EQUIPAMENTOS**

Para o presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e gases:

- Acetato de cobre (II) PA (Merck);
- Ácido clorídrico PA (Vetec);
- Álcool etílico absoluto para análise (Nuclear);
- Álcool etílico 92,8° GL (Minálcool);

- Cloreto estanoso (II) dihidratado PA (Spectrum);
- Dietanolamina PA (Merck);
- Extran® (Merck);
- Hidróxido de sódio (Vetec);
- Nitrogênio comum (IBG);

As soluções reagentes utilizadas foram:

- Solução de hidróxido de sódio 10%;
- Solução Reagente de Cullen.

A solução foi preparada adicionando 50 mL de dietanolamina, 24 mg de acetato de cobre (II) e álcool etílico absoluto até completar o volume do balão volumétrico de 500 mL.

Os padrões utilizados foram:

- Dissulfeto de carbono ( $CS_2$ ) 99,9% (Merck), para preparo das curvas de calibração;
- Thiram 99,8% (Riedel-de Hæn), para as contaminações da recuperação.

Os equipamentos utilizados foram: balança semi-analítica Metler com capacidade de 0,1 g a 1200 g e balança analítica AND HR-200 com capacidade de 0,1 g a 210,0 g, ambas calibradas. Para as análises espectrofotométricas foi usado um espectrofotômetro UV-Visível da marca Varian, modelo Carry 50, um conjunto de vidraria para reação vertical para análises de ditiocarbamatos proposto por CALDAS (2001) e manta aquecedora marca Fisatom. A vidraria volumétrica, como balões e pipetas, eram todas calibradas

### **3.3 – MÉTODOS**

A metodologia por espectrofotometria baseou-se na hidrólise ácida do ditiocarbamato existente na amostra, liberando o  $CS_2$ , para complexar com dietanolamina e acetato de cobre II, formando um composto de coloração amarela.

Em um balão de fundo chato de 1000 mL com duas conexões, foram colocados 100 g de amostra de tomate triturado, 200 mL de água destilada e deionizada, e 3 g de cloreto estanhoso. Na parte superior do balão foi conectado um condensador em bola, e neste condensador conectou-se uma torre de vidro, contendo 25 mL de solução de hidróxido de sódio 10%. Na parte interna da torre foi encaixada um tubo de vidro

contendo 15 mL de Solução Reagente de Cullen. Através da abertura lateral do balão, foi adicionado 30 mL de ácido clorídrico e em seguida foi colocado o “pescador” de vidro para insuflar nitrogênio no sistema. Esta montagem foi levada para manta aquecedora durante 30 minutos, para ocorrer a reação de hidrólise do ditiocarbamato, remoção das impurezas e a formação do complexo.

O sistema era verificado para que não ocorressem vazamentos, e após os 30 minutos, o complexo formado da reação do CS<sub>2</sub> com o Reagente de Cullen foi transferido para um balão volumétrico calibrado de 25 mL e o volume completado com álcool etílico absoluto. Este complexo foi levado ao espectrofotômetro para avaliação da absorbância no comprimento de onda de 435 nm.

O zero instrumental foi obtido analisando, em cada sequência de análises, um balão volumétrico com 15 mL de Reagente de Cullen e 10 mL álcool etílico absoluto, no mesmo comprimento de onda, com o objetivo de remover possíveis interferentes dos reagentes utilizados no método.

Para a mesma solução eram realizadas 5 leituras, e nenhuma leitura foi realizada após 15 minutos do término da extração.

Cuidados na rotina foram tomados, pois poderiam ocorrer contaminações oriundas de luvas de latex, teflon ou produtos que possuem enxofre em sua composição e poderiam induzir falsos positivos.

### **3.4 – PADRÕES: TIRAM E DISSULFETO DE CARBONO**

#### **3.4.1 – Tiram**

Para os testes de recuperação, foi escolhido o tiram para representar o grupo dos ditiocarbamatos, por ser o tiram uma molécula bem estudada, solúvel em água e solventes orgânicos, estável quando estocado em temperaturas acima de -20°C. O tiram é uma molécula simples e o CS<sub>2</sub> é o maior resíduo associado a esta molécula, e os estudos demonstram boa recuperação nos métodos conhecidos (FAO, 1994).

A solução estoque (SE) de tiram foi preparada pesando-se 10,5 mg de tiram em balão volumétrico calibrado de 50 mL, em seguida o volume foi completado com álcool etílico absoluto, e a concentração da solução estoque obtida foi  $210 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A partir da solução estoque SE, foi preparada a solução intermediária de concentração igual a  $42 \mu\text{g mL}^{-1}$ , pipetando-se 5 mL da solução estoque para um balão volumétrico calibrado de 25 mL, e em seguida completando-se o volume com álcool etílico absoluto.

### **3.4.2 – Dissulfeto de Carbono ( $\text{CS}_2$ )**

Para o preparo da solução estoque de  $\text{CS}_2$  foram usados balões volumétricos calibrados de 25 mL, contendo aproximadamente 20 mL álcool etílico absoluto. Foi pipetado  $32 \mu\text{L}$  de  $\text{CS}_2$  para um balão tarado previamente em balança analítica, em seguida o volume foi completado com álcool etílico absoluto. Baseado no peso obtido a concentração foi calculada.

A partir da solução estoque foi preparada a solução intermediária pipetando-se 2,5 mL para um balão volumétrico calibrado de 25 mL, e o volume completado com álcool etílico absoluto.

As curvas de calibração foram preparadas em balão volumétrico calibrado de 25 mL contendo 15 mL de Reagente de Cullen e adicionado do volume específico de solução intermediária para cada ponto, sendo o volume final completado com álcool etílico absoluto.

Atendendo as recomendações da SANCO/2007/3131 para avaliação do preparo de padrões novos, foram preparadas duas soluções estoques de forma independente e no mesmo dia, e a partir destas foi preparada uma solução intermediária e cinco replicatas de um ponto da curva de calibração. O  $\text{CS}_2$  por ser um composto volátil à temperatura ambiente, conforme o modo de preparo poderia volatilizar e apresentar uma concentração diferente da esperada.

Foi preparado o ponto da curva de calibração como já descrito, utilizando o volume de  $500 \mu\text{L}$  da solução intermediária. Os balões foram levados para análise em espectrofotômetro UV-Visível, para leitura em 435 nm. Então foi aplicado o teste de t para verificar se as médias das absorbâncias do ponto da curva de calibração obtido

das duas soluções intermediárias diferiram a 5% de probabilidade (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Para avaliação das curvas de calibração foram preparadas curvas de calibração com quatro pontos conforme já descrito, utilizando os volumes de 100, 300, 500 e 700  $\mu\text{L}$  de uma solução intermediária preparada no mesmo dia.

Foram construídos cartas de controle com os valores das interseções e as inclinações de cada curva de calibração obtidas em cada dia. Nestas cartas de controle foram representados os intervalos de 95% de confiança, com base no cálculo da variância combinada, obtida pela média das variâncias individuais de cada estimativa dos parâmetros da reta.

### **3.5 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E VALIDAÇÃO**

A validação do método foi conduzida por técnicos treinados dentro das boas práticas de laboratório e em diferentes dias. As verificações e manutenção preventiva dos equipamentos estavam em dia e a vidraria utilizada calibrada. Os parâmetros estudados do método foram avaliados seguindo os critérios de aceitabilidade definidos.

#### **3.5.1 – Linearidade**

A determinação da faixa de interesse para o  $\text{CS}_2$  foi baseada no estudo realizado por JUNQUEIRA et al. (2005), sendo a linearidade avaliada como descrito por SOUZA & JUNQUEIRA (2005).

Para determinação da linearidade e da faixa de concentração foram realizadas três replicatas de um branco e oito concentrações diferentes de  $\text{CS}_2$ . Em balão volumétrico de 25 mL foram adicionados 15 mL do Reagente de Cullen, adicionados de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ou 800  $\mu\text{L}$  de solução padrão intermediária de  $\text{CS}_2$  que correspondem à faixa de 0,6 a 5,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ou 0,015 a 1,30  $\text{mg kg}^{-1}$ . Em seguida, o volume foi completado com álcool etílico absoluto, totalizando 24 soluções contendo o analito e três brancos. Os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos

mínimos quadrados ordinários (MMOQ) aplicado ao modelo  $Y_i = a + bX_i$ , em que  $Y_i$  representa as respostas (absorbâncias),  $X_i$  as concentrações dos padrões dos analitos,  $a$  e  $b$  estimativas dos parâmetros da equação. Foram construídos gráficos dos resíduos da regressão ( $Y_i - a - bX_i$ ) para investigação de heteroscedasticidade ou desvio de linearidade. Os *outliers* são pontos extremos que poderiam influenciar na regressão, e foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, que foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % de resultados. Foram verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryan e Joiner), homoscedasticidade (teste de Levene, Brown e Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin e Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (testes de F de Snedecor). A TABELA 4 descreve o delineamento seguido para a linearidade.

TABELA 4. Delineamento para a linearidade.

| Nível                    | Vol. SI* ( $\mu\text{L}$ ) | Replicatas |    |     |
|--------------------------|----------------------------|------------|----|-----|
| <b>Branco</b>            | <b>0</b>                   | I          | II | III |
| <b>1</b>                 | <b>100</b>                 | I          | II | III |
| <b>2</b>                 | <b>200</b>                 | I          | II | III |
| <b>3</b>                 | <b>300</b>                 | I          | II | III |
| <b>4</b>                 | <b>400</b>                 | I          | II | III |
| <b>5</b>                 | <b>500</b>                 | I          | II | III |
| <b>6</b>                 | <b>600</b>                 | I          | II | III |
| <b>7</b>                 | <b>700</b>                 | I          | II | III |
| <b>8</b>                 | <b>800</b>                 | I          | II | III |
| <b>TOTAL: 3 x 9 = 27</b> |                            |            |    |     |

\* Volume de solução intermediária

### 3.5.2 – Efeito do dia

A avaliação do efeito do dia foi baseada nas curvas de calibração empregadas para os estudos de linearidade, obtidas em quatro dias, totalizando 12 brancos e 96 análises (TABELA 5). Após avaliação da homogeneidade das variâncias pelo teste de Pearson & Hartley (SNEDECOR e COCHRAN, 1989), as estimativas das inclinações e das interseções das curvas foram comparadas pelo teste  $t$  aplicado a três contrastes ortogonais com base na variância combinada ( $s_c^2$ ). Os contrastes  $Y_A$  e  $Y_B$  como descrito por AMARAL (2007).

As estatísticas  $t$  foram obtidas pelas seguintes equações:

$$t(Y_A) = \frac{b_1 - b_2}{EP(b_1 - b_2)} = \frac{b_1 - b_2}{s_c \sqrt{1/S_{xx_1} + 1/S_{xx_2}}}$$

$$t(Y_B) = \frac{b_1 + b_2 - 2b_3}{EP(b_1 + b_2 - 2b_3)} = \frac{b_1 + b_2 - 2b_3}{s_c \sqrt{1/S_{xx_1} + 1/S_{xx_2} + 4/S_{xx_3}}}$$

$$t(Y_C) = \frac{b_1 + b_2 + b_3 - 3b_4}{EP(b_1 + b_2 + b_3 - 3b_4)} = \frac{b_1 + b_2 + b_3 - 3b_4}{s_c \sqrt{1/S_{xx_1} + 1/S_{xx_2} + 1/S_{xx_3} + 9/S_{xx_4}}}$$

Analogamente, para comparação das interseções foram utilizadas:

$$t(Y_A) = \frac{a_1 - a_2}{EP(a_1 - a_2)} = \frac{a_1 - a_2}{s_c \sqrt{\sum X_1^2 / (n_1 S_{XX_1}) + \sum X_2^2 / (n_2 S_{XX_2})}},$$

$$t(Y_B) = \frac{a_1 + a_2 - 2a_3}{EP(a_1 + a_2 - 2a_3)} = \frac{a_1 + a_2 - 2a_3}{s_c \sqrt{\sum X_1^2 / (n_1 S_{XX_1}) + \sum X_2^2 / (n_2 S_{XX_2}) + 4 \sum X_3^2 / (n_3 S_{XX_3})}},$$

$$t(Y_C) = \frac{a_1 + a_2 + a_3 - 3a_4}{EP(a_1 + a_2 + a_3 - 3a_4)} = \frac{a_1 + a_2 + a_3 - 3a_4}{s_c \sqrt{\sum X_1^2 / (n_1 S_{XX_1}) + \sum X_2^2 / (n_2 S_{XX_2}) + \sum X_3^2 / (n_3 S_{XX_3}) + 9 \sum X_4^2 / (n_4 S_{XX_4})}}$$

sendo  $S_{XX} = \sum X^2 - (\sum X)^2 / n$ ,  $X$  a concentração dos analitos e  $n$  o número de pontos de cada curva. Os subscritos 1, 2, 3 e 4 representam os dias;  $Y_A$ ,  $Y_B$  e  $Y_C$  os contrastes ortogonais e  $EP = \sqrt{Var(Y)}$ , o erro padrão dos contrastes.

A variância combinada ( $s_c^2$ ) foi obtida pela equação:

$$s_c^2 = \frac{(n_1 - 2)s_1^2 + (n_2 - 2)s_2^2 + (n_3 - 2)s_3^2 + (n_4 - 2)s_4^2}{n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 8}$$



O efeito do dia foi considerado significativo quando a estatística  $t$  excedeu ao valor de  $t$  crítico para  $n_1 + n_2 + n_3 + n_4 - 8$  graus de liberdade e  $\alpha = 0,05$  para qualquer um dos contrastes ortogonais. Na TABELA 5 está apresentado o delineamento para o efeito do dia .

TABELA 5. Delineamento para o efeito do dia.

| DIA                               | NÍVEL  | REPLICATAS |    |     | DIA                        | NÍVEL  | REPLICATAS |    |     |
|-----------------------------------|--------|------------|----|-----|----------------------------|--------|------------|----|-----|
| 1º DIA                            | Branco | I          | II | III | 3º DIA                     | Branco | I          | II | III |
|                                   | 1      | I          | II | III |                            | 1      | I          | II | III |
|                                   | 2      | I          | II | III |                            | 2      | I          | II | III |
|                                   | 3      | I          | II | III |                            | 3      | I          | II | III |
|                                   | 4      | I          | II | III |                            | 4      | I          | II | III |
|                                   | 5      | I          | II | III |                            | 5      | I          | II | III |
|                                   | 6      | I          | II | III |                            | 6      | I          | II | III |
|                                   | 7      | I          | II | III |                            | 7      | I          | II | III |
|                                   | 8      | I          | II | III |                            | 8      | I          | II | III |
| TOTAL: 3 x 9 = 27 análises        |        |            |    |     | TOTAL: 3 x 9 = 27 análises |        |            |    |     |
| 2º DIA                            | Branco | I          | II | III | 4º DIA                     | Branco | I          | II | III |
|                                   | 1      | I          | II | III |                            | 1      | I          | II | III |
|                                   | 2      | I          | II | III |                            | 2      | I          | II | III |
|                                   | 3      | I          | II | III |                            | 3      | I          | II | III |
|                                   | 4      | I          | II | III |                            | 4      | I          | II | III |
|                                   | 5      | I          | II | III |                            | 5      | I          | II | III |
|                                   | 6      | I          | II | III |                            | 6      | I          | II | III |
|                                   | 7      | I          | II | III |                            | 7      | I          | II | III |
|                                   | 8      | I          | II | III |                            | 8      | I          | II | III |
| TOTAL: 3 x 9 = 27 análises        |        |            |    |     | TOTAL: 3 x 9 = 27 análises |        |            |    |     |
| TOTAL: 4 dias x 27 análises = 108 |        |            |    |     |                            |        |            |    |     |

### 3.5.3 – Efeitos de matriz

Para a avaliação dos efeitos de matriz utilizou-se o delineamento proposto por SOUZA (2007). Foram empregados os resultados de três replicatas do branco e seis concentrações diferentes de  $CS_2$  em solvente (álcool etílico com solução de Cullen) e dos resultados das três replicatas do branco e seis concentrações diferentes de  $CS_2$  combinados com extratos da matriz obtidos a partir de amostras brancas. Totalizando 42 análises, 21 análises para cada curva (TABELA 6).

Os parâmetros da regressão foram estimados e as premissas relativas ao MMQO também foram verificadas para estas curvas. Os *outliers* foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. Uma vez comprovadas as premissas de normalidade, homoscedasticidade, independência e ajuste ao modelo linear, a inclinação e a interseção obtidas para a curva de solventes foram comparadas com a inclinação e interseção calculadas para a curva de matriz. A homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas foi avaliada pelo teste de Pearson & Hartley (SNEDECOR & COCHRAN, 1989) e as inclinações e interseções foram comparadas pelo teste de *t*.

TABELA 6. Delineamento para o efeito matriz.

|   | Branco  | Nível 1    | Nível 2    | Nível 3    | Nível 4    | Nível 5    | Nível 6    |
|---|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Solvente</b>                                     | Replicatas  | Replicatas | Replicatas | Replicatas | Replicatas | Replicatas | Replicatas |
|   | I II III  | I II III   | I II III   | I II III   | I II III   | I II III   | I II III   |
|   | <b>TOTAL: 3 replicatas x 7 níveis = 21 análises</b> |            |            |            |            |            |            |
| <b>Matriz</b>                                       | Branco  | Nível 1    | Nível 2    | Nível 3    | Nível 4    | Nível 5    | Nível 6    |
|   | Replicatas  | Replicatas | Replicatas | Replicatas | Replicatas | Replicatas | Replicatas |
|   | I II III  | I II III   | I II III   | I II III   | I II III   | I II III   | I II III   |
| <b>TOTAL: 3 replicatas x 7 níveis = 21 análises</b> |   |            |            |            |            |            |            |
| <b>TOTAL: 2 curvas x 21 análises = 42</b>           |   |            |            |            |            |            |            |

### 3.5.4 – Seletividade, Inexatidão e Precisão

Existe dificuldade em se encontrar materiais de referências certificados (MRC) para agrotóxicos, então o tiram foi usado como material de referência para os estudos de seletividade, inexatidão e precisão em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial (TABELA 7). Foram analisadas amostras brancas e amostras adicionadas de solução padrão de tiram em álcool etílico absoluto, em três níveis de concentração, 0,15, 0,5 e 1,0 mg kg<sup>-1</sup> sendo todos os níveis dentro das faixas da curva de calibração com replicatas verdadeiras e independentes, divididas em quatro lotes de três replicatas, sendo cada lote analisado independentemente, em diferentes dias, por

diferentes analistas, simulando condições de reprodutibilidade parcial (SOUZA et al, 2007).

Os limites escolhidos não contemplaram o limite estabelecido pela legislação brasileira, LMR de 2,0 mg kg<sup>-1</sup> para o tomate, porque os dados dos PARAs de 2001 a 2006, e do Laboratório de Análises de Resíduos e Agrotóxicos nos anos de 2005 a 2008 não apresentaram tomates que ultrapassassem este limite (ANVISA, 2007d).

TABELA 7: Delineamento para avaliação da recuperação e precisão em condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.

|   |               |               |                |                |                |
|---|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Analista<br/>1</b>                                 | <b>1º DIA</b> | <b>Branco</b> | <b>Nível 1</b> | <b>Nível 2</b> | <b>Nível 3</b> |
|   |               | Replicatas    | Replicatas     | Replicatas     | Replicatas     |
|   |               | I II III      | I II III       | I II III       | I II III       |
| <b>TOTAL: 3 replicatas x 4 níveis = 12 análises</b>   |               |               |                |                |                |
| <b>Analista<br/>1</b>                                 | <b>2º DIA</b> | <b>Branco</b> | <b>Nível 1</b> | <b>Nível 2</b> | <b>Nível 3</b> |
|   |               | Replicatas    | Replicatas     | Replicatas     | Replicatas     |
|   |               | I II III      | I II III       | I II III       | I II III       |
| <b>TOTAL: 3 replicatas x 4 níveis = 12 análises</b>   |               |               |                |                |                |
| <b>Analista<br/>2</b>                                 | <b>3º DIA</b> | <b>Branco</b> | <b>Nível 1</b> | <b>Nível 2</b> | <b>Nível 3</b> |
|   |               | Replicatas    | Replicatas     | Replicatas     | Replicatas     |
|   |               | I II III      | I II III       | I II III       | I II III       |
| <b>TOTAL: 3 replicatas x 4 níveis = 12 análises</b>   |               |               |                |                |                |
| <b>Analista<br/>2</b>                                 | <b>4º DIA</b> | <b>Branco</b> | <b>Nível 1</b> | <b>Nível 2</b> | <b>Nível 3</b> |
|   |               | Replicatas    | Replicatas     | Replicatas     | Replicatas     |
|   |               | I II III      | I II III       | I II III       | I II III       |
| <b>TOTAL: 3 replicatas x 4 níveis = 12 análises</b>   |               |               |                |                |                |
| <b>TOTAL: 2 analistas x 2 dias x 12 análises = 48</b> |               |               |                |                |                |

Para identificação dos *outliers* nos testes de recuperação foi utilizado o teste de Grubbs (GRUBBS, 1969; BURKE, 2001). As estatísticas de Grubbs para um *outlier* ( $G_1$ ), dois *outliers* vicinais ( $G_2$ ) e dois *outliers* polares ( $G_3$ ) foram calculadas para cada nível de concentração. A indicação de *outlier* por pelo menos uma destas estatísticas foi suficiente para excluir o dado. Os cálculos foram feitos de modo iterativo, aplicando

o teste de Grubbs sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até um limite de 22,2 % no número original de resultados (HORWITZ, 1980). As estatísticas dos cálculos estão descritas por SOUZA (2007).

Após remoção dos *outliers* os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), adotando um delineamento fatorial completamente aninhado, que forneceu as estimativas da variância de repetitividade; da variância entre bateladas que inclui as fontes de variação confundidas do dia e do analista; e da variância da precisão intermediária (MAROTO et al., 1999). Os valores de referência para a reprodutibilidade parcial foram obtidos pelas equações de HORWITZ (1980) ou de THOMPSON (2002), dependendo da faixa de concentração do analito, sendo adotado 2/3 destes valores para avaliação da precisão em condições de repetitividade (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

### **3.5.5 – Limites de Detecção, Quantificação, Decisão e Capacidade de Detecção**

O limite de quantificação foi a concentração na qual o método conseguiu operar com precisão e exatidão aceitáveis, segundo os critérios adotados nos estudos de recuperação e precisão. O limite de detecção foi a concentração mais baixa do analito que foi detectada, mas não necessariamente quantificada, diferente de zero (sinal/ruído  $\leq 3$ ). Esses limites estabelecidos basearam nos resultados da recuperação média e desvio padrão relativo obtidos para as replicatas das amostras adicionadas, segundo SOUZA et al. (2005).

O limite de decisão e a capacidade de detecção estimados basearam nos resultados de recuperação obtidos nos experimentos de avaliação da reprodutibilidade parcial, de acordo com VAN LOCO e BEERNAERT (2003). A informação se o produto é autorizado e qual é seu LMR foi a base para o cálculo desses parâmetros.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – AMOSTRAS DE TOMATE

Para a seleção do tomate como matriz representativa para o trabalho foram considerados aspectos econômicos, técnicos e científicos. O tomate foi a cultura escolhida por estar presente na mesa dos mineiros, com consumo *per capita* de 5,5 kg por ano, além disto, Minas Gerais é o 3º maior produtor do país, atrás apenas de Goiás e São Paulo (IBGE,2009). Segundo dados do PARA, em 2007, 44,72% das amostras de tomate analisadas tiveram resultados insatisfatórios, significando que as amostras ou apresentaram níveis de resíduos de agrotóxicos acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação ou as amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura. Estes dados colocam o tomate como cultura importante em programas de monitoramento de resíduos de pesticidas. (ANVISA, 2007d).

O procedimento de amostragem baseado nas recomendações do CODEX ALIMENTARIUS (1999) assegurou a boa representatividade e integridade das amostras que chegaram em bom estado de conservação.

Devido as diversas variedades de tomate, oriundos de diferentes regiões e em diferentes estágios de maturação, a validação intralaboratorial para cada variedade era inviável, portanto o objetivo do trabalho ao triturar e homogeneizar as amostras de diferentes tomates foi assegurar que a validação fosse estendida aos vários tipos encontrados.

As amostras de tomates apresentaram diferentes leituras quando analisadas individualmente. Na TABELA 8 estão apresentados as leituras em absorbâncias das variedades de tomates trituradas e analisadas individualmente, antes do preparo da mistura final. São resultados obtidos de tomates que não apresentaram absorbância significativa e coloração amarela proveniente da reação do dissulfeto de carbono com o Reagente de Cullen.

TABELA 8. Estatística descritiva dos resultados das amostras brancas de 2007 e 2008.

|              | <b>2007</b> | <b>2008</b> |
|--------------|-------------|-------------|
| <b>n</b>     | 52          | 35          |
| <b>Média</b> | 0,0056      | 0,0064      |
| <b>DP</b>    | 0,0066      | 0,0074      |
| <b>Var</b>   | 4,42E-05    | 5,43E-05    |
| <b>CV %</b>  | 118,1       | 114,8       |
| <b>Máx</b>   | 0,0266      | 0,0233      |
| <b>Min</b>   | -0,0071     | -0,0084     |

\* n = tamanho da amostra, Média = absorvância média, DP = desvio padrão, Var = variância, CV% = coeficiente de variação em %, Máx = valor máximo, Mín = valor Mínimo.

Em 2007 foram analisadas 52 amostras de tomate em que não foi detectado CS<sub>2</sub> e em 2008 foram 35. As amostras foram de variedades diferentes, oriundas de regiões diferentes e coletadas em meses diferentes. Ao se comparar as médias amostrais das absorvâncias de 2007 e 2008, verificou-se que as médias das absorvâncias não diferiram a 5% de probabilidade, ou seja, pode-se assumir com certa segurança que não são significativamente diferentes a 5% de probabilidade.

Estas amostras foram misturadas e homogeneizadas, sendo então analisadas. A TABELA 9 apresenta os resultados obtidos da análise de 40 amostras desta mistura.

TABELA 9. Estatística descritiva dos resultados das amostras utilizadas como brancos para a validação.

|              | <b>Experimento</b> |
|--------------|--------------------|
| <b>n</b>     | 40                 |
| <b>Média</b> | 0,0068             |
| <b>DP</b>    | 0,0070             |
| <b>Var</b>   | 4,97E-05           |
| <b>CV %</b>  | 104,2              |
| <b>Máx</b>   | 0,0201             |
| <b>Min</b>   | -0,0056            |

\* n = tamanho da amostra, Média = absorvância média, DP = desvio padrão, Var = variância, CV% = coeficiente de variação em %, Máx = valor máximo, Mín = valor Mínimo.

Com este resultado as amostras obtidas da mistura das amostras de 2007 e 2008 foram consideradas brancas para análise de CS<sub>2</sub>, com absorvância máxima encontrada de 0,0201.

A partir destes dados calculou-se o limite de detecção instrumental (LOD<sub>instrumental</sub>), utilizando a média das amostras brancas do experimento mais 3,28 desvios-padrão. Foi adotado o valor de duas vezes 1,64 (3,28) porque é o valor exato de z para o nível de confiança de 95%.

$$\text{LOD}_{\text{instrumental}} = 0,0068 + 3,28 \times 0,0070 = 0,0298$$

O resultado abaixo desse limite não difere do ruído do equipamento, e portanto assume-se que o dissulfeto de carbono não foi detectado.

## 4.2 – PADRÕES

Não houve diferença significativa a 5% de probabilidade, entre as médias das absorvâncias do ponto de 500 µL obtido das soluções de CS<sub>2</sub> preparadas no mesmo dia. A forma de preparo de padrões descrita é adequado para rotina do laboratório. A TABELA 10 apresenta as absorvâncias encontradas para as replicatas das diluições das duas soluções estoques preparadas no mesmo dia, e sua estatística descritiva.

Foram preparadas 25 soluções intermediárias em 2007 e 24 em 2008. O coeficiente de variação das concentrações das soluções intermediárias preparadas foram de 8,86% em 2007 e 4,45% em 2008, demonstrando que o preparo das soluções intermediárias em dias diferentes variaram. A TABELA 11 apresenta as respostas nos anos de 2007 e 2008 e a análise descritiva destes dados.

TABELA 10. Absorbâncias das replicatas das soluções e a estatística descritiva.

| <b>Replicata</b> | <b>SE-A</b> | <b>SE-B</b> |
|------------------|-------------|-------------|
| <b>1</b>         | 0,1815      | 0,1793      |
| <b>2</b>         | 0,1745      | 0,182       |
| <b>3</b>         | 0,1849      | 0,1733      |
| <b>4</b>         | 0,1792      | 0,1805      |
| <b>5</b>         | 0,1798      | 0,1756      |
| <b>N</b>         | 5           | 5           |
| <b>Média</b>     | 0,1799      | 0,1781      |
| <b>DP</b>        | 0,0038      | 0,0036      |
| <b>Var</b>       | 1,43E-05    | 1,29E-05    |
| <b>CV %</b>      | 2,10        | 2,02        |

\* n = tamanho da amostra, Média = absorbância média, DP = desvio padrão, Var = variância, CV% = coeficiente de variação em %, SE = solução estoque.

TABELA 11. Estatística descritiva das soluções intermediárias em 2007 e 2008.

| <b>ANO</b>   | <b>SI (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b> |             |
|--------------|--|-------------|
|              | <b>2007</b>                                  | <b>2008</b> |
| <b>N</b>     | 25   | 24          |
| <b>Média</b> | 134,34                                       | 151,53      |
| <b>DP</b>    | 11,91  | 6,74        |
| <b>Var</b>   | 141,78                                       | 45,39       |
| <b>CV%</b>   | 8,86   | 4,45        |
| <b>Máx</b>   | 151,8  | 159,9       |
| <b>Mín</b>   | 121,0  | 141,5       |

\* n = tamanho da amostra, Média = absorbância média, DP = desvio padrão, Var = variância, CV% = coeficiente de variação em %, SE = solução estoque.



### 4.3 – LINEARIDADE E FAIXA DE CONCENTRAÇÃO

A faixa de trabalho escolhida para a curva de calibração foi de 0,62 a 5,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que corresponde a 0,15 e 1,30  $\text{mg kg}^{-1}$ . Foram realizadas quatro curvas de calibração em quatro dias diferentes. As premissas relativas à linearidade foram atendidas quando se trabalhou com as curvas do Dia 1 com 7 níveis, Dia 2 com 6 níveis, Dia 3 com 7 níveis e a curva do Dia 4 com 8 níveis.

O volume de Solução Intermediária usado no preparo dos níveis da curva foi o mesmo em todos os dias (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800  $\mu\text{L}$ ), porém as concentrações finais foram diferentes. Na FIGURA 2 é possível visualizar as faixas de trabalho de cada curva, após a remoção dos *outliers* e avaliação de todas as premissas.

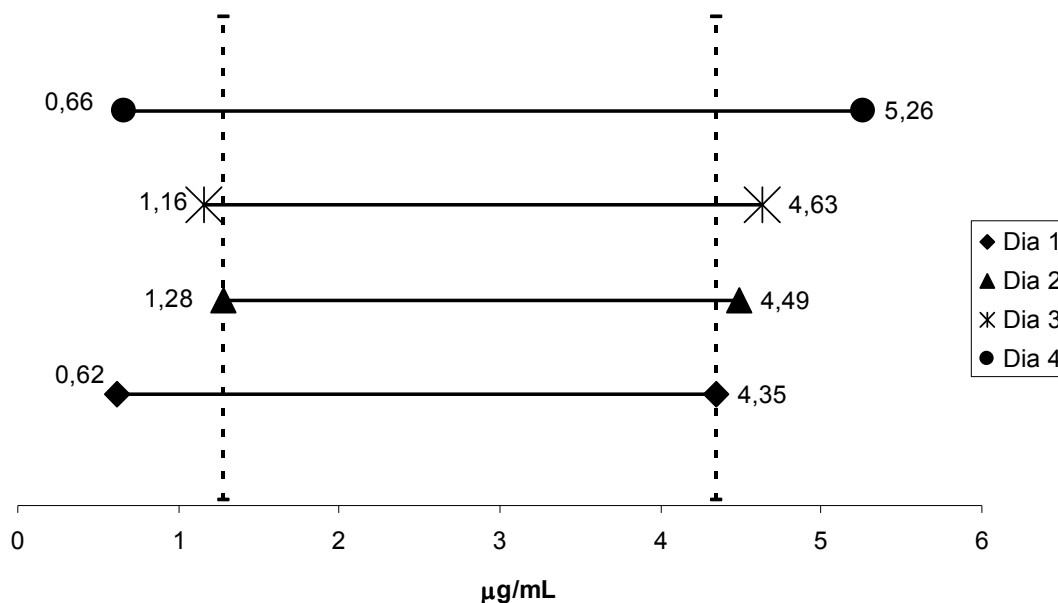


Figura 2 – Faixas de concentração em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das curvas de calibração preparadas nos dias 1, 2, 3 e 4. Dia 1 faixa do nível 1 ao 6; Dia 2 faixa do nível 2 ao 7; Dia 3 faixa do nível 2 ao 8 e Dia 4 faixa do nível 1 ao 8.

Para cada curva após a remoção dos *outliers* foram confirmados que os resíduos da regressão seguiam a distribuição normal, não apresentavam autocorrelação, eram independentes e homoscedásticos. As regressões foram significativas a um  $p < 0,001$  e não houve desvio da linearidade com  $p > 0,05$  em nenhuma delas.

Para o Dia 1 o ajuste ao modelo linear utilizou 7 níveis e 21 pontos. A curva de calibração do Dia 1 apresentou linearidade no nível 1 ao nível 7, que corresponde a faixa de 0,62 a 4,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo removidos 3 *outliers*, um em cada nível dos níveis 3, 5 e 6.

Para o Dia 2 foi possível o ajuste ao modelo linear utilizando 6 níveis e 18 pontos, na faixa do nível 2 ao 7, que correspondeu a faixa de 1,28 a 4,49  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Foram retirados 4 *outliers*, para que as premissas fossem atendidas, uma do nível 4, uma do nível 5 e duas do nível 7.

Já para o Dia 3 trabalhou-se com 7 níveis e 21 pontos, nos níveis de 2 a 8, que correspondeu a faixa de 1,16 a 4,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , removendo 2 *outliers*, um no nível 3 e um no nível 8.

O Dia 4 apresentou o ajuste ao modelo linear utilizando os 8 níveis e 24 pontos. O nível 1 ao 8 neste dia correspondeu a faixa de 0,66 a 5,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para este dia foram encontrados 4 *outliers*: um no nível 2, um no 3, um no 4 e um no 5.

Para todos os dias o teste dos resíduos padronizados Jackknife foi aplicado sucessivamente até que não fossem mais encontrados valores dispersos ou estes quando detectados não afetassem as premissas da regressão, a exclusão destes valores dispersos foi de no máximo de 22,2% dos resultados originais, nenhum resultado extrapolou este limite máximo.

A linearidade foi observada na faixa de 0,62 a 5,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com confirmação de todas as premissas relativas à regressão linear simples. Apesar do ajuste ao modelo linear ser possível nesta faixa, observa-se na FIGURA 3, que existe uma faixa comum a todas as faixas dos 4 dias. Como os valores extremos das curvas de calibração não foram os mesmos, o que era esperado devido a variação no processo de preparo de cada solução estoque, a faixa de trabalho comum a todas as curvas foi de 1,28 a 4,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que corresponde ao maior valor de concentração encontrada para o nível mais baixo e o menor valor encontrado para o nível mais alto presentes em todas as curvas.

Na TABELA 12 encontra-se o resumo dos dados das premissas relativas a cada dia de preparo da curva de calibração.

TABELA 12. Resultados da avaliação da linearidade para as quatro curvas de calibração em solvente, já excluídos os outliers.

| Estatística          | Dia 1   | Dia 2    | Dia 3    | Dia 4   |
|----------------------|---------|----------|----------|---------|
| <i>N</i>             | 21      | 18       | 21       | 24      |
| <i>Nível</i>         | 1 ao 7  | 2 ao 7   | 2 ao 8   | 1 ao 8  |
| <i>R</i>             | 0,9836  | 0,9607   | 0,9612   | 0,9664  |
| <i>p</i>             | > 0,10  | > 0,10   | > 0,10   | > 0,10  |
| <i>d</i>             | 1,915   | 2,011    | 1,950    | 1,699   |
| <i>p</i>             | >0,98   | >0,98    | >0,98    | >0,98   |
| <i>t<sub>L</sub></i> | - 0,136 | -1,508   | 1,559    | 0,543   |
| <i>p</i>             | > 0,05  | > 0,05   | > 0,05   | > 0,05  |
| <i>F</i> (1)         | 2218,53 | 37345,36 | 14807,27 | 1452,68 |
| <i>p</i>             | < 0,001 | < 0,001  | < 0,001  | < 0,001 |
| <i>F</i> (2)         | 2,841   | 1,797    | 1,669    | 1,944   |
| <i>p</i>             | > 0,05  | > 0,05   | > 0,05   | > 0,05  |

*n* = número de observações, *Nível* = faixa dos níveis de concentração; *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (Normalidade), *d* = estatística de Durbin-Watson (Independência), *t<sub>L</sub>* = estatística t de Levene (Homoscedasticidade), *F*(1) = razão entre variâncias (Regressão), *F*(2) = razão entre variâncias (Desvio da Linearidade), *p* = significância

Pelas FIGURAS 3, 4, 5, 6 e 7 é possível fazer a análise visual dos resíduos da regressão e avaliação das premissas do modelo.

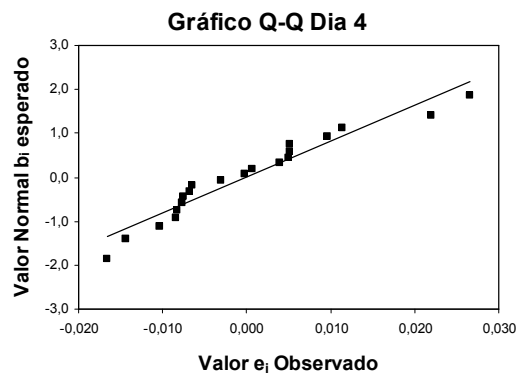
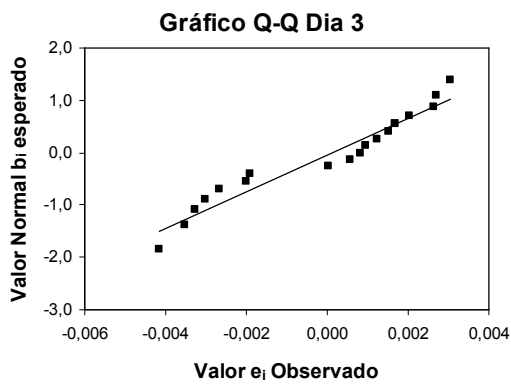
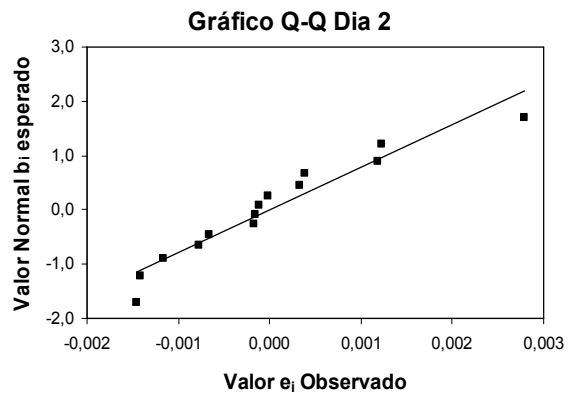
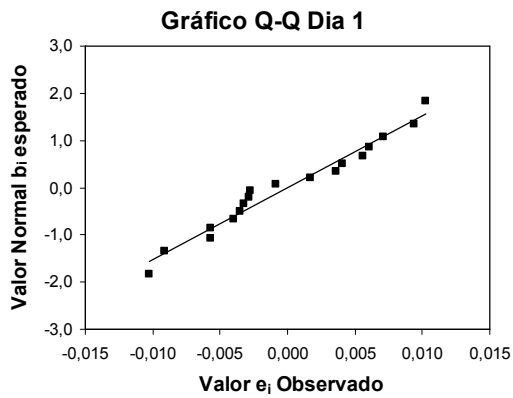


Figura 3 – Avaliação da normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner das quatro curvas em solvente. O gráfico do Dia 1 representa a curva do nível 1 ao 7; o do Dia 2 representa a curva do nível 2 ao 7; o do Dia 3 a curva do nível 2 ao 8; e do Dia 4 do nível 1 ao 8.

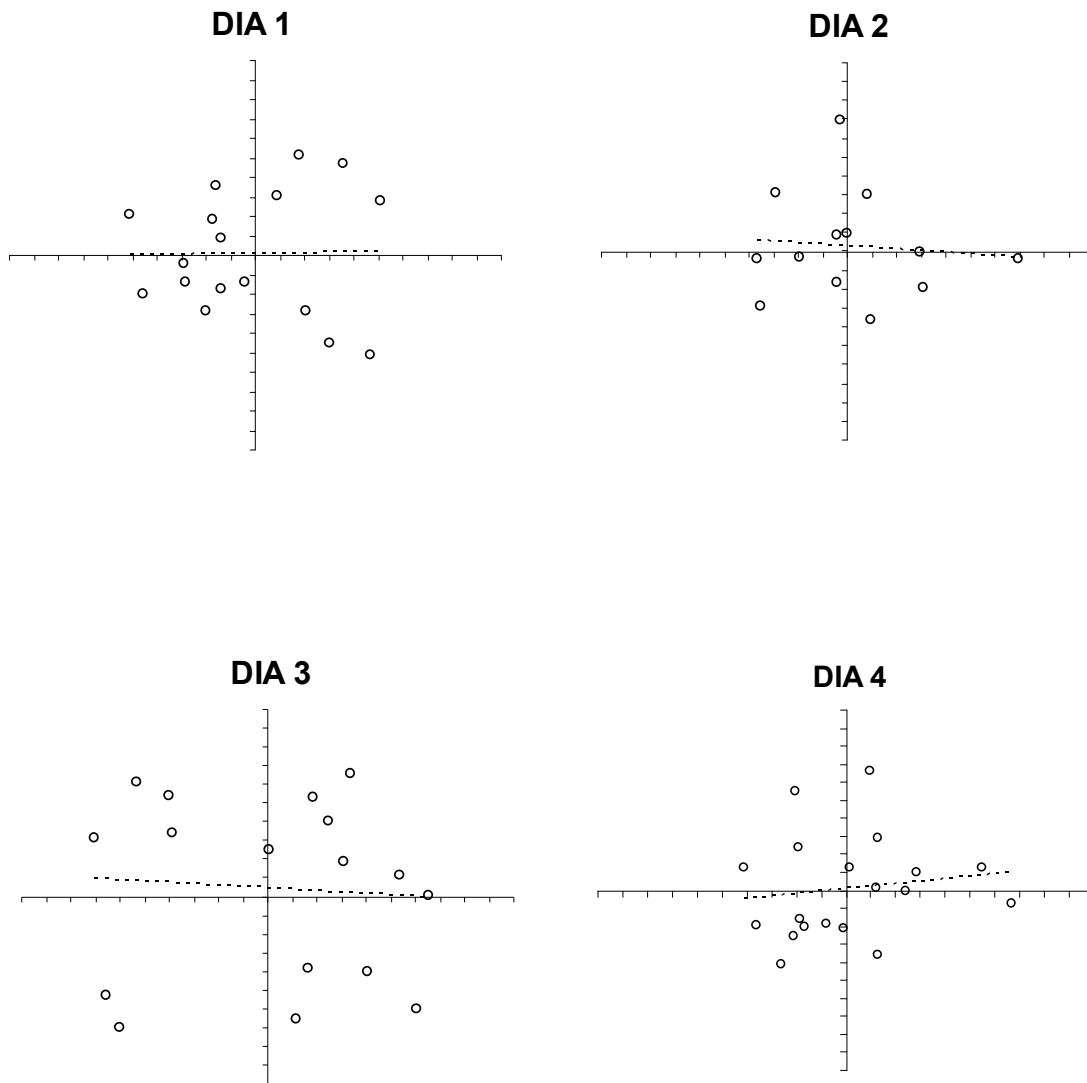


Figura 4 – Avaliação de autocorrelação dos resíduos pelo teste Durbin-Watson das curvas em solvente. O gráfico do Dia 1 representa a curva do nível 1 ao 7; o do Dia 2 representa a curva do nível 2 ao 7; o do Dia 3 a curva do nível 2 ao 8; e do Dia 4 do nível 1 ao 8. (O eixo x representa os valores  $e_i$  e o eixo y os valores  $e_{i-1}$ ).

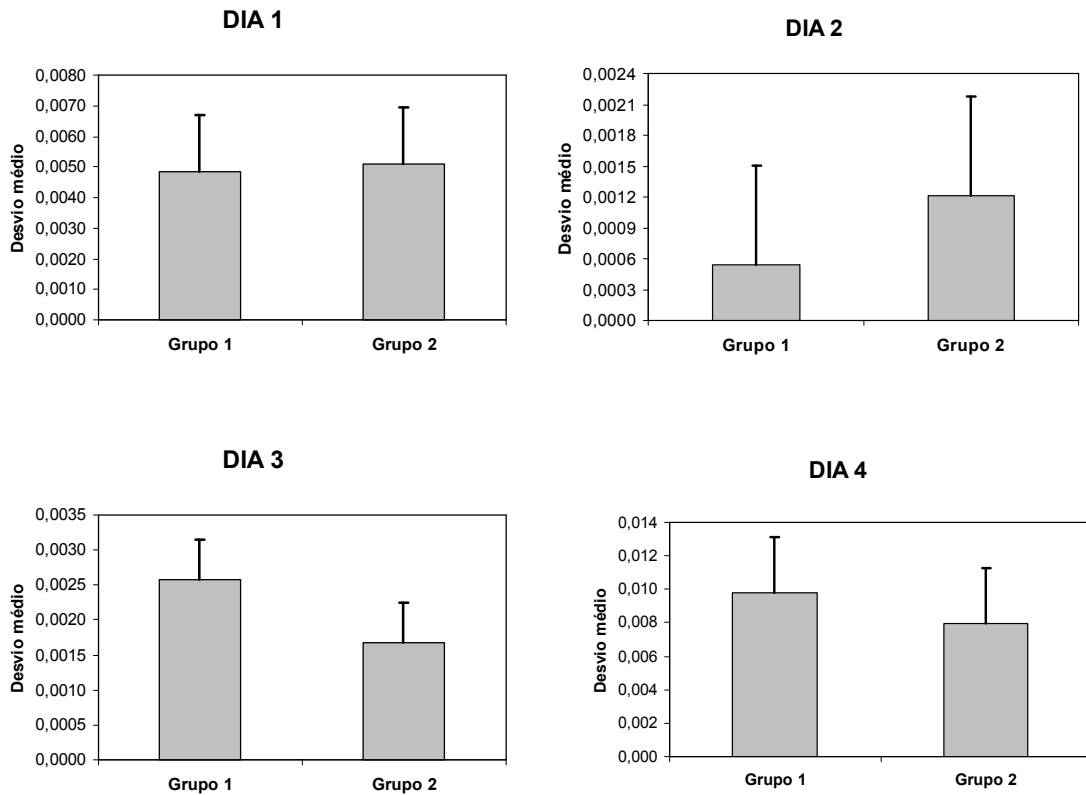


Figura 5– Avaliação da homogeneidade da variância pelo teste de Levene modificado das quatro curvas em solvente. O gráfico do Dia 1 representa a curva do nível 1 ao 7; o do Dia 2 representa a curva do nível 2 ao 7; o do Dia 3 a curva do nível 2 ao 8; e do Dia 4 do nível 1 ao 8. Os desvios médios  $e_i$  foram divididos em 2 grupos de tamanhos iguais, o grupo 1 são os primeiros resíduos e o grupo 2 os restantes.

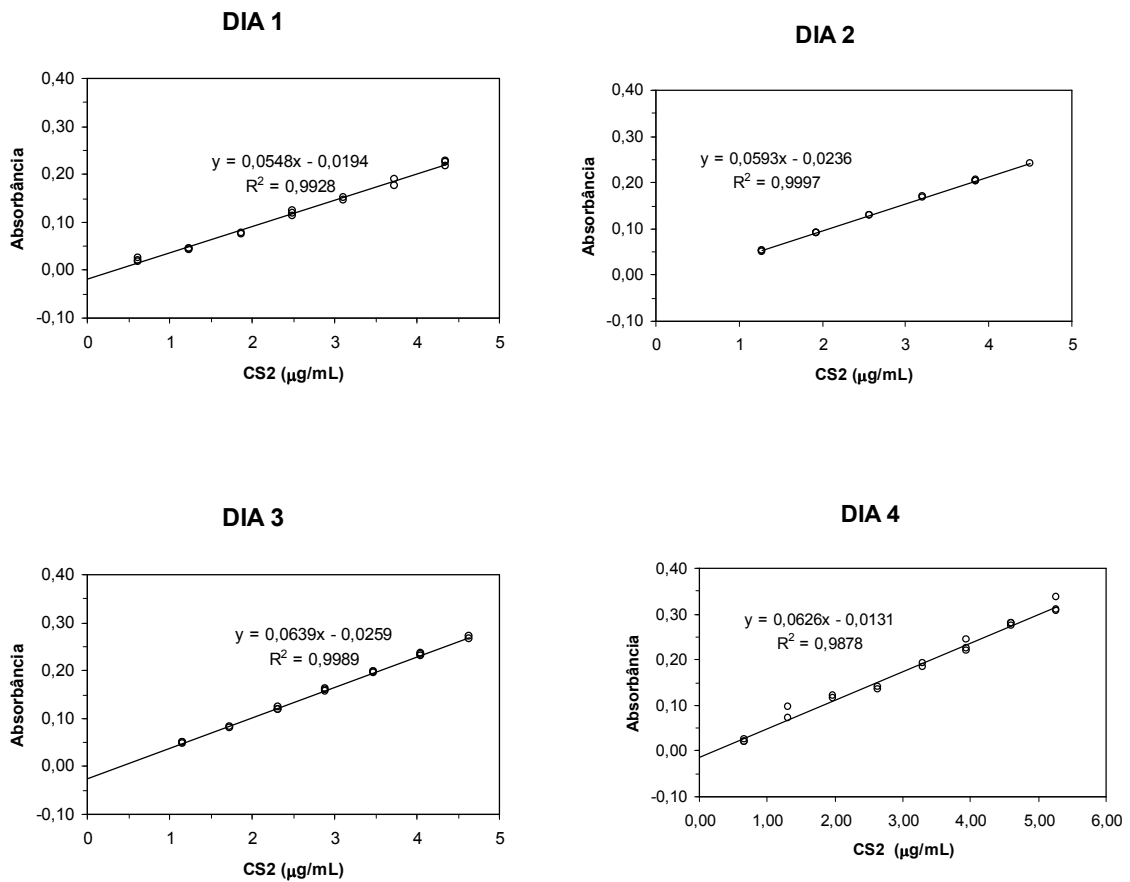


Figura 6– Curvas de regressão linear dos quatros dias em solvente. O gráfico do Dia 1 representa a curva do nível 1 ao 7; o do Dia 2 representa a curva do nível 2 ao 7; o do Dia 3 a curva do nível 2 ao 8; e do Dia 4 do nível 1 ao 8. (y = absorbância, x = concentração em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $R^2$  = coeficiente de determinação)

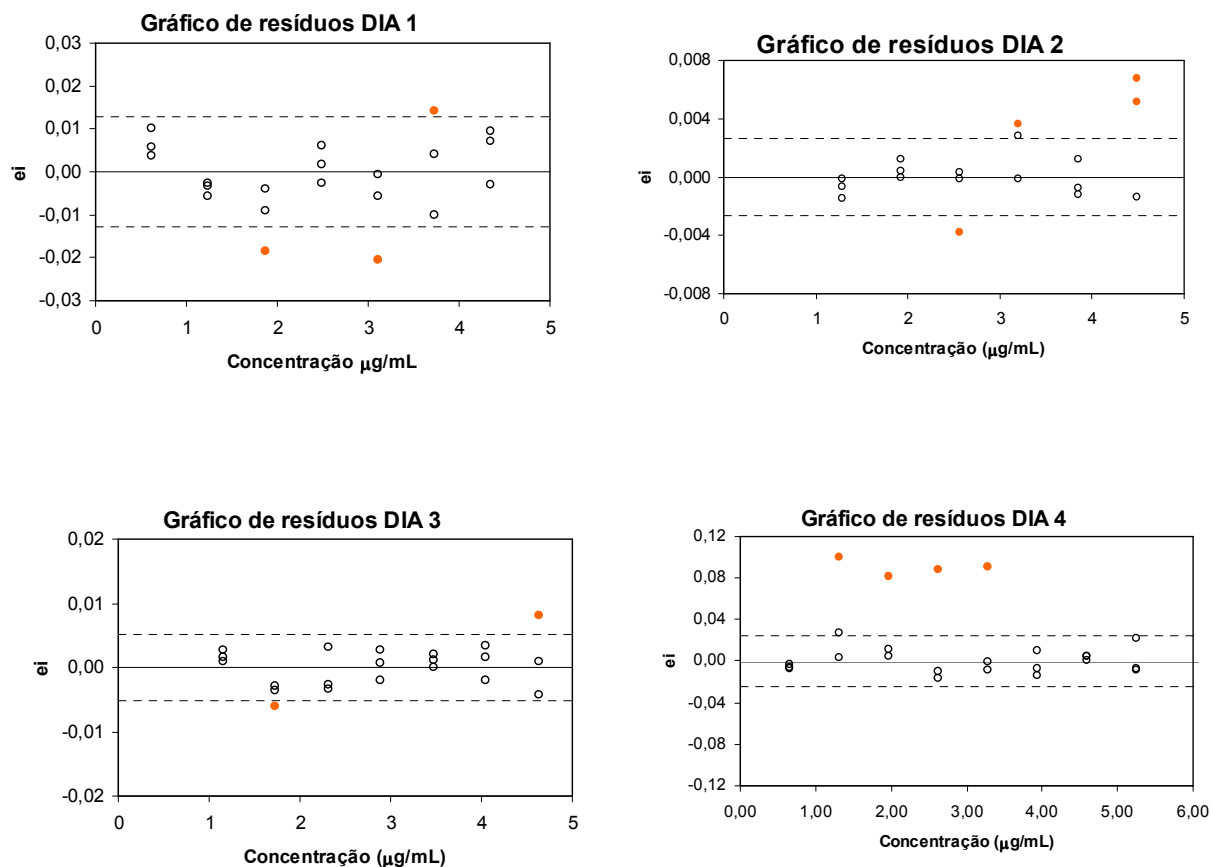


Figura 7 – Gráficos dos resíduos da regressão ( $e_i$ ) das quatro curvas em solventes com destaque para os *outliers* diagnosticados e retirados pelo teste de resíduos padronizados de Jacknife. O gráfico do Dia 1 representa a curva do nível 1 ao 7; o do Dia 2 representa a curva do nível 2 ao 7; o do Dia 3 a curva do nível 2 ao 8; e do Dia 4 do nível 1 ao 8. (As linhas pontilhadas representam o intervalo  $\pm t_{(1-\alpha/2, n-2)}S_{res}$ , sendo  $S_{res}$  o desvio padrão de  $e_i$ ).



## 4.4 – EFEITO DO DIA

Os resultados obtidos demonstraram que houve diferença significativa a 5% de probabilidade entre as inclinações, porém não se pode afirmar que há diferença entre as interseções a 5% de probabilidade (TABELA 13). Considerando que a interseção no método representa a resposta do instrumento na ausência de analito, o resultado obtido era esperado pois o laboratório possui um programa de gestão de qualidade implantado, onde os equipamentos possuem programa de calibração e manutenção preventiva, diminuindo os riscos de variação. O erro humano, as condições climáticas do dia, a volatilidade do CS<sub>2</sub>, e outros fatores não citados, influem no preparo das curvas padrões, e os resultados das inclinações evidenciam este efeito.

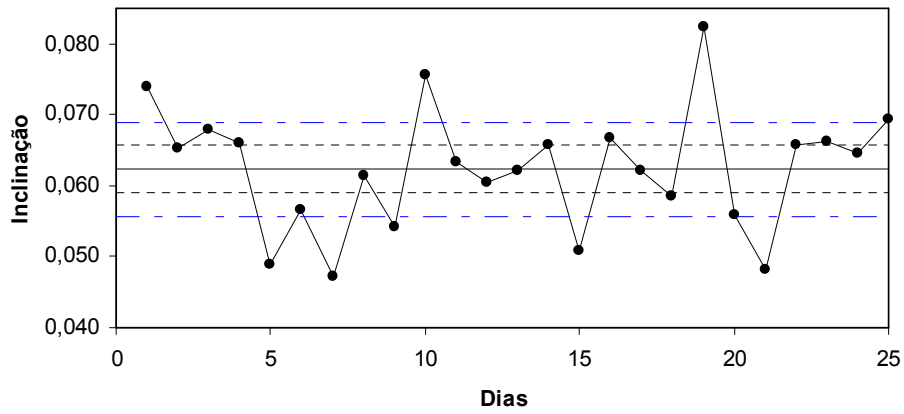
TABELA 13. Comparações das inclinações e interseções obtidas em diferentes dias.

|                    | <b>Contraste</b> | <b>Expressão</b>         | <b>Y</b> | <b>t</b> | <b>p</b> |
|--------------------|------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| <b>Inclinações</b> | Y <sub>A</sub>   | $b_1 - b_2$              | -0,00452 | 2,024    | 0,0472   |
|                    | Y <sub>B</sub>   | $b_1 + b_2 - 2b_3$       | -0,01368 | 3,708    | 0,0004   |
|                    | Y <sub>C</sub>   | $b_1 + b_2 + b_3 - 3b_4$ | -0,00991 | 2,453    | 0,0169   |
| <b>Interseções</b> | Y <sub>A</sub>   | $a_1 - a_2$              | 0,00429  | 0,191    | 0,8490   |
|                    | Y <sub>B</sub>   | $a_1 + a_2 - 2a_3$       | 0,00889  | 0,207    | 0,8367   |
|                    | Y <sub>C</sub>   | $b_1 + b_2 + b_3 - 3b_4$ | -0,02955 | 0,581    | 0,5634   |

\* Var: variância do contraste; DP: desvio padrão do contraste, t :estatística t, p : probabilidade

Confirmando os resultados obtidos com o experimento, na FIGURA 8 e 9 estão as cartas controle para inclinação e interseção das curvas de calibração de 2007 e 2008. Observa-se que em 2007 e 2008 as inclinações obtidas ficaram fora do intervalo de 95% de confiança demonstrando o efeito do dia no preparo das curvas. As interseções obtidas em 2007 estão incluídas no intervalo de 95% de confiança, porém em 2008 duas ficaram fora deste intervalo de confiança evidenciando que pode haver uma variação na resposta do equipamento.

**Distribuição das Inclinações em 2007**



**Distribuição das Inclinações em 2008**

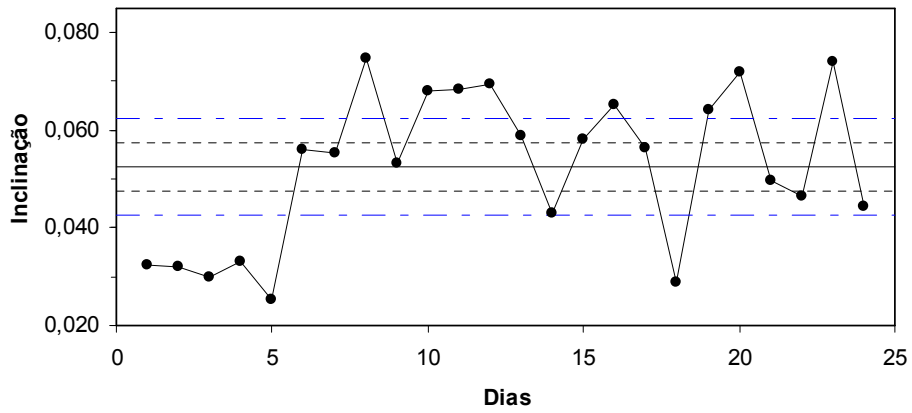
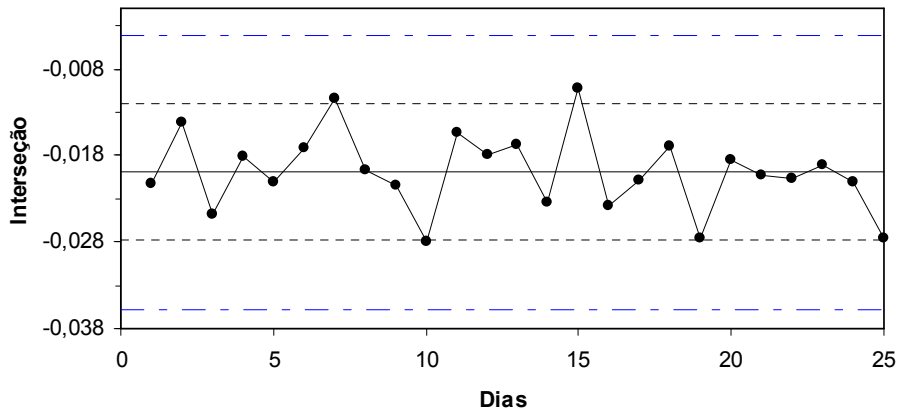


Figura 8 – Cartas controle para inclinação (b) das curvas de calibração referentes aos anos de 2007 e 2008. As linhas pontilhadas são  $b_{\text{médio}} \pm EP$ , e as linhas tracejadas são  $b_{\text{médio}} \pm t_{0,975} EP$ .

**Distribuição das Interseções em 2007**



**Distribuição das Interseções em 2008**

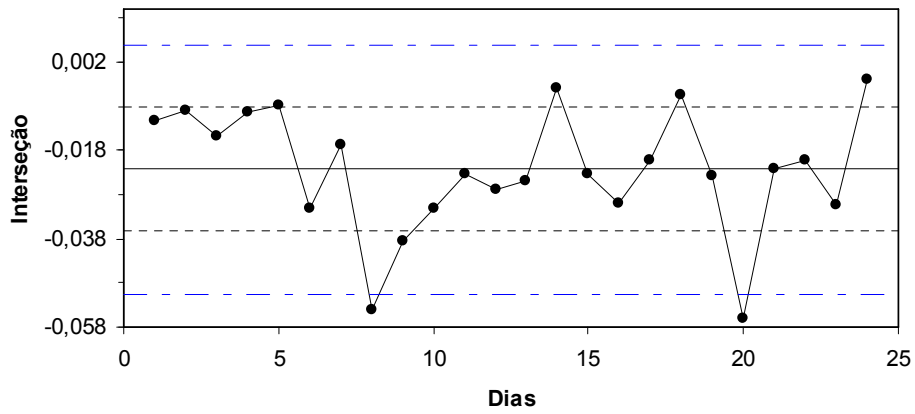


Figura 9 – Cartas controle para interseção (a) das curvas de calibração de 2007 e 2008. As linhas pontilhadas são  $a_{\text{médio}} \pm EP$ , e as linhas tracejadas são  $a_{\text{médio}} \pm t_{0,975} EP$ .

## 4.5 – EFEITO DE MATRIZ

Foi aplicado o teste de resíduos padronizados Jackknife para as curvas em solvente e em matriz. Não foram encontrados *outliers* para a curva preparada em solvente, já na curva preparada em matriz foram encontrados 4, sendo 2 no nível 1, um no nível 5 e um no nível 6.

As premissas relativas ao ajuste do modelo linear foram confirmadas para ambas as curvas. Pelo coeficiente de correlação de Ryan-Joiner os resíduos da regressão de ambas as curvas seguiram a distribuição normal e desvios da normalidade não foram significativos ( $p > 0,05$ ). Independência dos resíduos da regressão foi confirmada pelas estatísticas de Durbin-Watson, sendo a auto-correlação não significativa, ( $p > 0,10$ ) e a homoscedasticidade foi observada pelas estatísticas  $t$  de Levene, demonstrando que não há diferenças significativas entre as variâncias dos desvios ( $p > 0,05$ ). As regressões foram significativas ( $p < 0,001$ ) e os desvios de linearidade foram não significativos ( $p > 0,05$ ) pelos testes de  $F$  da análise de variância.

Com as premissas confirmadas, foi feita a comparação das inclinações e interseções pelo teste de  $t$  para avaliação dos efeitos matriz. O teste de  $F$  confirmou a homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas de solvente e matriz, assim aplicou-se o teste de  $t$  com variâncias combinadas.

As inclinações e interseções das curvas de solventes foram comparadas com aquelas estimadas para as curvas de matriz. Não foram constatadas diferenças significativas a 5% de probabilidade entre as inclinações e as interseções das duas curvas. A TABELA 14 apresenta os dados calculados obtidos a partir das curvas de calibração finais, e os valores da estatística  $t$  com variâncias combinadas.

Não foi observado efeito de matriz, entretanto este resultado deve ser interpretado com cuidado. A hipótese de que não há efeito matriz nas análises espectrofotométricas não foi descartada totalmente. A literatura relata que a formação fitogênica de  $CS_2$  é o maior problema em análises de ditiocarbamatos em vegetais como brócolis, repolho, couve flor e mamão. No estudo foi utilizada uma mistura de vários tipos de tomate, no entanto para a mistura não houve efeito da matriz, o que não significa que em um tipo específico de tomate este efeito não ocorria, além disto, o efeito da matriz ainda pode variar de dia para dia durante o uso na rotina por isto

assume-se esta premissa com ressalvas, e portanto deverá ser constantemente avaliada. (LEHOTAY, 2000).

TABELA 14. Comparações entre as inclinações e interseções das curvas de calibração preparadas em solvente e em matriz.

|                       | <b>Solvente</b> | <b>Matriz</b> |
|-----------------------|-----------------|---------------|
| <b>n</b>              | 18              | 14            |
| <b>Inclinação</b>     | 0,0667          | 0,0705        |
| <b>Interseção</b>     | -0,0358         | -0,0299       |
| <b>p (inclinação)</b> |                 | 0,50794       |
| <b>p (interseção)</b> |                 | 0,6379        |
| $s_c^2$               |                 | 0,0002        |

n = número de pontos da curva, p = probabilidade para inclinações e interseções,  $s_c^2$  = variância combinada

A FIGURA 10 apresenta os gráficos relativos à curva de calibração preparada em solvente e em matriz com as respectivas equações e coeficientes de determinação. São as curvas finais obtidas após a remoção dos *outliers* e com adequação ao ajuste linear, atendendo a todas as premissas.

Como durante o experimento não foi constatado o efeito de matriz, a validação foi realizada desconsiderando o efeito. Mas deve-se assumir este dado com cautela, pois o efeito da matriz sobre os resultados deverá ser constantemente avaliado, tanto para o tomate quanto para outras matrizes. Fatores como efeito do dia, variedade da cultura, estágio de maturação deverão ser considerados em estudos mais específicos.

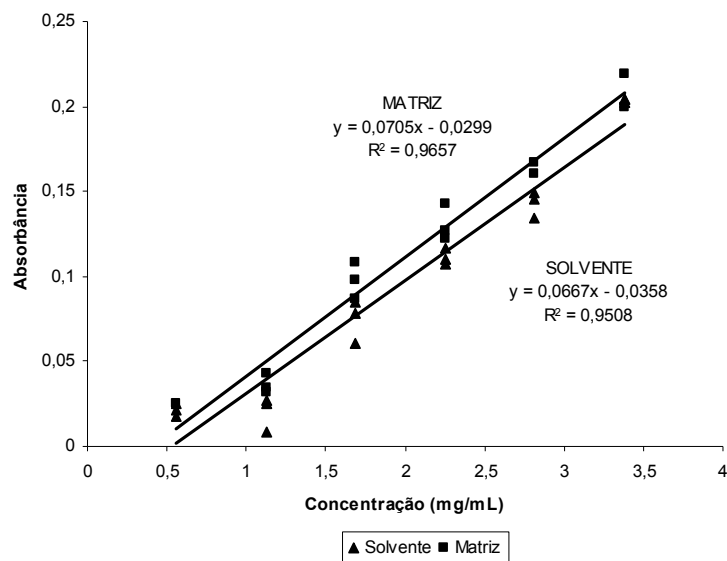


Figura 10 - Gráfico final das curvas de calibração preparadas em solvente e matriz.

#### 4.6 – SELETIVIDADE

Para assegurar a seletividade do método, foram analisadas 40 amostras da mistura de tomates consideradas amostras brancas. As absorbâncias foram variáveis, com média 0,0201, mas todas menores que as absorbâncias obtidas no estudo da linearidade para o menor nível da curva (média 0,0224). As amostras brancas também não apresentaram cor amarela, que é indicativo da presença de CS<sub>2</sub>, ao contrário das amostras contaminadas com o nível mais baixo. Mesmo em concentrações baixas, em torno de 0,6 µg mL<sup>-1</sup> a cor amarela resultante do complexo formado pelo CS<sub>2</sub> e o reagente de Cullen é bastante visível e evidente quando o CS<sub>2</sub> está presente. Para seletividade a resposta indistinguível dos padrões e das amostras adicionadas de padrões foram consideradas suficientes.

O maior problema deste método é a presença de CS<sub>2</sub> fitogênico que pode ocasionar falsos positivos (CRNOGORAC et al, 2009), mas o tomate não está entre as espécies que apresentam esta característica.

## 4.7 – INEXATIDÃO E PRECISÃO

Os resultados de recuperação obtidos foram avaliados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs. Após o diagnóstico dos *outliers* os resíduos obtidos pela diferença entre a recuperação média e os valores individuais de recuperação obtidos em cada dia, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ( $p > 0,10$ ) e homoscedasticidade ( $p > 0,05$ ), quando submetidos ao teste de Ryan e Joiner para normalidade e o teste F de Levene modificado para a homoscedasticidade.

A inexactidão e a precisão seguiram os parâmetros estabelecidos pela Sanco/3131/2007, com aceitabilidade para performance de validação de método na faixa de 70 a 120%, com desvio padrão relativo menor e igual a 20%, respectivamente.

Após confirmação da distribuição normal dos dados e da homoscedasticidade, foi realizada a estimativa dos desvios padrão relativos de repetitividade ( $DPR_r$ ) e do desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) por análise de variância. A TABELA 15 apresenta os dados obtidos.

TABELA 15. Resultados das premissas relativas à recuperação em 3 níveis e conclusão dos testes para inexactidão e precisão do método.

| Parâmetros   | Nível                     | I<br>0,15 mg/kg                       | II<br>0,5 mg/kg                       | III<br>1,0 mg/kg                      |
|--|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Outliers</b>  | Quantidade                | 0                                     | 2                                     | 2                                     |
| <b>Normalidade do resíduo</b>                          | R                         | 0,9851                                | 0,9953                                | 0,9735                                |
|  | p                         | $p > 0,10$                            | $p > 0,10$                            | $p > 0,10$                            |
|  | Conclusão                 | Resíduos seguem a Distribuição Normal | Resíduos seguem a Distribuição Normal | Resíduos seguem a Distribuição Normal |
| <b>Homogeneidade das variâncias dos dias/analistas</b> | R                         | 0,7458                                | 0,8301                                | 0,5324                                |
|  | p                         | $p > 0,05$                            | $p > 0,05$                            | $p > 0,05$                            |
|  | Conclusão                 | Há homoscedascidade                   | Há homoscedascidade                   | Há homoscedascidade                   |
| <b>Inexactidão</b>                                     | Média                     | 166,6                                 | 115,2                                 | 107,8                                 |
|  | Conclusão                 | Há inexactidão                        | Não há inexactidão                    | Não há inexactidão                    |
| <b>Precisão</b>  | Repetitividade            | 10,94                                 | 11,82                                 | 9,26                                  |
|  | Conclusão                 | Há precisão                           | Há precisão                           | Há precisão                           |
|  | Reprodutibilidade parcial | 14,92                                 | 11,82                                 | 9,26                                  |
|  | Conclusão                 | Há precisão                           | Há precisão                           | Há precisão                           |
|  | P                         | $p > 0,05$                            | $p > 0,05$                            | $p > 0,05$                            |

Para o nível I, correspondente a 0,15 mg/kg, pelo teste de Grubbs não foram encontrados *outliers*, os resíduos seguiram a distribuição normal com R de 0,9851 ( $p > 0,10$ ) pelo teste de Ryan e Joiner, e a homocedasticidade foi confirmada pelo teste F de Levene modificado, com R de 0,7458 a um  $p > 0,05$ . Houve inexatidão neste nível pois a média de recuperação de 166,6% ultrapassou a faixa especificada. Porém houve precisão, com a estimativa de desvios padrão relativos de repetitividade ( $DPR_r$ ) de 10,94% e desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) de 14,92%.

Para o nível II, correspondente a 0,5 mg/Kg, pelo teste de Grubbs foram diagnosticados 2 *outliers*, um no Dia 2 do analista 1 e um no Dia 4 do analista 2. Após a remoção dos *outliers*, os resíduos seguiram a distribuição normal com R de 0,9953 ( $p > 0,10$ ) pelo teste de Ryan e Joiner, e a foram homocedásticos pelo teste F de Levene modificado, com R de 0,8301 a um  $p > 0,05$ . Não houve inexatidão neste nível com média de recuperação de 115,2%, valor dentro da faixa especificada. A precisão foi alcançada, com a estimativa de desvios padrão relativos de repetitividade ( $DPR_r$ ) de 11,82% e desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) também de 11,82%, os valores não foram diferentes pois a estimativa da variância de repetitividade e da variância de reprodutibilidade parcial foram consideradas equivalentes, já que a variância de repetitividade foi maior que a variância do ensaio.

Já para o nível III, correspondente a 1,0 mg/kg, o teste de Grubbs identificou 2 *outliers*, um no Dia 1 e um no Dia 2 do analista 1, que foram removidos para a avaliação da normalidade e da homocedasticidade dos resíduos. O teste Ryan e Joiner confirmou a normalidade com o R de 0,9735 ( $p > 0,10$ ) e a homocedasticidade com o R de 0,5324 ( $p > 0,05$ ) foi confirmada pelo teste F de Levene modificado. A média obtida de 107,8% está dentro da faixa estabelecida, por isto o método não apresentou inexatidão neste nível. A estimativa de desvios padrão relativos de repetitividade ( $DPR_r$ ) de 9,26% e de desvios padrão relativos de reprodutibilidade parcial ( $DPR_R$ ) também de 9,26%, conferiram precisão ao método neste nível. Neste caso como no nível II os valores de  $DPR_r$  e  $DPR_R$  foram iguais pois a estimativa da variância de repetitividade e da variância de reprodutibilidade parcial foram consideradas equivalentes, já que a variância de repetitividade foi maior que a variância do ensaio.

Os resultados obtidos dos níveis de recuperação com tomate sinalizaram a possibilidade de extendê-las à outras matrizes, e possivelmente com níveis menores, inclusive com o próprio tomate. O protocolo proposto demonstrou ser possível a



inserção da validação na rotina do laboratório, e a extensão da faixa de trabalho a outras culturas.

#### **4.8 – LIMITES DE DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO, DECISÃO E CAPACIDADE DE DETECÇÃO**

O limite de detecção do método é de  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ . Este foi o nível em que o  $\text{CS}_2$  foi detectado visualmente pela evidência da cor amarela do complexo e apresentou absorvância média de 0,0408 durante a recuperação, valor superior a 3 vezes às médias do branco do experimento, e das médias dos anos de 2007 e 2008. O valor foi maior que o limite de detecção instrumental de 0,0298. Embora os cálculos de limites de detecção sejam diferentes é importante ressaltar que obtê-lo pela recuperação é mais seguro, já que foi neste nível que houve evidências da presença do  $\text{CS}_2$ , houve precisão, mas não houve exatidão não sendo possível quantificá-lo com segurança.

Para o limite de quantificação foi considerado a menor concentração do analito determinada com precisão e exatidão sob as condições estabelecidas no teste, ou seja, concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (THOMPSON et al., 2002). Neste caso o limite de quantificação do método foi de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , que é o nível mais baixo em que ocorreu precisão e exatidão aceitáveis.

Na literatura para métodos espectrofotométricos são encontrados valores para limites de detecção de  $0,28 \text{ mg kg}^{-1}$  e quantificação de  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  (SILVA, 2005), de  $0,03$  e  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  (ARAÚJO et al., 2004),  $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$  (CALDAS, 2004). Os valores encontrados na validação do presente trabalho estão próximos dos valores da literatura, ressaltando que o protocolo de validação adotado foi mais rigoroso e aplicado somente a uma cultura, podendo ainda ser reavaliado para outras culturas, outros materiais de referência e ainda adotando um protocolo de validação menos rigoroso.

Para os cálculos de limite de decisão e capacidade de detecção, foram considerados o LMR de  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$  para tomate, assim o limite de decisão foi de  $2,44 \text{ mg Kg}^{-1}$  e a capacidade de detecção  $3,00 \text{ mg Kg}^{-1}$ . (ANVISA, 2007)

## 5 – CONCLUSÕES

Para validação intralaboratorial do método espectrofotométrico os parâmetros de desempenho avaliados indicaram adequação para uso na análise de resíduos de ditiocarbamatos em tomate atendendo à legislação vigente no Brasil.

A linearidade do método foi obtida na faixa de 0,62 a 5,26  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com confirmação do efeito do dia e ausência de efeitos de matriz nos estudos realizados. Após a remoção dos *outliers* esta faixa é linear em todos os dias sendo possível usá-las para outras matrizes, fato já demonstrado por SOUZA et al. (2005), porém para o presente experimento a faixa de 1,28 a 4,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentou linearidade com remoção de menor número de *outliers* ou, em alguns casos, de nenhum.

O limite de detecção foi de 0,15  $\text{mg kg}^{-1}$  e o limite de quantificação de 0,5  $\text{mg kg}^{-1}$ . A média de recuperação foi de 115,2 %, confirmando que não houve inexatidão. O método apresentou precisão aceitável, com desvios padrão relativo de 11,82%. sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial. Para o LMR de 2,0  $\text{mg kg}^{-1}$  (ANVISA, 2007) o limite de decisão foi de 2,44  $\text{mg kg}^{-1}$  e a capacidade de detecção 3,00  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Os limites de detecção e quantificação encontrados na validação atendem com segurança a legislação brasileira em vigor.

O método é simples, de baixo custo e sensível, podendo ser usado como método de triagem e quantificação.

## 6 – SUGESTÕES

Preparar diariamente as curvas de calibração na faixa de 1,28 a 4,35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pois foi a faixa comum a todas as curvas de calibração dos 4 dias do delineamento para a linearidade, porém não significa que em novos experimentos esta faixa se amplie.

Extender o escopo à outras matrizes aplicando o mesmo protocolo de validação utilizado neste trabalho, inclusive para outras matrizes representativas que apresentam

formação fitogênica de CS<sub>2</sub>. Podendo se limitar a realização apenas dos testes de efeitos de matriz, recuperação, precisão e os limites, mantendo as mesmas faixas de trabalho.

Aplicar o mesmo protocolo a outros laboratórios para harmonizar os resultados das análises de ditiocarbamatos, e utilizá-los para o aperfeiçoamento de programas de monitoramento de resíduos e ainda, através dos resultados orientar consumidores, comerciantes e produtores quanto ao consumo do alimento seguro e do uso correto dos agrotóxicos.

## **7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABAKERLI, R. B. ; FAY, E. F. ; LUIZ, A. J. B. ; RODRIGUES, N. R. ; TOLEDO, H. H. B.; MEDINA, V. M. . Tolerância para Resíduos de EBDCs em Culturas com Geração Fitogênica de CS<sub>2</sub>. In: TERCER CONGRESO VIRTUAL IBEROAMERICANO SOBRE GESTIÓN DE CALIDAD EN LABORATORIOS, 2005, Madri. 2005. Anais... p. 365-368.

AMARAL, E. H. Determinação de Organofosforados: Validação de Método e Ocorrência de Resíduos em Produtos Agrícolas no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007.135 p (Dissertação, mestrado em Ciências de Alimentos).

ANTIGNAC, J.P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” european decision: guideline and application. Anal. Chim. Acta, v. 483, p. 325-334, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Controlando agrotóxicos nos alimentos. Relatório de Atividades, 2001 – 2004. Maio 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 15 de agosto de 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em 2 de agosto de 2007a.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografia/index.html>>. Acesso em 2 de agosto de 2007b.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Sistema de Informação sobre Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/sia.html>>. Acesso em 28 de setembro. 2007c.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Relatório Anual – 2001-2006. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos>. Acesso em 20 setembro 2007d.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Toxicologia. 2001-2006. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias.index.html>. Acesso em 20 setembro 2007e.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). AOAC Peer-verified methods program. Manual on polices and procedures. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 1998. 35 p.

ARAÚJO, A.C.P.; TELLES, D.L.; LIMA, L.L.A.; SILVA, M.; DE KOK, A. Dithiocarbamates in Fruits and Vegetables: a Comparative Study Between Chromatographic and Spectrophotometric Techniques In: 5TH EUROPEAN PESTICIDE RESIDUES WORKSHOP - PESTICIDES IN FOOD AND DRINK. anais, 234 p., Estocolmo, 2004.

BRANDIMAGETETEROVÁ E., LEHOTAY J., LIIMAGEKA O. GARAJ J. High-performance liquid chromatographic determination of dimethyldithiocarbamate residues in some agricultural products. Journal of Chromatography A Volume 354 p. 375-381, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei n. 7802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte o armazenamento a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e seus componentes e afins. Diário Oficial da União, Brasília, 12 jul. 1989, p. 11352-11415.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal (DDIV), Coordenação de Fiscalização de Agrotóxicos (CFA), Software: Agrofit, Brasília, 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n. 4074 de 4 de Janeiro de 2002. Regulamenta a Lei 7802 de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da União, Brasília, 8 jan. 2002b, p. 1-12.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa número 42 de 31 de dezembro de 2008. Institui o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal. Diário Oficial da União. Brasília, 05 de janeiro de 2009, Seção 1, p. 2.

BRUCE, P.; MINNKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim. Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. *LC GC*, p. 19-24, 2001.

CALDAS, E. D., CONCEIÇÃO, M. H., MIRANDA, M. C. C., SOUZA, L. C. K. K., LIMAS, J. F. Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues in Food by a Spectrophotometric Method Using a Vertical Disulfide Reaction System. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, n. 10, p. 4521-4525, 2001.

CALDAS, E. D., MIRANDA, M. C. C., CONCEIÇÃO, M. H., SOUZA, L. C. K. K. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. *Food and Chem. Toxic.*, v. 42, p. 1877-1883, 2004.

CAMPANHOLA, C. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: Fórum Nacional de Secretários da Agricultura, Ministério do Meio Ambiente. Programa de Defesa Ambiental Rural. Textos orientadores. Belo Horizonte: MMA, 2001. p 7-26.

CESNIK, H. B., GREGORCIC, A. Validation of the Method for the Determination of Dithiocarbamates and Thiuram Disulphide on Apple, Lettuce, Potato, Strawberry and Tomato Matrix. *Acta Chim. Slov.*, v. 53, p 100–104, 2006.

CODEX - Codex Alimentarius Commission. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. FAO/WHO: Rome. CAC/GL 33-1999.

CODEX - Codex Alimentarius Commission. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. FAO/WHO: Rome. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003.

COLLIS, C. H. COLLINS, G. L. B. Introdução a métodos cromatográficos.1993. Campinas: Editora da UNICAMP,1993. 280 p.

CRNOGORAC, G.; SCHWACK, W. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides.

Trends in Analytical Chemistry, 28, 40 -50. 2009.

CULLEN, T. E. Spectrophotometric determination of dithiocarbamate residues on food crops. Analytical Chemistry 36, 221–224. 1964.

DE KOK, A., van BODEGRAVEN, P. The determination of dithiocarbamate pesticides in fruits, vegetables and cereals via iso-octane extraction of carbondisulfide and subsequent GC–ECD. Food and Chemical Toxicology v 42 p 1877–1883 , 2000.

DE KOK, A., van BODEGRAVEN, P. The determination of dithiocarbamate pesticides in fruits, vegetables and cereals via iso-octane extraction of carbondisulfide and subsequent GC–ECD. In: 4th European Pesticide Residue Workshop – Pesticides in foods and drink, Anais, 319p., Roma, 2002

EKROTH, S. B., OHLIN, B., ÖSTERDAHL, B. Rapid and Simple Method for Determination of Thiram in Fruits and Vegetables with High Performance Liquid

Chromatography with Ultraviolet Detection. J. Agric. Food Chem., v 46, p 5302-5304. 1998.

EURACHEM. Guide to Quality in Analytical Chemistry – Na Aid to Accreditation, 2002. 57 p

EURACHEM. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, 1998. 61p

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, L 221/8, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on residue analytical methods (doc. SANCO/825/00) rev. 17 March 2004. Disponível em: <[http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications\\_en.htm](http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm)>. Acesso em 28 de novembro de 2007.

EUROPEAN COMMISSION -EC. COMMISSION DIRECTIVE 2007/57/EC of 17 September 2007 amending certain Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards maximum residue levels for dithiocarbamates. Official Journal of the European Communities, 2007, 243/61-70.

EUROPEAN COMMISSION. Quality control procedures for pesticide residues analysis (Doc. SANCO/2007/3131), 31 October 2007. Disponível em: <[http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications\\_en.htm](http://www.europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm)>. Acesso em 28 de Janeiro de 2008.



FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations. Pesticides residues in food, 1993. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues. Rome: FAO, 1994.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Plant and Dairy Foods and Beverages. Pesticide Analytical Manual (PAM), 3 ed., 1994, Washington: FDA, Updated October, 1999.

FRIEDRICHS, K, WINKELEr, H.D, GERHARDS, P., Determination of dithiocarbamate residues in foodstuff by head space gas chromatography and flame photometric detection. Z. Lebensm Unters Forsh. V. 201, 69–73. 1995.

GARCINUNO, R. M.,FERNANDEZ-HERNANDO, P., CAMARA, 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, p 225 -229. 2004.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. Technometrics, v. 11, p. 1-21, 1969.

GUSTAFSSON, K. H.; THOMPSON, R. A. High-pressure liquid chromatographic determination of fungicidal dithiocarbamates. J. Agric. Food Chem., v 29, p 729-732. 1981

GUSTAFSSON, K. H.; THOMPSON, R. A. Determination of Dithiocarbamate Fungicides in Vegetable Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography J. Agric. Food Chem., 31, 461-463. 1983

HAYAMA, T., YADA K., ONIMARU, S., YOSHIDA H., TODOROKI, K. NOHTA, H. , YAMAGUCHI, M., Simplified method for determination of polycarbamate fungicide in water samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry following derivatization with dimethyl sulfate. Journal of Chromatography A, v .1141, p. 251–258. 2007

HORWITZ, W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., v. 63, p. 1344-1355, 1980.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. LC/GC International,p. 96-105, 1998.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003 - Aquisição alimentar domiciliar per capita. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002/quisicao/default.shtm>. Acesso em 16 de outubro de 2009.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 2. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 25 p.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005. 28 p.

JUNQUEIRA, R. G., AMARAL, E. H. ; GOULART, S. R. ; CARVALHO, S. V. ;. Carbon Disulfide Method for Determination of Dithiocarbamate Residues in food: Linearity Assessment. In: 60 SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2005, Campinas - SP. 2005.

- KAZOS, ELIAS A., CONSTANTINE D Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*. v. 68, p. 2104–2110. (2007)
- KEPPEL, G. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *J. Assoc. Off. Anal.Chem.*, v. 52, p.162-167. 1969
- KEPPEL, G.E. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate. Residues by a modified carbon disulfide evolution method. *Journal of AOAC* 54, 528–532. 1971
- KESARI, R. GUPTA V. K Sensitive spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamate fungicide and its application in environmental samples *Talanta* Volume 45 (6), p. 1097-1102 1998
- KONTOU, S. TSIPI, D. OREOPOULOU, V. TZIA, C. Determination of ETU in Tomatoes and Tomato Products by HPLC-PDA. Evaluation of Cleanup Procedures. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (5), 2152 -2158, 2001.
- LEHOTAY, S.J. AOAC International collaborative study on the determination of pesticide residues in non fatty foods by supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. In: FAJGELP, A.; AMBRUS. A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p.89-99, 2000.
- LEMES, V. R. R. Avaliação de Resíduos de Ditiocarbamatos e Etilenotiouréia (ETU) em Fruta e sua Implicação na Saúde Pública e Ambiental. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2003. 129p. (Dissertação, Mestrado em Saúde Pública)

- LISHAUT H. V. SCHWACK W. Selective Trace Determination of Dithiocarbamate Fungicides in Fruits and Vegetables by Reversed-Phase Ion-Pair Liquid Chromatography with Ultraviolet and Electrochemical Detection. *Journal of AOAC International* Volume: 83 (3) p. 720-727. 2000.
- LO, C. C., HO M., HUNG, M. Use of High-Performance Liquid Chromatographic and Atomic Absorption Methods To Distinguish Propineb, Zineb, Maneb, and Mancozeb Fungicides. *J. Agric. Food Chem.* v. 44, p. 2720-2723. 1996.
- LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Dinâmica de Agrotóxicos no Ambiente. In: Fórum Nacional de Secretários da Agricultura, Ministério do Meio Ambiente. Programa de Defesa Ambiental Rural. Textos orientadores. Belo Horizonte: MMA, 2001. p 27-43.
- MACHADO, C. P. Estimativa do risco da ingestão de a resíduos de agrotóxicos em hortifrutícolas comercializados em Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG. 2004. 153 p. (Dissertação, mestrado em Ciências de alimentos).
- MALIK, A. K. Direct Spectrophotometric Determination of Ferbam (Iron (III) Dimethyldithiocarbamate) in Commercial Sample and Wheat Grains Using 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline. *J. Agric. Food Chem.* Vol 48, p. 5808-5811, 2000.
- MAROTO, A.; RIU, J.; BOQUÉ, R.; RIUS, F.X. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 173-185, 1999.
- MATHEW, L.T. RAO C. S. P. IYER A. D. Damodaran Spectrophotometric determination of ziram (dithiocarbamate fungicide) by thiocyanate and rhodamine 6G method 10 March 2000. *Talanta* Volume 42(1), p 41-43 1995.

- NAKAZAWA H TSUDA, Y., ITO, K., YOSHIMURA, Y., KUBO, H., HOMMA, H:  
Determination of dithiocarbamate fungicides by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27 ( 4) p.705-713. 2004
- NEWSOME, W. H. A Method for Determining Ethylenebis (dithiocarbamate) Residues on Food Crops as Bis (trifluoroacetamido) ethane. *J. Agr. FoodChern.* v. 22, nº. 5, p 886-889. 1974.
- PEASE, H. L., HOLT, R. F. Manganese Ethylenebis (dithiocarbamate) (Maneb)/ Ethylenethiourea (ETU) Residue Studies on Five Crops Treated with Ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) *J. Agric. Food Chem.* v. 25, no. 3, p. 561-567. 1977.
- PECHÁČEK, R.; VELISEK, J.; HRABCOVA, H. Decomposition Products of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solutions. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4584-4588, 1997
- PEREIRA, E.C. Resíduos de fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos em frutas e outros produtos de origem vegetal. *Rev. Soc. Bras. Toxicol*;1(1/2):41-3, jan.-jun. 1988.
- PIZZUTTI, I. R. ; SILVA, R. ; VARELI, C. S.; ZANELLA, R. ; ADAIME, M. ; KOK, A. . Analytical method validation for dithiocarbamates residues determination in soybeans, comparing flame photometric and mass spectrometry detections and the influence on cleanup. In: 1ST LATIN AMERICAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP (LAPRW), 2007, Santa Maria. 2007
- POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A.* v. 1158, p. 241-250. 2007.

- RODMAN, J.E.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; SYSTMA, K. J.; KAROL, K. G. Parallel Evolution of Glucosinolate Biosynthesis Inferred from Congruent Nuclear and Plastid Gene Phylogenies. *American Journal of Botany* 85 (7) : 997–1006. 1998
- ROYER, A.; MENAUD, M.; GRIMAULT, A.; Communal, P. Y. Development of automated headspace gas chromatography determination of dithiocarbamates in plant matrixes. *J. Agric. Food Chem.* v 49, p 2152-2158. 2001.
- SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L.; COSTA, J.B.N.; CAIXEIRO, J.M.R. Compostos ditiocarbamatos pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Quim. Nova*, v. 30, no. 1, p. 159-170, 2007
- SEIZIOGA. Fundamentos de toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu.Editora, 2003. p. 474.
- SHARMA, V. K. S. AULAKH J.S. MALIK A.K. Fourth derivative spectrophotometric determination of fungicide (tetramethyldithiocarbamate) using sodium molybdate and its application. *Food Chemistry*. v. 47, p 1524-1529. 2004.
- SILVA ,R.C. Comparação entre Métodos Cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD E GC-MS, e Espectrofotométrico para Determinação de Ditiocarbamatos em Alface.Santa Maria: Universidade Federal De Santa Maria - Química .2005 90p. (Dissertação, Mestrado em Química).
- SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Dados do mercado. Disponível em <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em 15 de julho de 2007.

SKOOG, D. A. WEST, D. M. HOLLER, F. J. CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. 8 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006. 1083 p.

SNEDECOR G.W.; COCHRAN W.G. Statistical methods. 8 ed. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.

SOUZA, S. V. C. Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p (Tese, Doutorado em Ciências de Alimentos).

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. Anal. Chim. Acta, v. 552; p. 25-35, 2005.

STERTZ, S. C. FREITAS, R. J. S. Teor de Dissufeto de Carbono em Agrião D'água (Nasturtium officinale) Obtido pelos Sistemas de Cultivo Orgânico, Convencional e Hidropônico. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, jan./dez. 2003. p 45-52

STOPPELLI, I. M.B.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. Ciênc. Saúde Coletiva, v. 10, suplemento Set/Dez, 2005.

SZOLAR, O. H. J. Environmental and pharmaceutical analysis of dithiocarmates. Analytica Chimica Acta, No. 582, p. 191-200, 2007.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst, v.125, p. 385-386, 2002.

USDA - United States Department of Agriculture. Pesticide Data Program (PDP). Disponível em <http://www.ams.usda.gov/science/pdp>. Acesso em 07 de fevereiro de 2007.

VAN LOCO, J.; BEERNAERT, H. An alternative method validation strategy for the European Decision 2002/657/EC. In: PROCEEDINGS OF EUROPEAN FOOD CHEMISTRY, 12, 2003. Proceedings... Brugges: European Food Chemistry, 2003. p. 91-94.

VAN OVERMEIRE, I.; VAN LOCO, J.; ROOS, P.; CARBONNELLE, S.; GOEYENS, L. Interpretation of CALUX results in view of the EU maximal TEQ level in milk. *Talanta*, v. 63, p. 1241-1247, 2004.

VRYZAS, Z. PAPADAKIS E. N., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Microwave-Assisted Extraction (MAE)-Acid Hydrolysis of Dithiocarbamates for Trace Analysis in Tobacco and Peaches. *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 2220-2226, 2002.

WEISSMAHR, K. W., HOUGHTON, C. L., SEDLAK, D. L. Analysis of the Dithiocarbamate Fungicides Ziram, Maneb, and Zineb and the Flotation Agent Ethylxanthogenate by Ion-Pair Reversed-Phase HPLC. *Anal. Chem.*, v. 70, 4800-4804. 1998.

WILLETTS, P.; WOOD, R. A critique on available in-house method validation documentation. In: FAJGELP, A.; AMBRUS, A. Principles and practices of method validation. In WORKSHOP ON THE PRINCIPLES AND PRACTICES OF METHOD VALIDATION, nov. 1999, Budapest, Hungary. Royal Society of Chemistry, n. 256, p. 253-295, 2000



WOODROW, J. E.; SEIBER, J. N. Analytical method for the dithiocarbamate fungicides ziram and mancozeb in air: preliminary field results. J. Agric. Food Chem, v 43, p 1524-1529. 1995.

YODEN, W.J.; STEINER, E.H. Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. Statistical techniques for collaborative tests. Arlington: AOAC, 1975. 88 p.