

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DENISE CARVALHO MELLO**

**DETERMINAÇÃO DOS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS  
ETILENOBISDITIOCARBAMATOS (EBDC) E PROPINEBE EM ALIMENTOS POR  
HPLC-UV**

BRASÍLIA

2014

**DENISE CARVALHO MELLO**

**DETERMINAÇÃO DOS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS  
ETILENOBISDITIOCARBAMATOS (EBDC) E PROPINEBE EM ALIMENTOS POR  
HPLC-UV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Eloisa Dutra Caldas

Co-orientador: Dr. Carlos Martín Infante  
Córdova

Brasília  
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

### Catálogo da publicação.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1019136.

M527d	Mello, Denise Carvalho. Determinação dos fungicidas ditiocarbamatos etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e propinebe em alimentos por HPLC-UV / Denise Carvalho Mello. -- 2014. xxi, 98 f. : il. ; 30 cm.  Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014. Inclui bibliografia. Orientação: Eloisa Dutra Caldas ; Co-orientação: Carlos Martín Infante Córdova.  1. Fungos na agricultura. 2. Ditiocarbamatos. 3. Alimentos. I. Caldas, Eloisa Dutra. II. Infante Córdova, Carlos Martín. III. Título.  CDU 632.952
-------	---

**DENISE CARVALHO MELLO**

**DETERMINAÇÃO DOS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS  
ETILENOBISDITIOCARBAMATOS (EBDC) E PROPINEBE EM ALIMENTOS POR  
HPLC-UV**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08 de dezembro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

**PRESIDENTE:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eloisa Dutra Caldas  
Membro Interno do Programa  
Universidade de Brasília

**MEMBROS:**

---

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello  
Membro Externo do programa  
Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Hosana Conceição  
Membro Externo do Programa  
Universidade de Brasília

**SUPLENTE:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Ribeiro de Souza  
Membro Externo do Programa  
Universidade de Brasília

*Aos meus pais, com amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, em especial aos meus pais pelo apoio, carinho e motivação.

À professora Eloisa pelas oportunidades, ensinamentos, orientação e confiança no meu trabalho, mesmo em momentos em que eu não acreditei na minha capacidade.

Ao professor Carlos Infante pelos ensinamentos, conselhos e pelo incentivo durante a realização desse trabalho.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Maria Hosana Conceição e Dr. Mauricio Homem de Mello por terem aceitado o convite de participação da banca e pelas contribuições.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Andreia por ter me incentivado a iniciar esse trabalho.

A todos os colegas do LabTox-UnB pelo convívio, auxílio e apoio.

À Mariana pela ajuda com as análises e pelo grande apoio dado durante a realização do trabalho e nas etapas finais. Obrigada pelos conselhos, convivência e por ter estado presente nesses momentos.

À Érica pelas análises das amostras e pela ajuda, convívio e troca de conhecimentos.

À Patricia pela ajuda com o equipamento, incentivo, ensinamentos e conselhos.

Ao David e à Rebecca pela ajuda com a otimização e validação dos métodos.

À Dhébora pela amizade de tantos anos.

Aos meus amigos que me apoiaram mesmo estando longe.

A todos que de alguma forma estiveram presentes e que sempre acreditaram que eu fosse conseguir finalizar esse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xix
RESUMO.....	xx
ABSTRACT .....	xxi
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
1. História dos fungicidas.....	2
1.1. A descoberta dos ditiocarbamatos.....	2
2. Os fungicidas ditiocarbamatos .....	3
2.1. Química dos ditiocarbamatos .....	3
2.2. Limites Máximos de Resíduos (LMR) para os ditiocarbamatos .....	7
3. Toxicidade dos fungicidas ditiocarbamatos em mamíferos.....	10
4. Métodos analíticos para determinação de ditiocarbamatos em alimentos.....	13
4.1. Determinação de ditiocarbamatos como CS <sub>2</sub> .....	13
4.2. Determinação de compostos ditiocarbamatos .....	16
4.3. Cromatografia de par iônico e método QuEChERS.....	25
5. Incidência de ditiocarbamatos em alimentos .....	27
5.1. No Brasil .....	27
5.2. Ditiocarbamatos em outros países.....	30
III.OBJETIVOS .....	31
IV. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
1. Padrões e reagentes.....	32
2. Equipamentos gerais .....	32
3. Sistema cromatográfico e espectrofotômetro.....	33
4. Suspensões padrão e soluções para análise.....	33
4.1. Método por cromatografia de par iônico .....	33
4.2. Método por metilação .....	35
4.3. Método espectrofotométrico (CS <sub>2</sub> ).....	37
5. Amostras.....	37

5.1. Fortificação das amostras para os testes de otimização e validação .....	38
6. Otimização do método por cromatografia de par iônico.....	38
6.1. Definição das condições cromatográficas.....	38
6.2. Estudos de estabilidade dos padrões .....	39
6.3. Etapa de extração.....	40
7. Otimização do método por metilação.....	40
7.1. Procedimento metilação/clean-up 1.....	40
7.2. Procedimento metilação/clean-up 2.....	41
7.3. Comparação entre metilação/clean-up 1 (cartuchos de sílica) e metilação/clean-up 2 (dispersão em PSA).....	42
7.4. Modificações no procedimento metilação/clean-up 2 .....	43
7.5. Efeito do pH da fase móvel.....	44
7.6. Alterações na vazão e no gradiente.....	45
7.7. Procedimento por metilação otimizado .....	46
7.8. Validação do método de metilação para análise de EBDC e propinebe.....	49
7.8.1. Seletividade .....	49
7.8.2. Linearidade.....	50
7.8.3. Repetitividade, LOQ e LOD .....	51
8. Método espectrofotométrico (CS <sub>2</sub> ).....	52
8.1. Curva analítica .....	53
8.2. Procedimento de digestão .....	53
9. Análise de amostras.....	54
V. RESULTADOS.....	55
1. Método por cromatografia de par iônico.....	55
1.1. Definição das condições cromatográficas.....	55
1.2. Estudos de estabilidade dos padrões .....	58
1.3. Etapa de extração.....	60
2. Método por metilação.....	61
2.1. Comparação entre metilação/clean-up 1 (cartuchos de sílica) e metilação/clean-up 2 (dispersão em PSA).....	61
2.2. Modificações no procedimento metilação/clean-up 2 .....	68
2.3. Efeito do pH da fase móvel.....	73



2.4. Alterações na vazão e no gradiente.....	75
2.5. Validação do método de metilação para análise de EBDC e propinebe.....	79
2.5.1. Seletividade .....	79
2.5.2. Linearidade.....	81
2.5.3. Repetitividade, LOQ e LOD.....	84
3. Análise de amostras.....	85
VI. DISCUSSÃO .....	86
VII. CONCLUSÕES.....	88
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C8 – Fase tipo octil

C18 – Fase tipo octadecil

CCPR – *Codex Committee on Pesticide Residues*

CG – Cromatografia gasosa

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DART – Análise direta em tempo real

DESI – Ionização de dessorção por *electrospray*

DMD – Dimetilditiocarbamatos

DT – Ditiocarbamatos

EBDC – Etilenobisditiocarbamatos

ECD – *Electron Capture Detector*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico dihidratado

ETU – Etilenotiouréia

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FPD – *Flame Photometric Detector*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IDA – Ingestão Diária Aceitável

JMPR – *Joint Meeting on Pesticide Residues*

LC – *Liquid Chromatography*

LMR – Limite Máximo de Resíduos

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDTC – Metilditiocarbamatos

MS – *Mass Spectrometer*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PBDC – Propilenobisditiocarbamatos

pc – Peso corpóreo

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PSA – *Primary Secondary Amine*

PTU – Propilenotiouréia

QuEChERS - *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

STM – Suspensão de Trabalho de Mistura

TBAHS – Tetra-n-butilamônio hidrogenosulfato

TCEP – Tris-(2-carboxietil)-fosfina

TOF – *Time of Flight*

UV – Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas relacionadas aos ditiocarbamatos. (A) ácido ditiocarbâmico, carbamato e ditiocarbamato; (B) Síntese dos ditiocarbamatos (Kanchi et al., 2013); (C) Brassinin.....4
- Figura 2.** Decomposição dos etilenobisditiocarbamatos e reações que levam à formação de etilenotiouréia (ETU) (IPCS, 1988).....11
- Figura 3.** Metabolismo do propinebe em ratos (FAO/WHO 1993).....12
- Figura 4.** Reação de hidrólise do ziram e formas de determinação do CS<sub>2</sub> formado (Conceição, 2002; Jardim, 2012) .....14
- Figura 5.** Sistemas de reação para determinação de resíduos de ditiocarbamatos por CS<sub>2</sub>. (A) Sistema horizontal (Cullen, 1964; Crnogorac e Schwack, 2009); (B) Sistema vertical (Caldas et al., 2001).....15
- Figura 6.** Formação de EBDC-dimetil (Lo et al.,1996). .....18
- Figura 7.** Sequência de reação para determinação de EBDC (M = metal) utilizando o método de metilação (Hayama e Takada, 2008).....20
- Figura 8.** Suspensão estoque de propinebe em acetonitrila (1 mg/mL). .....36
- Figura 9.** Reação de dimetilação de EBDC e propinebe (M = metal). .....43
- Figura 10.** Procedimento otimizado do método de metilação. Extração com purificação utilizando 150 mg de PSA, 900 mg de MgSO<sub>4</sub> e 150 mg de carvão ativado. Fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B) com vazão de 1,1 mL/min. Gradiente C: 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. Tempo de corrida: 36 minutos.....48
- Figura 11.** Sistema vertical utilizado para a digestão da amostra para análise de ditiocarbamatos, como CS<sub>2</sub>.....53
- Figura 12.** Separação dos ditiocarbamatos (1) mancozebe e (2) propinebe (0,24 µg/mL) no modo gradiente. (a) Suspensão padrão; (b) Solução EXM-S (solvente utilizado no preparo da suspensão padrão). Coluna Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6 mm, 5 µm. Fase móvel: solução EXM (10 mM) e metanol. Detecção em 286 nm. ....56
- Figura 13.** Separação dos ditiocarbamatos (1) mancozebe e (2) propinebe (0,24 µg/mL) no modo isocrático (25% metanol, v/v, em solução EXM). (a) Suspensão padrão; (b) Solução EXM-S (solvente utilizado no preparo da suspensão padrão).

Coluna Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6 mm, 5 µm. Fase móvel: solução EXM (10 mM) e metanol. Detecção em 286 nm. ....57

**Figura 14.** Separação dos ditiocarbamatos (1) mancozebe e (2) propinebe (0,48 µg/mL) no modo isocrático (35% de metanol, 52,0% de solução EXM (20 mM, pH=11) e 13,0% de solução EDTA+Fosfato (20 mM, pH=11)). (a) Suspensão padrão; (b) Solução EXM-S (solvente utilizado no preparo da suspensão padrão). Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6mm. Detecção em 286 nm. ....58

**Figura 15.** Estabilidade dos padrões analíticos durante 5 dias com armazenamento das suspensões de 0,48 µg/mL (A) temperatura ambiente e (B) temperaturas < -15°C. Cada ponto representa a média de duas leituras: em A, DPR <15%; em B DPR <5%. ....59

**Figura 16.** Extração de amostra fortificada de alface com solução “EXM-S”. (a) Branco da alface. (b) Alface fortificada com mancozebe no nível de 0,5 mg/kg. (c) Mistura de (1) mancozebe e (2) propinebe (0,48 µg/mL). Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6mm. Modo isocrático: 35% de metanol, 52,0% de solução EXM (20 mM, pH=11) e 13,0% de solução EDTA+Fosfato (20 mM, pH=11).....60

**Figura 17.** Comparação das áreas obtidas nos procedimentos de purificação utilizando cartuchos de sílica, ou PSA. As amostras foram fortificadas no nível de 5 mg/kg com suspensão padrão de mistura de mancozebe e propinebe. EBDC-dimetil e propinebe-dimetil: respectivamente, mancozebe e propinebe derivatizados. ....62

**Figura 18.** Cromatograma da suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....63

**Figura 19.** Cromatogramas dos extratos da cebola (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco da cebola; (b) Cebola fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.....63

**Figura 20.** Cromatogramas dos extratos da cebola (*clean-up*: PSA 150 mg). (a) Branco da cebola; (b) Cebola fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até

90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.....64

**Figura 21.** Cromatograma do extrato do branco do brócolis (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco do brócolis; (b) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....65

**Figura 22.** Cromatograma do extrato do branco do brócolis (*clean-up*: PSA 150 mg). (a) Branco do brócolis; (b) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna .....65

**Figura 23.** Cromatogramas dos extratos do tomate (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco do tomate; (b) Tomate fortificado no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.....66

**Figura 24.** Cromatogramas dos extratos do tomate (*clean-up*: PSA). (a) Branco do tomate; (b) Tomate fortificado no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....67

**Figura 25.** Cromatogramas dos extratos da couve (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco da couve; (b) Couve fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.....67

**Figura 26.** Cromatogramas dos extratos da couve (*Clean-up*: PSA 150 mg). (a) Branco da couve; (b) Couve fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.....68

**Figura 27.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “a”: 150 mg de PSA e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....70

**Figura 28.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “b”: 300 mg de PSA e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....70

**Figura 29.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “c”: 150 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....71

**Figura 30.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “d”: 300 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....71

**Figura 31.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “e”: 150 mg de PSA, 150 mg de C18 e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado

no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....72

**Figura 32.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “f”: 300 mg de PSA, 150 mg de C18 e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....72

**Figura 33.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “g”: 150 mg de PSA, 150 mg carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. ....73

**Figura 34.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (pH da fase móvel: 4). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel tampão acetato, pH 4 (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. ....74

**Figura 35.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (pH da fase móvel: 8). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel tampão fosfato, pH 8 (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. ....75



**Figura 36.** Cromatogramas dos brancos do brócolis, couve e repolho. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. .....76

**Figura 37.** Brancos da goiaba injetados nos gradientes A e B (A) Gradiente A: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna; (B) Gradiente B: Mesmas condições descritas no “Gradiente A”, com alteração na vazão (1,1 mL/min). *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. (a) Branco da goiaba; (b) Goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil.....77

**Figura 38.** Cromatogramas dos extratos da “Goiaba 4” utilizando o “Gradiente C”: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. (a) Branco da goiaba; (b) Goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil.....78

**Figura 39.** Cromatogramas dos extratos do “Repolho 2” utilizando o “Gradiente C”: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. (a) Branco do repolho; (b) Repolho fortificado no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil.....79

**Figura 40.** Cromatogramas de amostras repolho controle (Estudo de seletividade). (a) Repolho 1; (b) Repolho 2; (c) Repolho 4; (d) Repolho 5 (Tabela 4); (e) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente C”: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. .....80

**Figura 41.** Cromatogramas de amostras goiaba controle (Estudo de seletividade). (a) Goiaba 1; (b) Goiaba 2; (c) Goiaba 3; (d) Goiaba 4; (e) Goiaba 5; (f) Goiaba 6 (Tabela 4); (g) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03

mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente C: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. .....81

**Figura 42.** (A) Cromatograma do repolho fortificado no nível de 0,5 mg/kg. (a) Branco do repolho; (b) Repolho fortificado no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 0,5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Curvas analíticas de repolho fortificado pré-extração com (B) mancozebe e (C) propinebe; Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm com pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0 mm. Forno de coluna em 40°C. Volume de injeção de 25 µL, Gradiente: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. Detecção em 270 nm. Tempo de corrida: 36 min.....82

**Figura 43.** (A) Cromatograma da goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg. (a) Branco da goiaba; (b) Goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 0,5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Curvas analíticas de goiaba fortificada pré-extração com (B) mancozebe e (C) propinebe; Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm com pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0 mm. Forno de coluna em 40°C. Volume de injeção de 25 µL, Gradiente: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*:150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. Detecção em 270 nm. Tempo de corrida: 36 min.....83

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Estruturas e características dos ditiocarbamatos de uso permitido no Brasil. ....	7
<b>Tabela 1.</b> LMR dos ditiocarbamatos para culturas de uso alimentar no Brasil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2014).....	9
<b>Tabela 2.</b> Métodos de determinação direta dos fungicidas ditiocarbamatos (cromatografia líquida) .....	23
<b>Tabela 3.</b> Resultados dos programas Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) entre 2001 e 2010 (adaptado de Jardim e Caldas, 2012) ..	28
<b>Tabela 4.</b> Amostras controle utilizadas para os testes de seletividade .....	50
<b>Tabela 5.</b> Adsorventes e proporções usados nos 7 testes de <i>clean-up</i> , contendo 900 mg de MgSO <sub>4</sub> .....	69
<b>Tabela 6.</b> Coeficientes de Variação (%CV, n=3) obtidos após extrações dos analitos utilizando o método de metilação/QuEChERS .....	84
<b>Tabela 7.</b> Resultados das análises de ditiocarbamatos nos métodos espectrofotométrico (CS <sub>2</sub> ) e metilação/QuEChERS por HPLC-UV .....	85

## RESUMO

MELLO, Denise Carvalho. **Determinação dos fungicidas ditiocarbamatos etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e propinebe em alimentos por HPLC-UV**, Brasília, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

A técnica mais utilizada para a análise dos fungicidas ditiocarbamatos envolve a determinação indireta do CS<sub>2</sub> liberado após digestão ácida da matriz, e não distingue qual ditiocarbamato está presente na amostra. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico para determinação de etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e propinebe em alimentos por HPLC-UV. O mancozebe, ditiocarbamato mais utilizado no Brasil, foi utilizado com composto representante dos EBDC. As culturas testadas incluíram o repolho, couve, brócolis e goiaba. O primeiro método avaliado, de cromatografia de par iônico e detecção em 286 nm, não se mostrou satisfatório devido a dificuldades com o extrato e instabilidade do perfil cromatográfico dos analitos. O segundo método avaliado envolveu a decomposição dos ditiocarbamatos, metilação, extração/*clean-up* por QuEChERS, e cromatografia em fase reversa (detecção em 270 nm). Foram testados oito fases de *clean-up* e diferentes parâmetros da fase móvel (pH, vazão e gradiente). Os melhores resultados foram encontrados com *clean-up* com PSA/MgSO<sub>4</sub>/carvão ativado, fase móvel água:acetonitrila em gradiente e vazão de 1,1 mL/min (t=36 min). O método foi validado com LOQ de 0,2 mg/kg para o mancozebe e o propinebe (0,11 e 0,10 mg CS<sub>2</sub>/kg, respectivamente). Dezenove amostras de couve, brócolis, repolho, goiaba e caju foram analisadas pelo método HPLC-UV validado e pelo método convencional espectrofotométrico (CS<sub>2</sub>). Foram obtidos resultados positivos para CS<sub>2</sub> para 4 amostras de goiaba, que foram confirmados como EBDC por HPLC-UV. Resultados positivos para CS<sub>2</sub> foram obtidos para 10 amostras de brássicas (0,1-0,9 mg/kg), que não se confirmaram no método HPLC-UV, confirmando que estes alimentos fornecem resultados falso-positivos no método CS<sub>2</sub>. O método validado ainda precisa ser melhorado para eliminar alguns interferentes das amostras que co-eluem com os analitos de interesse.

**Palavras-chave:** ditiocarbamatos, alimentos, EBDC, mancozebe, propinebe, HPLC-UV.

## ABSTRACT

MELLO, Denise Carvalho. **Determination of dithiocarbamate fungicides ethylenebisdithiocarbamates (EBDC) and propineb in food by HPLC-UV**, Brasília, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

The most used method to determine dithiocarbamate fungicides in food involves the quantification of the CS<sub>2</sub> generated after acid digestion of the matrix, and do not distinguish among the dithiocarbamates present in the sample. The objective of this study was to develop and validate a method for the direct determination of ethylenebisdithiocarbamates (EBDC) and propineb in food by HPLC-UV. Mancozeb, the most used dithiocarbamate in Brazil, was used as representative of the EBDC group. The matrices tested included cabbage, collard green, broccoli and guava. The first evaluated method, by ion pair chromatography and detection at 286 nm, did not give satisfactory results due to problems with the sample extract and instability of the analytes chromatographic profiles. The second method tested involved the decomposition of the dithiocarbamate, methylation, extraction by QuEChERS and reverse phase chromatography (detection at 270 nm). Eight clean-up phases and different mobile phase conditions (pH, flow and gradient) were tested. The best results were obtained using clean-up with PSA/MgSO<sub>4</sub>/activate charcoal, water:acetonitrile mobile phase in gradient at 1.1 mL/min (t=36 min). The method was validated at LOQ of 0.2 mg/kg for both mancozeb and propineb (0.11 and 0.10 mg CS<sub>2</sub>/kg, respectively). Nineteen samples of collard green, broccoli, cabbage, guava and cashew apple were analyzed by the validated HPLC-UV method and by the CS<sub>2</sub> spectrophotometric method. Four guava samples gave CS<sub>2</sub> positive results, which were confirmed as EBDC by HPLC-UV. Ten brassica samples also gave positive results for CS<sub>2</sub> (0.1-0.9 mg/kg), which were not confirmed by HPLC-UV, agreeing with previous studies that show that these vegetable give false positive results for dithiocarbamates as CS<sub>2</sub>. The validated method still need to be improved to eliminate some matrix compounds that co-elute with the analytes of interest.

**Keywords:** dithiocarbamates, EBDC, food, mancozeb, propineb, HPLC-UV.

## I. INTRODUÇÃO

Fungicidas ditiocarbamatos são pesticidas não-sistêmicos largamente usados na agricultura devido a sua baixa toxicidade aguda, baixo custo de produção e baixa persistência ambiental (Van Lishaut, 2000; Crnogorac e Schwack, 2009). A maior preocupação com relação à toxicidade dos ditiocarbamatos para a população geral que consome alimentos tratados está nos produtos de degradação dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC), como mancozebe e metiram e do propinebe (etilenotiouréia e propilenotiouréia, respectivamente), que mostraram ser carcinogênicos em estudos com animais de laboratório (Doerge e Takazawa, 1990). Os ditiocarbamatos, principalmente o mancozebe, estão entre os fungicidas mais utilizados no Brasil (Rebelo et al., 2010), e seus resíduos foram os mais detectados em alimentos em programas de monitoramento (Jardim e Caldas, 2012).

A determinação direta de EBDC e propinebe apresenta problemas para o analista, pois esses compostos são polímeros e insolúveis nos solventes usados normalmente em análises de resíduos de pesticidas. Atualmente, o método mais utilizado para determinação de ditiocarbamatos em alimentos consiste em uma análise indireta, onde o  $CS_2$  liberado após digestão da amostra em uma solução ácida é quantificado por espectrofotometria ou cromatografia gasosa, sendo o resultado expresso em mg  $CS_2$ /kg de alimento. O limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido para este grupo de pesticidas também é expresso em mg  $CS_2$ /kg, e a origem desse  $CS_2$ , ou seja, qual composto foi aplicado no campo, não pode ser identificado na análise. Este método pode dar resultados falso-positivos para alimentos da família das *Brassicaceae*, pois compostos contendo enxofre estão presentes naturalmente em alguns alimentos e também liberam  $CS_2$  sob as condições de análise (Perz et al., 2000). Adicionalmente, os ditiocarbamatos apresentam parâmetros toxicológicos distintos (IPCS, 1993), o que dificulta uma avaliação de risco mais refinada da exposição a estes compostos na dieta. O principal objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método para análise de EBDC e propinebe por HPLC-UV.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. História dos fungicidas

Ao longo dos séculos, o homem sempre buscou meios para combater pragas e doenças que colocaram em risco a produção de alimentos. O enxofre foi utilizado como inseticida pelos chineses 1000 anos a.C., e como fungicida pelos europeus nos anos 1800, sendo ainda um importante pesticida utilizado no mundo atualmente. No século XVII, extrato de folhas de tabaco, raiz de *Derris elipitica*, contendo rotenona, e extrato das flores de *Chrysanthemum cineriefolum*, contendo piretros, foram usados como inseticidas. Em 1807, B. Prévost introduziu o uso do sulfato de cobre no combate à cárie do trigo, e em 1882, uma mistura de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio, conhecida como mistura de Bordeaux, foi introduzida na agricultura para o controle do míldio em videiras (Ecobichon, 2001).

Os primeiros fungicidas orgânicos sintetizados em laboratório foram os organomercuriais, usados no tratamento de sementes. O cloro (2-hidróxifenil) mercúrio, introduzido na Alemanha em 1913, mostrou-se posteriormente de pouca eficiência e de alta toxicidade para organismos não alvo, e o uso de organomercuriais foi descontinuado quando outras alternativas foram disponibilizadas (Klittich, 2008).

#### 1.1. A descoberta dos ditiocarbamatos

Investigações realizadas pela DuPont Company em 1931 mostraram que alguns derivados do ácido ditiocarbâmico possuíam atividade inseticida e fungicida (Tisdale, 1942). Os primeiros ditiocarbamatos foram sintetizados a partir de uma monoamina e do dissulfeto de carbono, e o primeiro a alcançar importância como fungicida foi o dissulfeto de tetrametiluram, mais comumente conhecido como tiram, para o qual uma patente foi concedida em 1934 para Tisdale e Williams (Gullino et al., 2010). O tiram só começou a ser comercializado a partir de 1940, quando Muskett e Colhoun (1942) demonstraram ser um tratamento efetivo para sementes (Gullino et al., 2010; Klittich, 2008). No entanto, o tiram não demonstrou ser eficiente

na aplicação foliar, o que levou ao desenvolvimento de moléculas mais ativas, baseadas em sais metálicos do ácido ditiocarbâmico. O dimetilditiocarbamato de ferro (III) (ferbam) foi reportado pela primeira vez por Anderson (1940) e independentemente por Kincaid (1942). O dimetilditiocarbamato de zinco (ziram) se seguiu ao ferbam, estando ambos estreitamente relacionados. O ziram, no entanto, demonstrou ser mais efetivo para a produção vegetal (Gullino et al., 2010).

Em 1940, a Rohm & Haas, Inc., preparou o nabam a partir de uma diamina, e pode ser considerado como o primeiro etilenobisditiocarbamato (EBDC) deste grupo de fungicidas. A alta solubilidade do nabam em água e sua relativa instabilidade conferem a este composto uma performance variável, e Heuberger e Manns (1943) descobriram que a estabilidade era melhorada com adição de sulfato de zinco, e o produto formado, zineb (etilenobisditiocarbamato de zinco), passou a ser comercializado a partir de 1945 sob o nome de Dithane Z-78 (Gullino et al., 2010).

Em 1950, como resultado da evolução acelerada do desenvolvimento de novos EBDC, foi concedida a patente do etilenobisditiocarbamato de manganês (manebe) à DuPont (Flenner, 1950), produto que revelou ser mais ativo do que o nabam e o zineb (Gullino et al., 2010). Em 1961, a Rohm & Haas desenvolveu o mancozebe, um íon complexo de zinco do manebe, que se tornou o mais importante e comercialmente significativo de todos os EBDC, e ainda é o fungicida mais vendido do mundo (Klittich, 2008). Outros dois fungicidas alquilenobisditiocarbamatos desenvolvidos na mesma época foram o metiram, introduzido na Alemanha pela BASF em 1958, e o propinebe, reportado pela primeira vez em 1963. Os compostos ditiocarbamatos tinham a vantagem de possuírem baixa toxicidade em mamíferos, plantas e no meio ambiente e com o modo de ação multi-sítio, e se tornaram um componente crítico de gestão de resistência para novos fungicidas (Klittich, 2008).

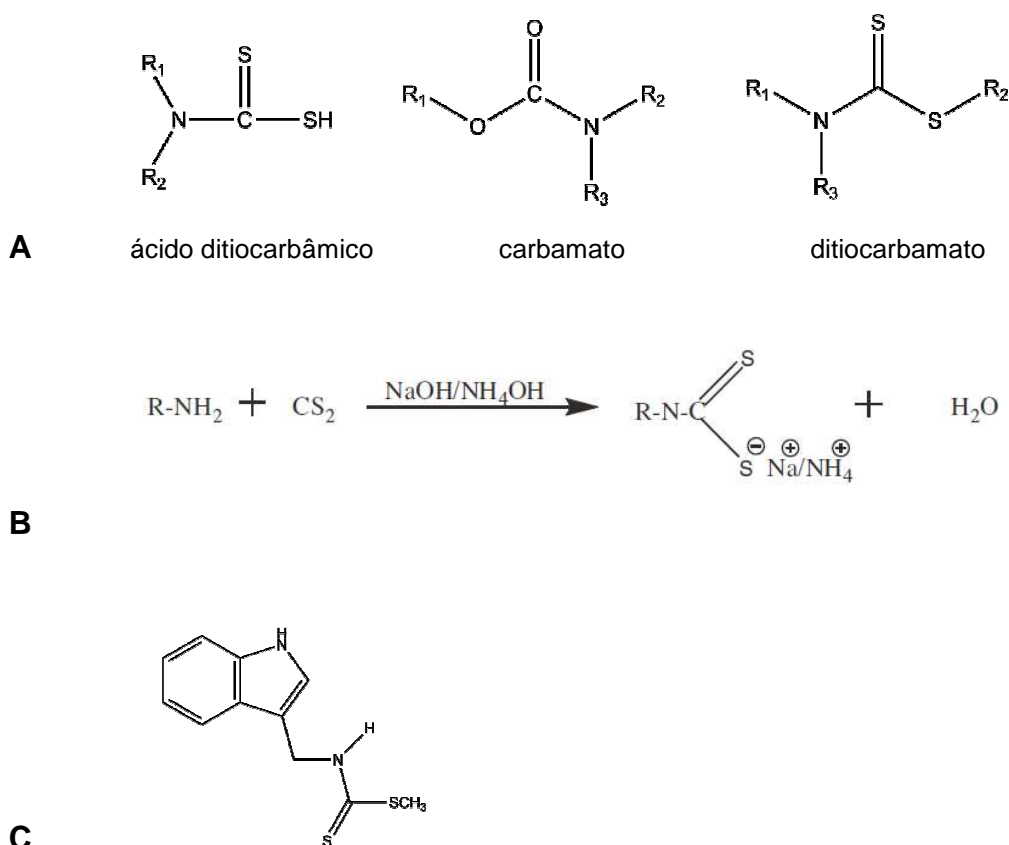
## **2. Os fungicidas ditiocarbamatos**

### *2.1. Química dos ditiocarbamatos*



Os ditiocarbamatos são uma classe de compostos organosulfurados, dos quais 21 compostos conhecidos são empregados como pesticidas (Motarjemi et al., 2014). Eles são largamente usados como fungicidas na produção agrícola de frutas e vegetais, para tratamento de sementes, solo, foliar e pós-colheita. São também usados como repelentes de roedores, aditivos na vulcanização da fabricação da borracha, como aditivos em lubrificantes e como antioxidantes (Schmidt et al., 2013).

Os ditiocarbamatos são derivados do ácido ditiocarbâmico ( $\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$ ), análogos dos carbamatos ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ), onde ambos os átomos de oxigênio são substituídos por átomos de enxofre (Figura 1A). São sintetizados a partir da reação de aminas primária e secundária com dissulfeto de carbono sob condições alcalinas (Kanchi et al., 2013; Figura 1B). As fitoalexinas da família crucíferas são fonte natural de ditiocarbamatos, como o brassinin (Figura 1C), que são biosintetizados como proteção ao ataque de fungos (Perz et al., 2000).



**Figura 1.** Estruturas relacionadas aos ditiocarbamatos. (A) ácido ditiocarbâmico, carbamato e ditiocarbamato; (B) Síntese dos ditiocarbamatos (Kanchi et al., 2013); (C) Brassinin.

Baseado na estrutura do esqueleto de carbono, os ditiocarbamatos são categorizados em subclasses, dependendo da natureza do elemento que forma um complexo com o esqueleto organosulfurado (Van Lishaut, 2000; Crnogorac e Schwack, 2009):

- metilditiocarbamatos (MDTC), que inclui o metam-sódico (Na);
- dimetilditiocarbamatos (DMD), que inclui o ziram (Zn), ferbam (Fe) e o tiram (não contém elementos de coordenação);
- etilenobisditiocarbamatos (EBDC), que inclui o manebe (Mn), zineb (Zn), nabam (Na), metiram (Zn) e mancozebe (Zn e Mn);
- propilenobisditiocarbamatos (PBDC), que inclui o propinebe (Zn).

O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo e cinco ditiocarbamatos são permitidos no país em 38 culturas de alimentos: mancozebe, metiram, propinebe, tiram e metam-sódico (ANVISA, 2014).

O mancozebe é um complexo contendo 20% de manganês e 2-5% de zinco. É um pó amarelo acinzentado e é praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. É decomposto em altas temperaturas pela umidade e em condições ácidas (Martin, 1974). No Brasil, é registrado para aplicação foliar para 46 culturas, sendo 37 de uso alimentar (ANVISA, 2014).

O propinebe é um polímero de zinco propilenobisditiocarbamato, preparado pela precipitação de propilenobisditiocarbamatos com sais de zinco solúveis em água. É um pó de coloração branca a amarelada e é praticamente insolúvel em todos os solventes comuns. É estável quando armazenado em ambiente frio e seco, mas se decompõe em meio fortemente alcalino ou ácido (Martin, 1974). No Brasil, o propinebe tem uso foliar permitido para 9 culturas, sendo 8 culturas de uso alimentar (ANVISA, 2014).

O metiram é produzido pela ligação oxidativa do ácido etilenobisditiocarbamato com um sal solúvel de zinco. É um pó amarelo praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos como acetona, benzeno, ou etanol, mas é solúvel, com decomposição, em piridina. É instável em condições fortemente ácidas ou alcalinas (Martin, 1974). O produto é usado no Brasil para

aplicação foliar em 19 culturas, sendo 17 de uso alimentar, e em sulco de plantio em uma cultura (ANVISA, 2014).

A interação do dissulfeto de carbono e da dimetilamina na presença de hidróxido de sódio (NaOH) produz dimetilditiocarbamato de sódio, o qual é oxidado por peróxido de hidrogênio ou iodo para formação do tiram. O tiram forma cristais incolores e sua solubilidade em água na temperatura ambiente é de cerca de 30 mg/L. É levemente solúvel em etanol e éter etílico, e solúvel em acetona e clorofórmio (Martin, 1974). No Brasil, pode ser aplicado em sementes ou solo (ANVISA, 2014), e seus resíduos não são esperados no alimento para o consumo.

O metam-sódico é produzido pela interação da metilamina com dissulfeto de carbono na presença de NaOH. O sal é um sólido branco cristalino, sua solubilidade em água é de 722 g/L, sendo moderadamente solúvel em etanol, mas praticamente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. É estável em solução concentrada aquosa, mas instável na diluição, sendo a decomposição promovida por ácidos e sais de metais pesados (Martin, 1974). O metam-sódico é um fungicida para aplicação no solo e no Brasil, ele é permitido para 6 culturas, sendo 4 de uso alimentar (ANVISA, 2014). É fitotóxico e a cultura deve plantada em solo tratado somente após sua completa decomposição (Martin, 1974), desta maneira, resíduos de metam-sódico não são esperados nos alimentos.

O Quadro 1 mostra as estruturas dos fungicidas ditiocarbamatos permitidos no Brasil, sua solubilidade e formas de uso. A baixa solubilidade do mancozebe, metiram e propinebe em água e solventes orgânicos se deve à estrutura polimérica desses compostos.

**Quadro 1.** Estruturas e características dos ditiocarbamatos de uso permitido no Brasil.

Ditiocarbamato	Estrutura	Solubilidade	Uso no Brasil <sup>2</sup>
<b>Mancozebe</b> <sup>1</sup> (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Mn) <sub>x</sub> (Zn) <sub>y</sub> , x/y=11; 271,2 g/mol (monômero)		Praticamente insolúvel em água e na maioria dos solventes;	Aplicação foliar em 46 culturas
<b>Metiram</b> <sup>1</sup> (C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> N <sub>11</sub> S <sub>16</sub> Zn <sub>3</sub> ) <sub>x</sub> ; 1088,6 g/mol (monômero)		Água: 2.1 - 4 mg/l (20°C); Praticamente insolúvel em solventes orgânicos	Aplicação foliar em 19 culturas
<b>Propinebe</b> <sup>3</sup> (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Zn) <sub>x</sub> ; 289.8 g/mol (monômero)		Água: <0,01 mg/L (20°C); Solventes orgânicos: <0,1 mg/L	Aplicação foliar em 8 culturas
<b>Metam-sódico</b> <sup>4</sup> : C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NNaS <sub>2</sub> ; 129,17 g/mol		Água: 722g/L; solúvel em metanol;	Aplicação no solo, 6 culturas
<b>Tiram</b> <sup>1</sup> :C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub> ; 240,4 g/mol		Água: 30 mg/l (25°C) Solúvel em acetona, clorofórmio e outros solventes orgânicos	Tratamento de semente (12 culturas) e solo (1 cultura)

1. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/>; 2. ANVISA, 2014; 3. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation04/PR\\_OPINEB.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/PR_OPINEB.pdf); 4. <http://www.cn-agro.com/fungicidas/Metam-sodium.html>;

## 2.2. Limites Máximos de Resíduos (LMR) para os ditiocarbamatos

O LMR é definido pela legislação como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico ou afim oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em mg/kg (BRASIL, 2003). No Brasil, os LMR dos ingredientes ativos são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), durante o processo de registro do produto.

No âmbito internacional, os LMR são estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, por meio do Comitê de Resíduos de Pesticidas (CCPR – *Codex Committee on Pesticide Residues*), tendo como base as recomendações do Grupo de Peritos em Resíduos de Pesticidas da Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) (JMPPR – *Joint Meeting on Pesticide Residues*). Essas recomendações são elaboradas a partir dos resultados dos estudos supervisionados de campo conduzidos em vários países e, em princípio, cobre o uso em qualquer país.

O método mais utilizado para análise de resíduos dessa classe de fungicidas em alimentos é a determinação indireta do produto de degradação dissulfeto de carbono (CS<sub>2</sub>), comum a todos os ditiocarbamatos. Desta maneira, no Brasil, no Codex e em outros países, os LMR dos resíduos de ditiocarbamatos são expressos em mg de CS<sub>2</sub>/kg de amostra, a partir de estudos de campo conduzidos por cada composto separadamente. A Tabela 1 mostra os LMR estabelecidos para os ditiocarbamatos para cada cultura de uso alimentar no Brasil, e o(s) ditiocarbamato(s) utilizado(s) nos estudos de campo que serviram de base para o LMR. Observa-se que para a maioria das culturas, o LMR foi estabelecido a partir do uso do mancozebe (31 das 37 culturas), sendo ele o mais provável de ser encontrado nos alimentos consumidos no Brasil. O tiram por sua vez, é utilizado apenas em sementes e solo (Quadro 1), portanto, a quantidade de resíduo que chega nos alimentos é muito pequena. O mesmo acontece com o metam-sódico, que é usado apenas em solo.

**Tabela 1.** LMR dos ditiocarbamatos para culturas de uso alimentar no Brasil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2014)

<b>Cultura</b>	<b>CS<sub>2</sub> (mg/kg)</b>	<b>Ditiocarbamato</b>
Abacate	1,0	Mancozebe
Abóbora	1,0	Mancozebe
Alface	3,0	Metiram
Alho	0,1	Mancozebe e metiram
Amendoim	0,3	Mancozebe e tiram
Arroz (sem casca)	0,1	Mancozebe e tiram
Aveia	0,3	Tiram
Banana	1,0	Mancozebe
Batata	1,0	Mancozebe, metam, metiram, propinebe e tiram
Berinjela	0,5	Mancozebe
Beterraba	0,3	Mancozebe e metiram
Brócolis	0,5	Mancozebe
Café	0,3	Mancozebe
Cebola	1,0	Mancozebe, metiram e propinebe
Cenoura	0,3	Mancozebe, metam e metiram
Cevada	1,0	Mancozebe e tiram
Citros	2,0	Mancozebe
Couve	1,0	Mancozebe
Couve-flor	0,5	Mancozebe
Ervilha	0,3	Mancozebe e tiram
Feijão	0,3	Mancozebe, metam, propinebe e tiram
Feijão-Vagem	0,3	Mancozebe
Figo	2,0	Mancozebe
Maçã	2,0	Metiram, mancozebe e propinebe
Mamão	3,0	Mancozebe
Manga	1,0	Mancozebe
Maracujá	1,0	Metiram
Melancia	0,3	Mancozebe e metiram
Melão	1,0	Mancozebe, metiram e propinebe
Milho	0,3	Mancozebe e tiram
Morango	0,2	Metam
Pepino	0,3	Mancozebe e metiram
Pêra	3,0	Mancozebe
Pêssego	4,0	Mancozebe e metiram
Pimentão	3,0	Mancozebe, metiram e propinebe
Repolho	1,0	Mancozebe

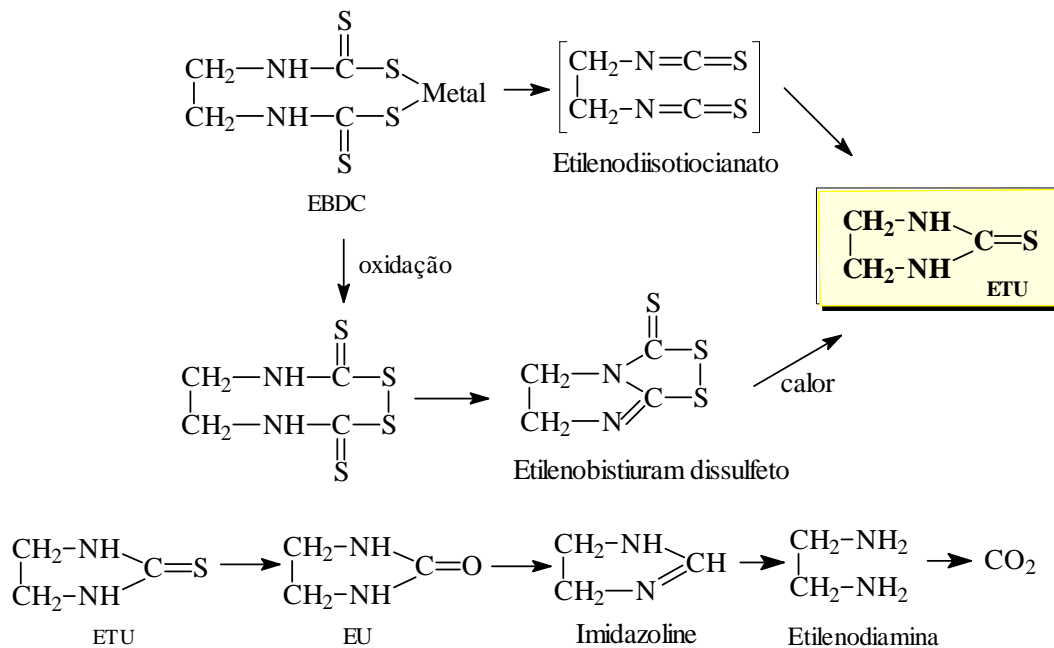
Teoricamente, em culturas onde apenas um ingrediente ativo é permitido, não deveriam ser encontrados resíduos de outros ditiocarbamatos. Entretanto, como o método de análise indireta não determina o ditiocarbamato, e sim seu produto de degradação  $CS_2$ , não é possível identificar se o agricultor usou um produto de uso proibido no Brasil, ou não permitido para a cultura em que o fungicida foi registrado. O mancozebe e o metiram são os ditiocarbamatos mais comercializados no Brasil (Rebelo et al., 2010).

### **3. Toxicidade dos fungicidas ditiocarbamatos em mamíferos**

Os ditiocarbamatos são considerados como compostos de relativa baixa toxicidade aguda, mas intoxicações no campo podem ocorrer após a exposição em altas doses, principalmente pelas vias respiratória e dérmica (Ecobichon, 2001). Os sintomas incluem fraqueza muscular, tontura, fadiga, dificuldade de andar, tremores e coma.

A exposição da população geral resulta da presença de resíduos destes compostos em alimentos que foram tratados no campo. A toxicidade crônica dos ditiocarbamatos é atribuída principalmente aos seus produtos de metabolização, principalmente a etilenotiouréia (ETU, imidazolidina 2-tiona), propilenotiouréia (PTU, 4-metil imidazolidina 2-tiona) e o dissulfeto de carbono ( $CS_2$ ) (Rubino, 2014; Kazos, 2007; Opacka, 1984).

A etilenotiouréia é uma tionamida heterocíclica e sua introdução no meio ambiente ocorre principalmente pelo uso dos fungicidas EBDC, como o manebe, mancozebe, zineb e metiram. No Brasil, os EBDC, juntamente com o propinebe, representam juntos mais de 90% do uso de ditiocarbamatos (Rebelo et al., 2010). A Figura 2 mostra o mecanismo de decomposição dos EBDC a ETU, que pode ocorrer nos organismos vivos (vegetais e animais), no ambiente e durante o processamento de alimentos.



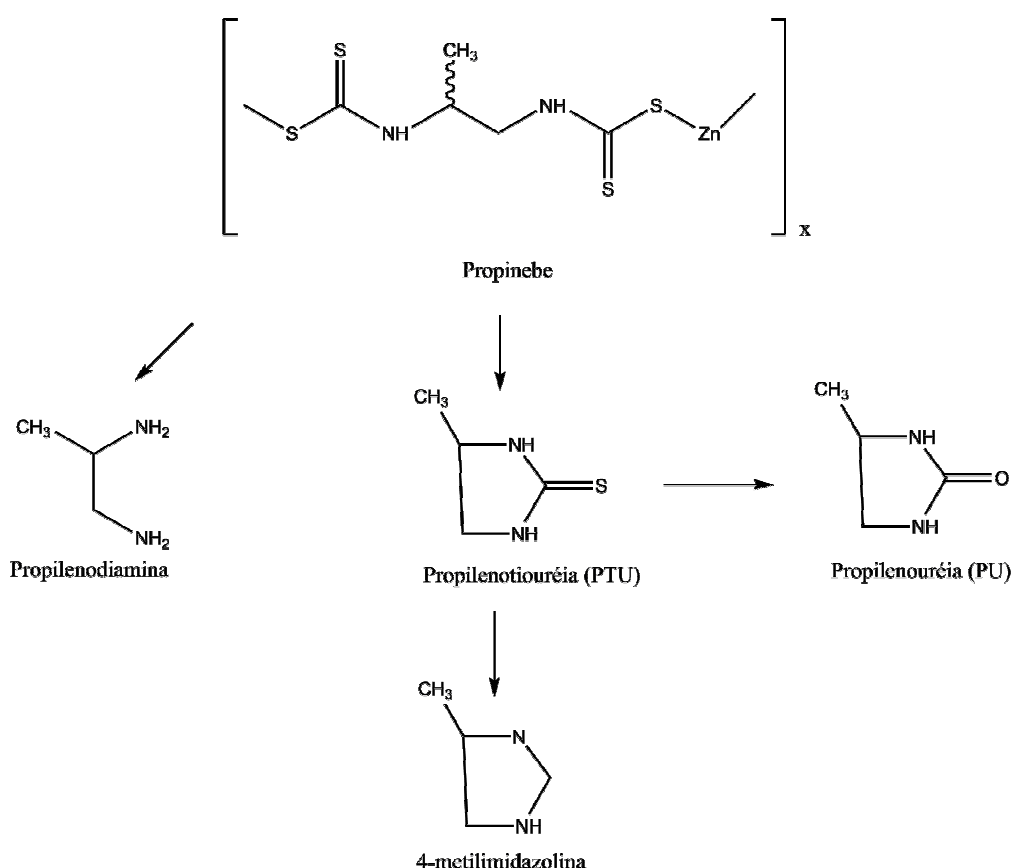
**Figura 2.** Decomposição dos etilenobisditiocarbamatos e reações que levam à formação de etilenotiuréia (ETU) (IPCS, 1988).

Estudos demonstraram efeitos na tireóide de roedores cronicamente expostos à ETU, que também demonstrou ter efeitos teratogênicos em ratos expostos via oral ou cutânea a esse composto, causando anormalidades no sistema nervoso central e no esqueleto (EPA, 1992). Redução no peso de filhotes, tamanho da ninhada e número de ninhadas viáveis foram observados após exposição de camundongos à ETU (Hardin et al., 1987; Dearfield, 1994). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que baixas doses de ETU podem interferir na homeostase da tireóide e no perfil do hormônio reprodutivo em ratos (Maranghi, 2013). Outro estudo demonstrou que a ETU atrapalha a expressão da *sonic hedgehog*, proteína que desempenha um papel crítico no desenvolvimento de vários órgãos (Mandhan, 2006; News Medical, 2011).

Em 1993, o JMPR estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o grupo dos EBDC de 0-0,03 mg/kg de peso corpóreo (pc), com base nos efeitos na tireóide de ratos (FAO, 1993). Esta IDA se aplica ao mancozebe sozinho ou em combinação com o manebe, metiram e/ou zineb. Uma IDA para ETU também foi alocada nesta mesma reunião (0-0,004 mg/kg pc).



A propilenotiouréia (PTU) (Figura 3) é um metabólito e produto de degradação toxicologicamente importante do propinebe. O propinebe se degrada facilmente em diferentes pH (4, 7 e 9), a 22°C e 50°C, levando à formação da PTU, que também é produzida durante a manufatura e estocagem do propinebe técnico (MacLachlan, *sem data*). Similarmente à ETU, a PTU é altamente solúvel em água e relativamente estável à hidrólise e fotólise, embora ela possa se degradar em soluções aquosas na presença de ácidos húmicos (Ripollés, 2012).



**Figura 3.** Metabolismo do propinebe em ratos (FAO/WHO 1993).

Estudos toxicológicos avaliados pelo JMPR mostraram aumento na incidência de adenomas hepatocelulares em camundongos machos expostos a PTU na dieta com 1000 mg/kg pc (a maior dose testada) e de carcinomas hepatocelulares em uma dieta de 10 mg/kg pc. Estes efeitos foram observados em fêmeas nas doses de 100 mg/kg pc. Nesse mesmo estudo, não foram observados tumores na tireóide atribuídos à PTU, mas um aumento da tireóide foi notado em camundongos machos

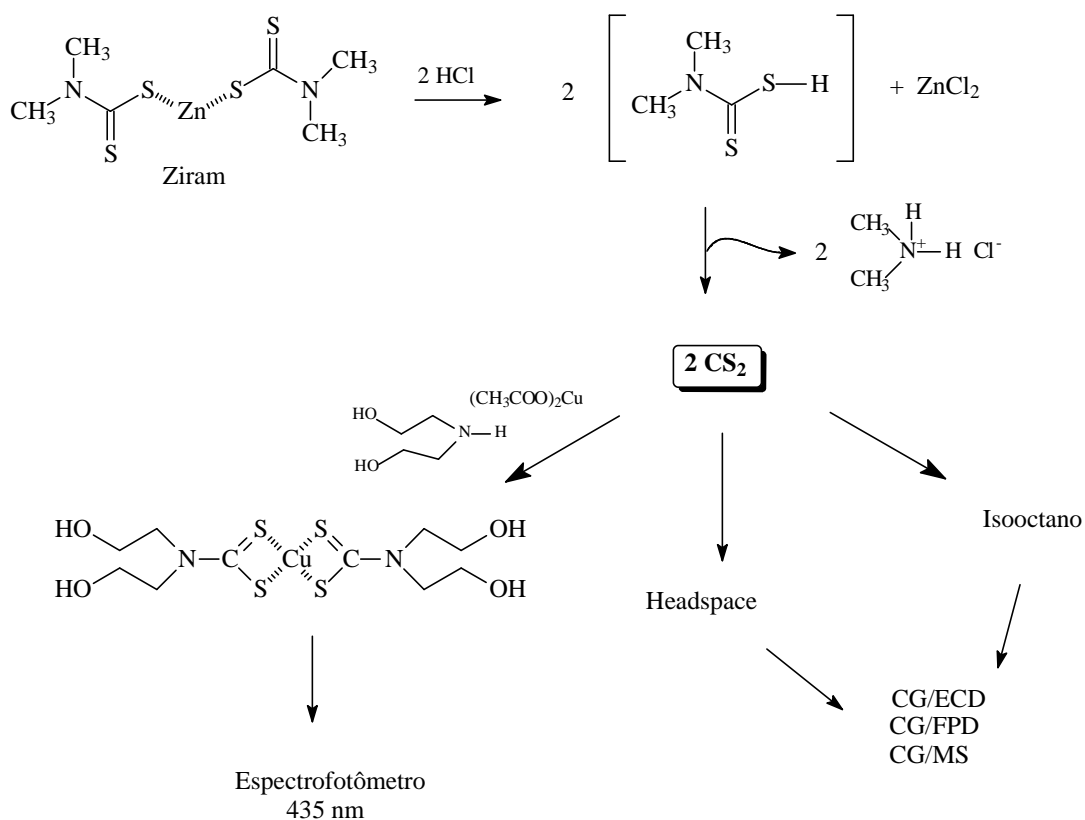
tratados com 1000 mg/kg pc (FAO/WHO, 1986a, b). Em um estudo crônico com ratos alimentados com dieta de 1000 mg/kg pc foram observados tumores na tireóide atribuíveis à PTU e efeitos goitrogênicos apenas na dose de 1 mg/kg pc, o menor nível testado (FAO/WHO, 1986a, b).

Em 1999, o JMPR concluiu que as lesões observadas na tireóide dos animais expostos a PTU ou ETU foram devido à depressão da síntese do hormônio da tireóide, e consequente estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-tireóide (FAO/WHO, 1999). O JMPR estabeleceu uma IDA de 0-0,007 mg/kg pc para o propinebe (FAO, 1993) baseado em efeitos na função tiroidiana.

#### **4. Métodos analíticos para determinação de ditiocarbamatos em alimentos**

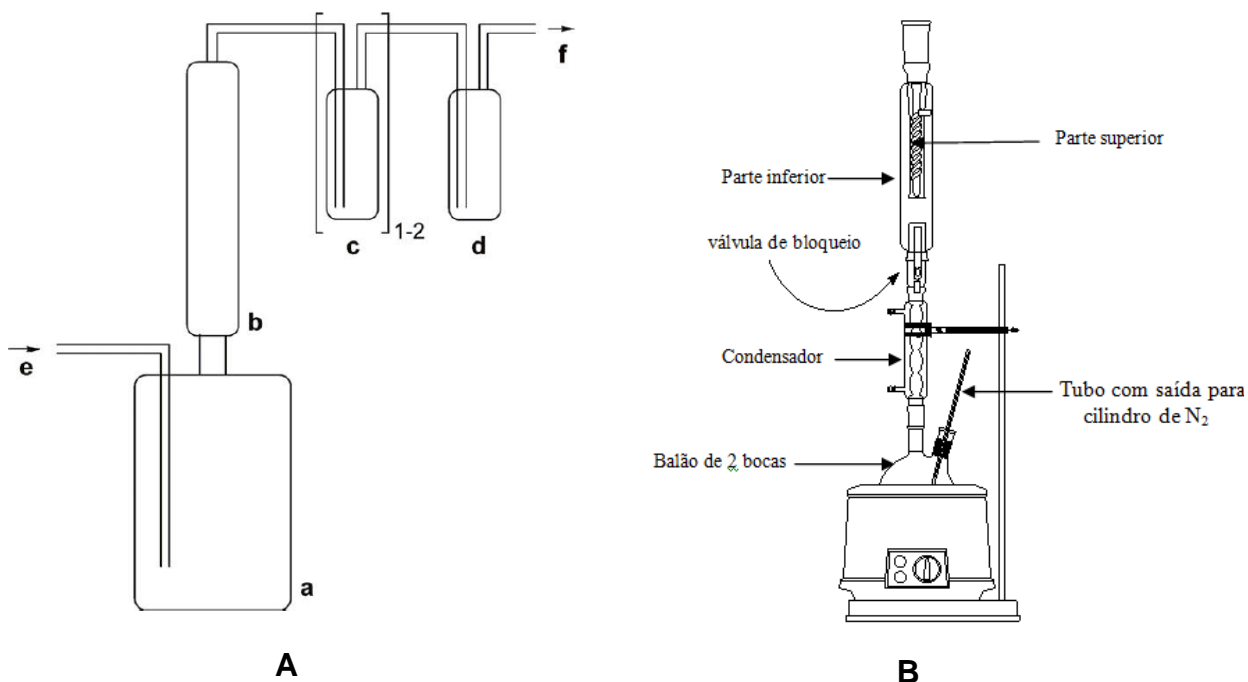
##### *4.1. Determinação de ditiocarbamatos como CS<sub>2</sub>*

A instabilidade dos ditiocarbamatos e o fato de os EBDC e o propinebe, em particular, serem polímeros e praticamente insolúveis em solventes orgânicos, foram a base para o desenvolvimento dos métodos atualmente mais utilizados para análise desses compostos. Estes métodos se baseiam na determinação do CS<sub>2</sub> liberado quando o ditiocarbamato presente no alimento é submetido a uma hidrólise ácida. O CS<sub>2</sub> liberado pode ser quantificado por espectrofotometria ou por cromatografia gasosa (Figura 4).



**Figura 4.** Reação de hidrólise do ziram e formas de determinação do  $\text{CS}_2$  formado (Conceição, 2002; Jardim, 2012)

O método espectrofotométrico baseia-se na proposta de Cullen (1964), posteriormente modificada por Keppel (1969). O método consiste na determinação do complexo cúprico formado após a liberação do  $\text{CS}_2$  durante a decomposição ácida do ditiocarbamato na presença de cloreto de estanho como agente redutor. O  $\text{CS}_2$  liberado durante a hidrólise é complexado em uma solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol. O complexo é analisado no espectrofotômetro a 435 nm e os resultados são expressos em mg  $\text{CS}_2$ /kg de alimento. Nessa proposta, utiliza-se um sistema de reação com suas partes dispostas horizontalmente (Figura 5A).



**Figura 5.** Sistemas de reação para determinação de resíduos de ditiocarbamatos por  $\text{CS}_2$ . (A) Sistema horizontal (Cullen, 1964; Crnogorac e Schwack, 2009); (B) Sistema vertical (Caldas et al., 2001).

No sistema horizontal (Figura 5A), a amostra com ácido (a) é aquecida sob refluxo (b), e o  $\text{CS}_2$  liberado atravessa o sistema com auxílio de um fluxo de nitrogênio introduzido em (e), ou pela aplicação de um leve vácuo (f), passando por uma ou duas soluções de limpeza (c) e por último, por uma solução reagente para a absorção do  $\text{CS}_2$  (d). Esse sistema, porém, é de difícil montagem e, por ter várias conexões, é suscetível a vazamentos de gás.

Um novo sistema de reação para análise de ditiocarbamatos foi desenvolvido por Caldas et al. (2001) (Figura 5B), que soluciona alguns problemas apresentados no sistema tradicional. O sistema vertical é compacto, relativamente robusto, fácil de montar e de limpar, menos suscetível a vazamentos e ocupa menos espaço na bancada. No sistema vertical, o balão de duas bocas contendo a amostra e o ácido é submetido a um aquecimento. Assim como no sistema horizontal, o  $\text{CS}_2$  liberado é carregado pelo sistema por um fluxo de nitrogênio, passando por uma solução de limpeza localizada na “parte inferior” do sistema, e complexado com a solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol, localizada na “parte superior”. A válvula de bloqueio impede qualquer refluxo do sistema de  $\text{CS}_2$  produzido no balão de reação.

O CS<sub>2</sub> complexado obtido em ambos os sistemas mostrados na Figura 5 é analisado pelo método espectrofotométrico (435 nm), que é largamente utilizado, devido ao seu baixo custo e pelo fato de o procedimento possuir poucas etapas.

No método de detecção do CS<sub>2</sub> por cromatografia gasosa (CG), a hidrólise ácida dos ditiocarbamatos presentes nos alimentos ocorre em um frasco fechado, e o CS<sub>2</sub> gerado (*headspace*) é injetado diretamente no cromatógrafo a gás (Hill, 1992; Jianren, 1989; Friedrichs, 1995), ou extraído simultaneamente em um solvente orgânico (isooctano ou hexano) antes da injeção (Harrington, 1998; Crnogorac e Schwack, 2009). A técnica de extração utilizando solvente orgânico é uma alternativa ao método de *headspace*, onde outros compostos voláteis além do CS<sub>2</sub>, os quais também contêm enxofre em suas estruturas, podem ser coletados e injetados no cromatógrafo gasoso, o que pode interferir nos resultados (Crnogorac e Schwack, 2009). Nas duas técnicas, a detecção pode ser feita por captura de elétrons (CG-ECD; Royer et al., 2001), fotométrica de chama (CG-FPD; Hill, 1992) ou espectrometria de massas (CG-MS; Dasgupta, et al., *sem data*).

Os limites de quantificação (LOQ) reportados por estudos utilizando diferentes formas de detecção do CS<sub>2</sub> normalmente se encontram na faixa entre 0,05 e 0,1 mg CS<sub>2</sub>/kg (Jardim, 2012).

Os LMR estabelecidos para o grupo ditiocarbamatos no Brasil e em outros países estão estabelecidos em níveis de CS<sub>2</sub> (ANVISA, 2003; FAO/WHO, 1993). Embora a determinação de CS<sub>2</sub> seja relativamente rápida e sensível, não possibilita a distinção entre os compostos ditiocarbamatos presentes na amostra. Outra limitação desse método é o fato de que as culturas que possuem geração fitogênica de CS<sub>2</sub> (como por exemplo, o repolho, couve, brócolis e cebola), fornecem resultados falso-positivos (Stertz e Freitas, 2003). Além disso, a determinação seletiva dessas classes é necessária para uma avaliação de risco refinada da exposição a estes fungicidas na dieta, já que a toxicidade não é a mesma entre os compostos (IPCS, 1993).

#### 4.2. Determinação de compostos ditiocarbamatos

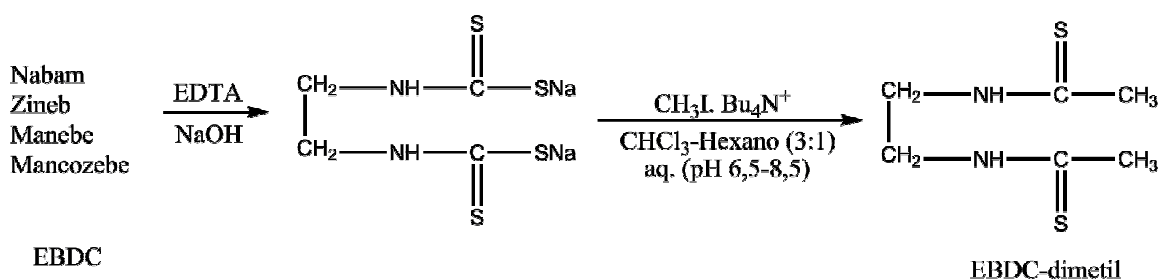
Métodos analíticos para determinação direta dos ditiocarbamatos têm sido reportados na literatura. A maior parte desses métodos basicamente envolve a transformação do composto ditiocarbamato em seus respectivos sais de sódio, deixando seus ânions disponíveis para análise. Essa transformação acontece após tratamento alcalino na presença de agentes complexantes, como por exemplo, o EDTA.

Pflugmacher e Ebing desenvolveram um método para análise de EBDC (manebe, zineb, mancozebe e nabam) e propinebe em maçã, feijão, cenoura, pepino, alface, batata e tomate, posteriormente adotado pela Alemanha como método oficial (DFG S 21, 1984). Este método leva em consideração o fato de os ditiocarbamatos serem fungicidas não sistêmicos, ou seja, a maior parte de seus resíduos permanece na superfície das frutas e vegetais. Nesse método, os resíduos de ditiocarbamatos são extraídos da superfície das amostras (não processadas) com solução aquosa de EDTA e o extrato submetido à separação por permeação de gel em coluna Sephadex LH-20 utilizando uma solução de EDTA 0,1 mol/L como eluente, e detecção espectrofotométrica em 285 nm. As recuperações obtidas das fortificações de amostras controle com os ditiocarbamatos nos níveis de 0,25 a 2 mg/kg, variaram de 79-106%. Foi reportado um LOQ de 0,05 mg/kg para as diferentes culturas, exceto para as amostras com área de superfície maiores, que requerem uma maior quantidade de EDTA na extração, como a alface, cujo LOQ foi de 0,5 mg/kg.

Gustafsson e Fahlgren (1983) determinaram tiram, ziram e zineb em amostras de alimentos e água por HPLC-UV com coluna de fase reversa Nucleosil RP-18 e detecção em 272 nm. Amostras de maçã, pêra, batata e tomate foram cortadas em pedaços e amostras de alface e morango não foram processadas. A primeira técnica de extração testada, utilizada apenas para o tiram presente na superfície das amostras, consistiu na extração com clorofórmio seguida por *clean-up* em uma coluna de sílica gel (Gustafsson e Thompson, 1981). Na segunda técnica, a extração é realizada com EDTA alcalino aquoso e solução de L-cisteína. Em seguida, os ânions de ditiocarbamatos foram extraídos em clorofórmio-hexano (3:1) como pares iônicos de tetra-n-butilamônio hidrogenosulfato (TBAHS) e derivatizado com iodeto de metila, formando o [N,N'-etilenobisditiocarbamato dimetil (EBDC-dimetil)]

(Figura 6). A distinção entre os EBDC não é possível, pois todos formam o mesmo produto de derivatização. A média das recuperações para o zineb, ziram e tiram para as culturas e água no nível de 0,5 mg/kg ficou em faixas de 60-85%, e os limites de detecção ficaram abaixo de 0,02, 0,01 e 0,01 mg/kg, para o zineb, ziram e tiram, respectivamente.

Lo et al. (1996) usaram o mesmo método publicado por Gustafsson e Fahlgren (1983) para investigar formulações de propinebe, e utilizaram absorção atômica para determinar se um produto EBDC era zineb, manebe ou mancozebe, pela análise dos conteúdos de Zn e Mn totais.



**Figura 6.** Formação de EBDC-dimetil (Lo et al., 1996).

Bardarov et al. (1989) foram os primeiros a aplicar cromatografia líquida de troca iônica para a determinação de EBDC e propinebe, porém em produtos técnicos, ar, sangue e tecidos. Neste método, os compostos foram extraídos com EDTA e antioxidante e determinados por HPLC-UV (285 nm) ou detecção eletroquímica.

Irth et al. (1990) determinaram zineb e manebe em solo após extração com uma solução aquosa alcalina de EDTA e pré-concentração seletiva como pares iônicos em uma pré-coluna C18, que foi carregada online com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), outro sal de tetrabutílamônio usado em técnicas de cromatografia de par iônico. Separadamente, o tiram foi determinado em amostras de solo, maçã e alface após extração com diclorometano usando uma coluna de fase reversa e complexação pós-coluna com cobre (II). Para amostras de solo fortificadas em 1 mg/kg, as recuperações obtidas para zineb, manebe e tiram foram maiores que 98% e os LODs foram de 0,1 mg/kg. Os LODs para o tiram variaram em

uma faixa de 0,005–0,01 mg/kg, exceto para a alface (0,05–0,1 mg/kg) (Irth et al., 1990 *apud* Crnogorac e Schwack, 2009).

Aplicando cromatografia de par iônico com detecção por quimioluminescência, Nakazawa et al. (2005) determinaram o mancozebe e o propinebe em pepinos e maçãs. As amostras cortadas em pequenos pedaços foram extraídas com tampão aquoso (10 mM de TBAHS, EDTA, fosfato de sódio dibásico e 0,1% de tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP)). As recuperações nos níveis de 1 a 10 mg/kg foram de 88 a 109% e os LOD obtidos foram de 0,09 e 0,4 µg/kg para o mancozebe e o propinebe, respectivamente (Nakazawa et al., 2004 *apud* Crnogorac e Schwack, 2009).

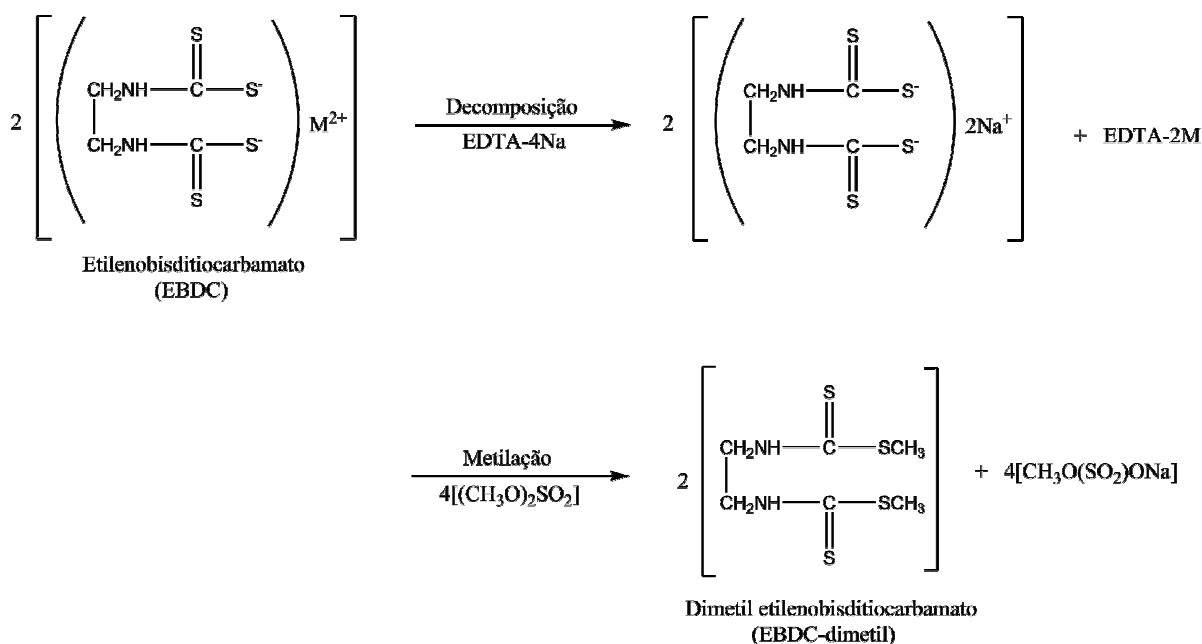
Três subclasses de ditiocarbamatos (dimetilcarbamatos ziram e ferbam, EBDC e propinebe) foram determinadas por Van Lishaut e Schwack (2000) por um método rápido de cromatografia por par iônico com detecção UV (286 nm) e eletroquímica (potencial de +0,60 V). Amostras de ameixa, maçã, tomate e uva, sem nenhum processamento, foram extraídas com tampão aquoso (pH 11,0; TBAHS, EDTA e fosfato de sódio bibásico). Bissulfito de sódio foi adicionado ao tampão aquoso antes do uso com o objetivo de estabilizar os ditiocarbamatos. As subclasses foram separadas por cromatografia em coluna Supelcogel ODP-50 (C18-polivinilálcool) usando metanol/tampão de extração como fase móvel. Os LOQs para a detecção UV foram de 13 a 18 µg de CS<sub>2</sub>/L e na detecção eletroquímica de 8 a 12 µg de CS<sub>2</sub>/L. As recuperações ficaram na faixa de 72 a 111%.

Garcinuño et al. (2004) determinaram o manebe e seus principais metabólitos (ETU e etilenouréia) por HPLC-UV (232 nm e 280 nm) em tomates. As amostras picadas foram extraídas com acetonitrila:diclorometano:clorofórmio (1:1:1), e o extrato separado por cromatografia em coluna de fase reversa LiChrosorb RP-18 e fase móvel de acetonitrila/metanol/100 mM de dodecil sulfato de sódio (SDS). LOQs de 0,45, 0,04, e 0,35 mg/kg foram obtidos para o manebe, ETU e etilenouréia, respectivamente.

López-Fernández et. al (2012) desenvolveram um método para determinação de resíduos de mancozebe, manebe e propinebe por HPLC-UV (270 nm) em frutas e vegetais, onde o extrato é submetido à reação de decomposição e metilação (Figura 7). O método foi validado para tomate, alface, pimentão, maçã, uva e morango. As



amostras foram cortadas e 10 g foram homogeneizados com 7,5 mL de tampão aquoso (pH 7,8), 0,1 g de L-cisteína, 0,5 g de EDTA e 10 mL de solução de dimetil sulfato em acetonitrila na concentração de 0,05 M. A mistura foi agitada por 15 minutos, 4 g de sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl) foram adicionados e a mistura foi agitada em vortex. Uma alíquota do extrato foi transferida para coluna de sílica e os resíduos eluídos com acetonitrila. O extrato foi submetido à análise cromatográfica com coluna C18. A quantificação foi baseada em curvas de calibração de padrão externo feitas com matrizes brancas fortificadas com os ditiocarbamatos. O método não faz distinção entre o mancozebe e o manebe, uma vez que se obtém o mesmo produto para os dois compostos após derivatização. Os LOQs para os compostos avaliados variaram de 0,02-0,5 mg/kg, com recuperações entre 74 e 139% para as matrizes analisadas.



**Figura 7.** Sequência de reação para determinação de EBDC (M = metal) utilizando o método de metilação (Hayama e Takada, 2008).

Alguns métodos para determinação direta dos ditiocarbamatos em alimentos por cromatografia líquida e detector de massas foram reportados na literatura. Blasco et al. (2004) desenvolveram um método para análise dos ditiocarbamatos dazomet, disulfiram, tiram, e dos metabólitos ETU e PTU em abacate, cereja, limão, noz, aveia, laranja, pêsego, arroz e tomate. As amostras foram cortadas e

homogeneizadas e a extração foi conduzida por dispersão de matriz em fase sólida com *carbograph*, eluídas com uma mistura de diclorometano e metanol e os compostos analisados por LC-MS. A média de recuperação variou entre 33-109%, com limites de quantificação em uma faixa de 0,25-2,5 mg/kg, exceto para o tiram e o disulfiram, que não foram recuperados a partir de frutas com alto teor de acidez.

Crnogorac et al. (2008) desenvolveram um método para determinação de três subclasses de ditiocarbamatos (DMDC, EBDC e propinebe) por LC-MS/MS e coluna ZIC-pHILIC (fase estacionária zwitteriônica acoplada a um polímero poroso) em tomate, maçã, pêra, uva, pepino, tamarillo e brócolis. As amostras foram extraídas com tampão de extração SHC-PA (bicarbonato de sódio (SHC) e DL-penicilamina (PA)). DMDC e EBDC deuterados foram utilizados como padrão interno. O método foi validado para tomate com recuperações em média entre 97-101% e o LOQ foi estabelecido em 0,005 mg/kg. As amostras foram analisadas usando LC-MS/MS, LC-MS e o método de determinação de ditiocarbamatos por CS<sub>2</sub>, obtendo-se resultados em concordância para os três métodos, exceto para brócolis e mamão, que produziram resultados falso-positivos no método por CS<sub>2</sub>.

Hayama e Takada (2008) desenvolveram um método para determinação de EBDC por LC-MS/MS em caqui, pêra, morango, repolho, alface e espinafre, e foi utilizado como base para otimização do método publicado por López-Fernández et al. (2012), descrito anteriormente (Figura 7). Durante a extração, após tratamento das amostras com EDTA, L-cisteína, água e solução de dimetil sulfato em acetonitrila, os extratos de acetonitrila foram particionados com sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio. Os extratos foram purificados com adsorvente amina primária secundária (PSA). A validação do método foi realizada nos níveis de 10, 50 e 100 ng/g, com o manebe sendo usado como representativo dos EBDC. As recuperações ficaram entre 71-101% com limites quantificação de 0,24 e 0,8 ng/g, respectivamente.

Cajka et al. (2011) usaram espectrometria de massas ambiente para determinar tiram e ziram em frutas. Foram utilizadas as técnicas de análise direta em tempo real (DART) combinada com espectrometria de massas TOF (*time of flight*) e Orbitrap<sup>®</sup> MS, e ionização de dessorção por *elektrospray* (DESI). O menor nível de calibração para o tiram foi de 0,1 mg/kg (DART–Orbitrap MS), e para o ziram de

0.5mg/kg (DART–TOFMS). Usando padrões internos de calibração foi possível obter resultados (semi) quantitativos.

Schmidt et al. (2013) adaptaram o método LC-MS/MS proposto por Crnogorac et al. (2008) para analisar ziram, ferbam, nabam, manebe, zineb, propinebe, metiram, tiram e mancozebe em maçã, pêra, uva de mesa, ameixa, tomate, manga, mamão, maracujá, damasco e brócolis. Na validação, foram obtidas recuperações que variaram entre 39-221% e LOD entre 0,02-1,19 mg/kg.

Os métodos de determinação direta dos ditiocarbamatos estão sumarizados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Métodos de determinação direta dos fungicidas ditiocarbamatos (cromatografia líquida)

Referência	Cromatografia	Extração	Ditiocarbamatos	Matrizes	LOQ, LOD, recuperação
Pflugmacher e Ebing (1980)	Cromatografia de permeação em gel	Extração de superfície: lavagem das amostras não processadas, com solução aquosa de EDTA.	Manebe, zineb, mancozebe	Maçã, feijão, cenoura, pepino, alface, batata e tomate	Recuperação média: 78-106% LOQ: Alface: 0,5 mg/kg; Demais culturas: 0,05 mg/kg
Gustafsson e Fahlgren (1983)	HPLC-UV	Amostras de maçã, pêra, batata e tomate: cortadas em pedaços Amostras de alface e morango: não foram cortadas.  - Técnica 1 (tiram): Extração com clorofórmio, <i>clean-up</i> e injeção no HPLC. - Técnica 2 (ziram e zineb): Extração com EDTA alcalino aquoso e solução de L-cisteína. Os ânions de DT foram extraídos em clorofórmio-hexano como pares iônicos de TBAHS e derivatizado com iodeto de metila.	Tiram, ziram e zineb	Maçã, alface, pêra, tomate, morango, tomate, batata e água	Recuperação média: Zineb: 58,7-70,0% Ziram: 69,4-84,8% Tiram: 61,5-78,2%  LOD: Zineb: < 0,02 mg/kg Ziram: < 0,01 mg/kg Tiram: < 0,01 mg/kg
Bardarov et al. (1989)	HPLC-UV eletroquímico e (cromatografia de troca iônica)	Dissolução dos EBDC e propinebe na presença de EDTA e antioxidante	EBDC, propinebe	Não foram utilizadas amostras de alimentos nas análises; compostos determinados em produtos técnicos, ar, sangue e tecidos	-----
Irth et al. (1990)	Cromatografia de troca iônica	Zineb e manebe: Extração em solução aquosa alcalina de EDTA e pré-concentração seletiva como pares iônicos em uma pré-coluna C18, carregada online com CTAB  Tiram: extração com diclorometano usando uma coluna de fase reversa e complexação pós-coluna com cobre (II).	Zineb, manebe e tiram	Zineb e manebe: solo  Tiram: solo, maçã e alface	Recuperações: >98%  LOD: 0,1 mg/kg.
Lo et al. (1996)	HPLC-UV e absorção atômica	Utilização do mesmo método publicado por Gustafsson e Fahlgren (1983) para investigar formulações de propinebe, e utilizaram absorção atômica para determinar se um produto EBDC era zineb, manebe ou mancozebe, pela análise dos conteúdos de Zn e Mn totais.	Zineb, manebe, mancozebe, propinebe	Investigar o ingrediente ativo em formulações de propinebe	-----
Van Lishaut e Schwack (2000)	HPLC-UV eletroquímico e (cromatografia de troca iônica)	Aplicação de um tampão aquoso (pH 11,0) contendo TBAHS, EDTA e fosfato de sódio bibásico nas amostras, na proporção de 1 mL por grama de amostra, exceto para materiais com alto coeficiente superfície/massa. Bissulfito de sódio (1 g/L) foi adicionado ao tampão aquoso antes do uso com o objetivo de estabilizar os DT	Ziram, ferbam, manebe, zineb, mancozebe e propinebe	Ameixa, maçã, tomate e uva	Detecção UV: LODs e LOQs de 6-7 µg de CS <sub>2</sub> /L e 13-18 µg de CS <sub>2</sub> /L, respectivamente.  Detecção eletroquímica: LODs e LOQs de 4-8 µg de CS <sub>2</sub> /L e de 8-12 µg de CS <sub>2</sub> /L, respectivamente.  Recuperações: 72-111%
Garcinuño et al.	HPLC-UV	As amostras foram picadas e extraídas usando uma	Manebe e seus	Tomate	LOQs:

Referência	Cromatografia	Extração	Ditiocarbamatos	Matrizes	LOQ, LOD, recuperação
(2004)		mistura de acetonitrila, diclorometano e clorofórmio (1:1:1).	principais metabólitos ETU, EBIS, EU.		Manebe: 0,45 mg/kg ETU: 0,04 mg/kg EU: 0,35 mg/kg
Blasco et al (2004)	LC-APCI-MS (ion modo positivo)	As amostras foram cortadas e homogeneizadas e a extração foi conduzida por dispersão de matriz em fase sólida, onde as amostras foram dispersadas com <i>carbograph</i> , eluídas com uma mistura de diclorometano e metanol.	Dazomet, disulfiram, tiram, ETU e PTU.	Abacate, cereja, limão, noz, aveia, laranja, pêssego, arroz e tomate	Recuperação: 33-109%  LOQ: 0,25-2,5 mg/kg (exceto para o tiram e o disulfiram, que não foram recuperados a partir de frutas com alto teor de acidez.
Nakazawa et al. (2005)	Cromatografia de par iônico com detecção por quimioluminescência	As amostras foram cortadas em pequenos pedaços e extraídas com tampão aquoso consistindo de 10 mM de TBAHS, EDTA, fosfato de sódio dibásico e 0,1% de tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) para estabilizar os DT.	Mancozebe e propinebe	Pepinos e maçãs	Recuperação: 88-109%  LODs: Mancozebe: 0,09 µg/kg Propinebe: 0,4 µg/kg
Crnogorac et al (2008)	LC-ESI-MS <sup>2</sup> (ion modo negativo)	As amostras foram extraídas com tampão de extração SHC-PA (bicarbonato de sódio (SHC) e DL-penicilamina (PA)). DMDC e EBDC deuterados foram utilizados como padrão interno	DMDC, EBDC e PBDC	Tomate, maçã, pêra, uva, tomate cereja, coquetel de tomates, pepino, tomate, tamarillo e brócolis	Recuperações para tomates: 97-101%  LOQ: 0,005 mg/kg
Hayama e Takada (2008)	LC-MS/MS	Após tratamento das amostras com EDTA, L-cisteína, água e solução de dimetil sulfato em acetonitrila, os extratos de acetonitrila foram particionados com sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio e purificados com adsorvente amina primária secundária (PSA).	Mancozebe, manebe e zineb	Caqui, pêra, morango, repolho, alface e espinafre	Recuperações: 71 e 101%  LOQ: 0,8 ng/g, respectivamente.
Cajka, et al. (2011)	DART-MS DESI-MS <sup>2</sup>	DART-MS: homogeneização criogênica das amostras com extração de 5 g de amostra com 5 mL de água por 10 mL de acetonitrila.  DESI-MS <sup>2</sup> : Amostras pesadas sem processamento em sacolas de polietileno e após adição de acetonitrila e padrão interno. A extração foi conduzida durante 15 minutos em um agitador.	Tiram e ziram	Maçã, pêra, morango, alface	Recuperação: DART-MS: 68-75% (fortificação nos níveis 10 e 5 mg/kg); 65-73% (fortificação nos níveis 5 e 1 mg/kg)  DESI-MS <sup>2</sup> : 85%
López-Fernández et al (2012)	HPLC-DAD	As amostras foram tratadas com EDTA, L-cisteína, tampão pH 7,8 e solução de dimetil sulfato em acetonitrila e os extratos de acetonitrila foram particionados com sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio e purificados com cartuchos de sílica.	Mancozebe, manebe e propinebe	Tomate, alface, pimentão, maçã, uva e morango	Recuperações: 74 -139% LOQ: 0,02- 0,5 mg/kg
Schmidt et al (2013)	LC-MS/MS	Adaptação do método proposto por Crnogorac et al. (2008)	Ziram, ferbam, nabam, manebe, zineb, propinebe, metiram, tiram e mancozebe	Maçã, pêra, uva de mesa, ameixa, tomate, manga, mamão, maracujá, damasco e brócolis	Recuperações: 39-221%  LOD: 0,02-1,19 mg/kg.

### 4.3. Cromatografia de par iônico e método QuEChERS

Vários trabalhos que propuseram métodos de determinação direta dos ditiocarbamatos utilizaram a cromatografia de par iônico para separar os ditiocarbamatos, após serem decompostos com solução alcalina de EDTA. Alguns métodos também optaram pela utilização de técnicas de derivatização, que transformam os ditiocarbamatos em formas metiladas a partir de seus sais de sódio solúveis, com extração e purificação utilizando o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), desenvolvido por Anastassiades et al. (2003). Técnicas de cromatografia de par iônico e o método QuEChERS estão descritas a seguir.

#### *Cromatografia de par iônico*

Os trabalhos iniciais em cromatografia líquida foram baseados em fases estacionárias muito polares (como sílica) e solventes relativamente não-polares eram utilizados como fase móvel. Por razões históricas, esse tipo de cromatografia é atualmente chamado cromatografia de fase normal. Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é apolar, geralmente um hidrocarboneto (C18), e a fase móvel, um solvente relativamente polar (geralmente mistura de água com metanol, acetonitrila ou tetrahidrofurano) (Skoog, 2005). A cromatografia de par iônico é um subgrupo da cromatografia de fase reversa, onde espécies que são facilmente ionizáveis são separadas em colunas de fase reversa (Skoog, 2005). O processo de separação ocorre pela interação eletrostática entre os íons presentes na amostra e os contra-íons da fase estacionária que possui grupos com carga (Klein, 2010). Quando a amostra possui componentes iônicos, esses componentes podem ser muito polares para serem retidos no modo fase reversa e em situações como essa, a cromatografia por par iônico pode ser útil (Dolan, 2008). Nesse tipo de cromatografia, normalmente a fase móvel é chamada de reagente de par iônico (RPI), que possui uma cauda apolar e uma parte iônica. Quando o reagente é adicionado à fase móvel, ele entra em equilíbrio com a coluna, onde a cauda apolar fixa-se à fase estacionária apolar (por exemplo, C8 ou C18), deixando o grupo funcional carregado voltado para fora. Dessa forma, as espécies iônicas de cargas

opostas presentes na amostra serão atraídas pelo RPI imobilizado, estabelecendo a retenção cromatográfica (Dolan, 2008). Os grupos derivados do ácido sulfônico e do ácido carboxílico podem ser usados para reter cátions e, da mesma forma, sais de amônio quaternário e aminas são utilizados para reter ânions (Klein, 2010).

A base da separação por troca iônica depende muito da interação existente entre os íons que serão separados e os grupos funcionais da fase estacionária. Quando analitos de diferentes afinidades com o RPI são injetados em uma coluna de troca iônica, os que possuírem maior afinidade com as cargas do RPI imobilizado migrarão pela coluna de maneira mais lenta. A retenção é reduzida quando a concentração dos íons competidores na fase móvel é aumentada. A retenção e a seletividade de separação podem ser influenciadas por esses íons competidores e suas cargas, e/ou pela mudança de carga dos íons do analito, como por exemplo, pela alteração do pH ou complexação. Dessa forma, o pH do eluente é um fator chave para controlar o estado da carga do analito e a seletividade pode ser manipulada basicamente pela concentração do RPI e pela porcentagem do modificador orgânico no eluente (Cecchi, 2008).

A análise de ditiocarbamatos proposta por Van Lishaut e Schwack (2000) utiliza o tetra-n-butilamônio hidrogenosulfato (TBAHS) como reagente de par iônico, que tem a função de extrair os ânions dos analitos como pares iônicos de tetrabutilamônio.

#### *Método QuEChERS*

Alguns trabalhos propõem como método de preparo da amostra, a utilização do método QuEChERS (Anastassiades et al. 2003), comumente usado em análises de resíduos de pesticidas e que leva esse nome devido às suas vantagens (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*). É muito utilizado em análises multirresíduos, por ser de aplicação ampla e por produzir resultados confiáveis (Jardim, 2012). O método original consiste na extração por agitação manual com acetonitrila, seguido da adição de  $MgSO_4$  e NaCl para partição das fases. A purificação é feita pela extração dispersiva em fase sólida com amina primária secundária (PSA) e  $MgSO_4$ . O carvão ativado também pode ser utilizado na etapa de purificação para amostras contendo clorofila e carotenóides. Nos métodos de

determinação direta dos ditiocarbamatos reportados na literatura, essa técnica é utilizada em conjunto com a decomposição e metilação dos ditiocarbamatos.

## **5. Incidência de ditiocarbamatos em alimentos**

### *5.1. No Brasil*

No Brasil há dois programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenados pela ANVISA e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), respectivamente. Jardim e Caldas (2012) analisaram os resultados obtidos pelo PARA e pelo PNCRC no período entre 2001 e 2010. Os ditiocarbamatos foram determinados como  $CS_2$  por espectrofotometria ou CG-FPD (LOQ = 0,05 a 0,4 mg/kg). Um total de 13.556 amostras de 22 alimentos foram analisadas no âmbito dos dois programas, 89% pelo PARA. Os resultados mostram que os ditiocarbamatos foram os pesticidas mais detectados, presentes em mais de 40% das amostras analisadas, seguido do carbendazim (~25%) e clorpirifós (~15%). A alface apresentou a maior porcentagem de amostras positivas para ditiocarbamatos (71,3%), seguido da maçã (67,7%) e tomate (56,4%) (Tabela 3).



**Tabela 3.** Resultados dos programas Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) entre 2001 e 2010 (adaptado de Jardim e Caldas, 2012)

<b>Alimento</b>	<b>Número de amostras analisadas</b>	<b>% amostras positivas para pelo menos um pesticida</b>	<b>% amostras positivas para ditiocarbamatos</b>
Abacaxi	270	41,9	11,5
Alface	1007	33,9	71,3
Arroz	298	18,5	3,6
Banana	911	11,3	45,6
Batata	1222	25,9	2,8
Beterraba	172	32,0	10,9
Cebola	263	1,1	0
Cenoura	1021	15,5	36,1
Couve-galega	129	58,1	46,7
Feijão	301	55,1	2,4
Laranja	1219	28,5	14,4
Limão	31	74,2	0
Maçã	1750	79,9	67,7
Mamão	1545	82,3	45,5
Manga	284	30,6	2,3
Melão	21	28,6	0
Morango	992	76,3	25,2
Pepino	146	53,4	29,5
Pimentão	266	82	26,1
Repolho	268	18,3	0
Tomate	1154	59,8	56,4
Uva	286	82,2	29,8

A maior parte das 1790 irregularidades encontradas no período estudado estava relacionada ao uso de ingredientes ativos não-autorizados (72,1% das irregularidades), sendo que a presença irregular de ditiocarbamatos foi encontrada em 138 amostras, principalmente de alface. Os ditiocarbamatos foram os pesticidas

encontrados com mais frequência acima dos LMR durante todo o período em estudo (121 amostras).

Stertz e Freitas (2003) analisaram 18 amostras de agrião d'água obtidas de três sistemas de cultivo diferentes (orgânico, convencional e hidropônico). Todas as amostras analisadas apresentaram resultados positivos para CS<sub>2</sub>, com médias de 0,84±0,53, 1,26±0,99 e 0,82±0,68 mg de CS<sub>2</sub>/kg para as amostras de agrião orgânico, convencional e hidropônico, respectivamente.

Lemes et al. (2005) validaram métodos e determinaram resíduos de ditiocarbamatos e de ETU em amostras de mamão tratadas com mancozebe e não tratadas. No total foram analisadas 41 amostras, que mostraram a presença de resíduos de ETU (0,01-0,32 mg/kg) e de mancozebe (0,5-2,1 mg CS<sub>2</sub>/kg) nas amostras tratadas.

Ciscato et al. (2009) analisaram 112 amostras de frutas para exportação (abacate, cherimólia, amora, figo, uva, goiaba, limão, manga, mamão e caqui) coletadas entre 2006 e 2007. Os ditiocarbamatos (23,1%) e os inseticidas piretróides (21,8%) foram os resíduos detectados com maior frequência, sendo encontrados em amostras de figo, goiaba, manga, mamão e caqui. Os níveis de ditiocarbamatos, em CS<sub>2</sub>, nas amostras de figo estavam acima do LMR da União Europeia, e várias violações foram encontradas devido ao uso proibido de ditiocarbamatos em algumas culturas no Brasil.

Mattos et al. (2011) determinaram a concentração de agrotóxicos em grãos, casca e farelo de arroz irrigado produzida em lavoura experimental cultivada no sistema convencional no Rio Grande do Sul. Foram encontrados resíduos de ditiocarbamatos na safra 2008/09 em amostras de grãos e farelo de arroz em concentrações entre 0,09 a 0,23 mg/kg. Em estudo conduzido por Caldas et al. (2011), 177 amostras de alimentos prontos para consumo servidos no Restaurante Universitário da Universidade de Brasília foram analisadas para determinação de ditiocarbamatos (método espectrofotométrico, LOQ = 0,05 mg CS<sub>2</sub>/kg), e inseticidas organofosforados. No total, 69,5% das amostras analisadas foram positivas para ditiocarbamatos, principalmente salada, vegetais cozidos e frutas; 42,8% das amostras foram positivas para organofosforados.

Jardim et al. (2014) analisaram 238 amostras de caqui (67), caju (32), goiaba (44) e pêsego (67) e polpas de fruta congeladas (11 de caju, 14 de goiaba e 3 de pêsego), coletadas no comércio brasileiro para determinação de ditiocarbamatos (método espectrofotométrico, LOQ = 0,05 mg/kg CS<sub>2</sub>) e outros 46 pesticidas. Os ditiocarbamatos foram os pesticidas mais presentes, sendo encontrados em todas as culturas analisadas (33,2 % do total de amostras), com a maior concentração de 7,09 mg CS<sub>2</sub>/kg encontrada em uma amostra de caqui. O uso de ditiocarbamatos em caqui, caju e goiaba não é permitido no Brasil.

Oliveira et al. (*sem data*) avaliaram a presença de ditiocarbamatos em amostras de repolho produzidas no Distrito Federal, em sistemas de cultivo convencional e com adubação orgânica. Foram encontradas concentrações de até 0,016 mg CS<sub>2</sub>/kg nas amostras cultivadas convencionalmente e até 0,512 mg CS<sub>2</sub>/kg para as produzidas sob sistema de adubação orgânica. Os teores mais altos de CS<sub>2</sub> encontrados em repolho cultivado sob sistema de adubação foram atribuídos ao maior acúmulo de compostos de enxofre proveniente do adubo orgânico.

## 5.2. Ditiocarbamatos em outros países

Os ditiocarbamatos também foram os pesticidas encontrados com mais frequência em programas de monitoramento em estudos em outros países. No programa de 2008 da União Européia, resíduos de ditiocarbamatos foram os que excederam os LMR com maior frequência (0,6% das amostras), sendo que todas as amostras eram de espinafre originárias de países da União Européia (EFSA, 2010). Também em 2008, foram publicados os resultados de um programa de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos da Bélgica, onde os ditiocarbamatos estavam entre os pesticidas mais encontrados nas amostras analisadas, principalmente caqui, manga, maracujá, espinafre e alface (AFSCA, 2008). Góralczyk et al. (2009) mostraram que os ditiocarbamatos foram os pesticidas mais detectados dentre as 392 amostras de alimento analisadas no período de 2010 a 2012 (26,5 % das amostras), principalmente maçã, e foram também os pesticidas mais frequentemente detectados acima dos limites permitidos.

### III.OBJETIVOS

#### Geral

Desenvolver e validar um método analítico para determinação de EBDC e propinebe em alimentos por HPLC-UV.

#### Específicos

1. Comparar dois métodos de determinação de EBDC e propinebe por HPLC-UV em hortaliças do tipo brássicas e em frutas;
2. Otimizar e validar o método mais satisfatório para análise de EBDC e propinebe por HPLC-UV;
3. Analisar amostras coletadas no comércio, pelo método cromatográfico validado e comparar os resultados com os da análise das mesmas amostras pelo método convencional de análise de ditiocarbamatos (espectrofotométrico, em termos de CS<sub>2</sub>).

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Padrões e reagentes

Padrões analíticos de mancozebe (pureza 73,50% ou 76,90%) e propinebe (pureza 78,00% ou 70,00%) foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer<sup>®</sup> (Alemanha). Dissulfeto de carbono grau HPLC foi obtido da marca Vetec<sup>®</sup>.

Metanol e acetonitrila grau HPLC e tetra-n-butilamônio hidrogenosulfato (pureza 98%) foram obtidos da Merck<sup>®</sup>. Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico dihidratado (pureza 99,0-101,0%), fosfato de sódio dibásico anidro (pureza  $\geq 99,0\%$ ), bissulfito de sódio, L-cisteína (pureza  $\geq 99,0\%$ ), sulfato de magnésio anidro (pureza  $\geq 99,5\%$ ), foi obtido da marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Ácido acético glacial (pureza 100%), acetato de sódio (pureza 99,5%) e cloreto de sódio (pureza 99,97%), foram adquiridos da marca JT Baker<sup>®</sup>. Dimetil sulfato foi adquirido da Riedel de Hæn<sup>®</sup>.

Amina primária secundária (PSA) e carvão ativado foram obtidos da marca Supelco<sup>®</sup>. Cartuchos Strata SI-1 silica cartridges (55  $\mu\text{m}$ , 70 Å, 500 mg, 3 mL) foram adquiridos da Phenomenex<sup>®</sup>. Cartuchos C18 Spe-ed SPE cartridges Octadecyl C18/18% 500 mg, 3 mL, foi adquirido da Applied Separations<sup>®</sup>.

Dietanolamina (pureza 99%), acetato de cobre II monohidratado (pureza 98-102%), álcool etílico (pureza 95%), hidróxido de sódio (pureza 99%), ácido clorídrico (pureza 32%), cloreto de estanho (pureza 98-103%), fosfato de sódio tribásico (pureza 98-102%) foram obtidos da marca Vetec<sup>®</sup>.

### 2. Equipamentos gerais

Ultrassom Modelo USC – 3300 da Unique<sup>®</sup>, pHmetro da marca AJ Micronal<sup>®</sup>, modelo AJX-512, com eletrodo combinado pH/ATC 201T-M, agitador Certomat<sup>®</sup> BS-T, agitador vortex AP 53 Phoenix<sup>®</sup>, centrífuga Rotina 380P da Hettich<sup>®</sup>, evaporador Marconi<sup>®</sup> 7006, mantas aquecedoras das marcas Quimis<sup>®</sup> (modelo Q321K-25) e Fisatom<sup>®</sup> (modelo 102E).

As soluções tampão e fases móveis foram filtradas com sistema de filtração a vácuo com utilização de membranas PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  da marca Millipore<sup>®</sup>. Os extratos

das amostras, suspensões padrão e padrões na forma derivatizada (Figura 7) foram filtrados em filtros de seringa Millex<sup>®</sup> LCR 0,45 µm. A água utilizada em todos experimentos foi tratada em um sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup>, modelo Gradiente CR.

Balões volumétricos calibrados da marca Laborglas<sup>®</sup> de 10, 25 e 50 mL foram utilizados neste estudo.

### **3. Sistema cromatográfico e espectrofotômetro**

Sistema HPLC-UV da marca Shimadzu<sup>®</sup>, modelo LC20AT, com injetor automático modelo SIL-20SA, loop de 100 µL, sistema de bombas quaternário LC-20AT, forno de coluna modelo CTO-20SAC, módulo comunicador CBM-20A e detector UV-VIS modelo SPD-M20A conectado ao software LC Solution<sup>®</sup>.

Foram utilizadas duas colunas analíticas para as análises realizadas no método de cromatografia de par iônico: coluna Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula, com pré-coluna Asahipak ODP-50G 4A 10 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula; coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm com pré-coluna Gemini C18 4 x 3,0 mm, ambos da Phenomenex<sup>®</sup>. Para as análises do método de metilação foram utilizadas duas colunas analíticas Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm (uma antiga e uma nova) e cartucho de pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0 mm, ambos da Phenomenex<sup>®</sup>.

O espectrofotômetro, utilizado nas análises de determinação de ditiocarbamatos por CS<sub>2</sub>, foi o modelo UV-1650 PC da marca Shimadzu<sup>®</sup>.

### **4. Suspensões padrão e soluções para análise**

#### *4.1. Método por cromatografia de par iônico*

Para esse método, foi usado como base o procedimento adaptado de Van Lishaut e Schwack (2000).

a) *Fase móvel EXM (aqueous extraction medium) (10 mM e 20 mM)*: mistura de TBAHS, EDTA e fosfato de sódio dibásico, ajustados para pH 11 com hidróxido de sódio. Para o preparo de 1 L de solução EXM (10 mM) foram pesados 3,3954 g de TBAHS, 1,4196 g de fosfato de sódio e 3,7224 g de EDTA. O dobro das quantidades foi pesado para o preparo da solução de 20 mM. As soluções foram preparadas em água Milli-Q® e colocadas em ultrassom durante 10 minutos antes de serem utilizadas no HPLC. Quando não estavam sendo usadas, as soluções foram mantidas refrigeradas.

b) *Fase móvel EDTA + fosfato de sódio (20 mM)*: mistura de EDTA e fosfato de sódio dibásico, ajustados para pH 11 com hidróxido de sódio. Para o preparo de 1 L de solução foram pesados 2,8392 g de fosfato de sódio e 7,4448 g de EDTA. A solução foi preparada em água Milli-Q® e colocada em ultrassom durante 10 minutos antes de ser utilizada no HPLC. Quando não estava sendo usada, a solução foi mantida refrigerada.

c) *Solução para o preparo das suspensões padrão e para extração (EXM-S)*: à solução EXM foi adicionado bissulfito de sódio na concentração de 1 g/L formando a solução “EXM-S”, usada no preparo das suspensões padrão de mancozebe e propinebe e durante a extração. O bissulfito de sódio foi adicionado à solução EXM imediatamente antes do uso.

d) *Suspensão estoque*: para o preparo das suspensões estoque de mancozebe e de propinebe, foram dissolvidos aproximadamente 10 mg dos ditiocarbamatos em 50 mL de solução EXM-S, obtendo-se uma suspensão de concentração de aproximadamente 0,15 mg/mL. A suspensão foi colocada em um ultrassom durante 5 minutos antes de ser utilizada no preparo das suspensões de trabalho. A suspensão de mancozebe era homogênea, mas a de propinebe mostrou um precipitado. As suspensões estoque foram armazenadas em freezer (-15°C) e agitadas vigorosamente imediatamente antes de serem utilizadas.

e) *Suspensão de trabalho*: 1 mL da suspensão estoque do pesticida foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com solução EXM-S para se obter a primeira suspensão de trabalho, de concentração aproximada de 6 µg/mL. A partir dessa suspensão, foram feitas as diluições necessárias para o preparo das suspensões de trabalho de 0,24 e 0,48 µg/mL. As suspensões foram armazenadas em freezer (-15°C).

f) *Suspensões de trabalho de mistura (STM)*: as suspensões de trabalho de mistura dos padrões mancozebe e propinebe foram preparadas em solução EXM-S a partir de suas respectivas suspensões de trabalho de 6 µg/mL. Foram preparadas suspensões de concentrações de 0,24 e 0,48 µg/mL (Van Lishaut e Schwack, 2000). As suspensões foram armazenadas em freezer (-15°C).

#### 4.2. Método por metilação

Para esse método, foi usado como base o procedimento adaptado de López-Fernández (2012).

a) *Suspensão estoque*: as suspensões estoque dos ditiocarbamatos mancozebe e propinebe (de concentrações de aproximadamente 1 mg/mL) foram preparadas transferindo-se quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL, aproximadamente 10 mg do respectivo pesticida e completando o volume com acetonitrila. As suspensões estoque utilizadas foram preparadas a cada duas semanas e armazenadas em freezer (-15°C). Antes de serem utilizadas, as suspensões eram agitadas para homogeneização (Figura 8).





**Figura 8.** Suspensão estoque de propinebe em acetonitrila (1 mg/mL).

b) *Suspensão de trabalho de mistura (STM)*: as suspensões de trabalho de mistura contendo ambos os ditiocarbamatos em estudo foram preparadas diariamente (quando não mencionado) em água Milli-Q<sup>®</sup>, a partir de suas respectivas suspensões estoque de 1 mg/mL, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 0,03 mg/mL. A cada pipetagem a suspensão de mistura resultante era agitada para homogeneização.

c) *Soluções para extração e metilação*

- Solução de dimetil sulfato 0,05 M em acetonitrila. O dimetil sulfato é um reagente tóxico e deve ser manuseado na capela, utilizando luvas, jaleco, óculos e máscara de proteção.
- Solução tampão fosfato (pH 7,8): fosfato de sódio tribásico 0,3 M: HCl 0,2 M (1:10). O pH foi corrigido com solução de NaOH 2 M.

d) *Soluções para testes de efeito do pH da fase móvel*

- Solução tampão acetato (para os testes de fase móvel com pHs 4 e 5): 3,5 mL de ácido acético e 11,56 g de acetato de sódio em balão volumétrico de 1 L, ajustado com HCl 2 M.
- Solução tampão fosfato (para o teste de fase móvel com pH 8): o mesmo tampão utilizado como solução para extração e metilação (item 4.2, "c") e o pH foi corrigido para 8 com solução de NaOH 2 M.

### 4.3. Método espectrofotométrico (CS<sub>2</sub>)

a) *Solução de digestão*: foram transferidos 31,25 g de SnCl<sub>2</sub> para um erlenmeyer de 4 L contendo cerca de 200 mL de água destilada e 500 mL de HCl 32%. Após a total dissolução do SnCl<sub>2</sub>, o volume foi completado para 2,5 L com água destilada.

b) *Solução de hidróxido de sódio 10% (m/v)*: 100 g de NaOH para um balão de 1 L, completando-se o volume com água destilada.

c) *Solução complexante*: foram transferidos 0,096 g de acetato de cobre para um balão volumétrico de 2 L contendo cerca de 200 mL de etanol. Em seguida, 200 g de dietanolamina foram transferidos para o balão, e o volume foi completado com etanol. A solução resultante de coloração azulada foi mantida refrigerada, sendo estável durante 3 meses.

d) *Soluções padrão de dissulfeto de carbono (CS<sub>2</sub>)*:

- Solução Estoque 1: 5 mL de etanol foram pesados em um balão volumétrico de 25 mL com tampa na balança analítica. A massa (M1) foi anotada. Em seguida, 0,1 mL de CS<sub>2</sub> foram transferidos para o balão, que foi imediatamente fechado e pesado. A massa (M2) foi anotada. O volume do balão foi completado com etanol.
- Solução Estoque 2: 1 mL da solução estoque 1 foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com etanol. A solução estoque 2 foi utilizada para a construção da curva analítica e se manteve estável apenas no dia do preparo.

As concentrações finais das soluções estoque 1 (3,7 mg/mL) e estoque 2 (0,07 mg/mL), foram dadas a partir do cálculo da diferença de (M2 – M1).

## 5. Amostras

As amostras controle (orgânicas, sem a presença dos analitos) ou convencionais de alface, brócolis, cebola, tomate, couve, repolho, goiaba e caju

utilizadas e analisadas no estudo foram adquiridas em supermercados, hortifrutigranjeiros ou feiras especializadas em venda de produtos orgânicos. Adicionalmente, algumas amostras de goiaba foram colhidas em pés de goiaba sem agrotóxicos na cidade de Brasília.

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer a temperaturas  $< -15^{\circ}\text{C}$  e processadas ainda congeladas no dia seguinte. Durante o processamento, as amostras foram cortadas em pedaços de aproximadamente  $1\text{ cm}^3$ . As amostras são processadas congeladas e rapidamente, para não permitir a degradação dos ditiocarbamatos.

Para análise no método por cromatografia de par iônico, 15 g de amostra foram pesados em erlenmeyers. Para as análises pelo método de metilação, 10 g de amostra foram pesados em tubos falcon de 50 mL. Para as análises no método espectrofotométrico ( $\text{CS}_2$ ), 150 g de amostra foram pesados em balões de duas bocas.

#### *5.1. Fortificação das amostras para os testes de otimização e validação*

a) *Método por cromatografia de par iônico*: a amostra controle de alface foi fortificada no nível de 0,5 mg/kg com volume apropriado das suspensões de trabalho, previamente preparadas e deixada em repouso durante 15 minutos para permitir a penetração da suspensão.

b) *Método por metilação*: as amostras controle foram fortificadas com volumes apropriados da STM de concentração 0,03 mg/mL e deixadas em repouso durante 15 minutos para permitir a penetração da suspensão.

### **6. Otimização do método por cromatografia de par iônico**

#### *6.1. Definição das condições cromatográficas*

As condições cromatográficas foram estabelecidas em estudos onde as suspensões padrão foram injetadas em diferentes condições e diferentes colunas

cromatográficas. Foram preparadas suspensões de trabalho de mancozebe e propinebe em EXM-S nas concentrações aproximadas de 0,24 e 0,48 µg/mL, e misturas dos dois pesticidas nas mesmas concentrações.

A princípio foi utilizada a coluna cromatográfica Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6mm, 5 µm de diâmetro de partícula, com pré-coluna Asahipak ODP-50G 4A 10 x 4,6 mm, 5 µm de diâmetro de partícula. A fase móvel consistiu inicialmente do gradiente de metanol e EXM (10 mM), conforme utilizado por Van Lishaut e Schwack (2000): % metanol (tempo em minutos) = 10(0)-60(15)-10(25)-10(40). Testes no modo isocrático também foram realizados, onde foram avaliadas diferentes proporções de solvente. As porcentagens de metanol testadas foram de 20, 25, 30 e 40% no modo isocrático.

Posteriormente foram realizados testes com a coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm e cartucho de pré-coluna Gemini C18 4 x 3,0 mm, onde as suspensões padrão foram injetadas no modo isocrático utilizando as mesmas porcentagens de metanol testadas na coluna anterior. Proporções de fase móvel compostas por três solventes também foram avaliadas utilizando-se a coluna Gemini. Uma dessas proporções foi escolhida como condição ideal para a coluna: 35% de metanol, 52,0% de solução EXM (20 mM, pH=11) e 13,0% de solução EDTA+Fosfato (20 mM, pH=11).

Em todos os testes foram injetados 50 µL de suspensão padrão do ditiocarbamato, ou mistura de ditiocarbamatos em cada coluna avaliada. A temperatura do forno de coluna foi estabelecida em 30°C e a vazão em 0,5 mL/min. A detecção foi conduzida em 286 nm.

## *6.2. Estudos de estabilidade dos padrões*

A estabilidade do mancozebe e propinebe foi avaliada durante 5 dias quando uma suspensão mista de 0,48 µg/mL foi armazenada a temperatura ambiente e no freezer (< -15°C). A suspensão foi injetada em duplicata diariamente no HPLC-UV e a análise conduzida no modo isocrático (25% de metanol e 75% de solução EXM (20 mM, pH=11) em coluna Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6 mm, 5 µm.

### 6.3. Etapa de extração

As extrações dos pesticidas da amostra de alface orgânico foram realizadas com base no procedimento descrito por Van Lishaut e Schwack (2000). Algumas modificações no procedimento original foram feitas com o objetivo de não diminuir a vida útil da coluna e para adaptar à rotina do laboratório, como a filtração do extrato com papel de filtro e o processamento das amostras.

Após o processamento, 15 g de amostra foram pesados em um erlenmeyer e fortificados no nível de 0,5 mg/kg com suspensão de propinebe e/ou mancozebe e deixadas em repouso durante 15 minutos antes da extração. Em seguida, 15 mL de solução EXM-S foram adicionados à amostra e o frasco agitado por 10 minutos em um agitador. O extrato resultante, de aparência turva e viscosa, foi centrifugado, filtrado com papel de filtro e, em seguida, uma alíquota de 1 mL foi passada através de um filtro de seringa Millex<sup>®</sup> e injetada no HPLC-UV (286 nm). A filtração com papel de filtro e filtro de seringa foi muito lenta e difícil, sendo necessária a utilização de mais de um filtro para cada extrato. O mesmo procedimento foi realizado com um branco da amostra.

Para a análise no HPLC, foi utilizada a condição otimizada para a coluna Gemini, descrita no item 6.1.

## 7. Otimização do método por metilação

Vários experimentos foram realizados no intuito de otimizar o método, durante os quais foram testados tipos de purificação (*clean-up*), efeito do pH da fase móvel, vazão da fase móvel e tipos de gradiente.

Os itens a seguir descrevem os procedimentos realizados durante cada etapa do processo de otimização e o procedimento otimizado, o qual foi utilizado para validação das matrizes goiaba e repolho.

### 7.1. Procedimento metilação/clean-up 1

Inicialmente teve-se como base o método de extração descrito no trabalho de López-Fernández et al. (2012), com algumas modificações. O procedimento consistiu na pesagem de 10 g de amostra em um tubo falcon de 50 mL e homogeneização com 7,5 mL de tampão pH 7,8, 0,1 g de L-cisteína, 0,5 g de EDTA e 10 mL de solução de dimetil sulfato 0,05 M em acetonitrila. O tubo foi agitado por 15 minutos e subsequentemente, 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio foram adicionados. A mistura resultante foi agitada em vortex durante 1 minuto e centrifugada durante 5 minutos a 4000 rpm e 10°C. Uma alíquota de 3 mL da fase orgânica (superior) foi coletada para o *clean-up* com cartucho de sílica Strata SI-1 previamente condicionado com 5 mL de acetonitrila. Após a passagem de 3 mL do extrato orgânico pelo cartucho, o mesmo foi carregado com 3 mL de acetonitrila. As duas frações (extrato e acetonitrila) foram coletadas juntas em um tubo falcon de 15 mL e concentradas em um evaporador até um volume final de 3 mL. Uma alíquota do extrato foi filtrada com filtros de seringa Millex<sup>®</sup> e 25 µL injetados no HPLC-UV (270 nm), com coluna Gemini antiga, mantida em um forno a 40°C, com uma vazão de 0,5 mL/min. As fases móveis utilizadas foram água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) usando o seguinte gradiente (Gradiente A): 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna (tempo de corrida: 20 minutos).

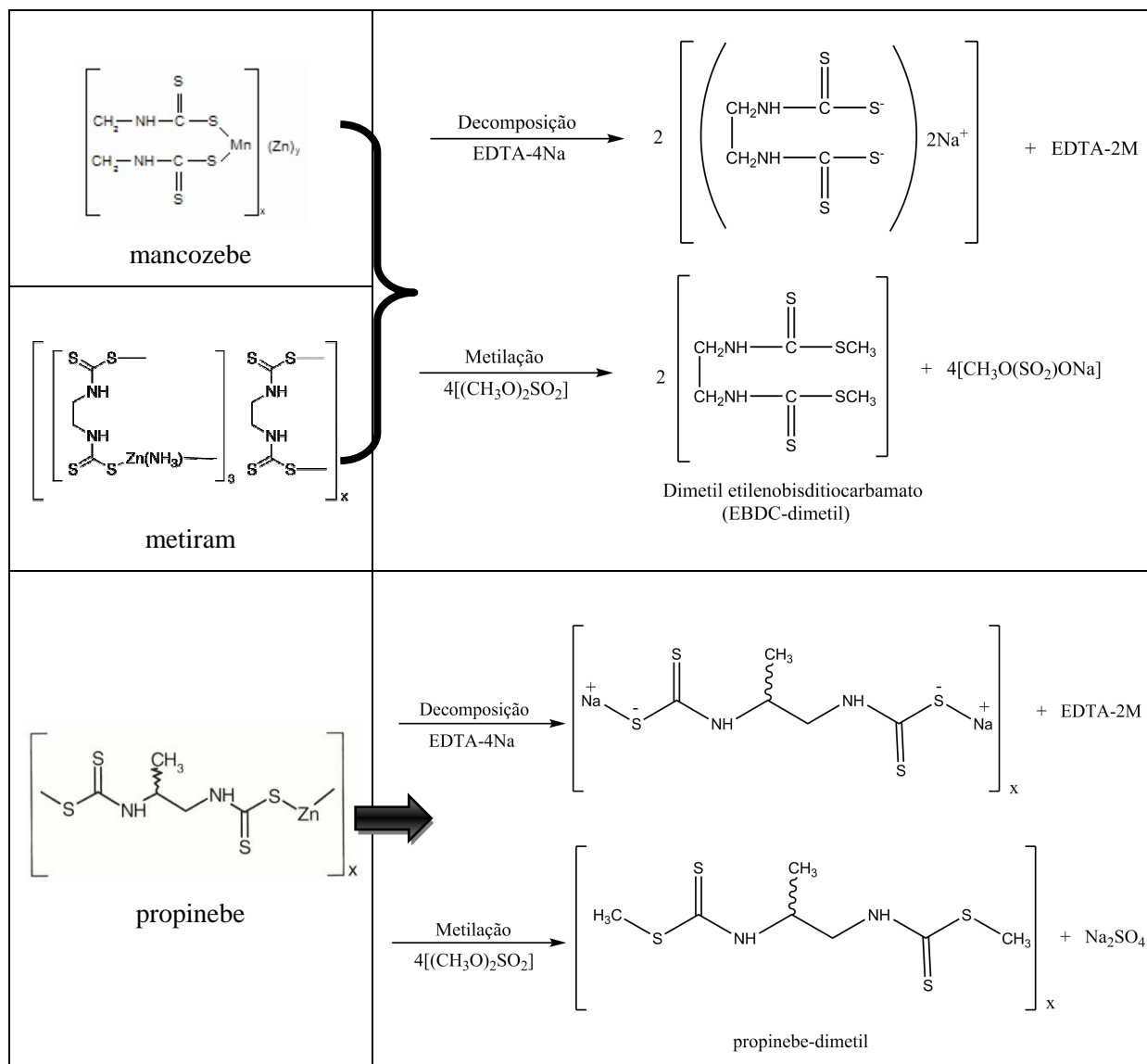
## 7.2. Procedimento metilação/clean-up 2

Para o segundo procedimento, após a centrifugação da mistura durante 5 minutos a 4000 rpm e 10°C descrito no procedimento 7.1, uma alíquota de 6 mL foi transferida para um tubo falcon de 15 mL contendo 150 mg de PSA e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. O tubo foi agitado durante 1 minuto em vortex e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. 1 mL do extrato resultante foi filtrado em filtro de seringa Millex<sup>®</sup> e transferido para um vial, antes de ser injetado no HPLC. Para a análise no cromatógrafo líquido, foram mantidas as mesmas condições do procedimento descrito no item 7.1.

### 7.3. Comparação entre metilação/clean-up 1 (cartuchos de sílica) e metilação/clean-up 2 (dispersão em PSA)

Os dois procedimentos descritos anteriormente foram comparados com amostras controle de alface, brócolis, cebola, goiaba, tomate em um dia (Dia 1) e com repolho e couve no dia seguinte (Dia 2). As amostras foram fortificadas no nível de 5 mg/kg com STM de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL), e extraídas em uma replicata utilizando os dois tipos de *clean-up* descritos anteriormente (mistura de PSA (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg) ou cartuchos de sílica Strata SI-1). As amostras analisadas no “Dia 1” foram fortificadas com uma STM preparada no mesmo dia da análise. As amostras do “Dia 2” foram fortificadas com a suspensão preparada no “Dia 1” no intuito de comparar o comportamento da suspensão de um dia para o outro. Um branco de cada amostra também foi extraído.

A mesma quantidade da mesma STM utilizada para fortificar as amostras foi derivatizada. A derivatização ocorre pela decomposição do ditiocarbamato pelo EDTA e metilação pelo dimetil sulfato, formando EBDC-dimetil e propinebe-dimetil. O procedimento de derivatização do padrão consistiu na adição de volume apropriado da STM diretamente ao tubo falcon de 50 mL sem amostra. Assim, a etapa de extração foi realizada como descrito para as amostras para que ocorresse a derivatização do mancozebe e propinebe. A Figura 9 ilustra as estruturas químicas dos EBDC e do propinebe metiladas.



**Figura 9.** Reação de dimetilação de EBDC e propinebe (M = metal).

#### 7.4. Modificações no procedimento metilação/clean-up 2

Com os resultados obtidos nos testes anteriores, a etapa de purificação foi definida com o uso da dispersão em PSA. Entretanto, em razão dos interferentes observados nos cromatogramas do brócolis, couve, repolho, goiaba e tomate nos dois procedimentos de purificação testados anteriormente, novos testes de *clean-up* foram realizados a fim de eliminar as interferências. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas no item 7.1. Para esses testes, foi utilizada



uma nova coluna Gemini C18, com as mesmas especificações da que estava sendo utilizada anteriormente.

Sete tipos de *clean-up* foram estabelecidos para os testes dessa etapa:

- a. PSA (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)
- b. PSA (300 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)
- c. PSA (150 mg) + sílica (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)
- d. PSA (300 mg) + sílica (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)
- e. PSA (150 mg) + C18 (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)
- f. PSA (300 mg) + C18 (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)
- g. PSA (150 mg) + carvão ativado (150 mg) + MgSO<sub>4</sub> (900 mg)

Apenas a matriz brócolis foi selecionada para esses experimentos, por ter sido considerada a mais problemática de acordo com os resultados do teste descrito no item 7.3. Em cada teste foram extraídos um branco e três amostras fortificadas no nível de 1 mg/kg usando uma STM de concentração de 0,03 mg/mL. A mesma quantidade de STM adicionada às amostras de brócolis para fortificação foi derivatizada.

#### 7.5. Efeito do pH da fase móvel

Foram testados três pHs de fase móvel (4, 5 e 8) na tentativa de eliminar os interferentes das matrizes que apareceram no mesmo tempo de retenção dos analitos. Uma amostra de brócolis controle foi fortificada no nível de 1 mg/kg com STM de concentração de 0,03 mg/mL. Um branco da amostra foi extraído e a mesma quantidade de STM utilizada na fortificação das amostras foi derivatizada. Os testes foram realizados em uma replicata. O *clean-up* foi conduzido com a mistura de 150 mg de PSA + 150 mg de sílica + 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. Paralelamente,

também foram medidos os pHs das amostras na etapa inicial da extração, a fim de verificar se a presença da matriz testada alteraria o pH do extrato.

Os mesmos extratos foram utilizados para todos os testes com as quatro fases móveis avaliadas: tampão acetato/acetonitrila (pH 4 e 5), tampão fosfato/acetonitrila, (pH 8) e água/acetonitrila. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas no item 7.1.

#### *7.6. Alterações na vazão e no gradiente*

Alterações na vazão e no gradiente da fase móvel foram realizadas ainda com o objetivo de solucionar o problema dos interferentes das matrizes de interesse. Para esses testes, foram utilizadas amostras controle de repolho e goiaba, as quais foram fortificadas nos níveis de 0,2, 0,5, 1, 2 e 5 mg/kg. Para a purificação, foram utilizados PSA + MgSO<sub>4</sub> + carvão ativado (150:900:150 mg). Os brancos das amostras também foram extraídos e a STM utilizada na fortificação das amostras foi derivatizada no nível de 5 mg/kg. Os gradientes e vazões testados estão descritos a seguir:

- a) **Gradiente A:** Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. (tempo de corrida: 20 minutos). Trata-se do mesmo gradiente descrito no item 7.1.
- b) **Gradiente B:** Foram utilizadas as mesmas condições descritas no “Gradiente A”, com alteração na vazão (1,1 mL/min) e no tempo de corrida (15 minutos).
- c) **Gradiente C:** Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. (tempo de corrida: 36 minutos)

### 7.7. Procedimento por metilação otimizado

Com base nos resultados obtidos durante a otimização, o procedimento a seguir foi estabelecido para a realização das etapas de validação do repolho e da goiaba e análise das amostras de repolho, brócolis, couve, goiaba e caju.

#### a) Extração e *clean-up*

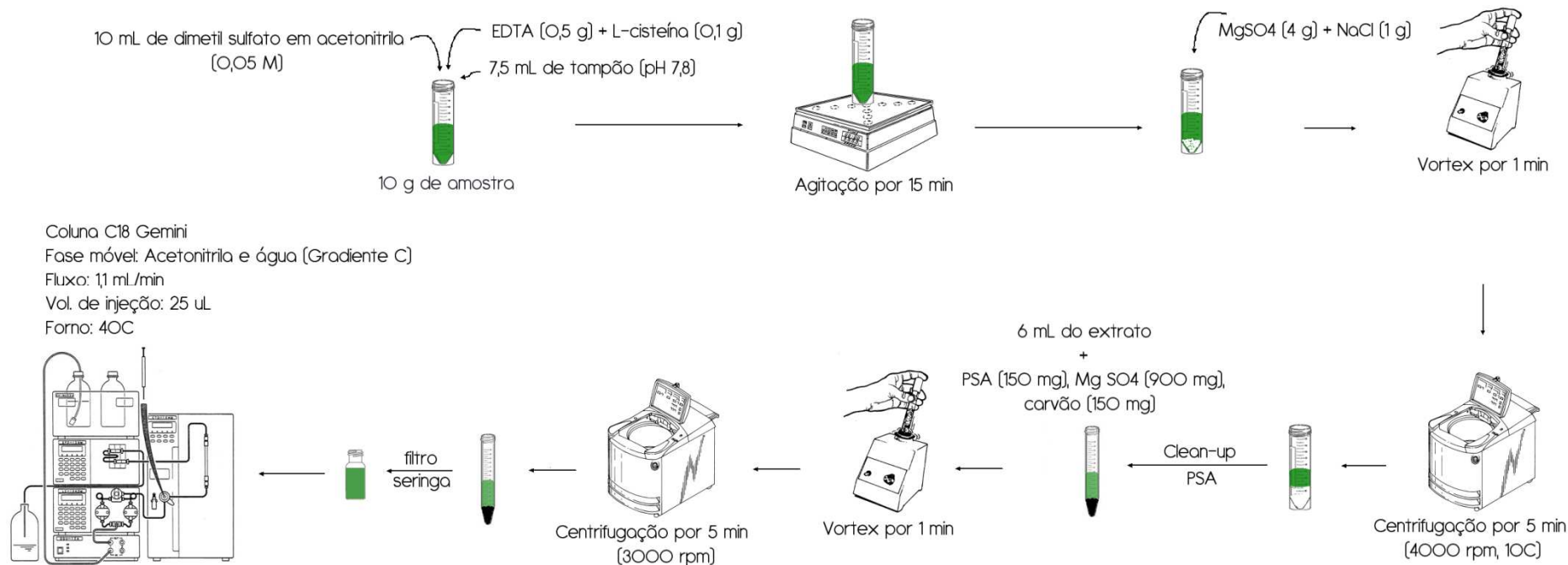
- Pesagem de 10 g de amostra em um tubo falcon de 50 mL e homogeneização com 7,5 mL de tampão pH 7,8, 0,1 g de L-cisteína, 0,5 g de EDTA e 10 mL de solução de 0,05 M de dimetil sulfato em acetonitrila.
- Agitação da mistura durante 15 minutos e, subsequentemente, adição de 4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio.
- Agitação da mistura resultante em vortex durante 1 minuto e, em seguida, centrifugação durante 5 minutos a 4000 rpm e 10°C.
- Transferência de uma alíquota de 6 mL para um tubo falcon de 15 mL contendo 150 mg de PSA, 900 mg de MgSO<sub>4</sub> e 150 mg de carvão ativado.
- Agitação do tubo durante 1 minuto em vortex e centrifugação durante 5 minutos a 3000 rpm.
- Filtração do extrato resultante em filtro de seringa Millex<sup>®</sup> e transferência para um vial, antes da injeção no HPLC.

#### b) Condições cromatográficas

- Coluna analítica: Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm e cartucho de pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0mm
- Temperatura do forno: 40°C
- Vazão: 1,1 mL/min
- Volume de injeção: 25 µL
- Fase móvel: Água (Solvente A) e Acetonitrila (Solvente B) (pH= 5-5,5)
- Gradiente: 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna (tempo de corrida: 36 minutos).

- Detecção: 270 nm

A Figura 10 ilustra o procedimento otimizado de maneira esquemática.



**Figura 10.** Procedimento otimizado do método de metilação. Extração com purificação utilizando 150 mg de PSA, 900 mg de MgSO<sub>4</sub> e 150 mg de carvão ativado. Fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B) com vazão de 1,1 mL/min. Gradiente C: 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. Tempo de corrida: 36 minutos.

## *7.8. Validação do método de metilação para análise de EBDC e propinebe*

Em procedimentos de validação, matrizes representativas podem ser usadas para validar métodos resíduo e multirresíduos (SANCO, 2013). Sendo assim, a matriz repolho foi escolhida como representativa das hortaliças do tipo brássica e a goiaba foi escolhida como representativa de frutas do tipo bagas, pomos, drupas, pequenas frutas, hortaliças de frutos. É importante ressaltar que a otimização do método foi realizada utilizando o mancozebe como representante dos EBDC, que inclui também o metiram, o único dessa subclasse registrado no Brasil (Figura 9).

### 7.8.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (Ribani et al., 2004). Ela foi avaliada no presente trabalho pela verificação da presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos detectados no sistema HPLC-UV (270 nm) (EBDC-dimetil e propinebe-dimetil; Figura 9). Essa avaliação foi realizada pela análise de amostras de alimentos orgânicos adquiridos de diversas fontes. Em paralelo aos testes de seletividade, também foi avaliada a estabilidade das amostras, observando se havia a formação de novos compostos durante períodos longos de estocagem.

Nove amostras de repolho orgânico (sem a presença dos analitos) foram analisadas. Dentre elas, quatro amostras foram adquiridas uma semana antes do dia da análise e a mais antiga, cerca de três meses antes da análise. As demais foram compradas na mesma semana em que foram analisadas. Todas as amostras foram armazenadas em freezer até o momento da análise.

Seis amostras de goiaba controle foram analisadas, sendo que três foram adquiridas em anos anteriores (2010 e 2012) e três em 2014. A Tabela 4 mostra as amostras utilizadas com as respectivas datas em que foram adquiridas.

**Tabela 4.** Amostras controle utilizadas para os testes de seletividade

<b>Amostra</b>	<b>Data de aquisição</b>	<b>Data da análise</b>
Repolho 1	05/06/2014	26/09/2014
Repolho 2	18/09/2014	26/09/2014
Repolho 3	24/09/2014	26/09/2014
Repolho 4	25/09/2014	26/09/2014
Repolho 5	25/09/2014	26/09/2014
Repolho 6	25/09/2014	26/09/2014
Repolho 7	25/09/2014	26/09/2014
Repolho 8	25/09/2014	26/09/2014
Repolho 9	25/09/2014	26/09/2014
Goiaba 1	18/01/2010	29/09/2014
Goiaba 2	14/07/2010	29/09/2014
Goiaba 3	24/02/2012	29/09/2014
Goiaba 4	24/04/2014	29/09/2014
Goiaba 5	25/09/2014	29/09/2014
Goiaba 6	25/09/2014	29/09/2014

O procedimento de extração e condições cromatográficas foram conduzidos como descrito no item 7.7.

Para os estudos de linearidade, repetitividade, Limite de Detecção do Método (LOD) e Limite de Quantificação do Método (LOQ), foram utilizados repolhos comprados na semana das análises. Para os estudos com a matriz goiaba, com base nos resultados do teste de seletividade, as 3 amostras controle adquiridas mais recentemente (Goiabas 4, 5 e 6) foram homogeneizadas e essa mistura foi utilizada como amostra controle durante os estudos.

#### 7.8.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2011). Ela foi avaliada para ambos os ditiocarbamatos por meio de 3 curvas analíticas em matriz branca fortificada pré-extração, cada uma contendo 5 pontos (0,2, 0,3, 0,5, 1 e 2 mg/kg). Cada ponto foi preparado adicionando-se volumes apropriados da suspensão padrão diretamente na amostra (antes da extração). O cálculo de fortificação para o nível de 0,5 mg de ditiocarbamato/kg de amostra está exemplificado abaixo:

Nível: 0,5 mg/kg

Massa da amostra: 10 g

0,5 mg → 1000 g de amostra

$m_{DT}$  → 10 g de amostra

$m_{DT} = 0,005$  mg de ditiocarbamato

Quantidade de suspensão necessária para a fortificação:

$C_{susp}$ : 0,03 mg/mL

$m_{DT}$ : 0,005 mg

Nível: 0,5 mg/kg

0,03 mg → 1 mL

0,005 mg →  $V_{susp}$

**$V_{susp} = 0,167$  mL de suspensão**

Onde  $C_{susp}$  é a concentração da suspensão usada na fortificação e  $V_{susp}$  é o volume de suspensão necessário para a fortificação.

A regressão linear foi avaliada pelo coeficiente de correlação ( $r$ ), parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, já que quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (Ribani et al., 2004). Além disso, foi avaliada a variância dos resíduos (teste de Cochran) e a significância da regressão (ANOVA) (INMETRO, 2011; Neto et al. 2010).

### 7.8.3. Repetitividade, LOQ e LOD

A precisão do método foi avaliada pela repetitividade, definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado



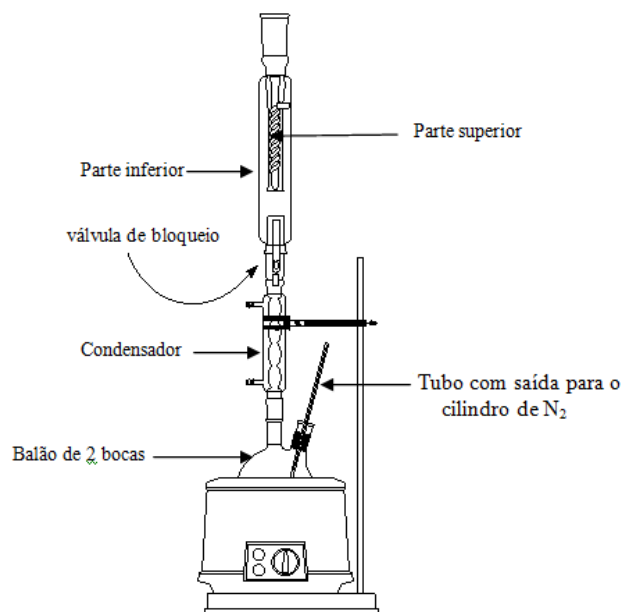
sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (Ribani et al., 2004).

Na avaliação da repetitividade, a matriz branca foi fortificada antes da extração em 5 níveis diferentes (0,2, 0,3, 0,5, 1 e 2 mg/kg), cada um realizado em triplicata. A quantificação foi feita com a utilização das curvas analíticas selecionadas nos testes de linearidade. De acordo com o SANCO (2013), são considerados aceitáveis valores de repetitividade  $\leq 20\%$  e o limite de quantificação do método (LOQ) pode ser definido como o menor nível de fortificação que atendeu esse critério. O limite de detecção do método (LOD) foi estabelecido como a metade do LOQ.

Estudos de recuperação não foram realizados por se tratar de um método onde a reação de derivatização ocorre na etapa de extração, assim, a curva analítica foi construída a partir da matriz branca fortificada antes do procedimento de extração (curva em matriz fortificada pré-extração). Portanto, qualquer perda durante o procedimento foi considerado na curva analítica, e valores de recuperação não são relevantes.

## **8. Método espectrofotométrico (CS<sub>2</sub>)**

A análise espectrofotométrica dos ditiocarbamatos foi realizada utilizando o sistema vertical mostrado na Figura 11 (Caldas et al., 2001). Como já foi mencionado anteriormente, nesse sistema, o CS<sub>2</sub> liberado pela hidrólise dos ditiocarbamatos reage com uma solução complexante, após passar por uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% m/v, que tem por função reter os vapores ácidos liberados da digestão do alimento (como H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>, HCl), formando um complexo de cor amarela, cuja intensidade é avaliada no espectrofotômetro (435 nm) contra uma curva analítica de CS<sub>2</sub>.



**Figura 11.** Sistema vertical utilizado para a digestão da amostra para análise de ditiocarbamatos, como CS<sub>2</sub>

### 8.1. Curva analítica

Em um conjunto de nove balões volumétricos de 25 mL, foram transferidos 5 mL de etanol e 15 mL de solução complexante (preparo no item 4.3). Em cada balão, foram adicionados volumes conhecidos da solução estoque 2 (preparo no item 4.3): 0,0 (branco); 0,05 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,5 mL; 0,8 mL; 1,2 mL; 1,7 mL e 2,0 mL. O volume de cada balão foi completado com etanol e as soluções foram lidas no espectrofotômetro em 435 nm. Uma nova curva analítica deve ser construída para cada solução complexante preparada. A solução complexante é estável durante 3 meses.

### 8.2. Procedimento de digestão

Em um balão de duas bocas de 500 mL foram pesados 150 g de amostra processada (Figura 11). Foram transferidos 20 mL de solução de hidróxido de sódio 10% m/v para a parte inferior do sistema vertical de reação e 15 mL de solução complexante para a parte superior do sistema. Em seguida, 175 mL de solução de

digestão foram transferidos para o balão de duas bocas contendo a amostra. O balão foi colocado em uma manta aquecedora e o condensador foi conectado ao balão (Figura 11). Gás nitrogênio foi conectado ao balão e as partes superior e inferior do sistema foram acopladas e conectadas ao condensador. Todas as conexões foram vedadas com graxa de silicone e, por fora, com fita veda-rosca. A válvula de nitrogênio foi aberta até a obtenção de um fluxo de gás suave e contínuo. Em seguida, foi aberta a válvula de água para permitir sua passagem pelos condensadores. O reostato da manta aquecedora foi ajustado no máximo e após um refluxo de vapor ter sido observado no interior do condensador, o reostato foi ajustado para uma temperatura mediana e a digestão foi conduzida por mais 45 minutos. Ao final deste tempo, o conteúdo da parte superior do sistema foi transferido quantitativamente com etanol para um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, foi preparado um branco em um balão de 25 mL, contendo 15 mL de solução complexante, sendo o volume completado com etanol. O espectrofotômetro foi zerado com o branco e a solução obtida após análise da amostra foi lida no equipamento em 435 nm e quantificada com a curva analítica previamente preparada. O resultado é dado em mg de CS<sub>2</sub>/kg de amostra.

Este método foi validado no LabTox-UnB e é acreditado junto ao Inmetro pela ISO 17025 (número da acreditação: CRL-0447).

## **9. Análise de amostras**

As amostras de repolho, couve, brócolis, goiaba e caju adquiridas no comércio foram analisadas em duplicata pelo método espectrofotométrico. Amostras com resultado positivo para CS<sub>2</sub> foram analisados pelo método HPLC-UV validado e os resultados comparados. Nesse método, curvas analíticas (em matriz fortificada pré-extração) de repolho e goiaba foram preparadas no dia da análise (0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 mg/kg).

## V. RESULTADOS

### 1. Método por cromatografia de par iônico

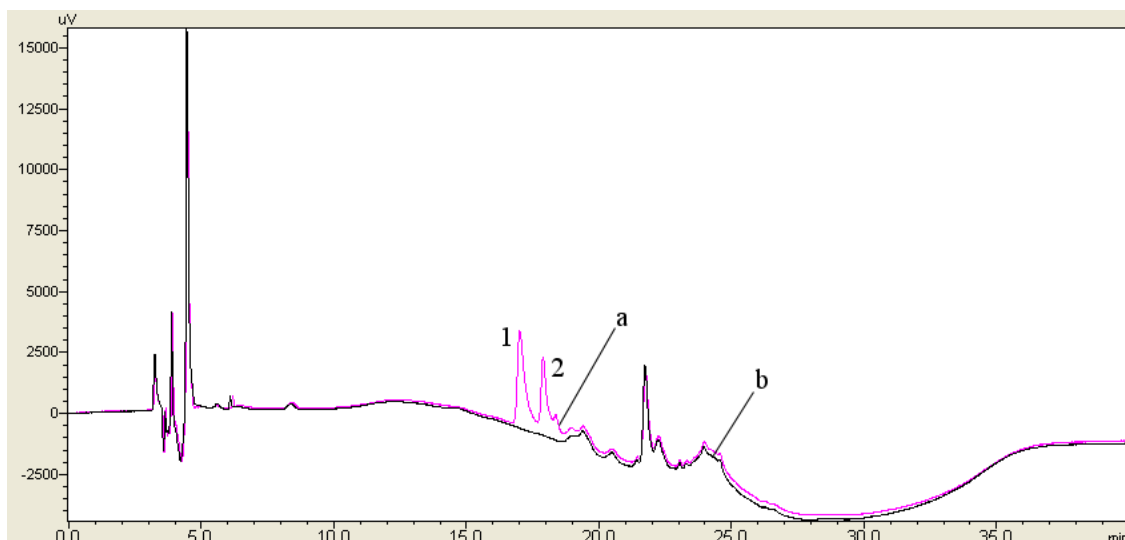
O primeiro método analítico testado foi baseado no artigo de Van Lishaut e Schwack (2000), que realizou uma determinação direta dos ditiocarbamatos, após tratamento alcalino dos fungicidas na presença de agentes complexantes. Os autores analisaram os ditiocarbamatos mancozebe, propinebe, metam-sódico e ziram. Entretanto, no presente trabalho apenas o mancozebe e o propinebe foram utilizados, uma vez que o metam-sódico é usado em solo, e resíduos nos alimentos não são esperados, e o ziram não é permitido no Brasil (ANVISA, 2014).

O tratamento alcalino é realizado na fase móvel do sistema de cromatografia líquida com solução “EXM”, que consiste na mistura de TBAHS, EDTA e fosfato ácido de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10 mM, ajustados para pH 11,0 com hidróxido de sódio. À solução EXM é adicionado o reagente bissulfito de sódio formando a solução “EXM-S”, usada no preparo das suspensões padrão de mancozebe e propinebe e como eluente na extração. O bissulfito de sódio é um forte agente redutor, que quando oxidado pelo ar, impede a oxidação dos ditiocarbamatos (Van Lishaut e Schwack, 2000). A amostra é tratada com uma solução de EDTA alcalino a fim de transformar os sais de zinco e manganês dos ácidos ditiocarbâmicos, em seus sais de sódio solúveis em água. Os ânions são extraídos como pares iônicos de tetrabutylamônio e o fosfato de sódio mantém estável o pH da solução. Segundo Van Lishaut e Schwack (2000), as suspensões padrão de ditiocarbamatos em EXM-S podem ser mantidas à temperatura ambiente por várias horas. A estabilidade dos padrões nestas condições e em temperaturas mais baixas foi avaliada neste trabalho.

#### *1.1. Definição das condições cromatográficas*

Na cromatografia de par iônico, o pH do eluente é um dos principais fatores controladores da carga do analito (Cecchi, 2008). Em razão do pH elevado da fase móvel utilizada (solução EXM, pH 11) foi necessário adquirir uma coluna que suportasse pHs básicos. A princípio foram realizados testes com a coluna polimérica

Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6mm, 5 µm no modo gradiente. A Figura 12 mostra o cromatograma referente à separação do mancozebe e do propinebe no modo gradiente em 286 nm, comprimento de onda que apresentou boa absorção para ambos os ditiocarbamatos.



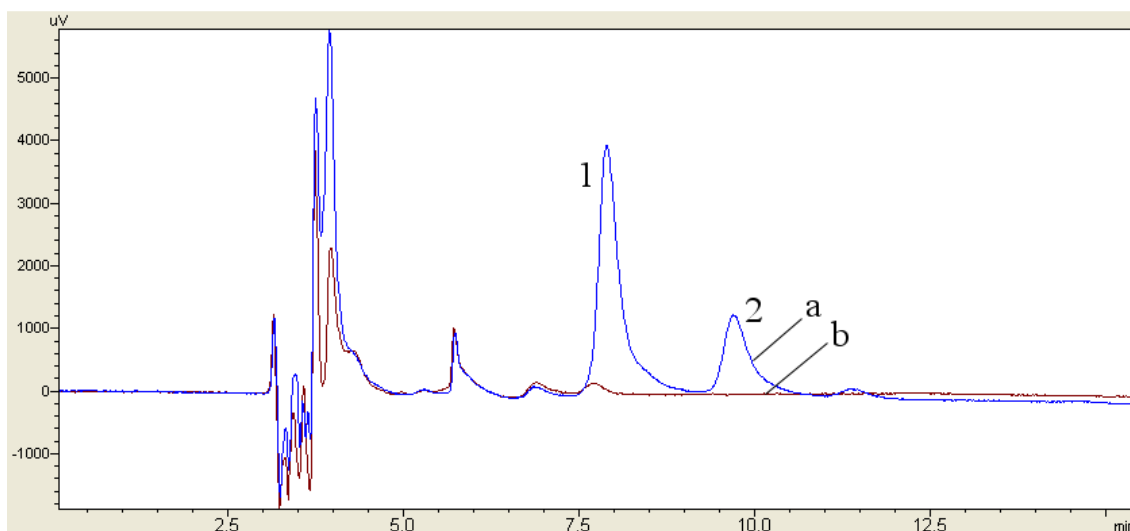
**Figura 12.** Separação dos ditiocarbamatos (1) mancozebe e (2) propinebe (0,24 µg/mL) no modo gradiente. (a) Suspensão padrão; (b) Solução EXM-S (solvente utilizado no preparo da suspensão padrão). Coluna Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6 mm, 5 µm. Fase móvel: solução EXM (10 mM) e metanol. Detecção em 286 nm.

O cromatograma mostra que a coluna conseguiu separar os ditiocarbamatos com boa resolução no modo gradiente, mas os picos saíram próximos uns dos outros, o que poderia ser um problema quando fossem injetados os extratos de matrizes. Além disso, o tempo de corrida proposto por Van Lishaut e Schwack (2000) era longo (40 minutos). Na tentativa de diminuir o tempo de corrida, foram realizados testes no modo isocrático com diferentes porcentagens de metanol (20, 25, 30 e 40%).

Na proporção utilizando 40% de metanol, não houve uma boa separação dos ditiocarbamatos. Os testes com as demais proporções de solventes mostraram que a diminuição da porcentagem de metanol aumentava os tempos de retenção dos ditiocarbamatos e os picos ficavam mais separados. Isso pode ter ocorrido, pois o aumento na quantidade de reagente de par iônico (RPI) na coluna resulta na formação de uma “camada” maior de RPI fixos a ela. Dessa forma, ao passarem

pela coluna, as espécies iônicas ficam mais tempo retidas e há um aumento no tempo de retenção.

A Figura 13 mostra o cromatograma obtido após separação dos ditiocarbamatos com fase móvel na proporção de 25% de metanol, escolhida como a melhor condição no modo isocrático para a coluna Shodex Asahipak.

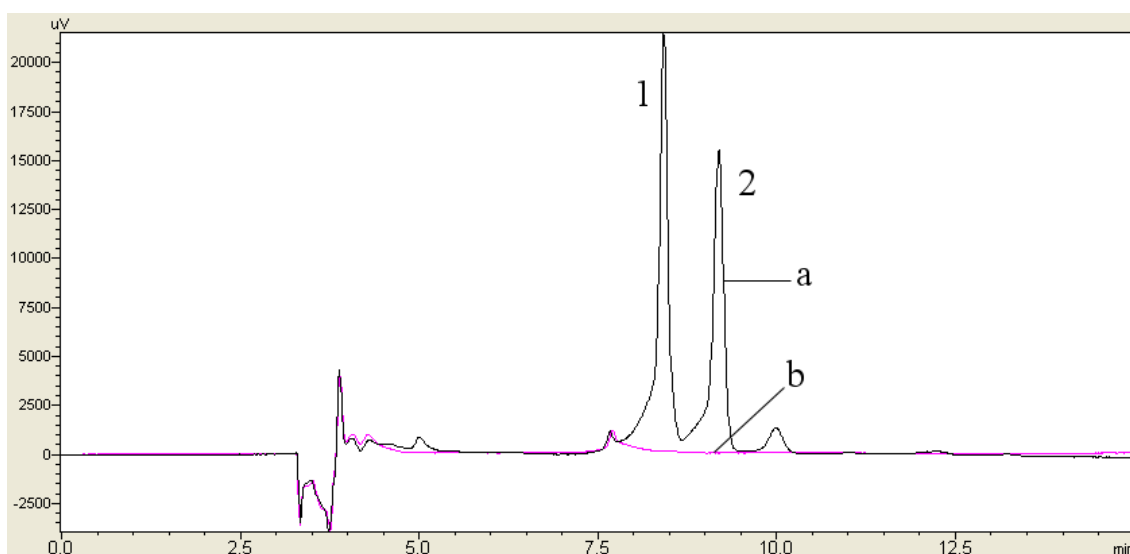


**Figura 13.** Separação dos ditiocarbamatos (1) mancozebe e (2) propinebe (0,24 µg/mL) no modo isocrático (25% metanol, v/v, em solução EXM). (a) Suspensão padrão; (b) Solução EXM-S (solvente utilizado no preparo da suspensão padrão). Coluna Shodex Asahipak ODP-50 150 x 4,6 mm, 5 µm. Fase móvel: solução EXM (10 mM) e metanol. Detecção em 286 nm.

A coluna de marca Shodex Asahipak, de base polimérica (polímero polivinil álcool), foi a primeira a ser escolhida para otimização do método devido a sua similaridade com a utilizada no artigo de Van Lishaut e Schwack (2000) (Supelcogel ODP-50 (C18-polivinilálcool) 150 x 4 mm, 5 µm). Entretanto, por ser uma coluna de alto custo, incluindo a pré-coluna correspondente, posteriormente optou-se por realizar novos testes utilizando-se a coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm com cartucho de pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0 mm, mais acessível e mais barata (aproximadamente 2,5 vezes menos que o valor da coluna Shodex Asahipak).

Os mesmos testes nos modos gradiente e isocrático mencionados anteriormente foram realizados na coluna Gemini, mas os resultados obtidos não foram satisfatórios. A base da coluna Gemini é sílica-C18 e foi necessário realizar uma otimização envolvendo um número maior de fatores para que o pareamento iônico ocorresse de maneira efetiva.

Para otimizar o método na coluna Gemini foram realizados testes utilizando combinações de três fases móveis (metanol, solução EXM (20 mM, pH=11) e solução EDTA+Fosfato). Ao final dos testes, concluiu-se que a coluna Gemini também pode ser utilizada para o método de cromatografia por par iônico e estabeleceu-se como a condição mais adequada para utilização dessa coluna, a proporção de 35% de metanol, 52,0% de solução EXM (20 mM, pH=11) e 13,0% de solução EDTA+Fosfato (20 mM, pH=11) no modo isocrático. A Figura 14 mostra a separação dos ditiocarbamatos na coluna Gemini, utilizando a condição otimizada.



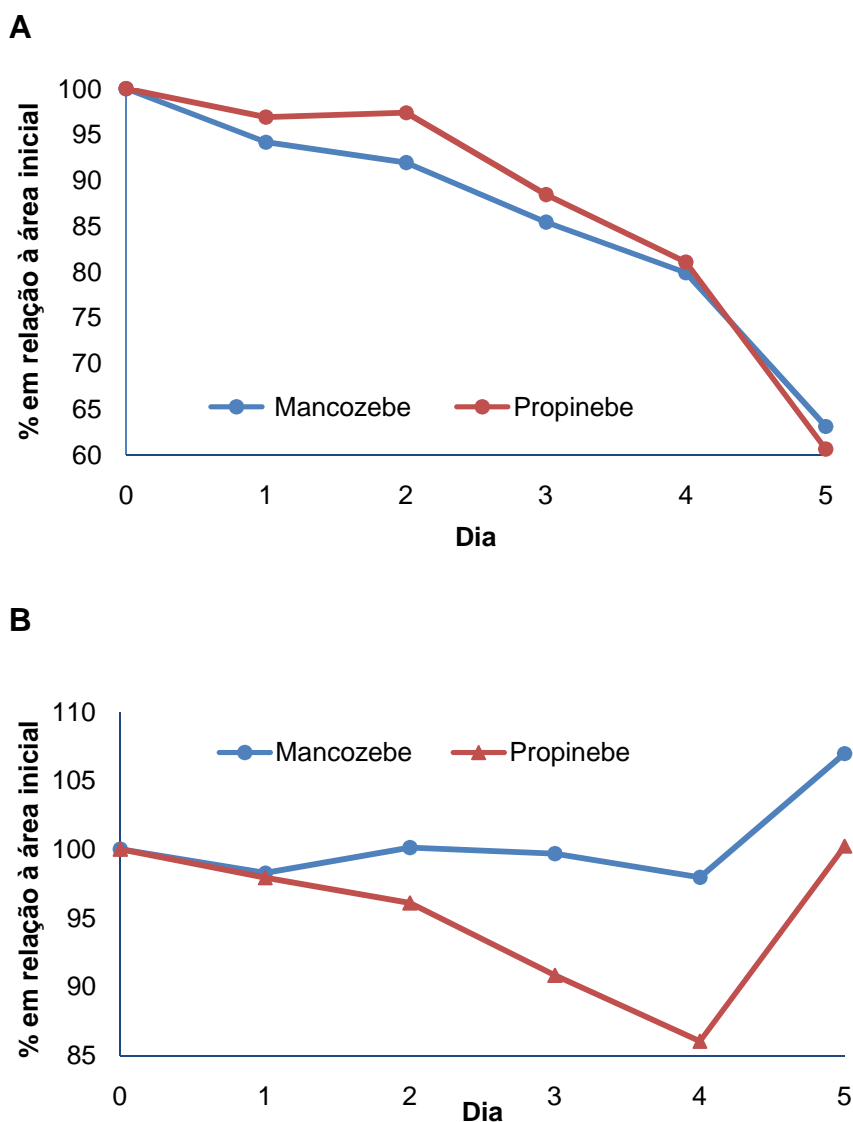
**Figura 14.** Separação dos ditiocarbamatos (1) mancozebe e (2) propinebe (0,48 µg/mL) no modo isocrático (35% de metanol, 52,0% de solução EXM (20 mM, pH=11) e 13,0% de solução EDTA+Fosfato (20 mM, pH=11)). (a) Suspensão padrão; (b) Solução EXM-S (solvente utilizado no preparo da suspensão padrão). Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6mm. Detecção em 286 nm.

### 1.2. Estudos de estabilidade dos padrões

Um estudo de estabilidade das suspensões foi realizado para avaliar o comportamento das suspensões padrão quando armazenadas em temperatura ambiente e no freezer (< -15°C).

A Figura 15A mostra a diminuição da área do pico do mancozebe durante o período de armazenamento, quando a suspensão padrão foi mantida à temperatura ambiente. Com relação ao propinebe, essa diminuição pôde ser observada mais evidentemente a partir do 3º dia. Na Figura 15B pode-se observar que durante o período do estudo as áreas do pico do mancozebe em média se mantiveram

constantes, quando a suspensão foi armazenada em temperaturas mais baixas. No caso do propinebe, nos dias 3 e 4 houve uma queda nas áreas, o que pode ser atribuído a variabilidade analítica. Com esses resultados concluiu-se que as suspensões padrão podem ser armazenadas no freezer a fim de retardar o processo de degradação, além de mostrarem que se deve evitar a injeção de padrões mantidos em vials à temperatura ambiente, muito tempo após o preparo dos frascos.

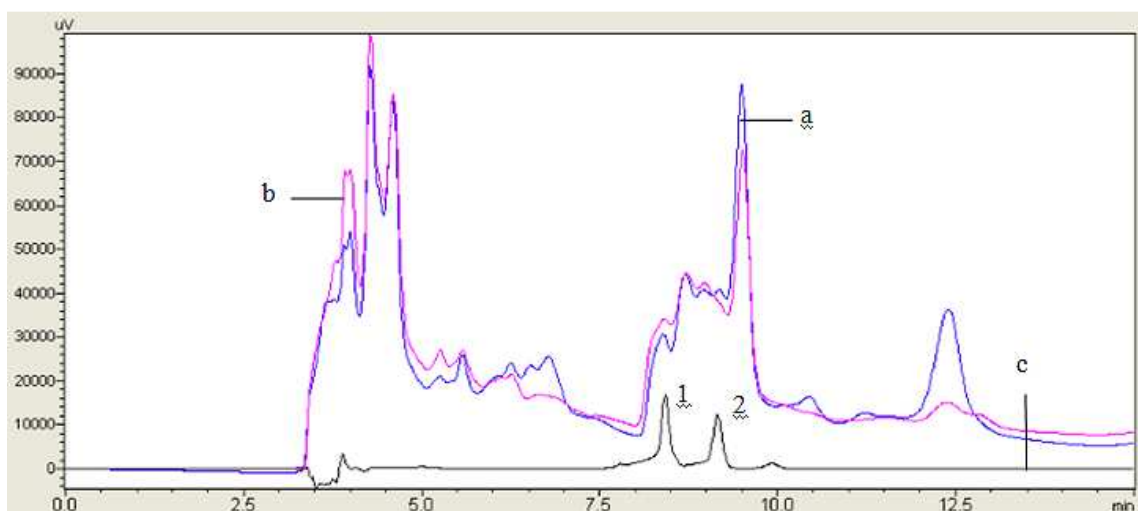


**Figura 15.** Estabilidade dos padrões analíticos durante 5 dias com armazenamento das suspensões de 0,48 µg/mL (A) temperatura ambiente e (B) temperaturas < -15°C. Cada ponto representa a média de duas leituras: em A, DPR <15%; em B DPR <5%.



### 1.3. Etapa de extração

A Figura 16 mostra os cromatogramas do extrato branco da amostra de alface, da amostra fortificada e da suspensão de mistura de mancozebe e propinebe (0,48 µg/mL), extraídos conforme descrito no item 6.3. A análise dos cromatogramas mostrou que o procedimento de extração realizado não proporcionou um resultado satisfatório, devido ao efeito de matriz.



**Figura 16.** Extração de amostra fortificada de alface com solução “EXM-S”. (a) Branco da alface. (b) Alface fortificada com mancozebe no nível de 0,5 mg/kg. (c) Mistura de (1) mancozebe e (2) propinebe (0,48 µg/mL). Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6mm. Modo isocrático: 35% de metanol, 52,0% de solução EXM (20 mM, pH=11) e 13,0% de solução EDTA+Fosfato (20 mM, pH=11).

O procedimento foi repetido, mas obteve-se o mesmo resultado insatisfatório. Foi levantada a necessidade de adicionar uma etapa de *clean-up* ao método de extração, que não foi prevista por Van Lishaut e Schwack (2000).

Em curto prazo, para a conclusão do presente trabalho, foi decidido que seria mais vantajosa a avaliação de um novo método do que a adição de uma etapa de extração ao método de cromatografia de par iônico, devido às dificuldades encontradas durante a sua otimização.

## 2. Método por metilação

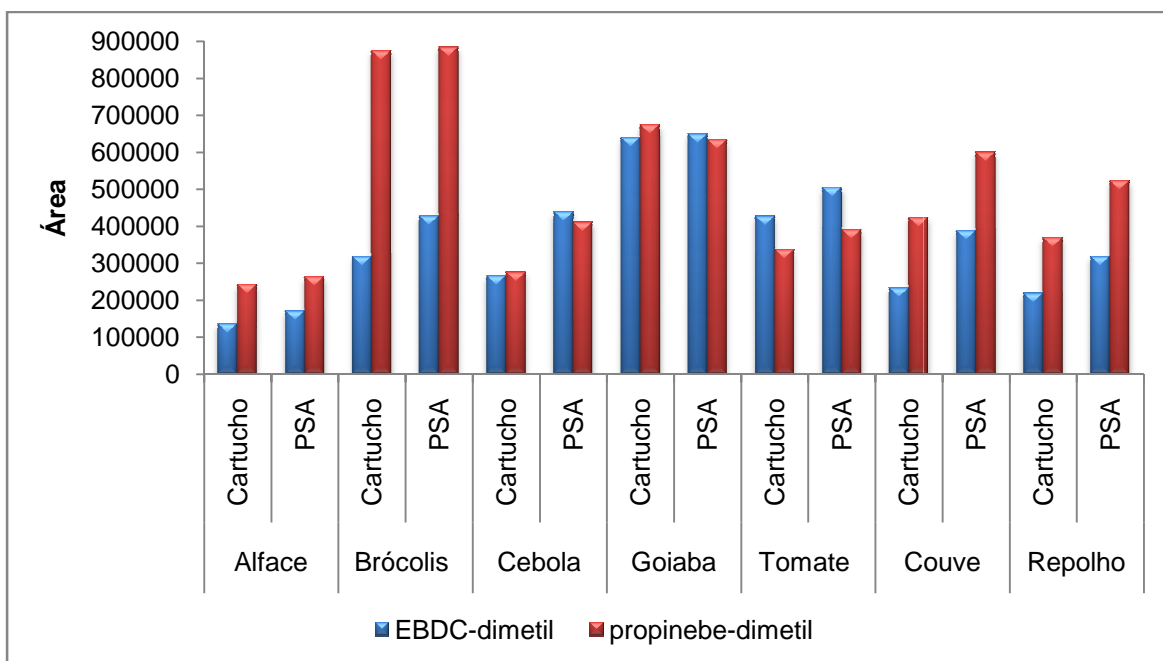
O segundo método avaliado nesse trabalho também utilizou o EDTA com o objetivo de transformar o mancozebe e o propinebe em seus respectivos sais de sódio. Contudo, nesse método adicionou-se uma etapa de metilação, que transformou o mancozebe (EBDC) e o propinebe em EBDC-dimetil e propinebe-dimetil, respectivamente, produzidos de seus sais de sódio solúveis (Figura 9). A S-metilação foi realizada com o reagente de metilação dimetil sulfato e os dois processos (decomposição com o EDTA e metilação) foram realizados simultaneamente, após a adição de todos os reagentes. L-cisteína também foi adicionada, tendo a função de estabilizar os ditiocarbamatos, quebrando as ligações dissulfeto de ditiocarbamatos oxidados (Gustafsson e Fahlgren, 1983).

Na sequência, foi utilizado o método QuEChERS, originalmente desenvolvido por Anastassiades et al. (2003), que consiste em um processo simples de extração usando acetonitrila, solvente útil por se separar mais facilmente da água e de compostos hidrofílicos do que outros solventes orgânicos polares (Hayama e Takada, 2008). Assim, após a decomposição e a metilação descritos acima, ocorreu uma partição líquido-líquido com os sais sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio, e SPE dispersivo usando os adsorventes PSA e carvão ativado. As soluções resultantes foram injetadas diretamente no sistema de HPLC.

### *2.1. Comparação entre metilação/clean-up 1 (cartuchos de sílica) e metilação/clean-up 2 (dispersão em PSA)*

Nos testes preliminares de extração foram utilizados cartuchos de sílica na etapa de *clean-up*. Um segundo procedimento foi testado utilizando *clean-up* dispersivo com uma mistura de PSA e MgSO<sub>4</sub>. Essa opção foi avaliada devido às dificuldades em se trabalhar com cartuchos de SPE, já que a diferença de fluxo dos diferentes extratos ao passarem pelas colunas poderia prejudicar os resultados dos ensaios.

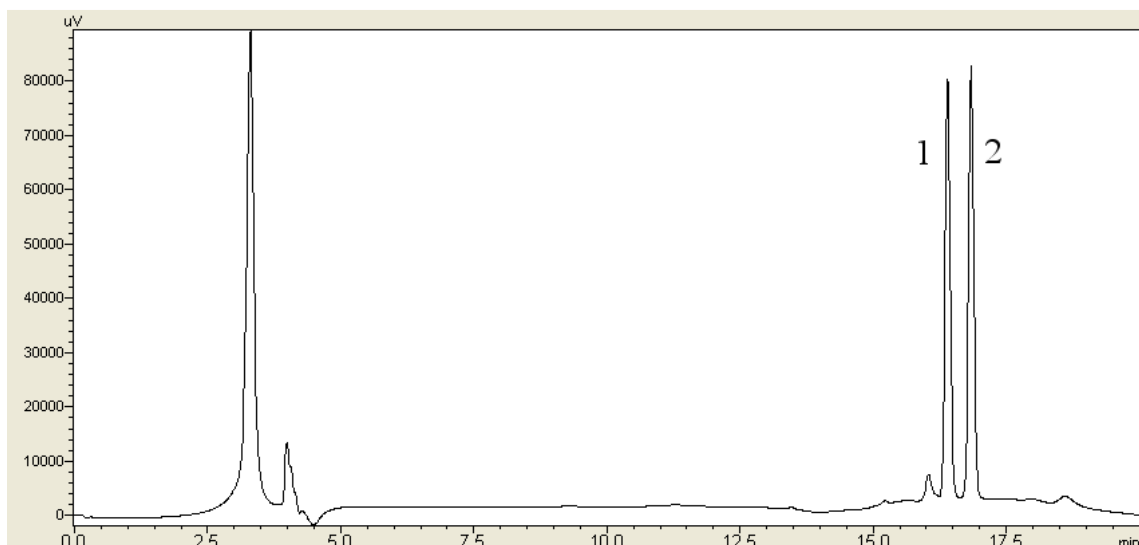
A Figura 17 ilustra a comparação entre as áreas obtidas nos dois procedimentos testados para as diferentes culturas analisadas.



**Figura 17.** Comparação das áreas obtidas nos procedimentos de purificação utilizando cartuchos de sílica, ou PSA. As amostras foram fortificadas no nível de 5 mg/kg com suspensão padrão de mistura de mancozebe e propinebe. EBDC-dimetil e propinebe-dimetil: respectivamente, mancozebe e propinebe derivatizados.

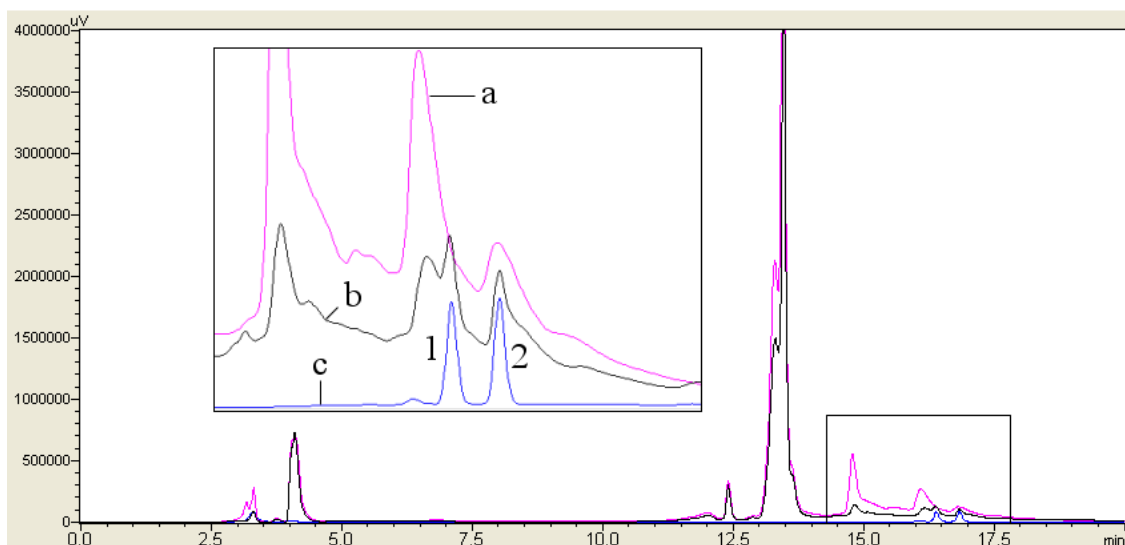
Áreas relativamente maiores dos picos referentes ao EBDC-dimetil e ao propinebe-dimetil foram obtidas para a maioria das culturas quando o PSA foi utilizado como *clean-up*, sendo a cebola a matriz onde foi observada a maior diferença entre os dois procedimentos. Para a goiaba, os resultados foram similares.

A Figura 18 mostra o cromatograma do EBDC-dimetil e do propinebe-dimetil, obtido após derivatização da STM de mancozebe e propinebe utilizada na fortificação das amostras.

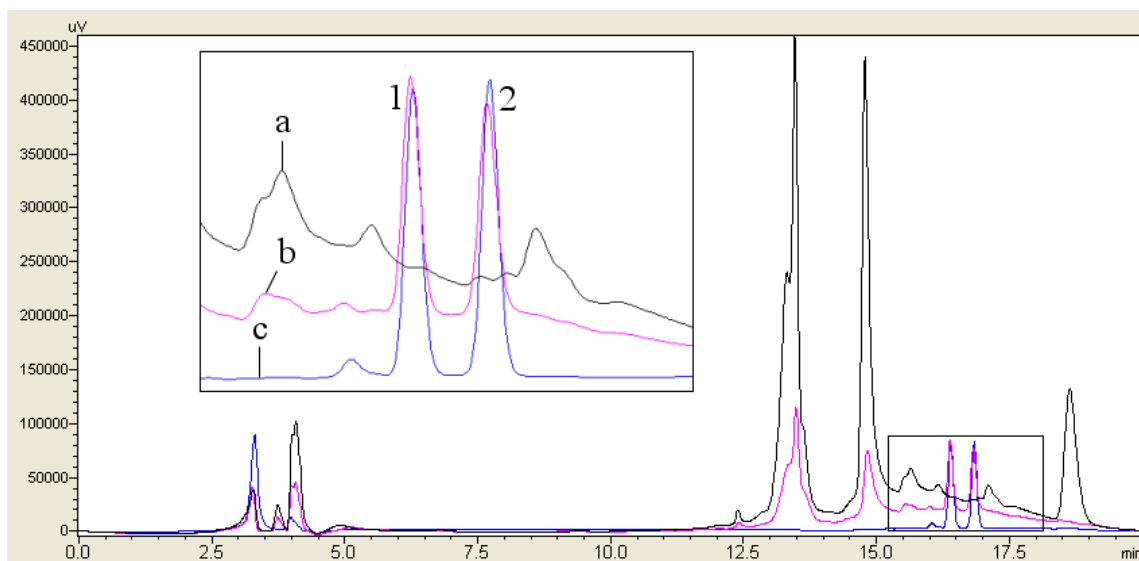


**Figura 18.** Cromatograma da suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.

As Figuras 19 e 20 mostram os cromatogramas da amostra de cebola, cujos extratos foram purificados com os cartuchos de sílica e com o PSA, respectivamente.



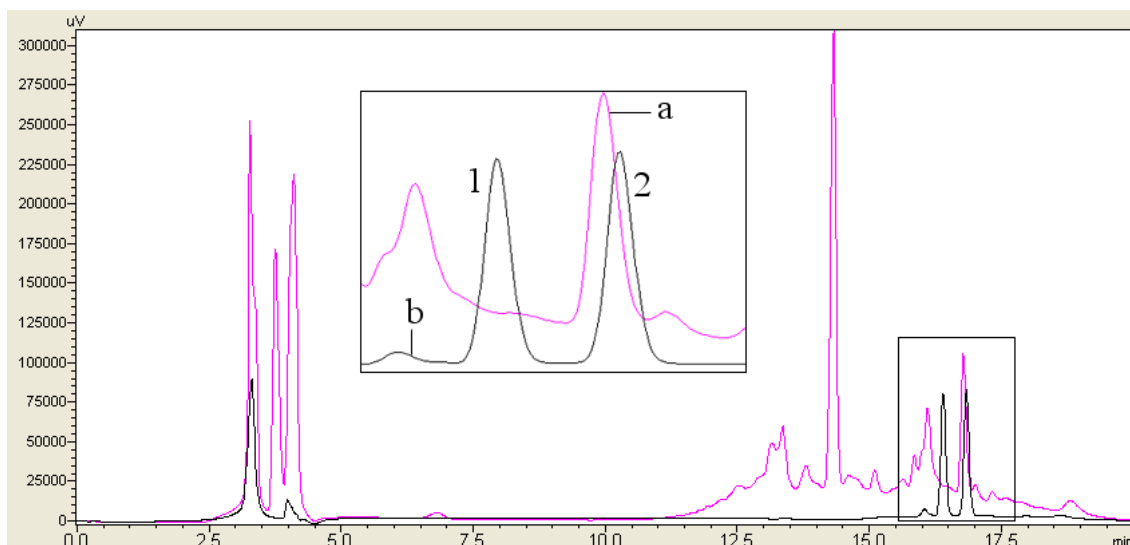
**Figura 19.** Cromatogramas dos extratos da cebola (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco da cebola; (b) Cebola fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



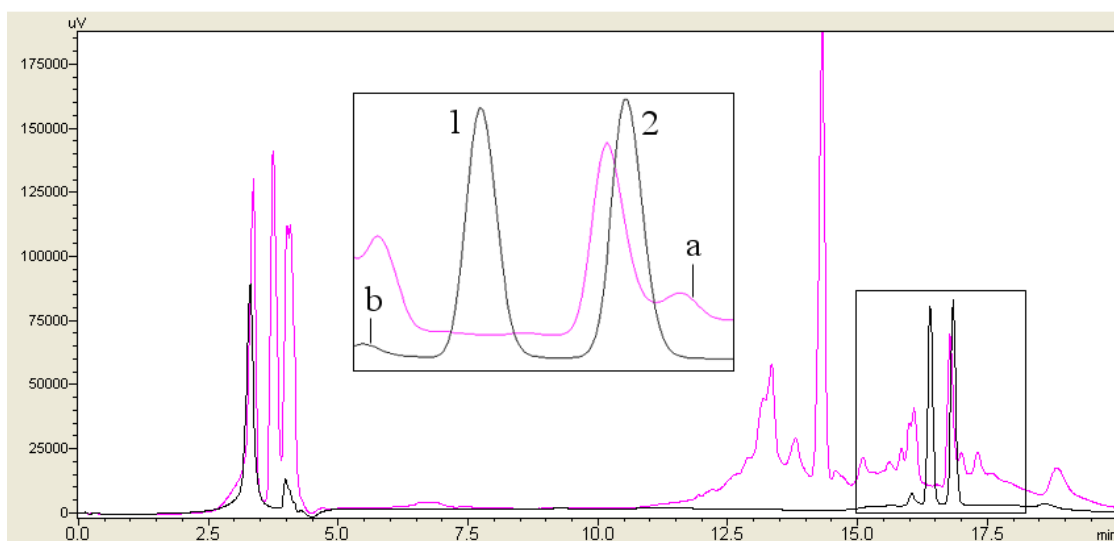
**Figura 20.** Cromatogramas dos extratos da cebola (*clean-up*: PSA 150 mg). (a) Branco da cebola; (b) Cebola fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.

Na Figura 19 é possível observar a presença de interferentes no cromatograma do branco da cebola, os quais saíram próximos aos tempos de retenção do EBDC-dimetil e do propinebe-dimetil. Os picos dos analitos eluíram com os interferentes formando “ombros”, o que dificultou a integração. O uso do PSA melhorou a purificação e picos mais bem definidos foram obtidos (Figura 20).

O brócolis apresentou um pico interferente com sinal elevado no tempo de retenção do propinebe-dimetil. A Figura 21 mostra o cromatograma do branco do brócolis purificado com a coluna de sílica, sobreposto com o cromatograma da mistura de mancozebe e propinebe derivatizada. A Figura 22 ilustra o brócolis purificado com o PSA. A comparação das duas figuras indicou que o interferente que sai próximo ao tempo de retenção do propinebe-dimetil (tempo de retenção=16,7-17,1) persistiu em ambos os tipos de *clean-up*. Na região do EBDC-dimetil (tempo de retenção =16,25-16,6), o cromatograma do *clean-up* com PSA se mostra mais limpo.



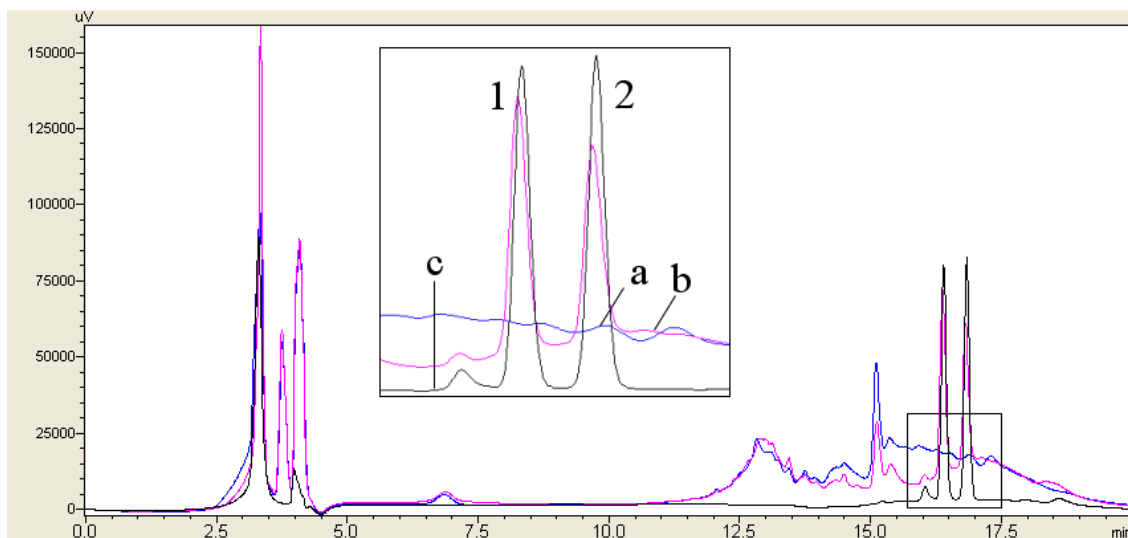
**Figura 21.** Cromatograma do extrato do branco do brócolis (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco do brócolis; (b) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



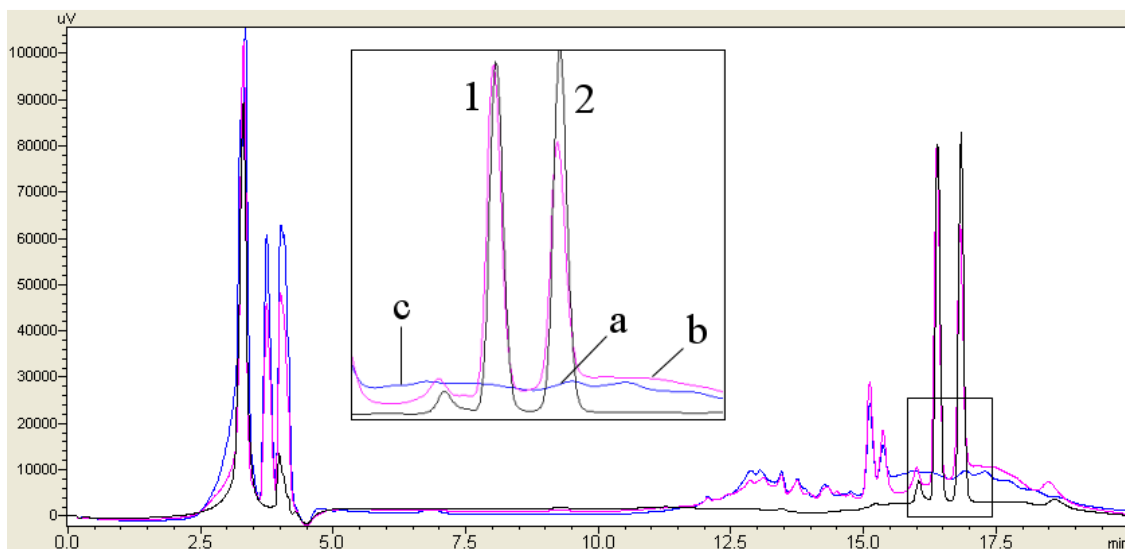
**Figura 22.** Cromatograma do extrato do branco do brócolis (*clean-up*: PSA 150 mg). (a) Branco do brócolis; (b) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna

Nas demais matrizes testadas (alface, goiaba, tomate, couve e repolho) os interferentes presentes em seus brancos após *clean-up* com PSA ou cartuchos de sílica não foram considerados significativos, já que suas áreas foram muito

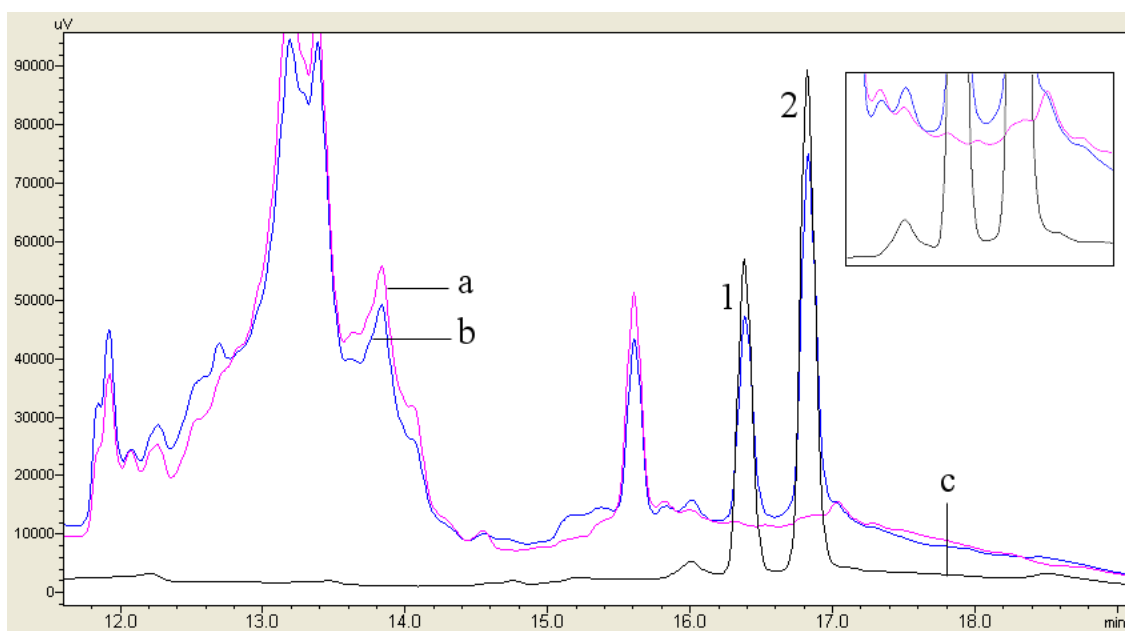
pequenas em comparação com os picos dos analitos na concentração testada (5,0 mg/kg). Entretanto, esses interferentes podem comprometer a quantificação em níveis mais baixos (Figuras 23-26). Assim como no brócolis, para as demais matrizes a mudança de *clean-up* não eliminou totalmente os interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse. As Figuras 23-26 mostram os cromatogramas do tomate e da couve, purificados com ambos os tipos de *clean-up*.



**Figura 23.** Cromatogramas dos extratos do tomate (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco do tomate; (b) Tomate fortificado no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.

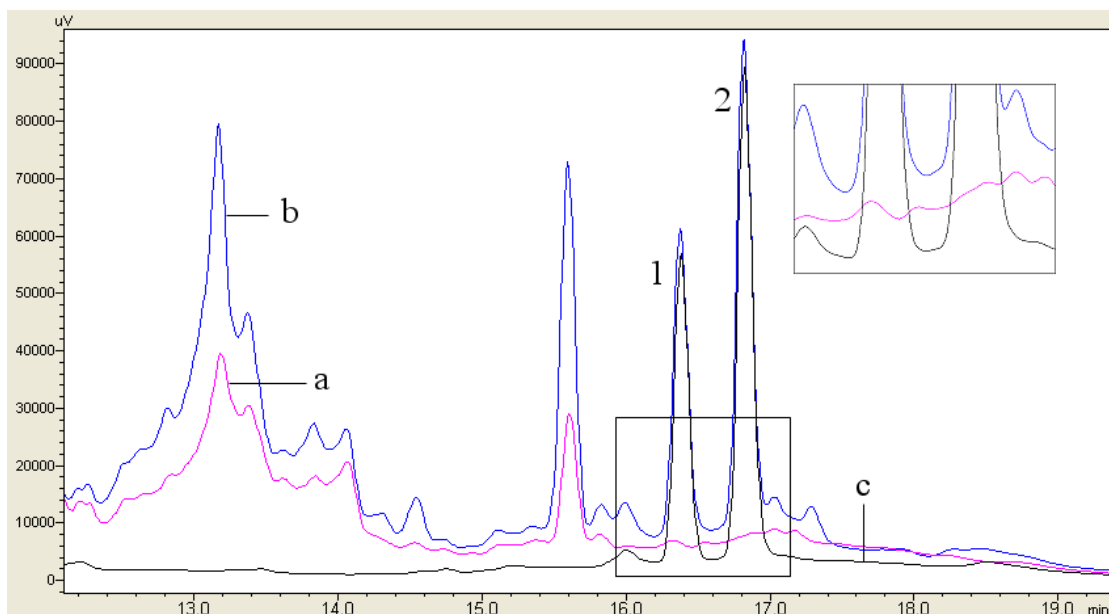


**Figura 24.** Cromatogramas dos extratos do tomate (*clean-up*: PSA). (a) Branco do tomate; (b) Tomate fortificado no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



**Figura 25.** Cromatogramas dos extratos da couve (*clean-up*: Cartucho de sílica). (a) Branco da couve; (b) Couve fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.





**Figura 26.** Cromatogramas dos extratos da couve (*clean-up*: PSA 150 mg). (a) Branco da couve; (b) Couve fortificada no nível de 5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.

Após avaliação dos resultados obtidos, optou-se por utilizar o PSA na etapa de purificação dos extratos, pelo fato de esse adsorvente ter sido mais eficiente. Entretanto, este procedimento ainda não se mostrou totalmente otimizado, principalmente em relação à presença de interferente de sinal elevado na matriz brócolis.

## 2.2. Modificações no procedimento metilação/*clean-up* 2

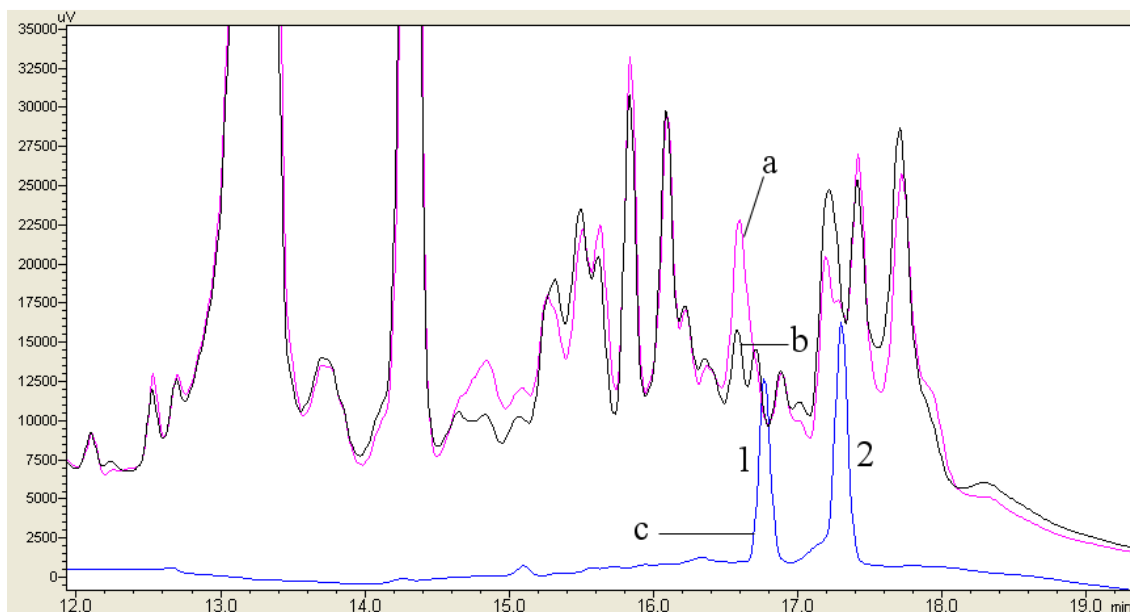
Os 7 tipos de *clean-up* testados nessa etapa estão resumidos na Tabela 5. Para os testes, foi utilizada uma amostra de brócolis orgânico fortificado no nível de 1 mg/kg (n=3). Esta matriz foi escolhida por ser a que apresentou o maior efeito matriz entre todas testadas.

**Tabela 5.** Adsorventes e proporções usados nos 7 testes de *clean-up*, contendo 900 mg de MgSO<sub>4</sub>

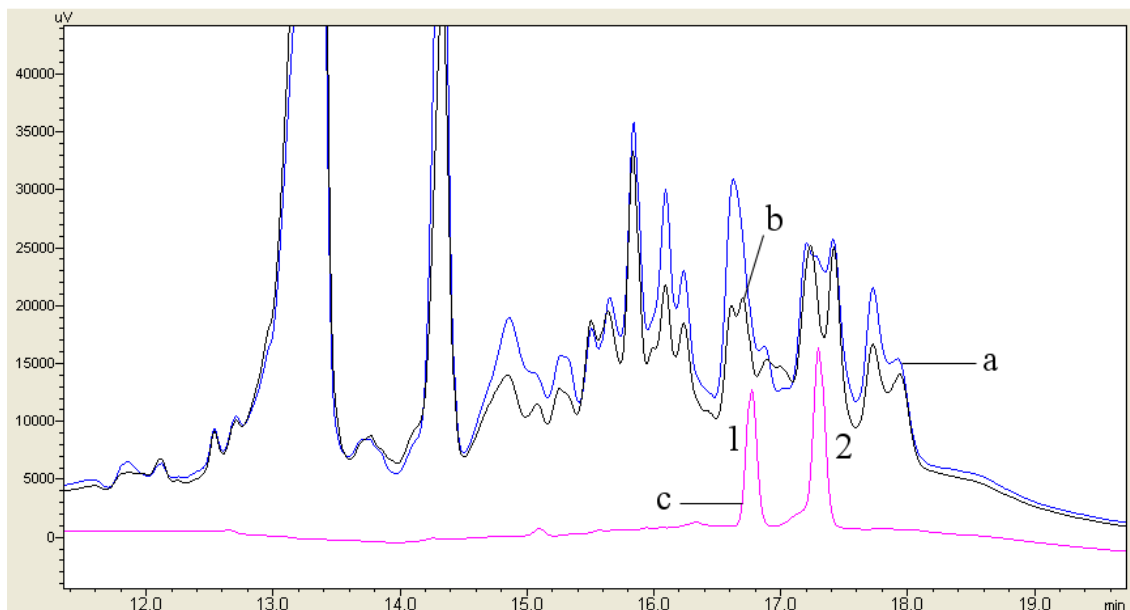
<b>Clean-up</b>	<b>Adsorventes</b>	<b>Proporção (mg)</b>
a	PSA	150
b	PSA	300
c	PSA + sílica	150 : 150
d	PSA + sílica	300 : 150
e	PSA + C18	150 : 150
f	PSA + C18	300 : 150
g	PSA + carvão ativado	150 : 150

A análise dos cromatogramas dos extratos das amostras de brócolis brancos e fortificados em todos os procedimentos de *clean-up* testados mostrou a presença de interferentes da matriz em tempos de retenção próximos àqueles dos analitos de interesse, EBDC-dimetil e propinebe-dimetil (Figuras 27-33). A mudança nos tempos de retenção em comparação com os resultados descritos no item 2.1, foi devido à troca da coluna Gemini durante a realização do estudo.

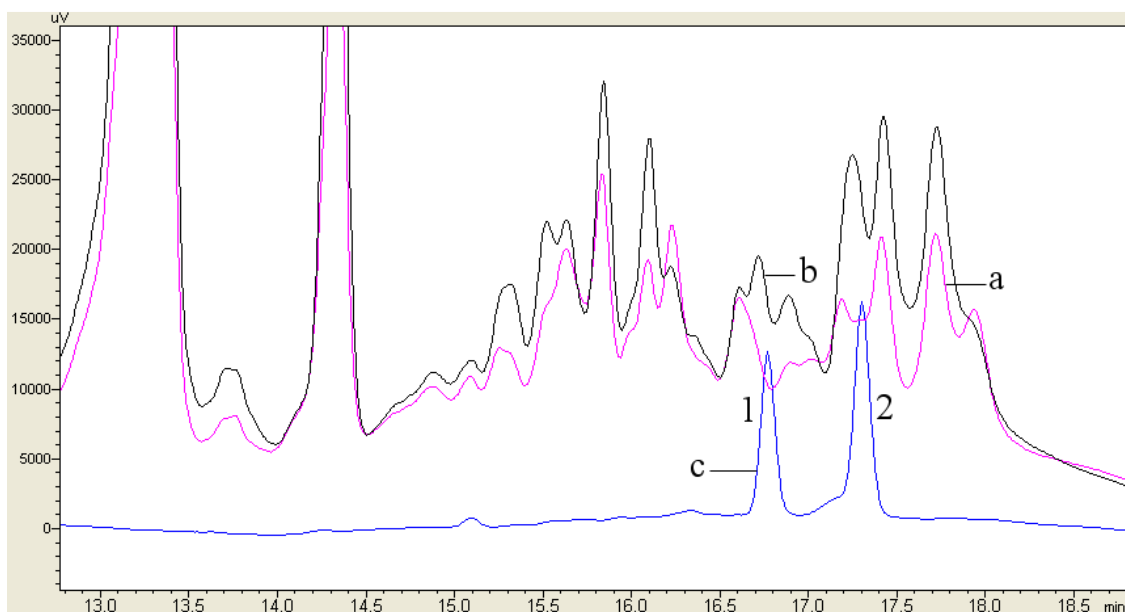
Entretanto, observou-se uma vantagem na adição do carvão ativado em comparação com os demais procedimentos de *clean-up*. O carvão ativado possui a função de remover clorofila e esterol das plantas (Lehotay, 2005), e pode proteger a coluna cromatográfica da presença de pigmentos, aumentando assim a sua vida útil. As Figuras 27-33 mostram os cromatogramas obtidos após aplicação dos 7 tipos de *clean-up* avaliados na amostra de brócolis.



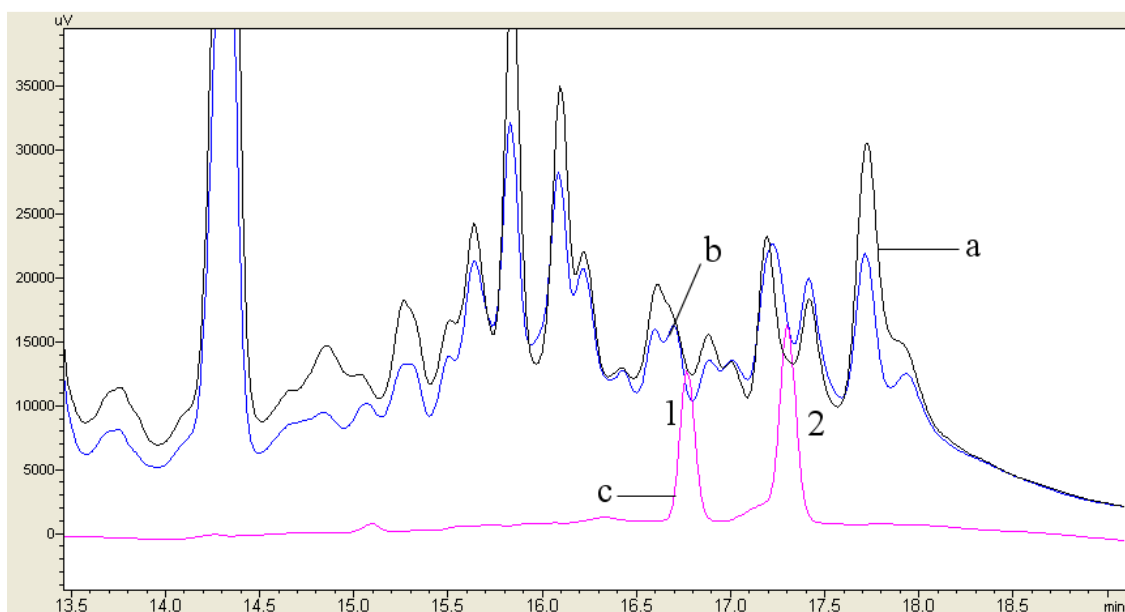
**Figura 27.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* "a": 150 mg de PSA e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o "Gradiente A": Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



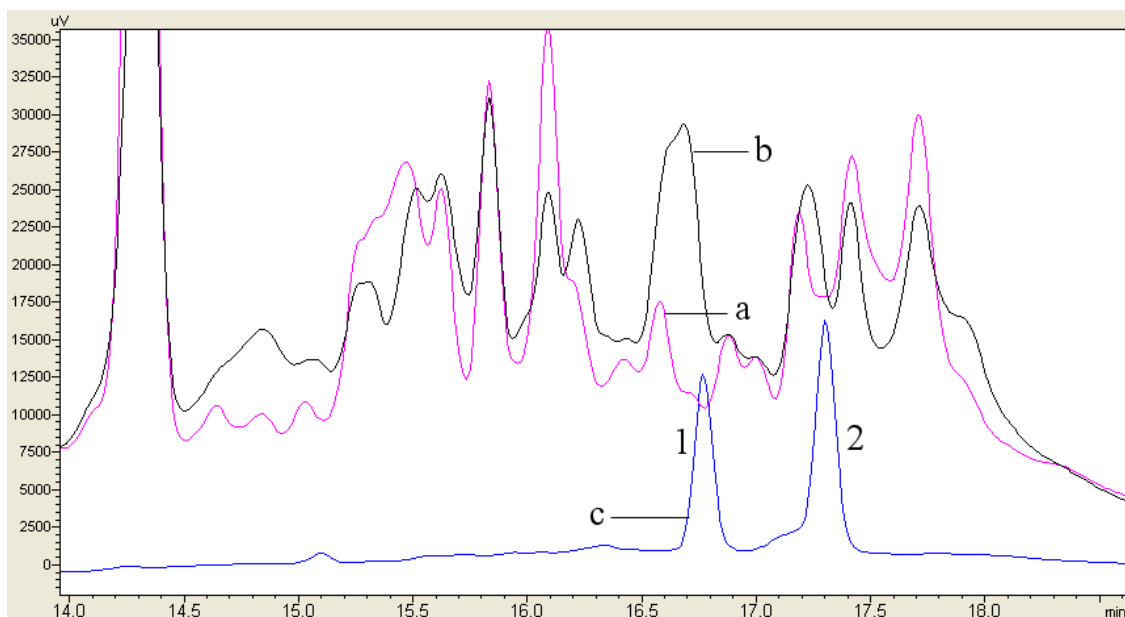
**Figura 28.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* "b": 300 mg de PSA e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o "Gradiente A": Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



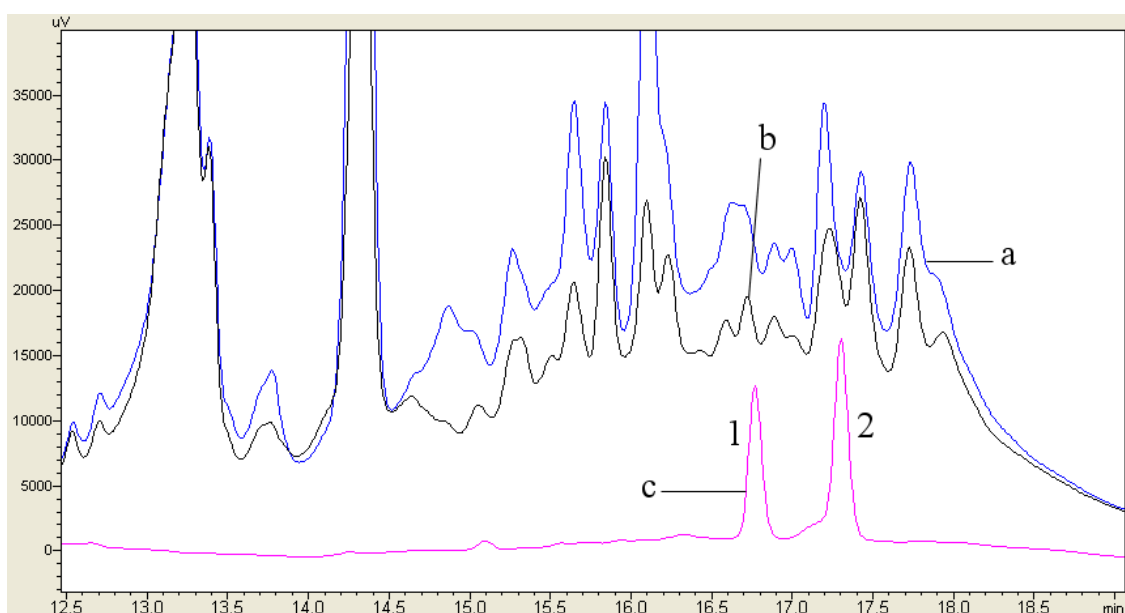
**Figura 29.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “c”: 150 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



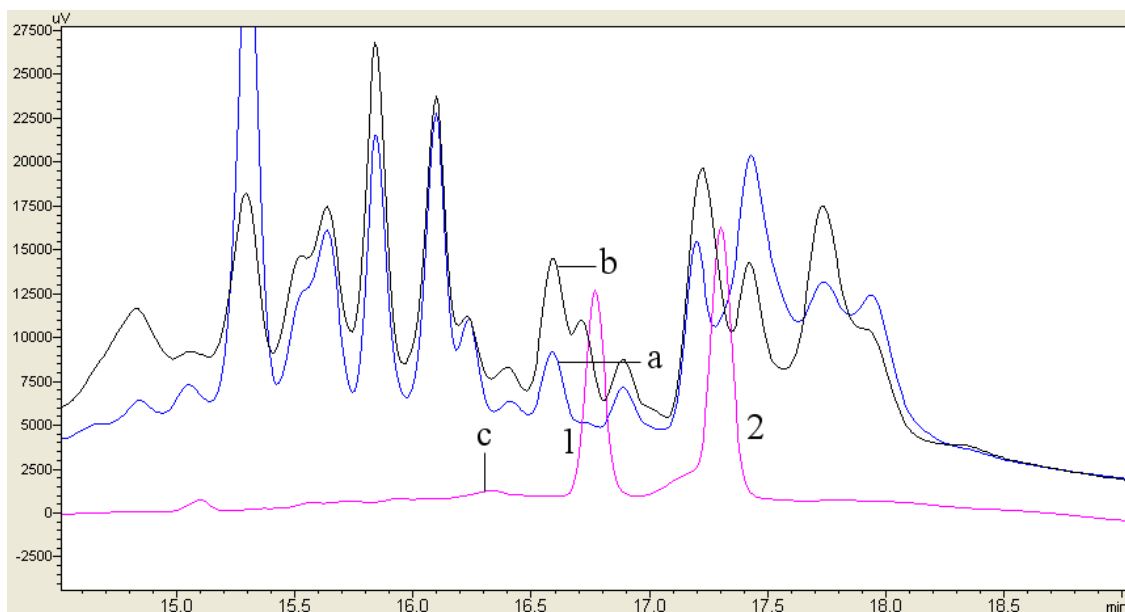
**Figura 30.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “d”: 300 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



**Figura 31.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “e”: 150 mg de PSA, 150 mg de C18 e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



**Figura 32.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “f”: 300 mg de PSA, 150 mg de C18 e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.



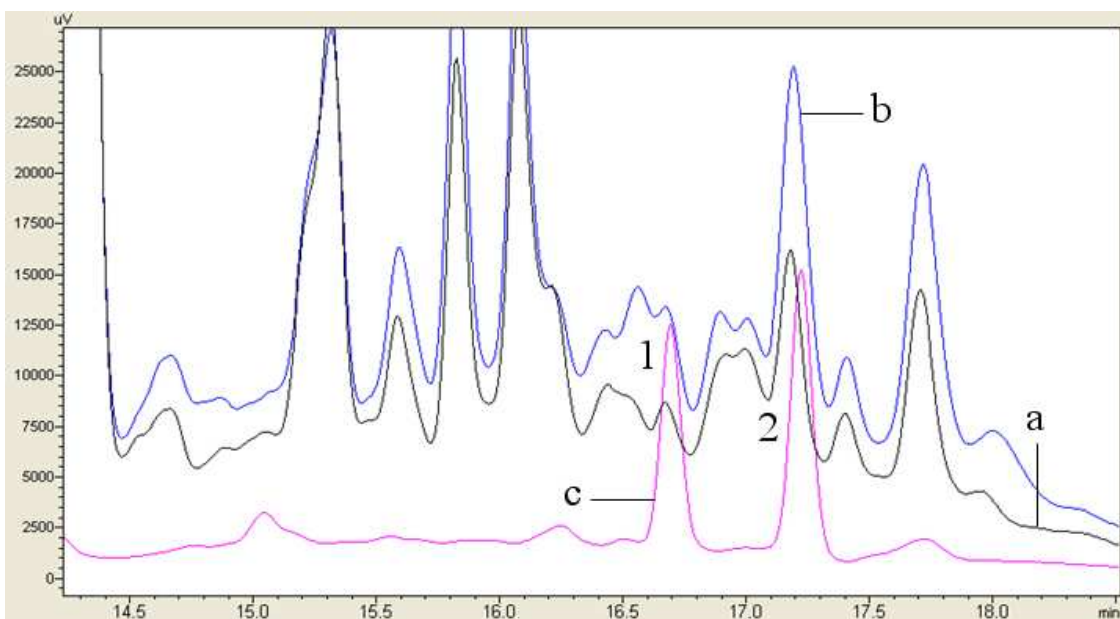
**Figura 33.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (*Clean-up* “g”: 150 mg de PSA, 150 mg carvão ativado e 900 mg de  $MgSO_4$ ). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna.

### 2.3. Efeito do pH da fase móvel

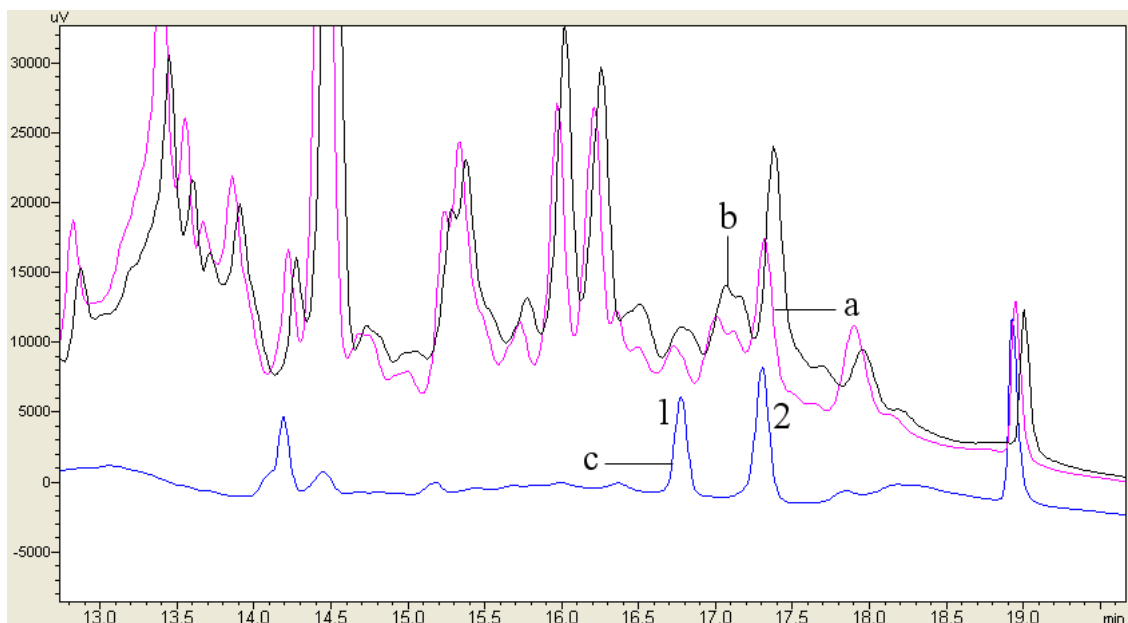
Primeiramente, investigou-se se a presença da matriz poderia afetar o pH do sistema de extração e derivatização. Após a adição do tampão pH 7,8 ao branco na etapa inicial da extração, o meio se manteve tamponado, e o pH se manteve em 4 após a adição da mistura de EDTA com L-cisteína e da solução de dimetil sulfato. O mesmo foi observado com o branco fortificado com mancozebe e propinebe e com a suspensão mista dos analitos.

Como se pode observar nas Figuras 27-33, observou-se uma diferença nos tempos de retenção dos analitos em solução quando comparado com os tempos nas amostras fortificadas quando a fase móvel utilizada foi acetonitrila:água (pH 5-5,5). Desta maneira, levantou-se a hipótese de que o pH da fase móvel seria alterado pela presença da matriz, o que afetaria o tempo de retenção dos analitos, e testou-se uma fase móvel com acetonitrila:água tamponada de pH 5. Adicionalmente, fases móveis tamponadas nos pHs 4 e 8 foram também testadas para avaliar se haveria mudança dos tempos de retenção dos interferentes em relação aos analitos.

Os resultados mostraram que a fase móvel tamponada com diferentes pHs não alterou consideravelmente os tempos de retenção dos interferentes. Além disso, o uso do tampão aumenta o risco de danificar o equipamento com entupimentos da tubulação e da coluna devido à possibilidade de precipitação dos sais do tampão quando em contato com outras substâncias. Portanto, a fase móvel água:acetonitrila foi mantida no método. As Figuras 34 e 35 mostram os cromatogramas de um extrato de brócolis (branco e fortificado) e STM utilizando-se fase móvel com pH 4 e 8, respectivamente.



**Figura 34.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (pH da fase móvel: 4). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel tampão acetato, pH 4 (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>.

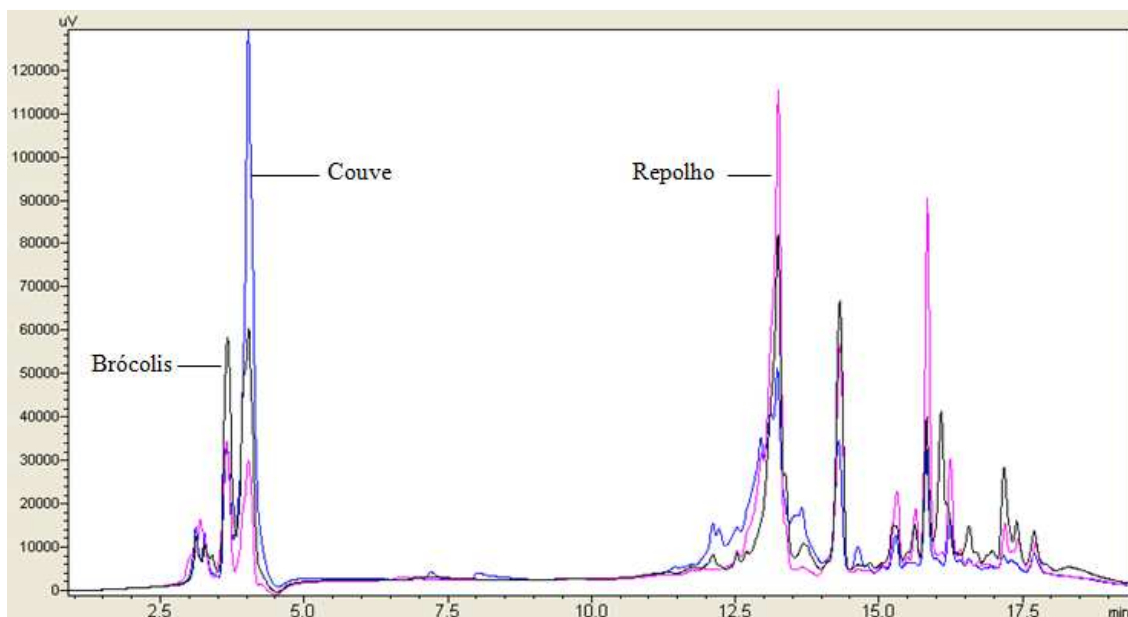


**Figura 35.** Cromatogramas dos extratos do brócolis (pH da fase móvel: 8). (a) Branco do brócolis; (b) Brócolis fortificado no nível de 1 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel tampão fosfato, pH 8 (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de sílica e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>.

#### 2.4. Alterações na vazão e no gradiente

Os resultados dos testes realizados no decorrer do trabalho mostraram que as brássicas repolho, brócolis e couve possuem perfis cromatográficos similares (Figura 36). Dessa forma, a partir dessa etapa a matriz repolho foi escolhida como representativa dessas culturas, e a goiaba como representante das frutas.

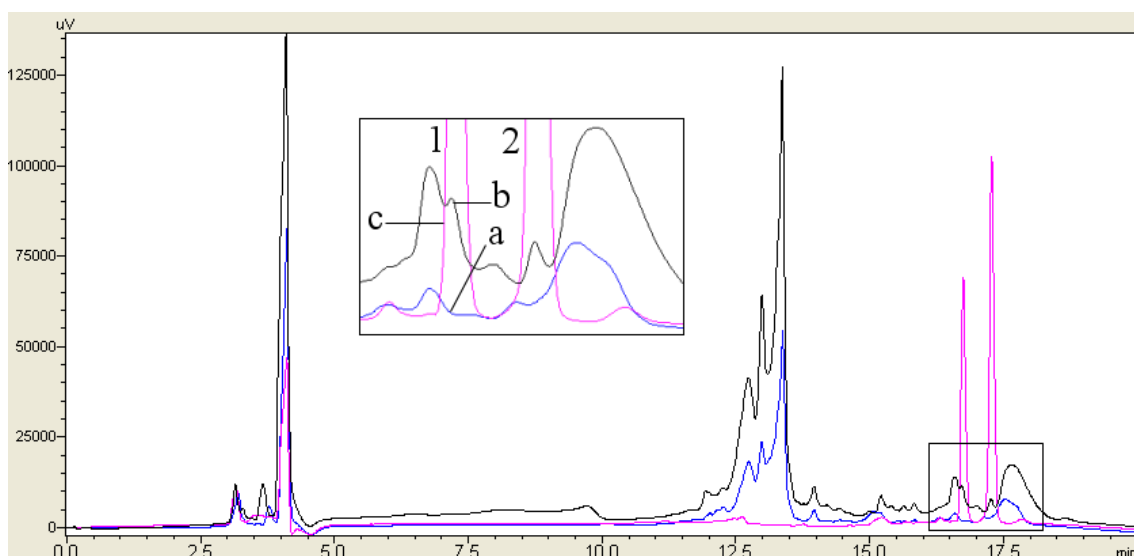
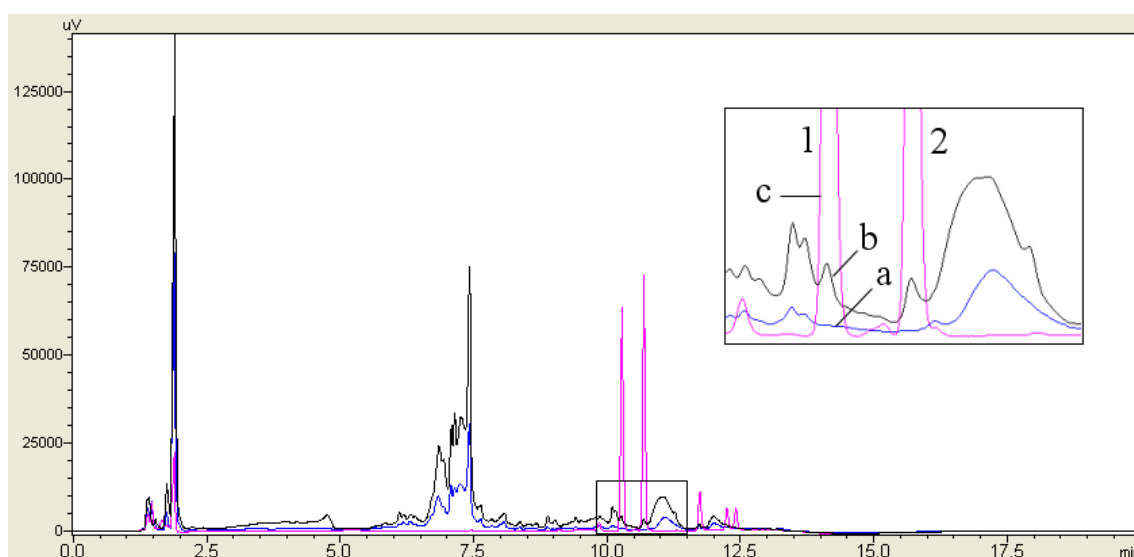




**Figura 36.** Cromatogramas dos brancos do brócolis, couve e repolho. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente A”: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>.

A mudança na vazão do Gradiente A (de 0,5 mL/min para 1,1 mL/min, “Gradiente B”) foi realizada com o objetivo de adiantar a saída dos analitos e verificar se a mudança poderia alterar a saída dos interferentes. O Gradiente C (Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna) foi proposto no intuito de fazer uma rampa mais suave, de forma que os interferentes e analitos saíssem de maneira mais lenta e mais espaçados.

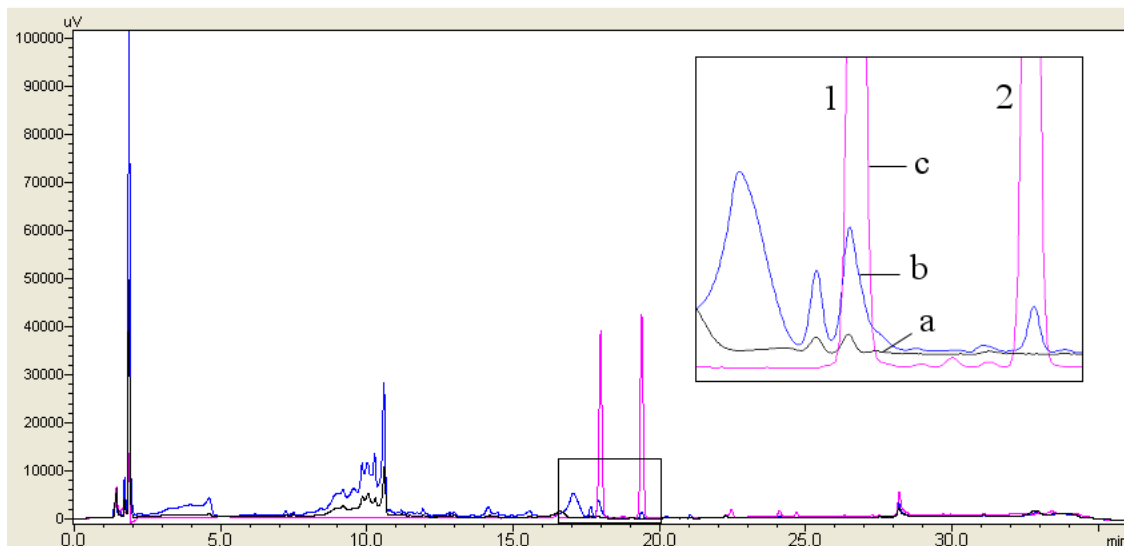
A Figura 37 ilustra os cromatogramas dos brancos da goiaba, quando injetados nos gradientes A e B.

**A****B**

**Figura 37.** Brancos da goiaba injetados nos gradientes A e B (A) Gradiente A: Vazão de 0,5 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–9 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 9–10 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna; (B) Gradiente B: Mesmas condições descritas no “Gradiente A”, com alteração na vazão (1,1 mL/min). *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. (a) Branco da goiaba; (b) Goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 5 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil.

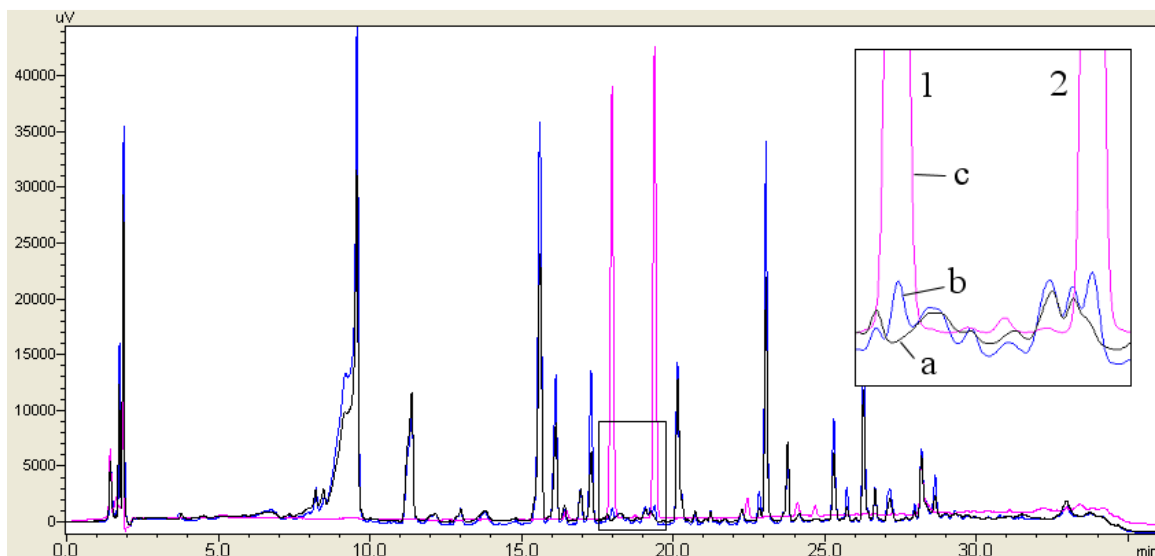
Em ambos os Gradientes A e B, foi observada a presença de interferentes da matriz goiaba, próximos aos tempos de retenção dos dois analitos de interesse (Figura 37). Entretanto, no Gradiente C (Figura 38), não foi observada a presença de

interferentes no tempo de retenção do propinebe-dimetil. A Figura 38 mostra os cromatogramas da goiaba utilizando o Gradiente C. Observa-se ainda um interferente da matriz co-eluído com o EBDC-dimetil.



**Figura 38.** Cromatogramas dos extratos da “Goiaba 4” utilizando o “Gradiente C”: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. (a) Branco da goiaba; (b) Goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil.

A alteração da vazão do Gradiente A não eliminou os interferentes que saem próximos aos tempos de retenção do EBDC-dimetil e do propinebe-dimetil no repolho. Entretanto, foram obtidos picos mais bem definidos na amostra fortificada no Gradiente C, em comparação com os Gradientes A e B. A Figura 39 mostra os cromatogramas para a matriz repolho, utilizando o Gradiente C. Observa-se um pequeno interferente da matriz co-eluído com o propinebe.

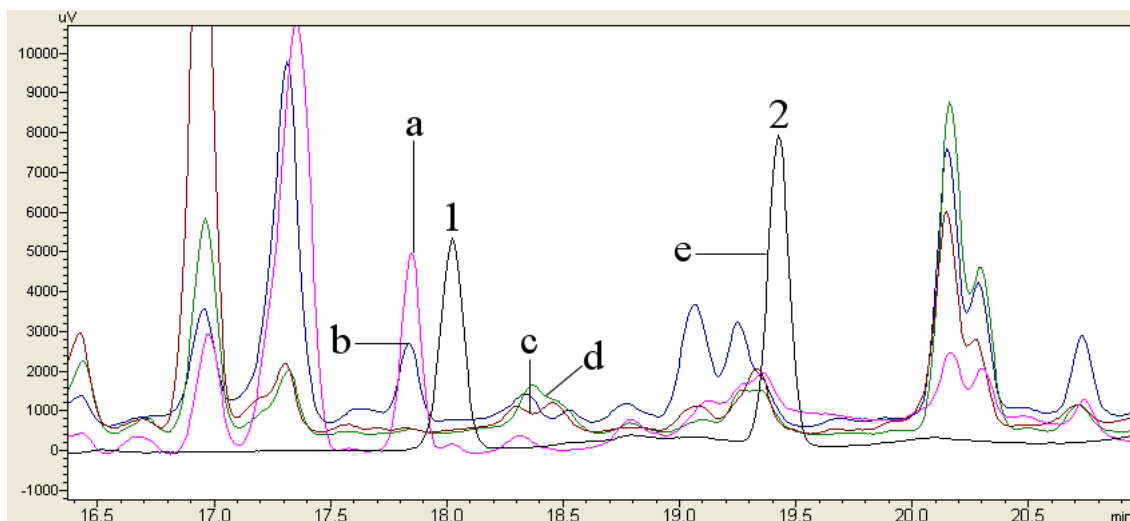


**Figura 39.** Cromatogramas dos extratos do “Repolho 2” utilizando o “Gradiente C”: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. (a) Branco do repolho; (b) Repolho fortificado no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil.

## 2.5. Validação do método de metilação para análise de EBDC e propinebe

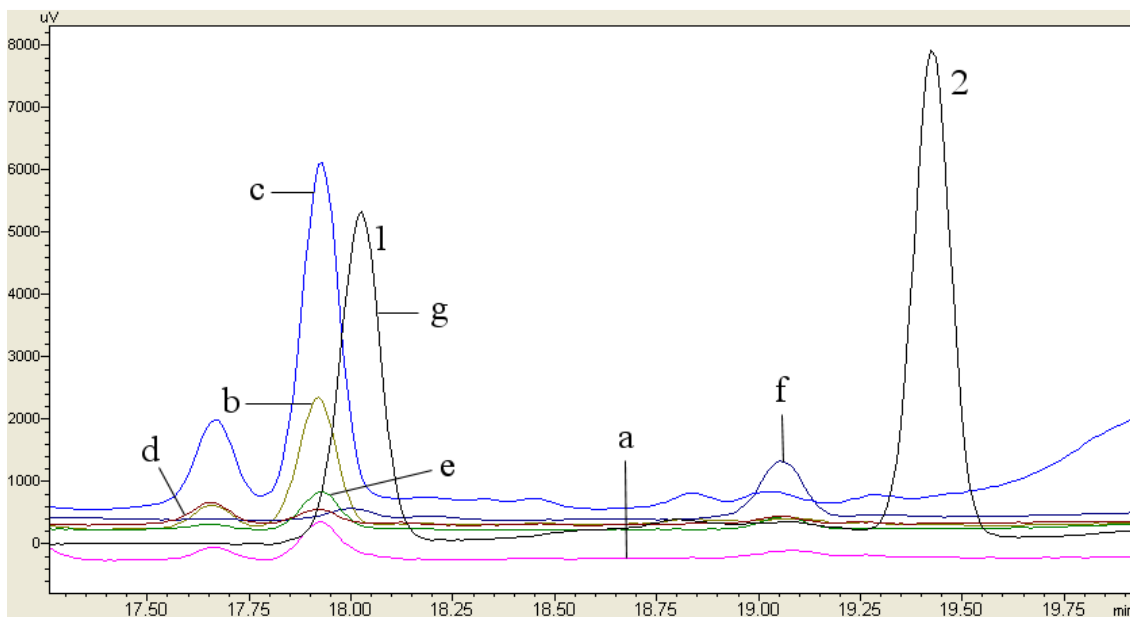
### 2.5.1. Seletividade

Os testes de seletividade mostraram diferentes perfis cromatográficos dos extratos dos 9 repolhos adquiridos em diferentes épocas e locais. A Figura 40 mostra os cromatogramas da amostra mais antiga testada (Repolho 1; ~ 3,5 meses entre aquisição e análise); do Repolho 2, analisado 8 dias depois da aquisição; e dos Repolhos 4 e 5, analisados 1 dia depois da aquisição. Principalmente, observa-se diferentes intensidades do “ombro” do interferente próximo ao tempo de retenção do propinebe-dimetil (19,3-19,4 min) e do interferente próximo ao EBDC-dimetil (17,7-17,9 min).



**Figura 40.** Cromatogramas de amostras repolho controle (Estudo de seletividade). (a) Repolho 1; (b) Repolho 2; (c) Repolho 4; (d) Repolho 5 (Tabela 4); (e) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente C”: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>.

Os testes com a goiaba demonstraram a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do EBDC-dimetil em todas as amostras analisadas (Figura 41). Algumas amostras mais antigas apresentaram interferentes com sinais maiores em comparação com amostras mais novas. As goiabas 2 e 3 (Figura 41, cromatogramas b – c) foram analisadas 2 e 4 anos depois de adquiridas, respectivamente, e as goiabas 5 e 6 dois dias depois da aquisição (Figura 41, cromatogramas e – f). As mais antigas foram analisadas pelo método espectrofotométrico na época em que foram adquiridas e produziram resultados negativos para CS<sub>2</sub>, mas no HPLC-UV mostraram a presença de interferentes importantes em tempos de retenção próximos ao EBDC-dimetil. Em todas as amostras testadas, não foi observada a presença de interferentes no tempo de retenção do propinebe-dimetil.



**Figura 41.** Cromatogramas de amostras goiaba controle (Estudo de seletividade). (a) Goiaba 1; (b) Goiaba 2; (c) Goiaba 3; (d) Goiaba 4; (e) Goiaba 5; (f) Goiaba 6 (Tabela 4); (g) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL) derivatizada no nível de 1 mg/kg. (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Na cromatografia, foi utilizado o “Gradiente C: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>.

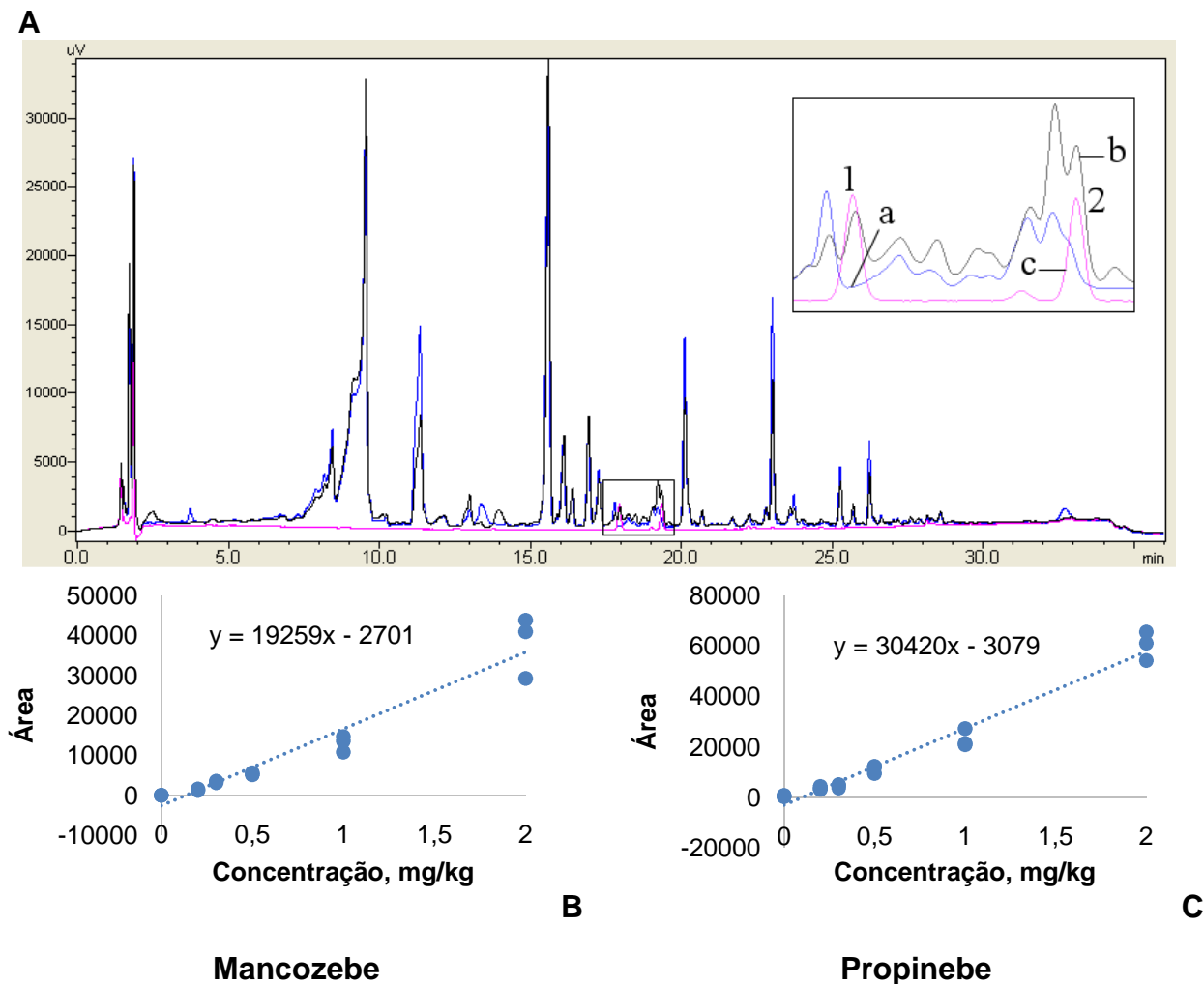
Outros aspectos que podem interferir nos perfis cromatográficos dos extratos, além do tempo de armazenamento, são estágio de maturação da amostra e variedade.

Para os estudos de validação, foi utilizado um homogenizado das amostras de goiaba adquiridas mais recentemente (goiabas 4, 5 e 6). Para o repolho, foi utilizada uma das amostras obtidas recentemente (Repolho 5).

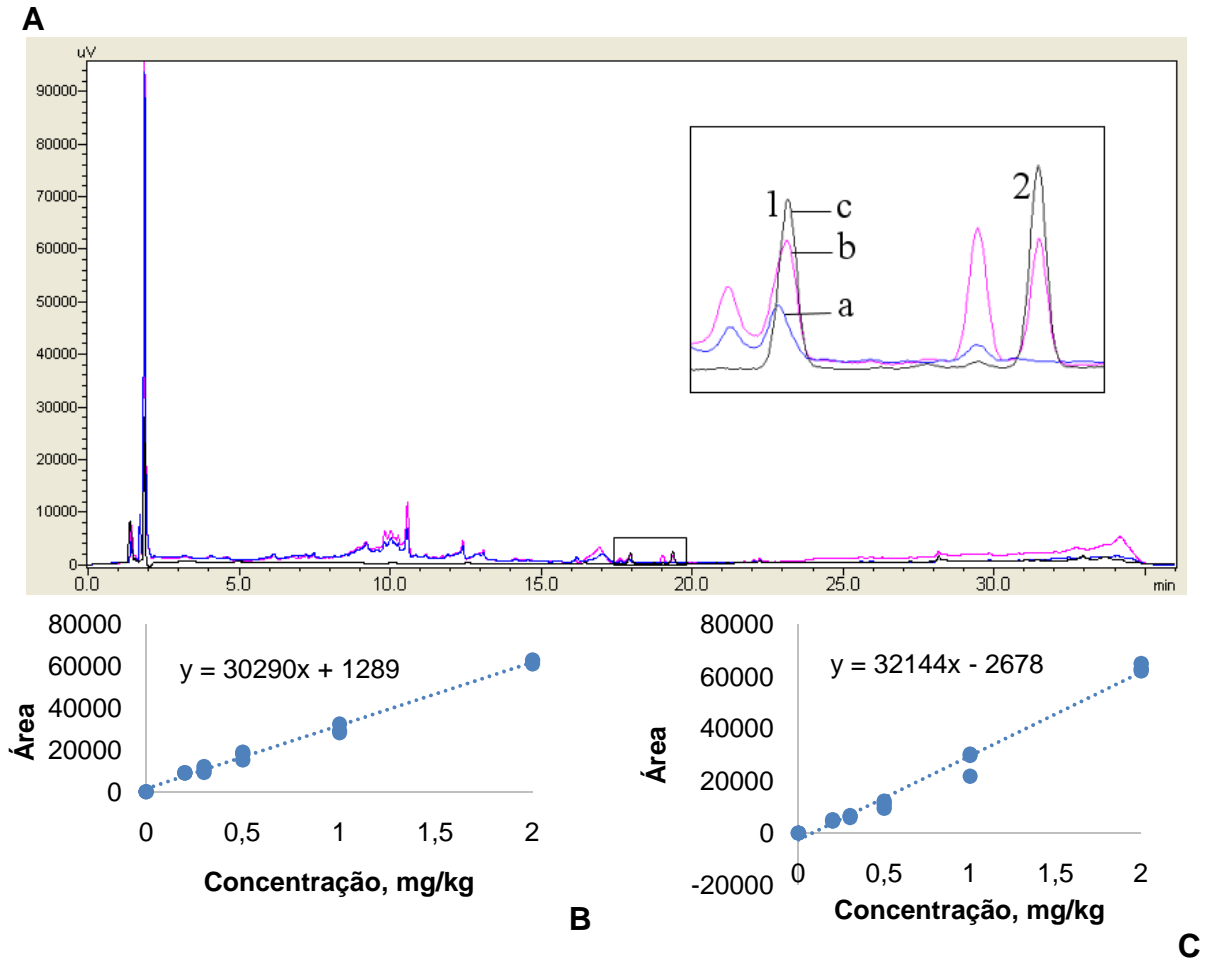
### 2.5.2. Linearidade

Para o presente método, a linearidade foi avaliada por meio de 3 curvas analíticas da matriz branca fortificada pré-extração nos níveis 0,2, 0,3, 0,5, 1 e 2 mg/kg (n=3 em cada nível). A variância dos resíduos em cada nível foi avaliada pelo teste de Cochran (INMETRO, 2011; Neto et al., 2010). Para o mancozebe em repolho e propinebe em goiaba, os dados se mostraram heterocedásticos, porém, as curvas de regressão ponderada, apesar de apresentarem correlação significativa (ANOVA;  $p < 0,05$ ), mostraram falta de ajuste, portanto, optou-se por utilizar

regressão linear também nestes casos. As Figuras 42 e 43 mostram os cromatogramas e as curvas analíticas para o repolho e a goiaba, respectivamente.



**Figura 42.** (A) Cromatograma do repolho fortificado no nível de 0,5 mg/kg. (a) Branco do repolho; (b) Repolho fortificado no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 0,5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Curvas analíticas de repolho fortificado pré-extração com (B) mancozebe e (C) propinebe; Coluna Gemini C18 5  $\mu$ m 150 x 4,6 mm com pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0 mm. Forno de coluna em 40°C. Volume de injeção de 25  $\mu$ L, Gradiente: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. Detecção em 270 nm. Tempo de corrida: 36 min.



### Mancozebe

### Propinebe

**Figura 43.** (A) Cromatograma da goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg. (a) Branco da goiaba; (b) Goiaba fortificada no nível de 0,5 mg/kg; (c) Suspensão de trabalho de mistura de mancozebe e propinebe (0,03 mg/mL; 0,5 mg/kg). (1) EBDC-dimetil (2) propinebe-dimetil. Curvas analíticas de goiaba fortificada pré-extração com (B) mancozebe e (C) propinebe; Coluna Gemini C18 5 µm 150 x 4,6 mm com pré-coluna C18 Gemini 4 x 3,0 mm. Forno de coluna em 40°C. Volume de injeção de 25 µL, Gradiente: Vazão de 1,1 mL/min, fase móvel água (solvente A)/acetonitrila (solvente B). 0,01 minutos, 10% de B; 0,01–30 minutos, mudança linear de 10 até 90% de B; 30–31 min, mudança linear de 90 até 10% de B, mantendo essas condições até o final da corrida para estabilização da coluna. *Clean-up*: 150 mg de PSA, 150 mg de carvão ativado e 900 mg de MgSO<sub>4</sub>. Detecção em 270 nm. Tempo de corrida: 36 min.

Coeficientes de correlação ( $r \geq 0,99$ ) foram obtidos para ambos os analitos nas duas matrizes testadas, com exceção da matriz repolho para o mancozebe ( $r = 0,977$  (Tabela 6)). Entretanto, foi demonstrado através da ANOVA, que todas as curvas foram significativas ( $p < 0,05$ ) e nenhum modelo possuiu falta de ajuste.



### 2.5.3. Repetitividade, LOQ e LOD

A repetitividade foi avaliada através da fortificação das matrizes brancas pré-extração em 5 níveis diferentes, cada nível sendo realizado em triplicata. A Tabela 6 mostra os coeficientes de variação (CV) obtidos.

**Tabela 6.** Coeficientes de Variação (%CV, n=3) obtidos após extrações dos analitos utilizando o método de metilação

Matriz	Analito	r	Nível de fortificação, mg DT/kg				
			0,2	0,3	0,5	1,0	2,0
Goiaba	Mancozebe	0,997	2,0	14,5	11,6	7,5	1,9
	Propinebe	0,994	2,2	14,3	13,9	7,6	1,9
Repolho	Mancozebe	0,977	4,2	3,3	3,9	12,7	19,1
	Propinebe	0,988	10,2	10,3	11,8	14,1	9,2

Foram obtidos valores de CV menores do que 20% em todos os níveis testados. O LOQ do método foi definido como o menor nível onde se conseguiu obter valores de  $CV \leq 20\%$  (SANCO, 2013), sendo assim, ele foi estabelecido como 0,2 mg ditiocarbamatos/kg de amostra para ambos os analitos, em ambas as matrizes. O LOD foi estabelecido como 0,1 mg ditiocarbamatos/kg de amostra.

Para conversão de valores de mancozebe e propinebe para  $CS_2$  ou vice versa, sabe-se que:

1 mol de mancozebe (271,2 g)  $\rightarrow$  2 moles de  $CS_2$  (152,3 g)

1 mol de propinebe (289,8 g)  $\rightarrow$  2 moles de  $CS_2$  (152,3 g)

Desta maneira, os fatores de conversão entre as duas unidades são:

Mancozebe  $\rightarrow CS_2$             F = 0,56

$CS_2 \rightarrow$  mancozebe        F = 1,78

Propinebe  $\rightarrow CS_2$          F = 0,52

$CS_2 \rightarrow$  propinebe         F = 1,9

Desta maneira, o LOQ para mancozebe e propinebe são, respectivamente, 0,11 e 0,10 mg  $CS_2$ /kg.

### 3. Análise de amostras

A Tabela 7 mostra os resultados das análises das amostras pelos métodos espectrofotométrico (CS<sub>2</sub>) e por HPLC-UV (metilação). Somente foram analisadas pelo método cromatográfico as amostras que deram resultados positivos para o método espectrofotométrico ( $\geq 0,05$  mg/kg CS<sub>2</sub>), com exceção da amostra de caju.

**Tabela 7.** Resultados das análises de ditiocarbamatos nos métodos espectrofotométrico (CS<sub>2</sub>) e metilação por HPLC-UV

Amostra	Espectrofotométrico mg CS <sub>2</sub> /kg	EBDC mg/kg (mg CS <sub>2</sub> /kg)	Propinebe mg/kg (mg CS <sub>2</sub> /kg)
Goiaba	0,06	0,2 (0,1)	<0,2 (<0,1)
Goiaba	0,07	0,4 (0,2)	<0,2 (<0,1)
Goiaba	0,05	0,3 (0,2)	<0,2 (<0,1)
Goiaba	0,05	0,6 (0,3)	<0,2 (<0,1)
Goiaba	<0,05	Não analisado	Não analisado
Goiaba	<0,05	Não analisado	Não analisado
Goiaba	<0,05	Não analisado	Não analisado
Goiaba	<0,05	Não analisado	Não analisado
Caju	<0,05	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Couve	0,2	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Brócolis	0,2	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Repolho	0,5	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Repolho	0,3	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Repolho	0,2	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Brócolis	0,9	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Couve	0,1	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Repolho	0,2	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Repolho	0,2	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)
Repolho	0,3	<0,2 (<0,1)	<0,2 (<0,1)

Das 8 amostras de frutas analisadas para CS<sub>2</sub>, 4 amostras de goiaba deram positivas no método espectrofotométrico, com resultados entre 0,05-0,07 mg/kg, embora o uso de ditiocarbamatos não seja permitido para essa cultura no Brasil. Quando estas amostras foram analisadas pelo método cromatográfico, foram encontrados níveis de EBDC entre 0,2-0,6 mg/kg ou 0,1-0,3 mg CS<sub>2</sub>/kg. Todas as amostras de hortaliças do tipo brássicas deram positivas para CS<sub>2</sub> no método espectrofotométrico (0,1-0,9 mg CS<sub>2</sub>/kg) e menores que o LOQ no método cromatográfico para os ambos os analitos.

## VI. DISCUSSÃO

Apesar de os ditiocarbamatos possuírem baixa toxicidade aguda em mamíferos, os EBDC (mancozebe, metiram, manebe) e propinebe produzem metabólitos (ETU e PTU) que possuem efeitos reprodutivos e câncer de tireóide em animais de laboratório. Como a toxicidade dos ditiocarbamatos é diferente para cada composto, a determinação direta dessa classe de fungicidas é importante para a realização de avaliações de risco mais detalhadas, uma vez que os resíduos dos ditiocarbamatos são os mais detectados em alimentos em programas de monitoramento. Entretanto, devido à baixa solubilidade da maioria dos ditiocarbamatos em solventes orgânicos, atualmente o método mais utilizado para a análise desses compostos em alimentos consiste em uma análise indireta de determinação do CS<sub>2</sub>, composto liberado por todos os ditiocarbamatos ao passarem por uma hidrólise ácida.

Neste trabalho foram avaliados dois métodos de análise direta de EBDC e propinebe. O método de cromatografia de par iônico proposto por Van Lishaut e Schwack (2000) foi escolhido como ponto de partida, por ser adequado à proposta inicial do presente trabalho de otimizar e validar um método rápido, simples e de baixo custo, que não necessita de etapas de *clean-up*. Porém, além de dificuldades na filtração do extrato da amostra, o perfil cromatográfico dos analitos neste método foi muito variável entre os dias de análise, dificultando a replicação dos resultados. Sabe-se que a cromatografia de par iônico pode ser problemática para o analista, pois a concentração do reagente de par iônico na fase estacionária depende de diversas variáveis, as quais devem ser controladas cautelosamente (Dolan, 2008). Portanto, para este estudo, este método foi abandonado e o método de análise de EBDC e propinebe após metilação foi avaliado.

Diversos testes foram realizados durante a etapa de otimização do método por metilação (López-Fernández, 2012). A maior limitação deste método foi a presença de compostos interferentes da matriz nos mesmos tempos de retenção dos analitos de interesse, o que comprometeu a seletividade do método, tornando-o também, menos sensível do que o método espectrofotométrico (LOQ de 0,1 e 0,05 mg CS<sub>2</sub>/kg para o método cromatográfico e espectrofotométrico, respectivamente).

Portanto, faz-se necessário um refinamento do método para que ele se torne mais seletivo. A presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos pode comprometer parâmetros da validação, mas ainda assim, resultados satisfatórios foram obtidos para linearidade e repetitividade. Outra limitação do método de metilação é o fato de não ser possível fazer distinção entre os ditiocarbamatos da classe dos EBDC, já que o mesmo produto metilado é obtido após derivatização desses compostos (López-Fernández, 2012).

Os resultados das análises de goiabas pelo método por HPLC-UV validado mostraram uma superestimativa dos valores de EBDC comparado ao método espectrofotométrico, esperado neste estudo devido aos interferentes da matriz goiaba que co-eluem com o mancozebe. Assumindo-se que o agricultor não utilizou nenhum ditiocarbamato não registrado no Brasil, os resultados obtidos nas análises das amostras de goiaba coletadas no comércio indicaram que o CS<sub>2</sub> encontrado foi proveniente da presença de mancozebe, ou metiram nas amostras positivas.

Todas as amostras de brássicas analisadas neste estudo foram positivas para CS<sub>2</sub>, mas apresentaram resultados < LOQ (0,2 mg/kg) para EBDC e propinebe, indicando que os valores de CS<sub>2</sub> encontrados não foram provenientes destes analitos, mas de outros fatores, especialmente a compostos presentes nestes vegetais que liberam CS<sub>2</sub> sob condições de análise, gerando falso-positivos nos métodos de determinação indireta (Perz et al., 2000). É possível comparar esses resultados com os de Crnogorac et al. (2008), que analisaram brócolis (entre outras culturas) por dois métodos de análise direta por LC-MS/MS e LC-MS, e pelo método por CS<sub>2</sub>, que resultou em resultados falso-positivos. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho reafirmam que a análise de ditiocarbamatos por espectrofotometria (CS<sub>2</sub>) produz falso-positivos para as brássicas (Perz et al., 2000; Stertz e Freitas, 2003). Os resultados positivos para o método espectrofotométrico também podem ter sido provenientes da presença de outros ditiocarbamatos não analisados neste trabalho, principalmente nas amostras onde se obteve valores elevados no método espectrofotométrico (0,5 e 0,9 mg CS<sub>2</sub>/kg para um repolho e um brócolis, respectivamente).

## VII. CONCLUSÕES

Neste trabalho, dois métodos de análise direta de ditiocarbamatos foram comparados. O método de cromatografia de par iônico não se mostrou adequado para análise de EBDC e propinebe nas condições testadas devido a dificuldades na extração e a constantes variações no perfil cromatográfico dos analitos entre os dias de análise.

O método de metilação otimizado apresentou interferentes na região dos EBDC na matriz goiaba e na região do propinebe na matriz repolho, e mostrou-se menos sensível do que o método espectrofotométrico. Entretanto, o método foi validado e se mostrou satisfatório para confirmar amostras positivas de goiaba por espectrofotometria ( $CS_2$ ) e que amostras de brássicas positivas para  $CS_2$  não contêm EBDC ou propinebe. Porém, o método validado deverá ser melhorado, principalmente com relação às condições cromatográficas a fim de obter um método mais sensível e mais seletivo.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSCA. (2008). Pesticide residue monitoring program in food of plant origin. Results of the official controls in accordance to regulation (CE) No 396/2005 and commission recommendation 2008/103/EC. Belgium: Federal Agency for the Safety of the Food Chain. Disponível em: <[http://www.favv.be/publications-en/\\_documents/2008\\_Belgium-summary.pdf](http://www.favv.be/publications-en/_documents/2008_Belgium-summary.pdf)> Acessado em: 08/11/2014.
- Anastassiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce., *J. AOAC Int.* 86, 412–431, 2003.
- Anderson, P.J. A successful spray for blue mold of tobacco. *Plant Dis. Rep.*, v. 26, p. 201-202, 1942.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias de produtos agrotóxicos. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia>> Acessado em 01/12/2014.
- Bardarov, V.; Zaikov, C. Application of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and electrochemical detection to the analysis of alkylenebis (dithiocarbamates) and their metabolites. *Journal of Chromatography*, v. 479, p. 97-105, 1989.
- Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y.; Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, v. 1028, p. 267–276, 2004.
- Brandes, G.A. The history and derivatives of ethylene dithiocarbamate fungicides. *Am. Potato. J.*, v. 30, p. 137-140, 1953.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica – Resíduos e contaminantes em alimentos. 1ª edição, Brasília, 2011.
- BRASIL. Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. ANVISA.

- Cajka, T.; Riddellova, K.; Zomer, P.; Mol, H.; Hajslova, J. Direct analysis of dithiocarbamate fungicides in fruit by ambient mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* v. 28, n. 10, p. 1372–1382, 2011.
- Caldas, E.D.; Conceição, M.H.; Miranda, M.C.C.; Souza, L.C.K.R.; Lima, 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.; Souza, M.V.; Jardim, A.N.O. Dietary risk assessment of organophosphorus and dithiocarbamate pesticides in a total diet study at a Brazilian university restaurant, *Food Addit. Contam.*, v. 28, n. 1, p. 71–79, 2011.
- Cecchi, T. Ion Pairing Chromatography, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 161-213, 2008.
- Ciscato, C.H.P; Gebara, A.B.; Monteiro, S.H. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. *Food Additives and Contaminants: Part B*, v.2, n. 2, p.140–145, 2009.
- Conceição, M.H. *Resíduos de Pesticidas em Tomates: Metodologia Analítica e Avaliação da Exposição Humana*. 2002. 134 f. Tese (Doutorado em Química)—Universidade de Brasília, Brasília, 2002.
- Crnogorac G.; Schmauder, S.; Schwack, W. Trace analysis of dithiocarbamate fungicide residues on fruits and vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, v. 22, p. 2539–2546, 2008.
- Crnogorac, G.; Schwack, W. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 1, p. 40-50, 2009.
- Cullen, T.E. Spectrophotometric Determination of Dithiocarbamates Residues. *Food Crops. Anal. Chem.*, v. 36, p. 221-224, 1964.
- Dasgupta, S.; Mujawar, S.; Banerjee, K.; Huebschmann, H-J.; Analysis of Dithiocarbamate Pesticides by GC-MS. Application Note 10333. Disponível em: <<https://static.thermoscientific.com/images/D22481~.pdf>> Acessado em: 29/11/2014.
- Dearfield, K.L. Ethylene thiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies. *Mutation Research*, v. 317, p. 111-132, 1994.

- DFG S 21, Ethylene and propylenebisdithiocarbamate fungicides, Manual of Pesticide Residue Analysis, v.I and II. Wiley VCH. Pesticides Commission, 1984. Disponível em : <[http://www.bfr.bund.de/cm/349/s21\\_eng.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/349/s21_eng.pdf)> Acessado em: 08/11/2014.
- Doerge, D. R.; Takazawa, R. S. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. *Chemical Research Toxicology*, v. 3, p. 98–101, 1990.
- Dolan, J.W., Ion Pairing - Blessing or Curse? *LCGC Europe*, Volume 21, Edição 5, Maio 2008. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com>>. Acessado em: 19 mar. 2013.
- EC (European Commission). Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Documento N° SANCO/12571/2013.
- Ecobichon, D.J. Toxic effects of pesticides. In: Amdur MO and Klaassen CD, editors. Casarett and Doll's toxicology: the basis of poisons. 6° Edição. New York: McGraw Hill; 2001.
- EFSA (European Food Safety Authority). Annual report on pesticide residues. *EFSA Journal*, v. 8, n. 6, p. 1646, 2010.
- EPA. The Determination of Whether Dithiocarbamate Pesticides Share a Common Mechanism of Toxicity, Health Effects Division Office of Pesticide Programs U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., U.S.A., 38 p., 2001.
- EPA, 1992. Disponível em <<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/ethyl-th.html>>. Acessado em 02/12/2014.
- EURL-SRM, 2009. Analysis of Dithiocarbamate Residues in Foods of Plant Origin Involving Cleavage into Carbon Disulfide, Partitioning into Isooctane and Determinative Analysis by GC-ECD; (V2). Disponível em <[http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth\\_DithiocarbamatesCs2\\_EurlSrm.PDF](http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_DithiocarbamatesCs2_EurlSrm.PDF)> Acessado em 28/11/2014.
- FAO/WHO (1986a) Pesticide residues in food. Report of the 1985 Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Plant Production and Protection Paper No. 68).



- FAO/WHO (1986b) 1985 Evaluations of some pesticide residues in food, Part II - Toxicology, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO Plant Production and Protection Paper No. 72)
- FAO Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO).1993. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides in Food and the Environment and the WHO Cores Assessment Group on Pesticide Residues. 1993. Disponível em [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Reports\\_1991-2006/Report1993.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Reports_1991-2006/Report1993.pdf). Acessado em 01/12/2014.
- FAO/WHO (1999) Pesticide residues in food. Report of the 1999 Joint Meeting of the FAO Meeting of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Plant Production and Protection Paper No. 153).
- Flenner, A.L. Manganous ethylene–bis-dithiocarbamate and fungicidal compositions containing same. U.S. patent 2,504,404, 1950.
- Friedrichs, K.; Winkeler, H.D.; Gerhards, P. Determination of Dithiocarbamate Residues in Foodstuff by Headspace Gas Chromatography and Flame Photometric Detection.*Z. Lebensm. Unters. Forsch.*,v. 201, p. 69-73, 1995.
- Garcinuño, R.M.; Fernández-Hernando, P.; Cámara, C. Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection, *Journal of Chromatography A*, v. 1043, p. 225–229, 2004.
- Góralczyk, K.; Struciński, P.; Korcz, W.; Czaja, K.A.; Hernik, T.; Snopczyński, et al. The survey of pesticide residues in food of plant origin in Poland, 2004–2007. *Rocz Panstw Zakl Hig*, v. 60, p. 113–119, 2009.
- Gullino, M.L.; Tinivella, F.; Garibaldi, A.; Kemmitt, G.M.; Bacci, L.B. Mancozeb Past Present and Future, *Plant Disease*, 2010.
- 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.; Fahlgren, C.H. Determination of Dithiocarbamate Fungicides in Vegetable Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, v. 31, n. 2, 1983.
- Hardin, B., Schuler R.; Burg J.; Booth G.; Hazelden K.; Mackenzie K.; Piccirillo V.; Smith K. Evaluation of 60 chemicals in a preliminary developmental toxicity test. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, v. 7, p. 29-48, 1987.
- Harrington, P.; Horner, J.; Hird, S.; Griffiths, T.; Reynolds, S. L. Modification of the Method for Measurement of Dithiocarbamate Residues as Carbon Disulfide in Fruit and Vegetables. *Central Science Laboratory*, p. 1-34, 1998.
- Hayama, T.; Takada, M. Simple and rapid method for the determination of ethylenebisdithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 392:969–976, 2008.
- Heuberger, J.W.; Manns, T.F. Effect of zinc sulphate-lime on protective value of organic and copper fungicides against early blight of potato. *Phytopathology*, v. 33, p. 1113, 1943.
- Hill, A.R.C. Headspace Methods for Dithiocarbamates. *Modern Methods for Pesticide Analysis. Emerging Strategies for Pesticide Analysis*, CRC Press Inc, p. 213-231, 1992.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 04. 2011. Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf). Acessado em 30/11/2014.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Pesticide residues in food-1993 evaluations. Part II. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr01.htm>. Acessado em 02/12/2014.
- IPCS (International Program on Chemical Safety). Environmental health criteria 78 dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and propylenethiourea: a general introduction. 1988. Disponível em

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc78.htm>. Acessado em 07/11/2014.

IPCS (International Program on Chemical Safety). Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Environmental Health Criteria 240, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/chem/principles/en/index1.html>> Acessado em 08/11/2014.

IPCS (International Program on Chemical Safety). PROPINEB First draft prepared by M. Watson Pesticide Safety Directorate, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Harpenden, Hertfordshire, United Kingdom. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr16.htm>>. Acessado em 12/12/2014.

Irth, H.; De Jong, G.J.; Brinkman, U.A.; Frei, R.W. Metallic copper-containing post-column reactor for the detection of thiram and disulfiram in liquid chromatography. *J Chromatogr.*, v. 370, n. 3, p. 439-447, 1990.

Jardim, A.N.O.; Caldas, E.D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde, *Quim. Nova*, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

Jardim, A.N.O.; Caldas, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. *Food Control*, v.25, p. 607-616, 2012.

Jardim, A.N.O. *Resíduos de pesticidas em alimento: validação de metodologia analítica, análise em frutas e avaliação da exposição da população brasileira pelo método probabilístico*. 2012. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

Jardim, A.N.O., Mello, D.C., Goes, F.C.S., Junior, E.F.F., Caldas, E.D., Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC–IECD, GC–FPD and LC–MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment, *Food Chemistry*, 164, 195–204, 2014.

Jianren, Y.; Yongquan, Z.; Shuzhen, J.; Zhengguo, W.; Fuzhen, Z. Gas Chromatographic Headspace Determination of Dithiocarbamate Fungicide Residues on Vegetables. *Sci. Agric. Sin*, v. 22, p. 76-80, 1989.

- Kanchi, S.; Singh, P.; Bisetty, K. Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: A critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 7, p. 11–25, 2013.
- Kazos, E.A.; Stalikas, C.D.; Nanos, C.G.; Konidari, C.N. Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. *Chemosphere*, v. 68, p. 2104–2110, 2007.
- Keppel G.E. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *J. Ass. off. Analyt. Chem.*, v. 52, p. 162-167, 1969.
- Kincaid, R.R. Disease in cigar-wrapper tobacco plant beds in Florida in 1942. *Plant Dis. Rep.*, v. 26, p. 223, 1942.
- Klein, A.C. Cromatografia Iônica como Método Analítico Alternativo para a Análise Quantitativa de Analitos. 2010. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Klittich, C.J. 2008. Milestones in fungicide discovery: Chemistry that changed agriculture. Online. Plant Health Progress. Disponível em <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2008/milestones>>. Acessado em: 07/11/2014.
- Lehotay, S.J., Mařtovská, K., Lightfield, A.R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables, *Journal of AOAC International*, v. 88, n°2, 2005.
- Lemes, V.R.R.; Barretto, H.H.C.; Kussumi, T.A.; Colacioppo, S. Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 64, n. 1, p. 50-57, 2005.
- Lo, C-C; Ho, M-H; Hung, M-D. 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.
- López-Fernández, O.; Rial-Otero, R.; González-Barreiro C.; Simal-Gándara, J. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, v. 134, p. 366-374, 2012.

- MacLachlan, D. Propineb (105 - see dithiocarbamates). Disponível em <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation04/PROPINEB.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/PROPINEB.pdf)> Acessado em: 08/11/2014.
- Mandhan, P.; Quan, Q.B.; Beasley, S.; Sullivan, M.; Sonic hedgehog, BMP4, and Hox genes in the development of anorectal malformations in Ethylenethiourea-exposed fetal rats. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 41, p. 2041–2045, 2006.
- Maranghi, F.; De Angelis, S.; Tassinari, R.; Chiarotti, F.; Lorenzetti, S.; Moracci, G.; Marcoccia, D.G.E.; Di Virgilio, A.; Eusepi, A.; Mantovani, A.; Olivieri, A.; Reproductive toxicity and thyroid effects in Sprague Dawley rats exposed to low doses of ethylenethiourea, *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 261–271, 2013.
- Maraschin, L. *Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense*. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)— Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2003.
- Martin, H.; Worthing, C.R. Pesticide Manual. 4ª edição, Academic Press Inc, 1974.
- Mattos, M.L.T.; Castro, I.M.; Scivittaro, W.B. Resíduos de Agrotóxicos em Grãos, Casca e Farelo de Arroz Irrigado. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. 6 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 130).
- Motarjemi, Y.; Moy, G.; Ewen, T.; Encyclopedia of Food Safety. Elsevier. 2014
- Muskett, A. E.; Colhoun, J. Prevention of seedling blight in the flax crop. *Nature*, 146:32, 1940.
- Nakazawa, H.; Tsuda, Y.; Ito, K.; Yoshimura, Y.; Kubo, Hiroaki; Homma, H. Determination of Dithiocarbamate Fungicides by Reversed-Phase Ion-Pair Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, n. 4, p. 705-713, 2005.
- National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylene Thiourea (CAS No. 96-45-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). NTP TR 388. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1992.
- Neto, B.B.; Scarmino, I.S.; Bruns, R. E.; Como Fazer Experimentos. Bookman: Porto Alegre, 2010.

- News Medical. Cientistas descobrem mecanismo de *Sonic Hedgehog* proteína de ação. 2011. Disponível em: <<http://www.news-medical.net/news/20110614/13348/Portuguese.aspx>> Acessado em: 08/11/2014.
- Oliveira, A.R.; Junqueira, A.M.R.; Conceição, M.H.; Borgo, L.A. Avaliação da presença de resíduos de ditiocarbamatos em repolho produzido no Distrito Federal.
- Opacka, J.; Baranski, B.; Wrofiska-Nofer, T. Effect of alcohol intake on some disturbances induced by chronic exposure to carbon disulphide in rats. II. Behavioural alterations. *Toxicology Letters*, v. 23, p. 91-97, 1984.
- Perz, R.C.; Van Lishaut, H.; Schwack, W. CS<sub>2</sub> Blinds in Brassica Crops: False Positive Results in the Dithiocarbamate Residue Analysis by the Acid Digestion Method *J. Agric. Food Chem.* v. 48, p. 792–796, 2000.
- Rebelo, R.M.; Vasconcelos, R.A.; Buys, B.; Mac, C.D.; Rezende, J.Á.; Moraes, K.O.C.; Oliveira, R.P. Pesticides and related commercialized in Brazil in 2009. An environmental approach. Brasília: IBAMA; 2010. Disponível em [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/pesticides\\_comercialized\\_in\\_brazil\\_2009.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/pesticides_comercialized_in_brazil_2009.pdf). Acessado em 11/11/2014.
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- Ripollés, C.; Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the residue determination of ethylenethiourea (ETU) and propylenethiourea (PTU) in water. *Journal of Chromatography A*, v. 1243, p. 53– 61, 2012.
- Royer, A.; Ménand, M.; Grimault, A.; Communal, P.Y. Determination of Dithiocarbamates in Plant Matrixes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 2152–2158, 2001.
- Rubino, F.M.; Mrema, E.J.; Colosio, C. Pesticide Residues: Dithiocarbamates. *Encyclopedia of Food Safety*, v.3, p.5-10. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128002407>>. Acessado em: 08/11/2014.

- Schmidt, B.; Christensen, H.B.; Peterse, A., Sloth, J.J; Poulsen, M.E. (2013) Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LC-MS/MS, *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 30, n. 7, 1287-1298, 2013.
- Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª edição norte-americana, Thomson, 2005. 999 p.
- Souza, M.V. *Resíduos de Agrotóxicos Ditiocarbamatos e Organofosforados em Alimentos Consumidos no Restaurante Universitário – UnB: Avaliação da Exposição Humana*. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- Stertz, S.C.; Freitas, R.J.S. Teor de dissulfeto de carbono em agrião d'água (*Nasturtium officinale* R. BE.) obtido pelos sistemas de cultivo orgânico, convencional e hidropônico. *Ecotox. E M. Amb*, v. 13, p. 45-52, 2003.
- Tavares, M.A. *Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC*. 2006. 249 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Proteção de Plantas)—UNESP, Botucatu. 2006.
- Tisdale, W.H.; Flenner, A.L. Derivatives of Dithiocarbamic Acid as Pesticides. *Industrial and engineering chemistry*, 1942.
- Van Lishaut, H.; 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 Association of Official Analytical Chemists International*, v. 83, n. 3, p.720-727, 2000.
- WHO (World Health Organization).Guidelines for Predicting Dietary Intake of Pesticides Residues. Global Environment Monitoring System Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEM/Foods). Geneva, 1997. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/pesticide\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/pesticide_en.pdf)> Acessado em: 08/11/2014.