

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

Nathália Ferreira Soares

**OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS NA MATRIZ TOMATE E SEU
ESTUDO COMO CANDIDATO A ITEM DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA**

Rio de Janeiro

2018

Nathália Ferreira Soares

**OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS NA MATRIZ TOMATE E SEU
ESTUDO COMO CANDIDATO A ITEM DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutora: Lucia Helena Pinto Bastos
Preceptoras: Maria Helena W. M. Cardoso
Angélica C. Oliveira

Rio de Janeiro

2018

Catologação na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Soares, Nathália Ferreira

Otimização, validação e implementação de método analítico para determinação de ditiocarbamatos na matriz tomate e seu estudo como candidato a item de ensaio de proficiência. / Nathália Ferreira Soares. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

53 f. : il., tab.

Trabalho de Conclusão do Curso (Especialista em Vigilância Sanitária) -Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2018.

Tutora: Lucia Helena Pinto Bastos.

Preceptora: Maria Helena W. M. Cardoso e Angélica C. Oliveira.

1. Etilenobis (ditiocarbamatos). 2. Lycopersicon Esculentum. 3. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas. 4 Estudos de Validação. I Título

Nathália Ferreira Soares

**OTIMIZAÇÃO, VALIDAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS NA MATRIZ TOMATE E SEU
ESTUDO COMO CANDIDATO A ITEM DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

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

Bernadete Ferraz Spisso (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

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

Maria Helena W. M. Cardoso (Doutora) - Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Angelica C. de Oliveira (Mestre) - Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu pai, Isaias e principalmente a minha mãe, Rosângela, pelo amor, incentivo e por apoiar minhas decisões e me amparar sempre que pensei em desistir.

Às minhas preceptoras, Maria Helena e Angelica, e à minha tutora, Lucia Helena, pela ótima orientação, paciência, confiança no meu trabalho e pelo apoio durante a seleção do mestrado. Será uma honra passar mais dois anos com vocês.

À minha primeira tutora Shirley, com quem comecei essa jornada e que mesmo em pouco tempo pode me ensinar muito sobre a importância do trabalho realizado dentro deste instituto. Ao Thomas pelo auxílio com o uso do equipamento; sua ajuda foi de grande importância para elaboração deste trabalho.

À Patrícia e Victor por dividir seu conhecimento comigo e pela amizade mesmo após a troca de setor. Também à Shaiene, Ana Clara e Joyce pela amizade e por me ensinar o significado de companheirismo dentro do ambiente de trabalho. À Thaiz por ser minha companheira dentro e fora do laboratório, pelos conselhos, paciência e por trazer mais luz para os meus dias com seu bom humor e sorriso. À Luiza e Gleyce pela amizade que surgiu aos poucos, mas que foi um importante amparo em muitos momentos. À “turma de nove” por me possibilitar conhecer pessoas maravilhosas que se tornaram verdadeiros amigos.

À professora Ana Cláudia que não foi apenas uma orientadora acadêmica, mas também uma amiga/mãe e mesmo de longe sempre me incentivou a perseguir meus sonhos e com muito carinho dividiu comigo minhas maiores realizações atuais.

Aos fiscais da SubVisa do Rio de Janeiro, do setor de Saúde de Alimentos, por terem me recebido de braços abertos e me ensinado ainda mais sobre Vigilância Sanitária.

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

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço e à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz”.

Ayrton Senna

RESUMO

No ano de 2014, a comercialização de agrotóxicos e afins no Brasil foi de 508.556 toneladas. Além disso, entre os dez ingredientes ativos (IA) mais vendidos no mesmo ano, o Mancozebe, da classe dos ditiocarbamatos (DTC), figura em oitavo lugar. Esta classe age contra um largo espectro de doenças causadas por fungos e tem aplicação em diversas culturas agrícolas. Embora a exposição a esses IAs resulte em baixa toxicidade aguda, os etilenobisditiocarbamatos possuem atividade carcinogênica, mutagênica e teratogênica em casos de exposição crônica, principalmente devido ao seu metabólito etilenotiuréia. O método espectrofotométrico é mais utilizado para detecção desses IAs em alimentos, porém é demorado e exige intenso trabalho laboral. Sendo assim, é importante a implementação de métodos mais rápidos para o monitoramento do uso destas substâncias. Desta forma, o objetivo do trabalho é validar o método de determinação de DTC por cromatografia a gás com espectrometria de massas (CG-EM) na matriz tomate e realizar um estudo preliminar para candidato a item de ensaio de proficiência utilizando mancozebe. O método foi validado segundo os critérios especificados pela União Europeia no documento SANTE e no *CODEX* levando em conta os parâmetros: seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão. Quanto à seletividade, as amostras de tomate avaliadas encontraram-se sem interferentes, o intervalo de trabalho de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, expresso como dissulfeto de carbono, mostrou-se linear. O LD $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o LQ $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram considerados adequados à legislação nacional (ANVISA). As análises apresentaram coeficiente de variação $\leq 20\%$ e taxa de recuperação entre 70-120%, assim para precisão e exatidão os resultados foram considerados satisfatórios. Além disso, realizou-se um estudo preliminar para elaboração de um item de ensaio de proficiência aplicando o método validado. Na análise da homogeneidade, utilizou-se os critérios estabelecidos pela ISO 13528 e a ABNT ISO GUIA 35 e o lote mostrou-se homogêneo. Assim, a utilização de métodos cromatográficos para determinação de DTC surge como alternativa devido à sua rapidez e maior sensibilidade, garantindo a segurança e inocuidade dos alimentos que chegam à mesa do consumidor.

Palavras-chave: Ditiocarbamatos. Tomate. CG-EM. Validação.

ABSTRACT

In 2014, the commercialization of agrochemicals and related products in Brazil was 508,556 tons. Furthermore, among the top ten active ingredients (AI) in the same year, Mancozebe, from the dithiocarbamate class, ranks eighth. This class acts against a wide spectrum of diseases caused by fungi and has application in diverse agricultural cultures. Although exposure to these IAs results in low acute toxicity, ethylenebisdithiocarbamates possess carcinogenic, mutagenic and teratogenic activity in cases of chronic exposure, mainly due to its metabolite ethyleneurea. The spectrophotometric method is more used to detect these IAs in food, but it is time consuming and requires intense work. Therefore, it is important to implement faster methods for monitoring the use of these substances. The target of the present paper is to validate the method of determination of dithiocarbamates by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) in the tomato matrix and to carry out a preliminary study for candidate to the proficiency test item using mancozeb. The method was validated according to the criteria specified by the European Union in the document SANTE and CODEX considering the parameters: selectivity, linearity, working range, limit of detection (LD) and quantification (LQ), precision and exactitude. Regarding the selectivity, the evaluated tomato samples were found without interferences, the working range of $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ expressed as carbon disulfide, was linear. LD $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ and LQ $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ were considered adequate to national legislation (ANVISA). The analyzes showed coefficient of variation $\leq 20\%$ and recovery rate between 70-120%, so for accuracy and precision, the results were considered satisfactory. Beyond that, a preliminary study was carried out to elaborate a proficiency test item applying the validated method. In the analysis of homogeneity, the criteria established by ISO 13528 and ABNT ISO GUIA 35 were used and the lot was homogeneous. Thus, the use of chromatographic methods for determination of dithiocarbamates appears as an alternative due to its speed and greater sensitivity, guaranteeing the safety and innocuity of the food that comes to the table of the consumer.

Key words: Dithiocarbamate. Tomato. GC-MS. Validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Equação para determinação da concentração de ditiocarbamatos (DTC) a partir do CS ₂ liberado pela hidrólise ácida da amostra.....	25
Figura 2	Cromatograma de íons totais da (a) amostra de tomate e (b) solução de CS ₂ na concentração de 0,05 µg mL ⁻¹ , analisada por GC-EM.....	29
Figura 3	Planilha para avaliação da curva de calibração referente ao primeiro dia de análise. Fortificação da matriz tomate nos níveis 1 e 2.....	31
Figura 4	Planilha para avaliação da curva de calibração referente ao segundo dia de análise. Fortificação da matriz tomate no nível 3...	32
Figura 5	Planilha de Calwer para determinação do LD e LQ do método cromatográfico para determinação de ditiocarbamatos.....	33
Figura 6	Concentrações de CS ₂ adicionadas e recuperadas nas amostras com suas respectivas taxas de recuperação e coeficiente de variação.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Equipamentos utilizados para preparação de reagentes, padrões e amostras.....	24
Tabela 2	Solventes, Reagentes, Padrões e Soluções utilizadas na análise de validação do método de determinação de ditiocarbamatos.....	24
Tabela 3	Identificação e massa do tomate utilizado para fortificação.....	34
Tabela 4	Dados referentes à preparação das soluções para fortificação do tomate.....	35
Tabela 5	Concentrações calculadas para as amostras utilizadas na análise de homogeneidade, em mg kg ⁻¹	37
Tabela 6	Análises estatísticas para estudo de homogeneidade, em mg kg ⁻¹	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Comunidade Europeia
CG-EM	Cromatografia à gás com espectrometria de massas
CG-DFC	Cromatografia gasosa com detector fotométrico por chama
CODEX	<i>Codex alimentarius</i>
CV	Coeficiente de variação
DMDC	Dimetilditiocarbamato
DPR	Desvio padrão relativo
DQ	Departamento de química
DTC	Ditiocarbamato
EBDC	Etilenobisditiocarbamato
ETU	Etilenotiuréia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IA	Ingrediente ativo
IBMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LD	Limite de detecção
LDI	Limite de detecção do instrumento
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LQ	Limite de quantificação
LQI	Limite de quantificação do instrumento
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MS	Ministério da Saúde

PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
PNAN	Política Nacional de Alimentação e Nutrição
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POP	Procedimento operacional padrão
PU	Procedimento de uso
SANTE	<i>European Comission Directorate-General For Health and Food Safety</i>
S/N	Razão sinal ruído

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Projetos para monitoramento de resíduos de agrotóxicos no Brasil	16
1.2 Classificação dos ditiocarbamatos quanto a classe química e toxicidade ..	17
1.3 Tomate no Brasil	19
1.4 Métodos para determinação de ditiocarbamatos em alimentos	19
1.5 Validação do método	20
1.5.1 Seletividade	20
1.5.2 Linearidade e faixa de trabalho	21
1.5.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	21
1.5.4 Exatidão e precisão	22
1.6 Ensaio de proficiência	22
2 OBJETIVO	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MÉTODO	25
3.1 Preparo e extração da amostra	25
3.1.1 Equipamento	25
3.1.2 Condições operacionais do equipamento.....	25
3.1.3 Equipamentos utilizados para preparação de reagentes, padrões e amostras	26
3.1.4 Materiais utilizados	26
3.2 Determinação quantitativa da concentração de DTCS	27
3.3 Validação de métodos analíticos	27
3.3.1 Seletividade	27
3.3.2 Linearidade e faixa de trabalho	28
3.3.3 Limites de detecção e quantificação (LD e LQ)	28
3.3.4 Exatidão e precisão	28
3.4 Estudos preliminares para a produção de um candidato à item de ensaio de proficiência para análise de ditiocarbamatos	29
3.4.1 Preparo dos itens de ensaio.....	29
3.4.2 Determinação da homogeneidade dos itens de ensaio.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Otimização do método de extração das amostras	31
4.2 Validação do método analítico	31
4.2.1 Seletividade	31

4.2.2 Linearidade e faixa de trabalho	33
4.2.3 Limite de detecção e quantificação	36
4.2.4 Precisão e exatidão	37
4.3 Estudos preliminares para produção de um candidato à item de ensaio para análise de ditiocarbamatos	40
4.3.1 Homogeneidade dos itens de ensaio	40
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A – FORMULÁRIO DE PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE DE TIRAM (2335 – E).....	47
ANEXO B – FORMULÁRIO DE PREPARO DE SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA DE TIRAM (2097 – I)	48
ANEXO C - FORMULÁRIO DE PREPARO DE SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA DE TIRAM (2100 – I)	49
ANEXO D – MONOGRAFIA DO INGREDIENTE ATIVO MANCOZEBE	50

1 INTRODUÇÃO

A lei nº 7.802, de julho de 1989 define os agrotóxicos como:

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

Podem ser classificados quanto ao modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou à natureza da praga combatida. Assim, as principais classes são: 1) Inseticidas que são aqueles que combatem insetos, larvas e formigas e são divididos em quatro grupos químicos principais, a saber, organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides; 2) Fungicidas que combatem os fungos e são separados quanto às suas características químicas em: ditiocarbamatos, trifenil estânico, dicarboximida e hexaclorobenzeno; 3) Herbicidas que combatem ervas daninhas e tem como principais representantes o paraquat, glifosato, pentaclorofenol, derivados do ácido fenoxiacético e dinitrofenóis; 4) Outras classes importantes, como: raticidas, acaricidas, nematicidas, molusquicidas e fumigantes (ANDREI, 2005).

No ano 2000 o consumo de agrotóxicos no Brasil foi de 170.000 toneladas e em 2014 saltou para 508.556 toneladas, o que representa um aumento de 135%. Além disso, a região com maior comercialização de agrotóxicos e afins no Brasil, no ano de 2014, foi a Centro-Oeste com 32,30% e entre os dez ingredientes ativos mais vendidos no mesmo ano, o Mancozebe da classe dos ditiocarbamatos (DTC) figura em oitavo lugar (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2017). Com relação a venda, no ano de 2015 três culturas responderam por 72% da venda de agrotóxicos no Brasil, com a soja em primeiro lugar consumindo 52%, milho e soja com 10% cada (BOMBARDI, 2017). Esse número expressivo pode ser justificado pela expansão do plantio de soja transgênica que resulta no maior consumo de glifosato e a resistência de fungos, insetos e plantas de crescimento espontâneo, também conhecidas como ervas daninhas, aos ingredientes ativos mais largamente utilizados.

O motivo principal que estimula o crescente uso de agrotóxicos é a diminuição dos preços e a isenção de impostos sobre esses produtos (PIGNATI; MACHADO, 2011). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2009) a área com maior utilização de agrotóxicos coincide com regiões em que há cultivo majoritário de monoculturas como soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz. De acordo com as projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a produção de soja para exportação deve aumentar 55%, 56,46% para o milho e 45,8% para o açúcar até 2020-2021. Assim, a contaminação por agrotóxicos nos alimentos que já atinge níveis preocupantes tende a ser ampliada nos próximos anos (BRASIL, 2010).

Quanto a regulamentação, a principal lei que rege todas as ações relacionadas aos agrotóxicos é a Lei de Agrotóxicos nº 7802, de 12 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002 (BRASIL, 2002), dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagem, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins.

Embora a legislação seja muito abrangente, na prática o controle do uso de agrotóxicos ainda é insuficiente devido principalmente à reduzida fiscalização de venda e uso, e aos incentivos fiscais à sua venda. Além disso, a reavaliação dos ingredientes ativos permitidos é dificultada pela excessiva burocracia e limitada mão-de-obra. Diante disso, constata-se que o Brasil possui instrumentos legais para fundamentar a melhoria no quadro de agrotóxicos no que se refere à saúde pública e ao meio ambiente, porém ainda é necessário superar barreiras político-econômicas para garantir o uso seguro e adequado destes produtos.

1.1 Projetos para monitoramento de resíduos de agrotóxicos no Brasil

No Brasil atualmente existem dois programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos: o programa PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos) do Ministério da Saúde (MS) e o PNCRC (Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que tem como objetivo conhecer o potencial de

exposição da população aos contaminantes nocivos à saúde e garantir a segurança do consumidor, impedindo a utilização de produtos nos quais tenha sido constatado o uso incorreto de agrotóxicos.

O programa PARA analisou nos anos de 2013 a 2015, 12.051 amostras coletadas em todo Brasil e foram detectados 134 agrotóxicos diferentes em 2.371 amostras insatisfatórias, sendo os ditiocarbamatos (precursores de dissulfeto de carbono) os ingredientes ativos com o terceiro maior índice de detecções. Das 730 amostras de tomate de mesa, 200 apresentaram resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura, sendo o clorpirifós e o acefato os ingredientes ativos com maior índice de detecção (BRASIL, 2016a).

O programa PNCRC no ano-safra 2014/2015 analisou 51 amostras de tomate e constatou que 68,63% apresentaram resultado satisfatório, porém 15 amostras obtiveram resultado insatisfatório devido à presença de resíduo de agrotóxico não permitido para a cultura em questão. Entretanto, o programa utiliza um número amostral pequeno, o que pode resultar em uma avaliação subestimada da presença de resíduos em tomate (BRASIL, 2016b).

Segundo a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) atualizada pela portaria nº 2.715, de 17 de novembro de 2011, a alimentação adequada contribui para a proteção e promoção da saúde, além de possibilitar o desenvolvimento humano com qualidade de vida e cidadania (BRASIL, 2013). A PNAN tem como principal propósito a melhoria das condições de alimentação da população brasileira através de ações para estimular o maior consumo de frutas e hortaliças (BRASIL, 2013). Assim, os resultados obtidos nesses programas contribuem para a segurança alimentar da população através do controle da presença de resíduos de agrotóxicos nos produtos ofertados ao consumidor e fornecem às vigilâncias sanitárias estaduais informações que podem auxiliar em seus programas de monitoramento.

1.2 Classificação dos ditiocarbamatos quanto a classe química e toxicidade

Os ditiocarbamatos são complexos de coordenação tendo como íon central o zinco, manganês ou ferro, agem contra um largo espectro de doenças causadas por fungos e tem aplicação em diversas culturas agrícolas, de frutas e hortaliças a cereais (SILVA, 2005). A classe é subdividida em dimetilditiocarbamatos (DMDC)

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

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

Quanto à toxicidade dos agrotóxicos desta classe, testes em ratos mostraram que a exposição de longo prazo ao manebe causa repressão da maturidade e crescimento dos espermatozóides, atividade embriotóxica, além de danos na tireoide de ratos que receberam $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$ desse agrotóxico em sua alimentação por 2 anos. No homem, a exposição prolongada a esse ingrediente ativo resulta em insuficiência renal aguda caracterizada clinicamente por altos níveis de creatinina, ureia e ácido úrico (LARINI, 1999).

O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é determinado pela ANVISA e é definido com a concentração máxima de resíduos de agrotóxicos que podem estar presentes no alimento de forma que não represente um risco inaceitável para a saúde do consumidor (BRASIL, 2003). Ressalta-se que a observância do intervalo de segurança, ou seja, o período entre a última aplicação do agrotóxico e a colheita, pode evitar o aparecimento de resíduos acima do LMR permitida. No Brasil, o LMR para ditiocarbamatos em CS_2 (mg kg^{-1}) determinado pela Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003, da ANVISA/MS é calculado em função dos ingredientes ativos da classe dos EBDCs e no tomate, matriz de interesse para o estudo, o limite é de $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de CS_2 para os IAs Mancozebe, Metam, Metiram e Propinebe (BRASIL, 2003).

1.3 Tomate no Brasil

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é muito popular tanto pelo seu uso *in natura* quanto para a produção industrial de produtos derivados, como molhos, extratos, sopas e catchup. Embora seja um fruto pertencente à família Solanaceae, em muitos casos ele é erroneamente classificado como hortaliça. Segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares realizada entre os anos de 2008-2009, o tomate é o segundo produto hortifrutigranjeiro mais consumido nos lares brasileiros com 6,6 g/dia em áreas urbanas, sendo os principais centros consumidores o Sul e Sudeste (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011). Fatores sociais e nutricionais podem ainda influenciar no perfil de consumo de frutos e hortaliças, podendo-se destacar o crescente interesse por dietas mais saudáveis e também aspectos sociais, como renda familiar, sexo, idade e estilo de vida, que podem ser determinantes na quantidade ingerida destes alimentos. Desta forma, é de extrema importância monitorar a presença de substâncias tóxicas com a finalidade de possibilitar a aquisição pelo consumidor de produtos seguros e de qualidade.

1.4 Métodos para determinação de ditiocarbamatos em alimentos

A análise de resíduos de agrotóxicos é frequentemente realizada por métodos multirresíduos, que visam analisar em uma amostra simultaneamente diferentes ingredientes ativos de agrotóxicos e seus metabólitos. São métodos rápidos e eficientes que aumentam a produtividade laboratorial e diminuem o tempo de análise (QUEIROZ, et al., 2008). Entretanto, a determinação de substâncias da classe dos ditiocarbamatos exige o emprego de metodologias específicas baseadas na quantificação do dissulfeto de carbono (CS₂) liberado pela hidrólise ácida dos IAs desta classe.

O principal método utilizado baseia-se na identificação por espectrofotometria do complexo dimetilditiocarbamato cúprico de cor amarela, formado pela reação entre o CS₂ e o acetato de cobre, que possui espectro de absorção na faixa do visível com comprimento de onda de 435 nm e sua quantificação é realizada através de uma curva de calibração (CALDAS, 2001). Um fator limitante do método é que o mesmo não é específico para os diferentes IAs da classe dos DTCs. O preparo da

amostra também é uma etapa crítica do método visto que a maioria dos ditiocarbamatos são instáveis na presença de oxigênio e umidade. Além disso, o corte das matrizes durante o processamento pode aumentar a ação enzimática resultando em diminuição da concentração dos ingredientes ativos e a produção de resultados subestimados refletindo em valores menores de recuperação, de forma que para evitar isso as amostras devem ser cortadas em forma de cubos (VUIK et al. 1992; SILVA, 2005).

O método espectrofotométrico é o mais utilizado para detecção de ditiocarbamatos em alimentos, porém para análise de um número grande de amostras, o mesmo é demorado, exige intenso trabalho laboral e não possui seletividade. Sendo assim, é importante o desenvolvimento de métodos mais rápidos para o monitoramento do uso destas substâncias.

1.5 Validação de métodos analíticos

A validação do método analítico tem como objetivo assegurar que o mesmo seja exato, reprodutível e flexível respeitando um intervalo específico no qual a substância será avaliada. A validação pode ser assegurada quando são usados métodos e equipamentos validados, o trabalho fica sob responsabilidade de pessoal qualificado e competente, há rastreabilidade e incerteza de medição, são empregados procedimentos de controle de qualidade e garantia da qualidade bem definidos e há evidência independente do desempenho (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010). Os critérios para análise de agrotóxicos em alimentos são especificados pela União Europeia no documento SANTE e no CODEX e inclui as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, intervalo de trabalho, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão (CODEX, 2003; SANTE, 2018).

1.5.1 Seletividade

É a capacidade do método de identificar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz (SANTE, 2018). Entretanto, substâncias diferentes podem apresentar respostas similares dependendo da condição utilizada no método,

assim deve-se proceder à análise, seguida por outras técnicas comprobatórias (BRITO, 2001).

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

1.5.2 Linearidade e intervalo de trabalho

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

Assim, primeiro é determinada uma faixa de trabalho que dependerá da sensibilidade do método e do LMR dos agrotóxicos avaliados, e por fim é construída uma curva analítica através da qual a linearidade da faixa de trabalho será determinada pelo método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) para caso de dados homocedásticos e a relação linear será representada pela equação de primeiro grau $y = bx + a$. O coeficiente de Pearson (r) obtido representa a correlação entre os valores de x e y , e seu quadrado fornecerá o coeficiente de determinação (R^2). Tais valores não são indicativos de linearidade, mas designam o grau de ajuste dos dados obtidos pela análise a curva, e para resíduos de agrotóxicos os valores aceitos são $R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$ (CARDOSO, et al., 2010).

1.5.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

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

O LQ e o LD podem ser determinados pela relação sinal/ruído, no caso de métodos analíticos que exibem linha de base. De acordo com o guia SANTE (2018), o LD é a concentração S/R 3:1 e o LQ é a concentração S/R 10:1.

1.5.4 Exatidão e precisão

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

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

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

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

1.6 Ensaio de proficiência

Ensaio de proficiência é o uso de comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório realizar um determinado ensaio ou medição de modo competente e demonstrar a confiabilidade dos resultados obtidos. Esses ensaios são importantes para laboratórios que avaliam a qualidade de produtos, entretanto os provedores de ensaios de proficiência na área de alimentos são poucos e em sua maioria são de origem internacional o que resulta em maiores custos para a instituição e inviabiliza a participação em um número maior de ensaios (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE, 2017).

O monitoramento dos resíduos de agrotóxicos nos produtos disponibilizados ao consumidor permite a avaliação, pelas autoridades competentes, da qualidade das práticas agrícolas em uso no país, bem como prevenir o agravo à saúde

decorrente do consumo desses alimentos. Assim, a realização de ensaios de proficiência permite avaliar o desempenho dos laboratórios competentes na avaliação de resíduos de agrotóxicos e contribui para o aumento da confiabilidade dos resultados das análises realizadas em nível nacional.

2 OBJETIVO

Avaliar e implementar um método de determinação de ditiocarbamatos em matriz tomate utilizando a cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas (CG-EM).

2.1 Objetivos específicos

- Otimizar, validar e implementar no setor um método para determinar ditiocarbamatos por CG-EM na matriz tomate.
- Efetuar estudos preliminares para a elaboração de candidato a item de ensaio de proficiência para determinação de ditiocarbamatos na matriz tomate utilizando o método validado.

3 MÉTODO

3.1 Preparo e extração da amostra

Os tomates foram adquiridos na região serrana do estado do Rio de Janeiro no ano de 2017.

Para o preparo da amostra o tomate foi cortado em forma de cubos e conservados em frascos devidamente identificados, sob refrigeração entre 3° a 6°C até o momento da análise.

Pesou-se 50 g \pm 0,5 g em frasco de vidro de 250 mL. Adicionou-se 100 mL da solução digestora contendo 0,0065 mol L⁻¹ de HCl e 1,25 g de cloreto de estanho II e 25 mL de isooctano. Os frascos foram bem vedados e colocados em banho a cerca de 80°C por 1 hora, sob agitação. Posteriormente, os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente e uma alíquota de 1,5 mL da fase orgânica, onde está presente o CS₂ após a digestão ácida, foi utilizada para injeção em CG-EM.

Vedar o frasco de vidro completamente é um ponto crítico da análise, visto que o CS₂ é muito volátil e caso a tampa não esteja bem fechada pode ocorrer perda do mesmo levando a resultados subestimados ou mesmo falsos negativos.

3.1.1 Equipamento

Para este trabalho foi utilizado o cromatógrafo à gás com espectrometria de massas (CG-EM), cromatógrafo modelo 6890N, detector modelo 5973N e fabricante Agilent Technologies. O equipamento está ligado à uma estação de trabalho com o software ChromoQuest.

3.1.2 Condições operacionais do equipamento

Foi utilizado um volume de injeção de 4 μ L do extrato, o injetor estava no modo *Pulsed Split* na temperatura de 220°C e com fluxo constante de 1,5 mL por minuto. Na rampa a temperatura inicial foi de 60°C por 5 minutos, após esse tempo houve um aumento de 50°C por minuto até alcançar 200°C, mantido por 2 minutos. Utilizou-se o espectrômetro de massas em modo de Monitoramento Seletivo de Íons (SIM), ionização por impacto de elétrons com energia de 70 elétron-volts e

monitorou-se o íon molecular m/z 76 e m/z 78, sendo o primeiro íon molecular referente ao isótopo mais abundante do enxofre, com massa molecular de 32 e o segundo referente ao isótopo com massa molecular 34, que é o segundo mais abundante na natureza.

3.1.3 Equipamentos utilizados para preparação de reagentes, padrões e amostras

Além do cromatógrafo a gás, foram utilizados os equipamentos listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Equipamentos utilizados para preparação de reagentes, padrões e amostras.

Equipamento	Balança Analítica	Balança Analítica	Balança Analítica	Banho
Modelo	XP205	AG245	LP 620 P	DUBNOFF Metabolic Shaking
Fabricante	METTLER TOLEDO	METTLER TOLEDO	Sartorius	Precision Scientific
Nº de Série	B018030980	1117220420	12070904	-

Fonte: (Do autor, 2018).

3.1.4 Materiais utilizados

Os solventes, reagentes e padrões utilizados na validação estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Solventes, Reagentes, Padrões e Soluções utilizadas na validação do método de determinação de ditiocarbamatos.

Solvente, Reagente, Padrão / Grau	Fabricante	Lote	Número da solução estoque
Dissulfeto de Carbono / SPECTRO	TEDIA	1101323	-
Ácido Clorídrico 37% / PA	Merck	K47379617	-
Cloreto Estanoso / PA	Merck	B1403415	-
Hidróxido de Sódio / PA	Merck	B573698	-
Isooctano	Sigma-Aldrich	13496DMV	-
Tiram	AccuStandard	4152-02	2335-E

Fonte: (Do autor, 2018).

3.2 Determinação quantitativa da concentração de DTCS

A concentração de ditiocarbamatos na amostra é calculada em função do CS₂ particionado na fase orgânica contendo isooctano, liberado após a digestão ácida. Assim, para a determinação quantitativa desses IAs, foi preparada uma curva analítica a partir da solução-intermediária de CS₂ (5 µg mL⁻¹) com as concentrações 0,05, 0,10, 0,25, 0,5 e 1,0 µg mL⁻¹, respectivamente. Nos ensaios de validação, a regressão linear e um coeficiente angular obtidos através da curva analítica permitiram determinar a concentração de CS₂ na amostra e posteriormente a concentração de DTC tiram através da equação apresentada na figura 1.

Figura 1 - Equação para determinação da concentração de ditiocarbamatos (DTC) a partir do CS₂ liberado pela hidrólise ácida da amostra.

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

Fonte: POP 65.3120.079 – Determinação de resíduos de ditiocarbamatos em hortifrutigranjeiros.

3.3 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada observando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação do método, precisão como repetibilidade e exatidão como recuperação, avaliando os resultados obtidos pela comparação com os critérios de aceitação definidos no CODEX e no SANTE (*European Commission Directorate-General For Health and Food Safety*) (CODEX, 2003; SANTE, 2018).

3.3.1 Seletividade

É a habilidade de um método de distinguir com precisão o analito de interesse dos outros possíveis interferentes presentes na amostra. Assim, para determinar a

seletividade foi injetada uma amostra branco e um solução padrão de CS₂ para comprovar se a amostra não possuía interferentes com o mesmo tempo de retenção das substâncias em estudo.

3.3.2 Linearidade e intervalo de trabalho

Para o estudo da linearidade foi utilizada uma curva de calibração nas concentrações nominais de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 µg mL⁻¹ de CS₂, que foram injetadas no cromatógrafo três vezes para cada “vial”. A linearidade da faixa de trabalho para o método de ensaio foi verificada através da curva de calibração utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Avaliou-se a significância da regressão através do coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2) dentro da faixa aceitável ($R^2 \geq 0,95$ e de $r \geq 0,98$) e a homogeneidade na variância dos resíduos da regressão pelo método de *Cochran*.

3.3.3 Limites de detecção e quantificação (LD e LQ)

Os limites de detecção e quantificação do método foram estabelecidos com base no aplicativo Calwer 2.2 validado para análise de resultados segundo o POP 65.3120.084, revisão 00 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE, 2005).

3.3.4 Exatidão e precisão

O ensaio de recuperação foi realizado através da fortificação de uma amostra branco de tomate utilizando três diferentes concentrações do agrotóxico tiram (0,188; 0,375; 0,750 mg kg⁻¹), de modo que após a extração as concentrações teóricas de CS₂ fossem 0,238; 0,476; 0,952 µg mL⁻¹, respectivamente. Utilizou-se o ditiocarbamato tiram devido a sua grande solubilidade em solventes orgânicos e maior estabilidade em solução quando comparado a outros ingredientes ativos desta mesma classe. Toda solução preparada seguiu o procedimento Especificação, Manuseio, Armazenamento, Preparo e Registro do Material de Referência de Agrotóxicos nº POP 65.3120.096, revisão 07 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE, 2014).

O resultado foi determinado pela comparação entre a concentração adicionada e a concentração calculada através da média das quadruplicatas para cada um dos 3 níveis de fortificação (CARDOSO, et al., 2010). Desta forma foi possível determinar a exatidão do método.

Já a precisão (repetibilidade) foi avaliada através do coeficiente de variação (% CV) ou desvio padrão relativo (% DPR) dos resultados das quadruplicatas em cada um dos 3 níveis de fortificação.

O cálculo da taxa de recuperação e repetitividade dos analitos e os critérios de aceitação foram os indicados pelo *Codex Alimentarius* e SANTE (2018), a saber, o intervalo de recuperação deve ser de 70 a 120 % e os coeficientes de variação (CV) devem ser $\leq 20\%$.

3.4 Estudos preliminares para a produção de um candidato à item de ensaio de proficiência para análise de ditiocarbamatos

3.4.1 Preparo dos itens de ensaio

O tomate foi processado em liquidificador industrial e fortificado com um produto comercial formulado em pó contendo mancozebe como ingrediente ativo na concentração de 80% (m/m). Assim, para facilitar a distribuição do produto, a polpa foi peneirada para a retirada das cascas e sementes até a obtenção de uma amostra homogênea. Posteriormente, foi adicionada uma massa do produto formulado com a concentração de mancozebe de 200 mg kg^{-1} (corresponde a $56 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de CS_2). Homogeneizou-se a polpa em batedeira industrial por duas horas e por fim, para a preparação dos itens de ensaio foram separados aproximadamente 50g da mistura em potes de vidro âmbar de forma sequencial, totalizando 40 potes.

3.4.2 Determinação da homogeneidade dos itens de ensaio

Foram selecionados de forma aleatória cinco itens de ensaio representativos do conjunto e extraídos conforme item 3.1. Aplicando a equação descrita na figura 1, foi determinada a utilização de $10\text{g} \pm 0,5\text{g}$ da amostra para realização do ensaio e diluição do extrato final na proporção de 1:25 com solvente isooctano a fim de que a

concentração obtida de CS₂ estivesse dentro da faixa de trabalho determinada na validação do método.

A homogeneidade entre os itens foi avaliada segundo a análise estatística determinada pela ISO 13528 *Statistical Methods for use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2015) e a ISO GUIA 35 (ABNT, 2012). A amostra de tomate de cada item de ensaio foi dividida em duas partes, analisadas de forma independente e posteriormente foi calculada a média das mesmas ($X_{t,1}$ e $X_{t,2}$), para cada amostra, e em seguida a média geral. A partir destes valores, foi possível calcular o desvio padrão das médias das amostras (s_x), utilizando a Eq. 1, bem como as diferenças entre as duas porções de teste (w_t), conforme Eq. 2.

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t..} - \bar{x})^2 / (g - 1)} \quad \text{Eq. 1}$$

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad \text{Eq. 2}$$

Fonte: (INCQS, 2016).

Utilizando os valores calculados para s_x e w_t , é possível determinar o desvio padrão dentro das amostras (s_w), e o desvio padrão entre as amostras (s_s), aplicando as Eq. 3 e 4.

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)} \quad \text{Eq. 3}$$

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)} \quad \text{Eq. 4}$$

Fonte: (INCQS, 2016).

As amostras podem ser consideradas adequadamente homogêneas se:

$$s_s \leq 0,3\sigma_H$$

onde σ_H é o desvio padrão alvo, obtido através da equação de Horwitz, da concentração média do agrotóxico de interesse para o estudo da homogeneidade, que neste caso é o mancozebe.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método de extração das amostras

Os alimentos são matrizes complexas, assim os protocolos de preparo das amostras empregadas podem variar conforme as características intrínsecas de cada matriz. O método de determinação de ditiocarbamatos através de cromatografia gasosa com detector fotométrico por chama (CG-DFC) já havia sido validado para a matriz couve, porém o mesmo não mostrou a mesma eficácia para a matriz tomate em CG-EM, apresentando valores de recuperação bem abaixo da faixa entre 70-120% especificada pela Comunidade Europeia (CE) para a área de resíduos de agrotóxicos (SANTE, 2018). Desta forma, foi necessário realizar modificações no método de extração da amostra.

Para avaliar se a ordem que os componentes da reação eram acrescentados influenciava na faixa de recuperação obtida, a amostra foi tratada de três formas segundo a ordem de adição: 1) solução de fortificação, solução digestiva e isooctano; 2) solução digestiva, solução de fortificação e isooctano e 3) solução digestiva, isooctano e solução de fortificação. O melhor tratamento entre os três avaliados foi o terceiro, o qual obteve valor de recuperação mais próximo da faixa esperada de 70-120% e devido a isso essa sequência foi utilizada na validação do método.

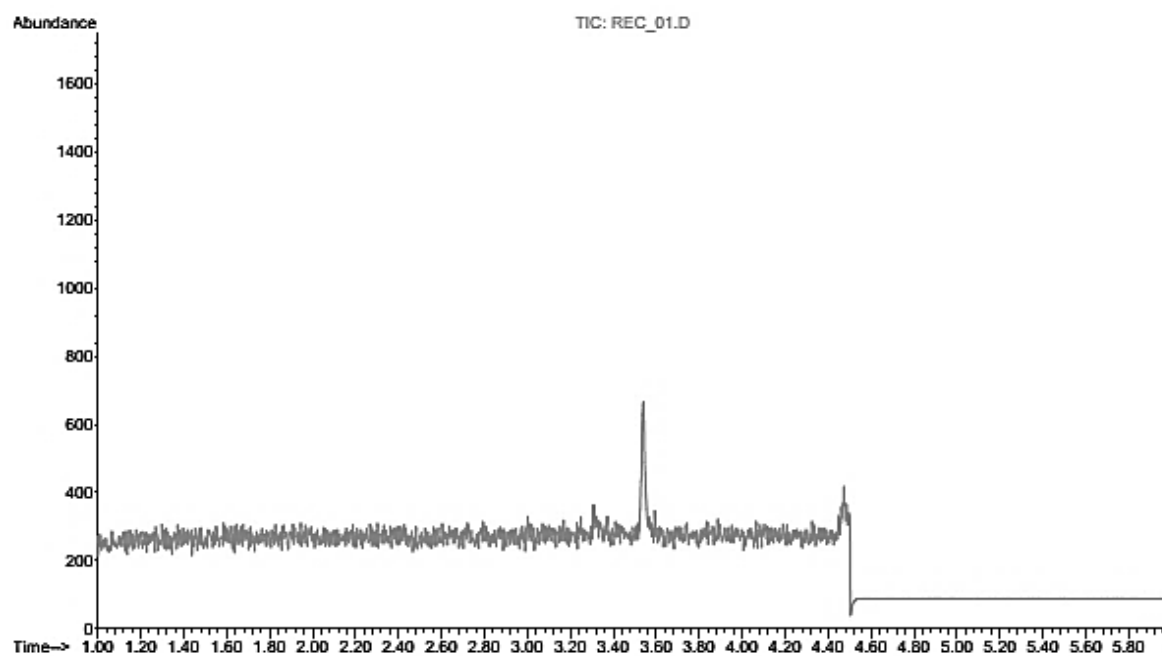
4.2 Validação do método analítico

4.2.1 Seletividade

Na Figura 2 é apresentado o cromatograma da amostra de tomate e de uma solução de CS₂ na concentração de 0,05 µg mL⁻¹ obtidos por CG-EM.

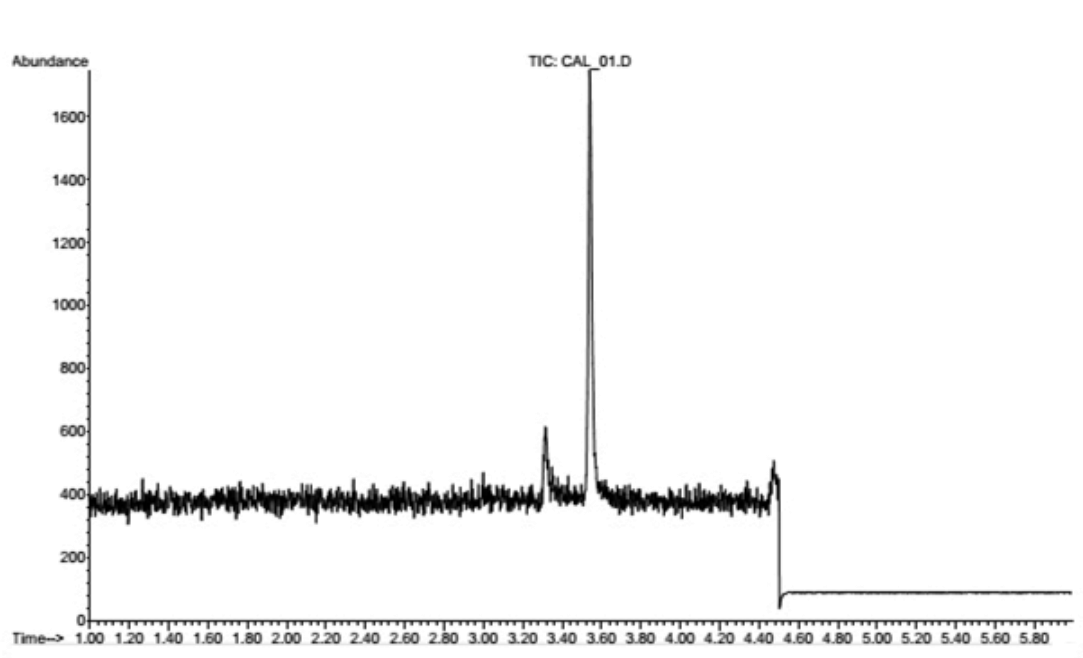
Figura 2 - Cromatograma de íons totais da (a) amostra de tomate e (b) solução de CS_2 na concentração de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, analisada por CG-EM.

(a)



Fonte: (Do autor, 2018)

(b)



Fonte: (Do autor, 2018)

O primeiro ponto da curva analítica, que corresponde a concentração de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CS_2 apresentou área 2,5 vezes maior que a amostra em análise (Figura 2b). Desta forma, embora a amostra não esteja completamente livre de ditiocarbamatos (Figura 2a), ela foi utilizada nas análises de validação e os cálculos foram corrigidos levando em conta a concentração de CS_2 apresentada pela mesma.

As amostras de tomate não apresentaram interferentes no tempo de retenção do CS_2 , que pudessem levar a um resultado falso positivo; demonstrando ser, o tomate selecionado, apto ao uso na validação e o método seletivo, por não apresentar interferentes no tempo de retenção dos analitos a serem avaliados.

4.2.2. Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade da faixa de trabalho foi verificada através da leitura da curva analítica utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários de acordo com a equação tipo: $y = bx + a$. Para tal, utilizou-se a planilha apresentada no anexo C do POP 65.3120.082 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE, 2015) na qual verifica-se há existência de valores aberrantes, a homogeneidade na variância dos resíduos da regressão e a significância da regressão. Nas Figuras 3 e 4 são apresentadas as planilhas com os dados obtidos para formulação da curva analítica.

Figura 3 - Planilha para avaliação da curva de calibração referente ao primeiro dia de análise. Fortificação da matriz tomate nos níveis 1 e 2.

Concentração		Resposta	Cálculos				Avaliação dos resíduos - Homocedasticidade							
Pontos	µg/ml	área	Média	Variância dos resíduos	Desv. Pad.	CV (%)	Somatório Variância	Maior Variância	C calculado	C teórico	Resultado	homofhetero		
1	0,05	1340	1344,00000	373,00000	19,3132	1,437	1428275,66667	723781,33333	0,50675	0,684	Homocedástico			
	0,05	1365												
	0,05	1327												
ANOVA - da regressão e Teste de desvio da Linearidade														
2	0,10	3071	3155,00000	14508,00000	120,4492	3,818	Fonte	G.L.	SQ	MQ	F	valor-p	Sign.	
	0,10	3293					Regressão	1	2523475436,9329	2523475436,9329	11327,8908	1,668E-20	p < 0,05	
	0,10	3101					Resíduos	13	2895965,4671	222766,5744	#			
3	0,25	8604	8850,66667	148674,33333	385,5831	4,357	Total	14	2,53E+09	#	#			
	0,25	8653					Xmed=	0,3800	Resultado	Regressão	Significativa			
	0,25	9295					Ymed=	13675,800						
4	0,50	18641	18238,33333	723781,33333	850,7534	4,665	Se ² =	222766,5744						
	0,50	17261					Se=	471,9815						
	0,50	18813					n=	15						
5	1,00	37116	36791,00000	540939,00000	735,4856	1,999	coef. linear=	-516,8618	n = número de observações	u = número de níveis	2 = número de parâmetros estimados			
	1,00	35343					coef. ang =	37349,1100						
	1,00	37308					alfa=	0,05						
Somatório	5,7	205137					u=	5						
							r =	0,99943						
							R2 =	0,99885						
							p =	0,05						

Curva analítica - CS ₂ 5p. em triplicata	

Fonte: (CARDOSO, et al., 2010).

Figura 4 - Planilha para avaliação da curva de calibração referente ao segundo dia de análise. Fortificação da matriz tomate no nível 3.

Concentração		Resposta	Cálculos				Avaliação dos resíduos - Homocedasticidade						
Pontos	µg/ml	área	Média	Variância dos resíduos	Desv. Pad.	CV (%)	Somatório Variância	Maior Variância	C calculado	C teórico	Resultado		
1	0,05	1391					368398,66667	221464,33333	0,60115	0,684	Homocedástico		
	0,05	1372	1378,66667	114,33333	10,6927	0,776							
	0,05	1373											
ANOVA - da regressão e Teste de desvio da Linearidade													
2	0,10	3147					Fonte	G.L.	SQ	MQ	F	valor-p	Sign.
	0,10	3133	3128,66667	434,33333	20,8407	0,666	Regressão	1	2529761467,0258	2529761467,0258	25793,4702	7,964E-23	p < 0,05
	0,10	3106					Resíduos	13	1275008,7076	98077,5329	#		
3	0,25	8925					Total	14	2,53E+09	#	#		
	0,25	8980	8887,33333	13496,33333	116,1737	1,307	Xmed=	0,3800					
	0,25	8757					Ymed=	13755,133					
4	0,50	18824					Se ² =	98077,5329	Resultado	Regressão	Significativa		
	0,50	18180	18600,66667	132889,33333	364,5399	1,960	Se=	313,1734					
	0,50	18798					n=	15					
5	1,00	36248					coef. linear=	-455,1946					
	1,00	36952	36780,33333	221464,33333	470,6000	1,279	coef. ang =	37395,5998	n = número de observações				
	1,00	37141					alfa=	0,05	u = número de níveis				
Somatório	5,7	206327					u=	5	2 = número de parâmetros estimados				
							r =	0,99975					
							R2 =	0,99950					
							p =	0,05					

Curva analítica - CS₂ 5p. em triplicata

$y = 37395,5998x - 455,1946$
 $R^2 = 0,9995$

Gráfico de Resíduos

Fonte: (CARDOSO, et al., 2010)

O método foi realizado em dias diferentes devido a capacidade de análise, assim foi necessário preparar a curva para análise dos níveis 1 e 2 de fortificação (Figura 3) e outra para avaliação do nível 3 (Figura 4).

As curvas de calibração mostraram-se lineares e com resíduos homocedásticos na faixa de concentração estudada entre 0,05 a 1,0 µg mL⁻¹ expressa como CS₂ (faixa de trabalho), além de não apresentarem valores aberrantes. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores ou iguais a 0,98 e de determinação (R²) maiores ou iguais a 0,95 e estão de acordo com os definidos no SANTE (2018).

O valor de LD de 0,04 mg kg⁻¹ e LQ de 0,06 mg kg⁻¹ foram confirmados a partir da fortificação em quadruplicata da concentração testada, apresentando precisão e recuperação adequadas. Os valores dos limites de detecção e de quantificação do método calculados estão de acordo com a faixa linear adotada e o LMR para matriz tomate.

4.2.4 Precisão e exatidão

As amostras foram pesadas conforme descrito na tabela 3 e analisadas em dias diferentes devido à limitação analítica do processo.

Tabela 3 - Identificação e massa do tomate utilizado para fortificação.

Identificação das amostras	Massa (g)
25/10/17– 1º Nível de Fortificação – 1ª Replicata	50,0268
25/10/17– 1º Nível de Fortificação – 2ª Replicata	50,0436
25/10/17– 1º Nível de Fortificação – 3ª Replicata	50,0019
25/10/17– 1º Nível de Fortificação – 4ª Replicata	50,0324
25/10/17– 2º Nível de Fortificação – 1ª Replicata	50,0435
25/10/17– 2º Nível de Fortificação – 2ª Replicata	50,0398
25/10/17– 2º Nível de Fortificação – 3ª Replicata	50,0497
25/10/17– 2º Nível de Fortificação – 4ª Replicata	50,0303
26/10/17– 3º Nível de Fortificação – 1ª Replicata	50,0221
26/10/17– 3º Nível de Fortificação – 2ª Replicata	50,0173
26/10/17– 3º Nível de Fortificação – 3ª Replicata	50,0574
26/10/17– 3º Nível de Fortificação – 4ª Replicata	50,0122
25/10/17 – Branco	50,0462

Fonte: (Do autor, 2018)

As soluções para fortificação da matriz tomate foram preparadas usando a solução estoque (2335-E) de tiram que produziu as soluções intermediárias para a

fortificação (2097-I e 2100-I) com a concentração de $156,4475 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $46,9342 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O registro dessa preparação encontra-se na Tabela 4 e nos formulários das soluções, nas pastas denominadas: Registro de Soluções Estoque e Registro de Soluções Intermediárias (ANEXO A, B e C).

Tabela 4 - Dados referentes à preparação das soluções para fortificação do tomate.



Solução de Tiram	Concentração de Tiram ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Alíquota de Diluição (mL)	Volume (mL) Final de Diluição	Solução Intermediária Nº	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) final das Soluções 2097-I e 2100-I de Tiram
2335-E	391,12	10	25	2097-I	156,45
2097-I	156,45	15	50	2100-I	46,93

Fonte: (Do autor, 2018)

A Figura 6 apresenta as massas empregadas de tiram para a fortificação das amostras de tomate, $0,188$; $0,375$ e $0,750 \text{ mg kg}^{-1}$ do ditiocarbamato Tiram para obtenção das concentrações de CS_2 $0,238 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Nível 1), $0,476 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Nível 2) e $0,952 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Nível 3).

Para obtenção da solução utilizada no ensaio foi necessário diluir a solução intermediária 2100-I na proporção de 4:10 no solvente etanol obtendo uma concentração final de $18,77 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CS_2 .

Figura 6 - Concentrações de CS₂ adicionada e recuperada nas amostras com suas respectivas taxas de recuperação e coeficiente de variação.

		Ministério da Saúde										
		FIOCRUZ										
		Fundação Oswaldo Cruz										
		Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Planilha de Cálculo da Concentração da Amostra - Ditiocarbamatos										
DQ - Resíduos de Agrotóxicos												
Validação do Ditiocarbamato:		Tiram										
Matriz:		Tomate										
Período de Execução:		out/17										
Nº de Níveis:		3										
Nº de Replicatas:		4										
Analista Responsável:		Nathália/Thaiz										
Cálculos:												
Concentração da Solução Adicionada de Padrão	Aiquota da Solução Adicionada de Padrão	Quantidade de Padrão Adicionado	Massa da Amostra Fortificada	Concentração de Padrão Adicionado na Amostra	Concentração de CS ₂ Adicionado Correspondente	Concentração de CS ₂ Adicionado	Concentração de CS ₂ Encontrado	Concentração de CS ₂ Encontrado	Recuperação	Média	DP	CV
µg mL ⁻¹	mL	µg	g	mg kg ⁻¹	µg mL ⁻¹	mg kg ⁻¹	µg mL ⁻¹	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	-	%
18,7737	0,50	9,3869	50,0268	0,1876	0,2379	0,1189	0,2074	0,1036	87	89	5,5E+00	6
	0,50	9,3869	50,0436	0,1876	0,2379	0,1189	0,2018	0,1008	85			
	0,50	9,3869	50,0019	0,1877	0,2379	0,1190	0,2308	0,1154	97			
	0,50	9,3869	50,0324	0,1876	0,2379	0,1189	0,2063	0,1031	87			
18,7737	1,00	18,7737	50,0435	0,3751	0,4759	0,2377	0,4030	0,2013	85	84	4,5E+00	5
	1,00	18,7737	50,0398	0,3752	0,4759	0,2378	0,3774	0,1886	79			
	1,00	18,7737	50,0497	0,3751	0,4759	0,2377	0,4279	0,2137	90			
	1,00	18,7737	50,0303	0,3752	0,4759	0,2378	0,3903	0,1950	82			
18,7737	2,00	37,5474	50,0221	0,7506	0,9518	0,4757	0,7186	0,3591	75	76	2,3E+00	3
	2,00	37,5474	50,0173	0,7507	0,9518	0,4757	0,6986	0,3492	73			
	2,00	37,5474	50,0574	0,7501	0,9518	0,4753	0,7355	0,3673	77			
	2,00	37,5474	50,0122	0,7508	0,9518	0,4758	0,7488	0,3743	79			

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016.

Conforme observado na figura 6, todos os coeficientes de variação nos diferentes níveis de concentração mostraram-se dentro dos limites especificados ($\leq 20\%$) pelo SANTE (2018). Além disso, todas as taxas de recuperação nos diferentes níveis de concentração mostraram-se dentro dos limites especificados, a saber, de 70 a 120%. Sendo assim, os resultados foram considerados satisfatórios para as figuras de mérito precisão e exatidão.

Segundo dados do Relatório de Validação do Ditiocarbamato Tiram em Tomate realizado no setor de Resíduos de Agrotóxicos no ano de 2012 (INCQS, 2012) a faixa de trabalho do método espectrofotométrico para a matriz em estudo é 0,25 a 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o limite de quantificação é de 0,296 mg kg^{-1} CS₂. Enquanto que utilizando CG-EM a faixa de trabalho foi de 0,05 a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3 e 4) e o LQ 0,06 mg kg^{-1} CS₂ (Figura 5). A sensibilidade do método cromatográfico foi consideravelmente maior, corroborando a importância de sua implementação na análise de resíduos de agrotóxicos na rotina do setor.

4.3 estudos preliminares para elaboração de um candidato a item de ensaio de proficiência para análise de ditiocarbamatos

4.3.1 Homogeneidade dos itens de ensaio

Embora na validação tenha sido utilizado o agrotóxico tiram, no preparo dos itens de ensaio de proficiência utilizou-se o mancozebe por ser o agrotóxico mais comercializado entre os ditiocarbamatos e por pertencer a subclasse dos etilenobisditiocarbamatos que possui atividade mutagênica e carcinogênica devido ao seu metabólito ETU (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1992; LARINI, 1999). Além disso, o produto comercial formulado possui excipientes que aumentam sua estabilidade, quando comparado a substância padrão utilizada em ensaios laboratoriais, justificando a escolha de seu uso neste estudo.

Para cada item de ensaio foram realizadas duas análises completas produzindo dois resultados (A e B), conforme apresentado na tabela 5 e o resultado das análises estatísticas para determinação da homogeneidade estão descritas na tabela 6 e estão em conformidade com a ISO 13528 *Statistical Methods for use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2015) e a ISO GUIA 35 (ABNT, 2012).

Tabela 5 - Concentrações calculadas para as amostras utilizadas na análise de homogeneidade, em mg kg⁻¹.

Item de Ensaio	Sub-amostra 1	Sub-amostra 2
1	113,8	119,9
2	119,9	113,8
3	108,6	108,0
4	110,7	106,7
5	110,4	111,2

Fonte: (Do autor, 2018)

Tabela 6 - Análises estatísticas para estudo de homogeneidade, em mg kg⁻¹.

Média Geral	112,3
Desvio Padrão Alvo (σ_H)*	24,7
Desvio Padrão Alvo x 0,3	7,4
S_x	4,3
S_w	3,0
S_s	3,7
Incerteza da homogeneidade	3,7
Resultado	Homogêneo

Fonte: (Do autor, 2018)

* Desvio padrão de *Horwitz* (modificado por Thompson), correlacionado a concentração média das cinco amostras.

As amostras são consideradas homogêneas se o desvio padrão entre as amostras (s_s) for menor ou igual a $0,3\sigma_H$. De acordo com os resultados da análise estatística apresentados na Tabela 6, o valor calculado para $0,3\sigma_H$ foi 7,4 e o $s_s = 3,7$, assim os itens de ensaio puderam ser considerados suficientemente homogêneos e com baixa incerteza para o ingrediente ativo presente.

A principal limitação à obtenção de amostras artificialmente contaminadas para o ensaio de ditocarbamatos é a rápida degradação dos ingredientes ativos. VUIK et al. (1992) realizaram um experimento na matriz alface e constatou que a concentração do agrotóxico Tiram foi reduzida a quase metade após 30 minutos, provavelmente a ação de enzimas liberadas após o corte. A utilização de um produto formulado com ditocarbamato como ingrediente ativo foi empregada como o objetivo de obter maior estabilidade dos itens de ensaio, conforme será avaliado em estudos posteriores.

Portanto, a elaboração de um ensaio de proficiência de ditocarbamatos a nível nacional, possibilitaria a participação de um número maior de laboratórios de análise de resíduos de agrotóxicos no Brasil devido ao menor custo, contribuindo assim para a maior confiabilidade dos resultados fornecidos e um melhor monitoramento dos produtos ofertados ao consumidor.

5 CONCLUSÃO

O método foi otimizado, validado e implementado para ditiocarbamatos expressos como CS₂ em tomate empregando a técnica de CG-EM segundo os parâmetros determinados pela literatura para análise de resíduos de agrotóxicos.

Os resultados apresentados demonstraram que a implementação do mesmo na rotina do setor é proveitosa devido ao fato de ser rápido, exigir menos trabalho laboral, ser mais sensível e apresentar eficiência superior ao método espectrofotométrico.

Além disso, utilizando-se o método validado foi possível realizar um estudo preliminar para a elaboração de um candidato a item de ensaio de proficiência para a determinação de ditiocarbamatos na matriz tomate com homogeneidade adequada.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 35:** materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

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

BELPOGGI, F. et al. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 982, n. 1, p. 123-136, 2002.

BOMBARDI, M. L. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH – USP, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2013 a 2015**. Brasília: Anvisa, 2016a. Disponível em: <www.anvisa.gov.br> Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio de 2009/10 a 2019/2020**. Brasília: Mapa/AGE/ACS, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. Brasília, 2013. 84 p.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jan. 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 03 ago. 2017.

_____. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989. Lei federal dos agrotóxicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 03 ago. 2017.

_____. Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de set. 2003. p.48-50.

_____. Promove a publicação do Subprograma de Monitoramento em culturas agrícolas para o exercício de 2014/2015, referente Plano Nacional de Controle de

_____. Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal - PNCRC/Vegetal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 115 de 17 de junho de 2016. 2016b.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco**: metodologia e aplicação. 2001. 70f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2004.

CALDAS, E. D. et al. Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by spectrophotometric method using a vertical disulfide reaction system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Brasilia, v 49, n. 10, p. 4521-4525, 2001.

CARDOSO, M. H. W. M. et al. Method validation for determination of pesticide residues in tomatoes: a laboratorial experience. **Food Science and Technology**, (Campinas), v. 30, p. 63-72, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Guidelines on good laboratory practice in residue analysis - CAC/GL 40-1993**. Rev. 01. Rome: FAO/WHO, 2003. Disponível: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg_040e.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2017.

EUROPEAN COMMISSION. Directorate General for Health and Food Safety. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**: SANTE/11813/2017. Europa, 2018. 42 f.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e venda de agrotóxicos no Brasil**. Brasília, 2017. Disponível: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 20 ago. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Rio de Janeiro, 2009. 777 p. ISSN 0103-6157. Disponível em: <http://bit.do/ibge_censo06>. Acesso em: 02 ago. 2017

_____. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=25>. Acesso em: 15 dez. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **POP 65.3120.079**: determinação de resíduos de ditiocarbamatos em hortifrutigranjeiros. Rev. 08. Rio de Janeiro, 2016. 13 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.3120.082**: parâmetros estatísticos para validação de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2015. 31 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.3120.084**: validação dos aplicativos desenvolvidos para o Microsoft Excel Din-Analyte e Calwer 2.2 (Modificado). Rev. 00. Rio de Janeiro, 2005. 19 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **POP 65.3120.096**: especificação, manuseio, armazenamento, preparo e registro de material de referência de agrotóxicos. Rev. 07. Rio de Janeiro, 2014. 09 f. (Manual da Qualidade. Seção 4.3).

_____. **Relatório de Validação do Ditiocarbamato Tiram em Tomate**. Rio de Janeiro, 2012. 30 f.

_____. **Ensaio de proficiência para determinação de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros 11° rodada: matriz manga**. Rio de Janeiro, 2016. 47 f.

_____. **Ensaio de proficiência para determinação de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros 12° rodada: matriz couve-flor**. Rio de Janeiro, 2017. 31 f.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (Brasil). **Orientações para a seleção e uso de materiais de referência**: DOQ CGRE 016. Revisão: 02. Rio de Janeiro, 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13528**: statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, Switzerland, 2015.

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

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. M. H. O agronegócio e seus impactos na saúde dos trabalhadores e da população do estado de Mato Grosso. In: GOMEZ, CM;

MACHADO, JMH; PENA, PGL. (Orgs.). **Saúde do trabalhador na sociedade brasileira contemporânea**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011.

QUEIROZ, S. C. N. et al. **Métodos para a determinação de multiresíduos de agrotóxicos em produtos agrícolas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Disponível: <http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_71.pdf>. Acesso em: 08/09/2017.

SILVA, R. **Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECD, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ethylene Thiourea (CAS No. 96-45-7) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies)**. Bethesda, MD, 1992. (National Toxicology Program. Technical Report, 388).

VUIK, J.; VAN DINTER, R.; DE VOS, R. H. Improved sample pretreatment of the carbon disulfide evolution method for the determination of dithiocarbamate residues in lettuce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Holanda, v. 40, n. 4, p. 604-606, 1992.

**ANEXO A – FORMULÁRIO DE PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE DE TIRAM
(2335 – E). DQ – RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS**

FORMULÁRIO DE PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE DE MRA

N.º: 2335 - E	Data de Validade: 03/06/2019	Analista (s): Marina	Data de Preparo: 26/06/2017
Concentração Nominal: 400 µg/mL			
AGROTÓXICO:		FORNECEDOR: AccuStandard	
Tiram		LOTE N.º: 4152-02	
		PUREZA: 97,1 % (A)	
		DATA DE VALIDADE: 03/06/2019	
		OBSERVAÇÃO:	
PESO NOMINAL: 0,01007 (g) (B)		Volume de diluição final: 25 (mL) (C) N.º de calibração do balão: V4280	
PESO DO MRA CORRIGIDO: 0,009777970 (g) (D = B*A/100)			
SOLVENTE: Alcool Lichrosolv	FORNECEDOR: Merck		LOTE: K47798027
CONCENTRAÇÃO REAL FINAL: 391,118800 µg/mL (D*10⁶/C)			
Observações: T16.0-1			
Solução avaliada () sim () não () conforme () não conforme			
Soluções avaliadas _____ Equipamento/sequência: _____			
Solução reavaliada em _____ () sim () não () conforme () não conforme			
Soluções avaliadas _____ Equipamento/sequência: _____			
Padrão acabou! Ultrassom!			

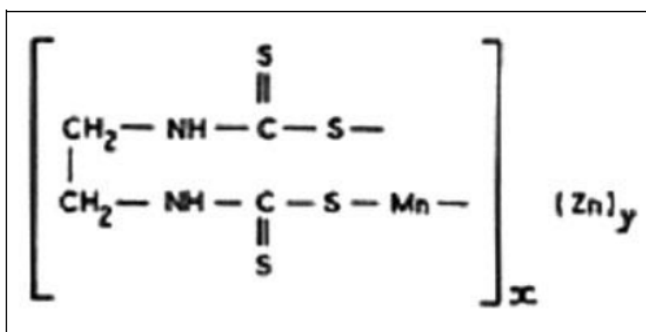
ANEXO D – MONOGRAFIA DO INGREDIENTE ATIVO MANCOZEBE

Consulta ao site da Anvisa em 11/12/2017

ÍNDICE MONOGRAFICO	NOME
M02	MANCOZEBE

M02 – Mancozebe

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: MANCOZEBE (mancozeb)
- b) Sinonímia: Manzeb
- c) N° CAS: 8018-01-7
- d) Nome químico: manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt
- e) Fórmula bruta: $(C_4H_6N_2S_4Mn)_x (Zn)_y$
- f) Fórmula estrutural:



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

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

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

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

UNA = Uso Não Alimentar

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

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

(*) Ditiocarbamatos:

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

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

* LMR estabelecido para arroz sem casca

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

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

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

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