

MAURO CESAR DIAS

**Determinação Espectrofotométrica de Fungicidas Ditocarbamatos em Frutos
do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Curso de Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
Janeiro de 1997

MAURO CESAR DIAS

**Determinação Espectrofotométrica de Fungicidas Ditiocarbamatos em
Frutos do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de agosto de 1996.

Prof. Luiz Cláudio de A. Barbosa

Profa. Tânia Toledo de Oliveira

Prof. Efraim Lázaro Reis
(Conselheiro)

Prof. Antônio Augusto Neves
(Conselheiro)

Profa. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

A Jeová.

A Gerzi e Marilda.

Às avós Tico e Stela.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade oferecida para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela orientação, paciência e, principalmente, pela amizade.

Aos professores Antônio Augusto Neves e Efraim Lázaro Reis, pelo incentivo, pelo apoio e pela cooperação nas análises desenvolvidas.

Ao colega Leonardo Miranda e à FUNED, pelas orientações de amostragens e várias colaborações.

Aos professores Fernando Egreja, José Humberto de Queiroz e Rochel Lago, pelo auxílio nas correções deste trabalho.

Aos professores Luíz Cláudio de Almeida Barbosa e Tânia Toledo de Oliveira, pelas inúmeras colaborações prestadas.

Aos professores Luiz Carlos Guedes de Miranda, Tanus Jorge Nagem e Marcelo Picanço, pelas colaborações prestadas.

Aos amigos do Curso de Agroquímica, particularmente a Adilson Vidal, Márcia Paranho, Cíntia Chagas e Fernando Barcellos, pelo companheirismo de todas as horas.

Aos funcionários do Departamento de Química da UFV, em especial a Eduardo Monteiro, Jorginho, Onezina, Solange, Lucinha e José Luiz.

Aos colegas e amigos Almir Andreão, Marcelo Henrique, Paulo Fidêncio, Lourdes, Adair, Marley, Vanderlúcia e Reinaldo, pelas atenções prestadas.

Aos grandes amigos Carlo Batitella, Claudia Gonçalves, Elita e Sonia Madali, pela amizade de todas as horas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Mauro Cesar Dias, filho de Gerzi Lima Dias e Marilda Guimarães Dias, nasceu em Vitória-ES, em 26 de novembro de 1967.

Concluiu o segundo grau no curso Técnico em Química pelo Colégio Americano Batista de Vitória, e, anos mais tarde, o curso de Instrumentação Industrial pelo SENAI.

Após ter trabalhado e estagiado em empresas siderúrgicas e de chocolates, iniciou seus estudos de graduação no curso de Química da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES.

Em 1990, ingressou na Universidade Federal de Viçosa-UFV, onde diplomou-se em Bacharel em Química após quatro anos.

Em março de 1994, ingressou no curso de Agroquímica pela mesma universidade, defendendo sua dissertação de *Magister Scientiae* no tempo hábil de dois anos e meio, em 28 de agosto de 1996.

CONTEÚDO

EXTRATO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Histórico.....	4
2.2. Classificação.....	5
2.2.1. Ditiocarbamatos metálicos.....	6
2.2.2. Etilenobisditiocarbamatos metálicos.....	9
2.2.3. Propilenobisditiocarbamatos.....	13
2.2.4. Bissulfetos de tiuram.....	14
2.3. Usos e mecanismos de ação.....	16
2.4. Degradação.....	17
2.5. Métodos utilizados para determinação de ditiocarbamatos.....	20
2.5.1. Métodos espectrofotométricos.....	20
2.5.2. Métodos cromatográficos.....	24
3. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	29
3.1. Quimiometria.....	29
3.1.1. Matrizes: suas notações e representações.....	30
3.1.2. A relação entre duas matrizes de dados.....	35

3.2. Análise de componentes principais (PCA).....	37
3.3. Regressão de componentes principais (PCR).....	40
3.4. Método dos mínimos quadrados parciais (PLS).....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Sínteses de etilenobisditiocarbamatos.....	43
4.1.1. Síntese do nabam.....	43
4.1.2. Síntese do maneb.....	44
4.1.3. Determinação da pureza do maneb.....	45
4.2. Seqüência experimental.....	46
4.3. Amostras.....	46
4.3.1. Amostras de tomates pronto para consumo.....	46
4.3.2. Amostras para determinação da curva de persistência.....	48
4.3.3. Nomenclatura das amostras.....	48
4.4. Técnicas de extração e análises.....	49
4.4.1. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD)....	49
4.4.2. Método espectrofotométrico de hidrólise ácida.....	49
4.4.2.1. Estudos preliminares do método de hidrólise ácida.....	50
4.4.2.2. Curva de calibração para CS ₂	52
4.4.2.3. Análise de resíduos pelo método de hidrólise ácida.....	52
4.4.2.4. Determinação da eficiência do método de hidrólise ácida.....	53
4.4.3. Calibração multivariada (PLS).....	56
4.4.3.1. Calibração e previsão.....	56
4.4.4. Método espectrofotométrico com 1-(2'-piridilazo)-2-naftol (PAN).....	58
4.4.4.1 Curva de calibração do método do PAN.....	58
4.4.4.2. Determinação de resíduos de maneb em amostras de tomates pelo método do PAN.....	58
4.4.4.3. Interferência do zinco no método do PAN.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Síntese do maneb.....	61

5.2. Resultados da identificação do maneb por CCD.....	62
5.3. Resultados do método espectrofotométrico de hidrólise ácida.....	64
5.3.1. Estudos preliminares do método de hidrólise ácida.....	64
5.3.2. Curva de calibração do CS ₂	67
5.3.3. Determinação de resíduos de maneb em tomates pelo método de hidrólise ácida por calibração univariada.....	68
5.3.4. Curva de persistência do maneb pelo método de hidrólise ácida.....	71
5.3.5. Eficiência do método de hidrólise ácida.....	72
5.4. Resultados do método de calibração multivariada (PLS).....	73
5.4.1. Calibração e previsão.....	74
5.4.2. Determinação dos níveis de resíduos de maneb em tomates por calibração multivariada.....	83
5.5. Resultados do método de extração espectrofotométrica com PAN.....	84
5.5.1. Determinação da interferência do Zn(II) no método do PAN.....	84
5.5.2. Curva de calibração do maneb.....	85
5.5.3. Determinação de resíduos de maneb em tomates pelo método do PAN.....	87
5.5.4. Curva de persistência do maneb pelo método do PAN.....	89
5.5.5. Eficiência do método do PAN.....	92
5.6. Comparação dos resultados.....	93
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

EXTRATO

DIAS, Mauro Cesar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 1997.
Determinação espectrofotométrica de fungicidas ditiocarbamatos em frutos do tomateiro (*lycopersicon esculentum* Mill.). Professora Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Professores Conselheiros: Antônio Augusto Neves e Efraim Lázaro Reis.

Os fungicidas ditiocarbamatos são amplamente empregados em diversas olericulturas no controle da requeima da batata e do tomate, no mídio da videira, em antraquinoses da abóbora e do pepino, etc. Apesar de a maioria desses fungicidas estarem catalogados na classe de toxicidade inexpressiva ao homem, eles podem apresentar, em casos excepcionais, riscos sérios à saúde humana. Procurou-se, neste trabalho, avaliar o nível de contaminantes em tomates produzidos e comercializados na região de Viçosa, determinando-se os índices de resíduos de fungicidas ditiocarbamatos no fruto total, na casca e na polpa. Desse modo, fez-se necessário determinar a curva de persistência do fungicida maneb, em tomates, em duas condições: amostras expostas no campo e amostras armazenadas em laboratório. Para essas análises utilizou-se o método espectrofotométrico de hidrólise ácida, amplamente estudado preliminarmente, no qual fez-se uso de Curva de Calibração e Calibração Multivariada (PLS) e do método espectrofotométrico de extração com 1-(2'-piridilazo)-2-naftol (PAN).

Para identificar o fungicida ditio-carbamato presente nas amostras aleatórias, foi empregada Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Os resultados foram expressos em níveis de maneb, fungicida ditio-carbamato bastante utilizado pelos agricultores dessa região. O tempo máximo de permanência deste fungicida foi de 10 dias no fruto armazenado em laboratório e de oito dias no fruto exposto no campo, sendo o tempo máximo de permanência estipulado pelo fabricante de sete dias. Comparando os resultados, o método espectrofotométrico de extração com PAN apresentou níveis de resíduos de maneb relativamente superiores aos encontrados pelo método espectrofotométrico de hidrólise ácida. Possivelmente, espécies de manganês presentes, oriundas da degradação do maneb, interferem no processo de complexação com PAN, o que poderia justificar esses resultados. O uso da Calibração Multivariada possibilitou estudos de técnicas com-putacionais, complementando o método espectrofotométrico de hidrólise ácida. Os níveis de resíduos de maneb determinados no fruto total estão abaixo do limite máximo permitido pela legislação, que é de 2 mg kg^{-1} em tomates.

ABSTRACT

DIAS, Mauro Cesar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 1997.
Determinação espectrofotométrica de fungicidas ditiocarbamatos em frutos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Professora Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Professores Conselheiros: Antônio Augusto Neves e Efraim Lázaro Reis.

Dithiocarbamates fungicides are widely used to control a great variety of fungous diseases in potatoes, grapes, pumpkins, cucumbers, etc. In general these fungicides are considered harmless to the human health, however in some exceptional cases they may show strong toxicity. The aim of this work was the determination of dithiocarbamates residues in tomatoes, produced and sold in Viçosa region. The tomatoes were analysed as total fruit, peel and pulp. It was studied the persistence time of the fungicide Maneb in tomatoes submitted to two different conditions: one exposed on field and the other stored in laboratory. The carbon disulfide evolution method, studied previously, was used for the analysis of dithiocarbamate residues, using both the univariate and the multivariate calibration methods. It was also used the extraction spectrophotometric determination with 1-(2'-pyridilazo)-2-naphthol (PAN). For the identification of the dithiocarbamate fungicide present in the samples it was used thin layer chromatography. The obtained fungicides concentrations were expressed as

Maneb ($\mu\text{g g}^{-1}$) which is the fungicide most frequently used in Viçosa. It was found that the maximum persistence time of fungicide in tomatoes stored in laboratory was of 10 days whereas for tomatoes exposed on field were of 8 days. These results contrast with the persistence time reported by the Maneb's manufacturer which is claimed to be of 7 days. The method of Maneb residues analyses by extraction spectrophotometric with PAN showed relatively higher values compared to the carbon disulfide evolution method. This might be due to manganese species such as MnS and MnO₂ originated from the Maneb decomposition which can interfere in the process of complexation with PAN. The multivariate calibration method allowed the use of computational techniques which improved the carbon disulfide evolution method. The Maneb residue levels detected in total fruit in all cases were lower than $2 \mu\text{g g}^{-1}$ of tomatoes which is the maximum value specified by the Brazilian legislation.

1. INTRODUÇÃO

Com o incentivo agrícola na década de 70, a produção de alimentos no Brasil sofreu grandes transformações. O uso de agrotóxicos, substâncias biocidas que permitem controle rápido e eficiente de importantes pragas e doenças das lavouras, cresceu de maneira incontrolável, em busca de maior produção. Isto gerou grandes prejuízos ao meio ambiente, poluindo o próprio homem, tanto pelo manejo inadequado, como pelo consumo de frutas e verduras contaminadas.

Dentre os agrotóxicos, os chamados "venenos úteis", há a classe dos fungicidas, os quais também vêm sendo aplicados de maneira crescente na agricultura. Os fungicidas orgânicos são os mais usados, destacando-se aqueles do grupo ditiocarbamato (DTC), em que o tipo específico dos etilenobisditiocarbamatos metálicos (EBDC) é o mais importante, sendo empregado principalmente em culturas de tomate.

Apesar de a maioria desses fungicidas pertencer à categoria de toxicidade inexpressiva ao homem, eles podem apresentar, em casos excepcionais, riscos sérios à saúde humana. Pesquisas da EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL-EMATER, em 1993, mostraram casos de intoxicação extrema por fungicidas EBDC na região de Viçosa. Os etilenobisditiocarbamatos e a etilenotiouréia (ETU), principal produto de degradação desses fungicidas, estão relatados na literatura como causadores de alterações funcionais e

morfológicas na tireóide de roedores (GRISOLIA, 1995). Estudos relatados na literatura comprovaram que a ETU, em altas concentrações, é um agente cancerígeno e teratogênico (CAMONI et al., 1988).

Com base nesses problemas, verificou-se a necessidade de avaliar os níveis de resíduos de fungicidas EBDC mais empregados em plantações de tomates.

Este trabalho consiste em estudar e comparar diferentes técnicas para determinação de resíduos desses fungicidas, em amostras de tomates produzidos e comercializados na região de Viçosa-MG.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O comitê de padronização de testes com fungicidas, da Sociedade Americana de Fitopatologia, define fungicida como "um agente físico ou químico capaz de matar o fungo ou inibir o crescimento micelano e a germinação de seus esporos" (PONTE, 1986). Ou seja, são agentes capazes de desenvolver, sobre os fungos, ação letal ou inibidora, fungistática.

No Brasil, na olericultura, a produção de tomate ocupa o segundo lugar por ordem de importância econômica (FREITAS, 1992). A cultura é bastante vulnerável ao ataque de fungos, necessitando de freqüentes aplicações de fungicidas. Estas aplicações podem ser feitas incorretamente, por excesso de pulverizações e dosagens incorretas, poluindo o meio ambiente. Outros tipos de problemas são causados pela falta do uso de equipamentos individuais de proteção e pelo destino de embalagens, que na maioria das vezes são deixadas no campo, podendo causar intoxicação tanto ao aplicador como ao consumidor.

Cerca de 60% dos fungicidas fabricados no Brasil correspondem aos ditiocarbamatos, segundo dados da Associação Nacional de Defensivos Agrícolas (ANDEF) (SUPERINTENDÊNCIA AGROPECUÁRIA-SUPAGRO, 1986). Os DTC apresentam maior especificidade de ação em enfermidades de grande expressão econômica (PONTE, 1986), competindo diretamente com os fungicidas cúpricos ou com os fungicidas sulfurados inorgânicos. Os fungicidas ditiocarbamatos apresentam menor fitotoxicidade e maior poder fungicida, vantagens que os tornam com maior preferência de uso em lavouras de tomate, cebola, alho, fumo, seringueira, trigo, etc.

2.1. Histórico

O ácido ditiocarbâmico, H_2NCSSH (Figura 1), composto altamente instável em seu estado livre, foi sintetizado na década de 20, para acelerar a ação do enxofre na vulcanização da borracha e para uso como inseticida.

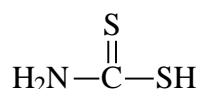


Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido ditiocarbâmico.

Anderson (1942) e Kincaid (1942), citados por FREAR (1955), comprovaram que alguns de seus derivados metálicos, mais estáveis, apresentavam propriedades antifúngicas. Estes derivados metálicos, denominados fungicidas ditiocarbamatos (DTC), são facilmente produzidos por tratamento de aminas alifáticas primárias ou secundárias, com dissulfeto de carbono (CS_2) em solução alcoólica alcalina (FREAR, 1955), segundo a equação:



A adição de uma solução contendo sal de Mn(II), Fe(III), ou Zn(II), etc., pode produzir grande variedade de derivados, com diferentes propriedades físicas e químicas.

2.2. Classificação

A maioria dos fungicidas ditiocarbamatos são compostos organometálicos oriundos da substituição do hidrogênio do grupamento -SH do ácido ditiocarbâmico por metais, como Mn(II), Cu(II), Zn(II), etc. (PONTE, 1986).

A ação química desses fungicidas tem sido bastante estudada, levando a uma classificação que coincide com o comportamento químico. De um lado encontram-se os dimetilditiocarbamatos (DDTC) e os dissulfetos de tiuram e, do outro, os etilenobisditiocarbamatos (EBDC). Essa classificação, segundo os estudos de Ludwig e Thorn (1960), citados por BARBERÁ (1974), leva em consideração a maior atividade dos DDTC e dissulfetos de tiuram em fungos do gênero *Rhizopus* e a menor atividade em fungos do gênero *Aspergillus*, enquanto os EBDC têm maior atividade em fungos do gênero *Aspergillus* do que em fungos do gênero *Rhizopus*. e a -10 59.04 pil.

agosto de 1984, classifica esses fungicidas, com base em evidências de mecanismos de ação e em diferenças estruturais, em:

- . monoalquilditiocarbamatos: EBTC e propilenobisditiocarbamatos; e
- . dialquilditiocarbamatos: ditiocarbamatos metálicos e bissulfetos de tiuram.

Uma classificação mais recente, encontrada no mesmo relatório, divide os fungicidas ditiocarbamatos em quatro grupos:

- . ditiocarbamatos metálicos;
- . etilenobisditiocarbamatos metálicos (EBTC);
- . propilenobisditiocarbamatos metálicos; e
- . bissulfetos de tiuram.

Seguindo esta classificação, os principais ditiocarbamatos serão caracterizados a seguir.

2.2.1. Ditiocarbamatos metálicos

Os fungicidas ditiocarbamatos metálicos apresentam os hidrogênios do grupo $-NH_2$ do ácido ditiocarbâmico substituídos por grupos alquila, geralmente grupos metila, os quais são denominados dimetilditiocarbamatos (DDTC). Como exemplo de fungicidas ditiocarbamatos mais importantes deste tipo têm-se o ferbam e o ziram.

Ferbam

O ferbam, dimetilditiocarbamato de ferro (III), de fórmula molecular $C_9H_{18}FeN_3S_6$, é obtido pela reação de um sal de Fe(III), em solução, com dimetilditiocarbamato de sódio. A Figura 2 ilustra a fórmula estrutural do ferbam. Este composto foi um dos primeiros fungicidas ditiocarbamatos a serem comercializados, e em 1942 publicou-se o primeiro trabalho de campo a seu respeito (SHARVELLE, 1961).

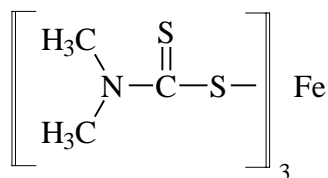


Figura 2 - Fórmula estrutural do ferbam.

Características e propriedades químicas (FREAR, 1955):

- . sólido preto;
- . p.f. = 180 °C, com decomposição;
- . solubilidade em água: 130 µg mL⁻¹;
- . solúvel em solventes orgânicos, como: clorofórmio, piridina e acetonitrila; e
- . instabilidade: em presença de calor, luz e umidade.

O período de carência deste fungicida é de sete dias, e ele está classificado na classe IV (classe dos pesticidas inócuos aos animais superiores), com valor de DL₅₀ oral aguda (quantidade da substância capaz de matar 50 % dos animais de teste) superior a 5.000 mg kg⁻¹ em ratos (TOMLIN, 1994). O uso deste fungicida não é permitido pela legislação brasileira (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS-FUNED, 1994).

Ziram

O ziram, dimetilditiocarbamato de zinco (II), de fórmula molecular C₆H₁₂N₂S₄Zn, é obtido pela reação entre o dimetilditiocarbamato de sódio com um sal de zinco em solução aquosa. A Figura 3 ilustra a fórmula estrutural do ziram. Este fungicida é relativamente estável quimicamente, mas é decomposto por alguns ácidos e por contato prolongado com metais, como cobre e ferro (FREAR, 1955).

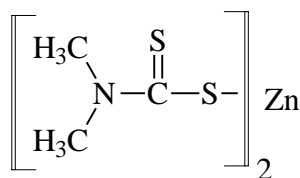


Figura 3 - Fórmula estrutural do ziram.

Características e propriedades químicas (BARBERÁ, 1974):

- . sólido branco;
- . p.f. = 240 °C, com decomposição;
- . solubilidade em água: 65 µg mL⁻¹ a 25°C;
- . solúvel em clorofórmio, acetona e sulfeto de carbono; e
- . solúvel em solução alcalina e ácido clorídrico diluídos.

O ziram está catalogado na classe III, apresentando DL₅₀ entre 500 e 5.000 mg kg⁻¹ (TOMLIN, 1994), sendo a ingestão diária aceitável em humanos na faixa de 0 a 0,02 mg kg⁻¹. Estudos feitos em cobaias de laboratório comprovaram os efeitos teratogênicos do ziram em altas concentrações (CAIRNS e SHERMA, 1993).

Este fungicida foi liberado para uso conforme Portaria da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) de nº 22, de 18 de maio de 1984 (D.O.U., ano CXXII-nº 98, de 22 de maio de 1984 - pág: 7228 - seção I), citada pelo relatório sobre Ditiocarbamatos do Centro de Informações Toxicológicas e do Meio Ambiente da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (1984). A Portaria de nº 10 de 08 de março de 1985 estipula em um máximo de 3 µg kg⁻¹ os níveis de resíduos em tomate (SUPAGRO, 1986).

O ziram é comercializado no Brasil com o nome de Rodisan SC, usado em cítrus, trigo e videira, segundo Compêndio de Defensivos Agrícolas (1993).

2.2.2. Etilenobisditiocarbamatos metálicos

Os fungicidas ditiocarbamatos deste tipo são sais metálicos que apresentam os grupos ditiocarbâmicos unidos por um grupo etileno entre os grupos amino (BARBERÁ, 1974). Enquadra-se neste grupo de fungicida ditiocarbamato o mancozeb, complexo de zinco e manganês.

Os EBTC são os fungicidas mais usados no controle de fungos, principalmente em regiões quentes e úmidas, em cereais, frutas, verduras e legumes.

Pertencem a este tipo de EBTC os seguintes fungicidas:

Nabam

O nabam, etilenobisditiocarbamato de sódio, tem como fórmula molecular $C_4H_6N_2S_4Na_2$. A Figura 4 ilustra a fórmula estrutural do nabam. É obtido a partir da reação da etilenodiamina com CS_2 e hidróxido de sódio, sendo o precursor para obtenção dos demais EBTC. Esse composto foi descrito como fungicida por Dimond et al. (1943), citados por FREAR (1955), e tem ação no controle de várias doenças de plantas, apresentando baixa toxicidade em animais e plantas.

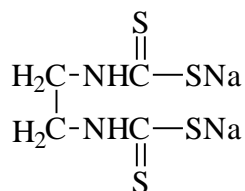


Figura 4 - Fórmula estrutural do nabam.

Características e propriedades químicas (BARBERÁ, 1974):

- . sólido branco cristalino hexa-hidratado;
- . decompõe-se ao calor;
- . insolúvel em solventes orgânicos;
- . instável em presença de calor, luz e umidade no estado sólido;
- . estável em solução aquosa; e
- . p.f. = 82 °C (VAN DER KERK e KLÖPPING, 1952).

O nabam está classificado na classe III dos pesticidas, com DL_{50} em torno de 500 mg kg^{-1} (TOMLIN, 1994), e seu uso não é permitido pela legislação brasileira (FUNED, 1994).

Zineb

O zineb, etilenobisditiocarbamato de zinco (II), é obtido a partir do nabam pela adição de solução de Zn (II) e tem fórmula molecular $C_4H_6N_2S_4Zn$. Quando aquecido, decompõe-se, emitindo vapores tóxicos de NO_x e SO_x . Sua fórmula estrutural está representada na Figura 5.

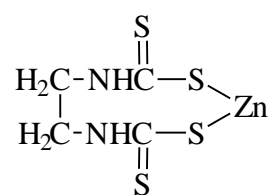


Figura 5 - Fórmula estrutural do zineb.

Características e propriedades químicas (BARBERÁ, 1974):

- . sólido branco;
- . decompõe-se ao calor;
- . solubilidade em água: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$;

- . solúvel em piridina; e
- . instável em presença de calor, luz e umidade.

O zineb está classificado na classe IV, com DL_{50} acima de 5.000 mg kg^{-1} em ratos (TOMLIN, 1994). De acordo com Spynu (1989), citado por CAIRNS e SHERMA (1993), o zineb causa tumores malignos em cobaias de laboratório. O uso deste fungicida foi proibido no Brasil pela Portaria de número 10, de 08 de março de 1985, da SNVS, citada por FUNED (1994).

Maneb

O maneb, etilenobisditiocarbamato de manganês, é um fungicida ditiocarbamato bastante efetivo no controle de fungos em tomate, batata, videira e seringueira (Compêndio de Defensivos Agrícolas, 1993), sendo um dos mais usados. Sua fórmula molecular é $C_4H_6N_2S_4Mn$, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 6. Este composto é obtido pela reação do nabam em solução aquosa com um sal de Mn(II).

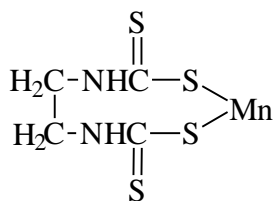


Figura 6 - Fórmula estrutural do maneb.

Características e propriedades (BARBERÁ, 1974):

- . sólido amarelo;
- . decompõe-se ao calor;
- . pouco solúvel em água; e
- . instável em presença de umidade.

Segundo GRISOLIA (1995), o maneb apresenta resposta positiva quanto à mutagenicidade em diferentes microorganismos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*. Becker (1990), citado por GRISOLIA (1995), por sua vez, detectou efeitos teratogênicos deste fungicida em camundongos.

Este fungicida foi liberado para uso, conforme Portaria da SNVS de nº 22, de 18 de maio de 1984 (D.O.U., ano CXXII-nº 98, de 22 de maio de 1984 - pág: 7228 - seção I), citada pelo relatório sobre Ditiocarbamatos, do Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (1984). O maneb está catalogado na classe IV, apresentando DL_{50} acima de 5.000 mg kg^{-1} (TOMLIN, 1994). A Portaria de nº 10 de 8 de março de 1985, da SNVS, estabeleceu níveis de resíduos de no máximo 2 mg kg^{-1} em tomates, citada por SUPAGRO (1986), sendo a ingestão diária aceitável em humanos na faixa de 0 a $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$.

O maneb é comercializado com 80% do princípio ativo com o nome comercial de Curzate M + Zn, apresentando período de carência de sete dias (BARBERÁ, 1974).

Mancozeb

O mancozeb, polímero de etilenobisditiocarbamato de manganês e zinco, contém 20% de Mn e 2,55% de Zn em sua molécula. A Figura 7 ilustra a fórmula estrutural do mancozeb. É um dos fungicidas DTC mais eficientes sendo bastante usado atualmente em diversas plantações.

Características e propriedades (FREAR, 1955):

- . pó cinza-amarelado;
- . p.f. = $192-194 \text{ }^\circ\text{C}$, com decomposição; e
- . praticamente insolúvel em água.

O mancozeb está classificado na classe IV, apresentando DL_{50} acima de 5.000 mg kg^{-1} em ratos (TOMLIN, 1994). Em trabalhadores expostos durante a produção deste fungicida houve aumento significativo na frequência de

aberrações cromossômicas, principalmente em fumantes (Jablonická et al., 1989, citados por GRISOLIA, 1995).

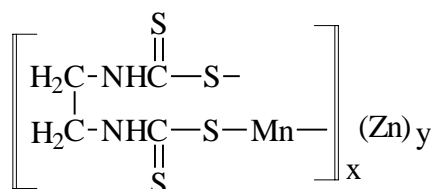


Figura 7 - Fórmula estrutural do mancozeb.

A Portaria de nº 10, de 8 de março de 1985, estabeleceu níveis de resíduos de no máximo 0,2 mg kg⁻¹ em tomates (SUPAGRO, 1986), estando a ingestão diária aceitável em seres humanos na faixa de 0 a 0,05 mg kg⁻¹. No comércio é conhecido pelos nomes de Combilan PM, Cuprozeb (associado com oxicloreto de cobre), Dithane PM, Dithane SC, Dihiobin 780 PM, Manzate 800 e Ridomil-Mancozeb BR, usados no controle de queima e requeima do tomate e da batata, no mofo azul do tabaco, na ferrugem do alho e da cebola, etc. (Compêndio de Defensivos Agrícolas, 1993).

2.2.3. Propilenobisditiocarbamatos

Os fungicidas ditiocarbamatos deste tipo apresentam grupos ditiocarbamatos unidos por um grupo propileno entre os grupos amino (BARBERÁ, 1974), sendo o principal fungicida deste grupo o propineb.

Propineb

O propineb, propilenobisditiocarbamato de zinco, apresenta fórmula molecular $C_5H_8N_2S_4Zn$, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 8.

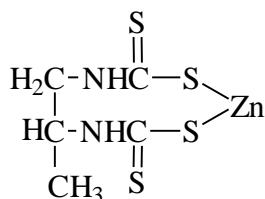


Figura 8 - Fórmula estrutural do propineb.

Características e propriedades (BARBERÁ, 1974):

- . sólido cinza;
- . decompõe-se a 130°C ;
- . insolúvel na maioria dos solventes orgânicos; e
- . instável em meio alcalino e ácido.

O propineb está classificado na classe IV, apresentando DL_{50} acima de 5.000 mg kg^{-1} (TOMLIN, 1994). O uso deste fungicida foi proibido no Brasil pela Portaria de nº 04, de 19 de fevereiro de 1995, da SNVS (FUNED, 1994).

2.2.4. Bissulfetos de tiuram

Os fungicidas ditiocarbamatos deste tipo apresentam dois grupos ditiocarbâmicos unidos pelos enxofres terminais e os hidrogênios dos grupamentos $-\text{NH}_2$ substituídos por grupos alquila. O principal fungicida deste tipo é o tiram.

Tiram

O tiram, tetrametiltiuram dissulfeto (TMTD), de fórmula molecular $C_6H_{12}N_2S_4$, é obtido pela oxidação do dimetilditiocarbamato de sódio, $C_3H_6NS_2Na$, em presença de peróxido de hidrogênio. A Figura 9 ilustra a fórmula estrutural do tiram. Guy (1934), citado por FREAR (1955), estudou primeiramente as propriedades inseticidas do tiram. Suas propriedades fungicidas foram constatadas anos depois.

Propriedades e características (FREAR, 1955):

- . sólido amarelo;
- . p.f. = 155-156°C;
- . solubilidade em água: 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ à temperatura ambiente;
- . pouco solúvel em etanol, e bastante solúvel em clorofórmio; e
- . não-fitotóxico.

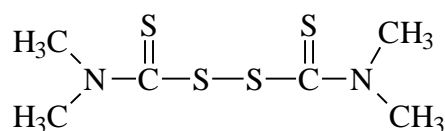


Figura 9 - Fórmula estrutural do tiram.

O tiram apresenta DL_{50} 2,5 mg kg^{-1} , segundo Bátorá (1982), citado por BRANDSTETEROVA et al. (1984b). Sua toxicidade crônica é de 200 mg kg^{-1} em coelhos, e o período de carência é de sete dias (BARBERÁ, 1974). Segundo o Codex Alimentarius Commission (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o tiram apresenta limite de ingestão diária de 0,005 mg kg^{-1} em seres humanos, citado pelo relatório sobre Ditiocarbamatos, do Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria de Saúde e do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul (1984).

No comércio é conhecido pelos nomes de Auram 700, Mayram, Rhodiauram 700, Vetran, Vitavax-Tiram PM Uniroyal, usados em plantações de trigo, soja, arroz, amendoim, sorgo, feijão, etc., de acordo com o Compêndio de Defensivos Agrícolas (1993).

2.3. Usos e mecanismos de ação

Os fungicidas são usados como protetores, desinfetantes e curativos. Como protetores são preventivos, capazes de aderir à superfície vegetal com a finalidade de constituir uma barreira tóxica que previne a penetração do fungo mediante, quase sempre, inibição do processo germinativo de seus esporos. Como desinfetantes, são erradicantes, aplicados às sementes, ao solo, aos instrumentos agrícolas e aos depósitos de produtos vegetais, com o objetivo de eliminar os fungos que os infestam. Como curativos, os fungicidas são quimioterápicos, atuando sobre o fungo já associado à planta enferma, eliminando o mesmo (PONTE, 1986).

Os fungicidas ditiocarbamatos são bastante usados na agricultura, principalmente como protetores contra fungos e repelentes de pássaros. Apresentam importância em análises inorgânicas na determinação de cobre, como aceleradores na vulcanização da borracha, sendo usados como antioxidantes, e em aplicações na medicina (CAIRNS e SHERMA, 1993). Como protetores, são usados, por exemplo, para prevenir ferrugem em sementes (como é o caso do tiram) e como protetores foliares, para prevenir manchas de folhas ou doenças que levam a planta à secura (por exemplo, o ferbam) (SHARVELLE, 1961).

Dentre os fungicidas ditiocarbamatos mais utilizados atualmente estão o maneb e o mancozeb. O maneb é usado como protetor de doenças, como a requeima da batata e do tomate (*Phytophthora infestans*), o míldio da videira (*Plasmopara viticola*) e a requeima da seringueira (*Phytophthora ssp.*). O mancozeb também é usado em doenças da batata e do tomate (queima ou pinta-preta e requeima), bem como em doenças de diversos outros produtos agrícolas,

tais como a antracnose da abóbora e do pepino, a ferrugem e mancha-púrpura da cebola e do alho, etc. (Compêndio de Defensivos Agrícolas, 1993).

Os fungicidas ditiocarbamatos apresentam dois mecanismos principais de ação. Os fungicidas do grupo dos dialquilditiocarbamatos (ferbam, ziram e tiram) agem no interior da célula, formando complexos com os metais pesados presentes, principalmente o cobre (II). O complexo formado deste metal é extremamente tóxico ao fungo. Os fungicidas DTC do grupo dos monoalquilditiocarbamatos (maneb, mancozeb e propineb) apresentam um hidrogênio ligado ao nitrogênio (grupo -NH-), podendo reagir com grupos tiólicos de enzimas e coenzimas, comprometendo processos vitais do organismo do fungo.

2.4. Degradação

Os fungicidas ditiocarbamatos são compostos pouco estáveis em condições ambientais, originando diversos produtos de degradação. Vários desses produtos de degradação são mais tóxicos que os DTC de origem.

Segundo estudos de Thorn et al. (1962), citados por BRANDSTETEROVA et al. (1984b), os fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos metálicos, como o ferbam, são convertidos em tetrametiltiuram monossulfeto (TMTM), tetrametiltiuram dissulfeto (TMTD) e tetrametiltiouréia (TMTU) (Figura 10).

Os etilenobisditiocarbamatos, EBTC, apresentam como principal produto de degradação a etilenotiouréia, ETU. A Figura 11 ilustra as reações da degradação dos etilenobisditiocarbamatos, segundo FISHBEIN e FAWKES (1965).

A ETU faz parte da formulação dos EBTC, e os níveis de resíduos dependem das condições de estocagem, principalmente, dos níveis de umidade. A legislação italiana permite, em um máximo de 2% de umidade, 0,5% de ETU (CAMONI et al., 1988). De acordo com o USA: Drinking Water Guideline for ETU, citado por GRISOLIA (1995), doses acima de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em água

aumentam o risco de desenvolvimento de hiperplasia da tireóide (bócio) e o risco de câncer de fígado.

Estudos relatados na literatura comprovam que a ETU é um agente teratogênico, mutagênico e, em altas concentrações, cancerígeno (CAMONI et al., 1988).

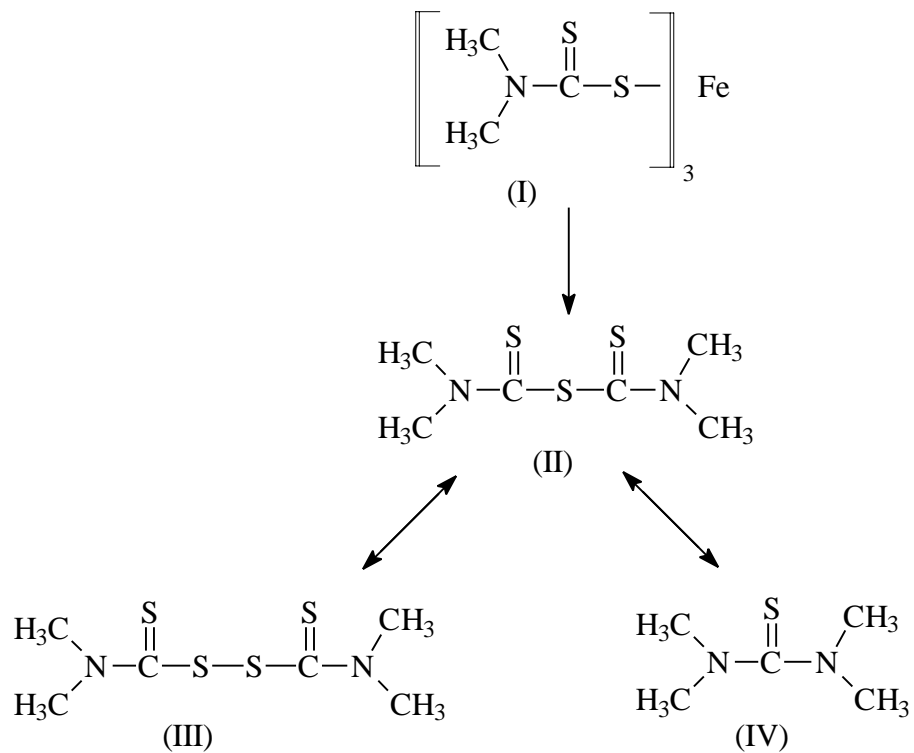


Figura 10 - Degradação do (I) ferbam, sendo (II) TMTM, (III) TMTD e (IV) TMTU (BRANDSTETEROVA et al., 1984b).

2.5. Métodos utilizados para determinação de ditiocarbamatos

As propriedades físicas e químicas dos fungicidas ditiocarbamatos dificultam as metodologias de análises dos níveis de resíduos desses compostos (CAIRNS e SHERMA, 1993). Essas dificuldades são ocasionadas principalmente pela baixa solubilidade em água e solventes orgânicos, pela indefinição de suas massas moleculares (muitos ditiocarbamatos são polímeros) e, ainda, pela baixa estabilidade, principalmente no caso dos EBTC, segundo Newsome (1980), citado por CAIRNS e SHERMA (1993).

Geralmente, os métodos utilizados não apresentam a possibilidade de identificação do fungicida, ou então são específicos para determinações individuais de alguns DTC. Vários métodos citados na literatura são próprios para determinações simultâneas de ditiocarbamatos que não são mais utilizados atualmente na agricultura.

2.5.1. Métodos espectrofotométricos

Os métodos espectrofotométricos são os mais baratos para determinação de resíduos de DTC, pois são mais econômicos e de fácil execução. Um dos métodos empregados neste trabalho foi o método clássico de determinação espectrofotométrica, desenvolvido por CLARKE et al. (1951), com algumas modificações. Este método baseia-se na decomposição ácida do ditiocarbamato, pela qual há liberação quantitativa de dissulfeto de carbono (CS_2), o qual é extraído em reagente cromóforo de Cu(II) e dietanolamina, desenvolvendo coloração amarela.

Várias modificações deste método são relatadas na literatura, tanto em termos de equipamentos como em parâmetros de determinação (CARVALHO e YOKOMIZO, 1988). CULLEN (1964) utilizou acetato de zinco em substituição ao acetato de chumbo, para eliminar interferentes (H_2S , SO_2), e dietanolamina em substituição à dietilamina, como reagente cromóforo. Mais tarde, KEPPEL

(1969) modificou novamente o método, introduzindo um agente redutor (cloreto estanoso) e ácido clorídrico diluído em substituição ao ácido sulfúrico. A seguir, KEPPEL (1971) sugeriu, em um novo estudo, a decomposição ácida do ditiocarbamato a partir da temperatura do ambiente, seguida de aumento gradual da temperatura, em substituição à adição de ácido previamente aquecido. A partir de então o método foi pouco modificado.

A reação do CS₂ com os reagentes cromóforos resulta na formação de dois complexos, os quais apresentam absorções máximas em comprimentos de onda diferentes. O complexo 1:1 apresenta $\lambda_{\text{máx}} = 370$ nm, e o complexo 1:2 apresenta $\lambda_{\text{máx}} = 430$ nm. Nas determinações espectrofotométricas, segundo LOWEN (1951), KEPPEL (1971), CULLEN (1964), CARVALHO e YOKOMIZO (1988) e FUNED (1994), o $\lambda_{\text{máx}}$ que deve ser usado é do complexo 1:2 de 430 nm.

Esse método apresenta limite de detecção de 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em CS₂ (LOWEN, 1951), oriundo da degradação ácida do DTC presente na amostra. É um método viável economicamente, bastante usado em análise de rotina, porém não identifica o DTC presente na amostra. Atualmente sua eficiência vem sendo questionada (CARVALHO e YOKOMIZO, 1988). Visando aprimorá-lo, fez-se uso do método de Calibração Multivariada-PLS ("Partial Least Squares"), a ser discutido no item 3.

Outros métodos espectrofotométricos foram desenvolvidos. VERMA et al. (1983) desenvolveram um método também baseado na hidrólise ácida dos fungicidas DTC. O CS₂ formado é borbulhado em uma solução de α -toluenotiol e hidróxido de potássio em 80% de álcool *tert*-butílico, ocorrendo a formação de um composto amarelo de benzil tritiocarbamato de potássio. Entretanto, este método apresenta um limite de detecção de 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em CS₂, superior ao método anterior, não sendo utilizado para determinação de níveis de resíduos, mas somente para determinações do composto ativo na formulação do fungicida.

Outro método, desenvolvido por MALIK e RAO (1990), para determinação do dibam, dietilditiocarbamato de sódio, tiram, ziram, N-metilpi-

perazinacarbotidioato de sódio e morfolina-4-carbodioato de potássio, baseia-se na conversão destes fungicidas em complexos de ditiocarbamato de selênio. Os complexos formados são extraídos em clorofórmio e medidos em 430 nm. Este método, apesar de apresentar boa sensibilidade (5,0; 6,0; 4,6; 4,0; 10,0 e 9,8 µg, respectivamente para dibam, dietilditiocarbamato de sódio, tiram, ziram, N-metilpiperazinacarbotidioato de sódio e morfolina-4-carbodioato de potássio), não possibilita identificar os fungicidas presentes, dentre os quais quatro deles não são citados para uso pelo Compêndio de Defensivos Agrícolas (1993). Outro fator importante são os interferentes do método, como o Zn^{2+} , geralmente presente nas formulações na forma de sulfato de zinco, como agente estabilizante.

Também foram desenvolvidos métodos em que os metais presentes nos fungicidas ditiocarbamatos são os responsáveis pela determinação espectrofotométrica. Estes métodos, apesar de mais sensíveis, não levam em conta a degradação do fungicida, uma vez que é pela parte inorgânica que se faz a detecção.

Um método bastante efetivo para determinação espectrofotométrica do maneb foi descrito por QUINTERO et al. (1989). Este método se baseia na ação catalítica do manganês na reação do indicador verde de malaquita com periodato de sódio (em presença de ácido nitrilotriacético), usando a técnica “stopped-flow” de mistura de reagentes. A reação é monitorada por meio da descoloração do verde de malaquita, medindo-se o declínio da absorvância em 615 nm, sendo linear na faixa de 1-90 ng mL⁻¹ em maneb. Este método pode ser aplicado para determinar o ingrediente ativo na formulação do fungicida e para análises de resíduos em vegetais, sem necessidade de extração, uma vez que o maneb é hidrolisado em ácido nítrico concentrado. Este método não apresenta seletividade entre maneb e mancozeb, sendo este último um polímero que também apresenta manganês em sua constituição.

MALIK e RAO (1991) utilizaram difenilcabazona como agente complexante dos íons Zn^{2+} e Fe^{3+} presentes em alguns DTC. Este método é restrito a três fungicidas, como o ziram, ferbam e zineb, sem possibilidade de

identificação. Apresenta vários interferentes, entre cátions e ânions e outros fungicidas ditiocarbamatos, como nabam e maneb.

MALIK et al. (1991) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos, tiram, ziram, ferbam e dietil-ditiocarbamato de sódio (NaDDC), baseado na conversão dos mesmos em complexos de cromo (III). Os complexos são extraídos com naftaleno fundido e suas absorções medidas em 430 nm. O método é bastante sensível, detectando um mínimo de 6,0; 1,0; 8,0; 7,0 e 12 µg de dibam, tiram, ziram, ferbam e NaDDC, respectivamente, sendo os equivalentes em CS₂ de 3,18; 4,42; 2,65; 3,82 e 4,6 µg de CS₂.

VERMA et al. (1992) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de zineb e mancozeb, baseado na reação destes ditiocarbamatos com níquel (II) em dimetilsulfóxido e metanol. Os complexos de níquel formam-se instantaneamente e são medidos em 380 nm. Estes complexos amarelos de níquel são estáveis por duas horas, apresentando linearidade entre a concentração e a leitura de absorvância acima de 12 µg mL⁻¹.

AGRAWAL et al. (1992) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação do zineb, baseado na liberação de sulfeto de hidrogênio (H₂S), proveniente do zineb. O H₂S é absorvido em uma solução de sulfonato de N-N-dimetil-p-fenileno diamina e cloreto férrico, formando o azul de metileno. A linearidade é obedecida na faixa de concentração de 3 a 32 µg mL⁻¹.

WALASH et al. (1993) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de maneb e zineb e ETU, produto da degradação destes dois fungicidas, usando 2,6-dibromoquinona clorimida (DBQ) e 2,6-dicloroquinona clorimida (DCQ) como reagentes cromóforos. Solução de EDTA foi usada como solvente, onde os EBTCs reagem com DBQ ou DCQ, produzindo um composto de coloração vermelha, com $\lambda_{\text{máx}} = 495$ nm. A ETU, por sua vez, produz um composto de cor amarela, com $\lambda_{\text{máx}} = 385$ nm. A percentagem de extração do maneb e zineb em pepino foi de 94,5% e, em tomate, de 89,2%.

Outro método empregado neste trabalho foi proposto por RAO et al. (1993), para determinação específica do maneb, com devidas modificações. O método determina os níveis de resíduos de maneb, baseado na extração do manganês complexado com 1-(2'-piridilazo)-2-naftol (PAN). O complexo Mn-PAN é extraído em isobutil metil cetona (MIBC) e sua absorção é medida em 550 nm. Este método é mais sensível que o método clássico de hidrólise ácida, podendo detectar um mínimo de $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$ em maneb. A presença de zinco, presente na formulação do fungicida na forma de sulfato de zinco, é mascarada com adição de fluoreto. Porém, o inconveniente deste método é a não-seletividade perante o fungicida mancozeb, o qual também apresenta manganês em sua constituição.

KAPOOR e RAO (1994) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de ziram e zineb, baseado na conversão dos mesmos em complexos de 4-(2-piridilazo)-resorcinol, que é dissolvido em acetona e água e depois medido em 490 nm. A linearidade obtida foi na faixa de concentração de $0,025-1,25$ e $0,025-1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ziram e zineb, respectivamente. O limite de detecção dos dois fungicidas foi de $0,20 \mu\text{g g}^{-1}$ em produtos alimentícios.

Recentemente, MARTINEZ et al. (1994) empregaram o método de hidrólise ácida, usando reagente cromóforo de Cu (II) para determinação da mobilidade dos dois fungicidas metam e tiram em amostras de solos. A curva de persistência do tiram foi determinada em crescimento de feijão e melão em estufas, sendo o tempo médio de persistência de 10,6 e 12,2 dias, respectivamente.

Enzimas podem ser usadas como sensores para detecção de pesticidas. Segundo MARTY et al. (1993), os fungicidas ditiocarbamatos inibem a enzima aldeído desidrogenase. Utilizando sensor NADH, o maneb foi detectado em níveis de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5.2. Métodos cromatográficos

Os primeiros trabalhos publicados sobre análises cromatográficas de fungicidas ditiocarbamatos citam a cromatografia em papel (CP) e a

cromatografia em camada delgada (CCD). MACKINLEY et al. (1960) descreveram uma técnica de CP em que foram observados que os grupos dos ditiocarbamatos apresentavam fatores de retenção (Rfs) diferentes. De acordo com seus resultados, o grupo dos ditiocarbamatos metálicos e o grupo dos bissulfetos de tiuram apresentavam Rfs bem maiores que os EBTC em fase móvel, constituídas de solução 5 % de formamida em clorofórmio.

HYLIN (1966) propôs uma técnica de CCD mais eficiente para identificação de DTC. Segundo seus resultados, o maneb e outros três DTC (tiram, ziram e zineb), como também um produto de degradação dos ditiocarbamatos metálicos, o TMTD (tetrametilmonossulfeto de tiuram), podem ser identificados simultaneamente. O grupo dos ditiocarbamatos metálicos e o tiram apresentaram Rfs bem menores que os EBTC, utilizando como fases móveis benzeno e benzeno:metanol:ácido acético (48:8:4) e cloreto cuproso como reagente revelador. O maneb apresentou desenvolvimento de cor marrom ante o reagente revelador, e os demais fungicidas apresentaram desenvolvimento de cor amarela. Esta técnica foi usada neste trabalho para identificação prévia da presença do maneb nas amostras coletadas de tomate.

Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são mais efetivos para identificação e quantificação dos produtos de degradação dos DTC, e as cromatografias de adsorção e de fase reversa (fase móvel polar e fase estacionária apolar) são as mais usadas (BRANDSTETEROVA et al., 1984a).

A separação dos fungicidas DTC é bastante complicada. Muitos trabalhos baseiam esta separação na conversão dos fungicidas em um sal mais estável. Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura cita apenas a identificação do ferbam e dos seus produtos de degradação, ou outros DTC, com grande diferença nas estruturas, não empregados na agricultura atualmente.

BRANDSTETEROVA et al. (1984a) estabeleceram condições ótimas para separação simultânea do ferbam e dos seus produtos de degradação, utilizando como fase móvel acetonitrila:metanol:água (37:33:30). Seus resultados mostram que os produtos de degradação variam com a temperatura. Em

temperaturas menores (323 K), o principal produto de degradação é o tetrametildissulfeto de tiuram (TMTD), enquanto em temperaturas maiores (423 K) o principal produto de degradação é o tetrametilmonossulfeto de tiuram (TMTM), formando pequenas quantidades de tetrametiltiouréia (TMTU). Isto ocorre em virtude de o ponto de fusão do TMTD ser de 418 K, sendo decomposto a TMTM.

Em outro trabalho, BRANDSTETEROVA et al. (1984b) estudaram a influência da radiação UV na degradação do ferbam. Utilizando cromatografia de fase reversa, eles mostraram que uma irradiação de apenas 5 minutos é necessária para degradar o fungicida, sendo o TMTD o principal produto de degradação formado. À medida que o ferbam é exposto à radiação, há elevação nos níveis de TMTU e TMTM, sendo o TMTM formado depois da degradação do TMTD.

BRANDSTETEROVA et al. (1986) determinaram níveis de ferbam e seus produtos de degradação em amostras de tabaco, milho e morango por CLAE. Eles utilizaram cromatografia de fase reversa, detector UV (254 nm), clorofórmio e metanol como solventes extratores e acetonitrila:metanol:água (40:35:25) como fase móvel. O limite de detecção encontrado para os resíduos de ferbam foi de $0,014 \mu\text{g mL}^{-1}$. O melhor solvente extrator foi o clorofórmio, e os níveis de resíduos encontrados estavam dentro dos critérios da FAO (Codex Alimentarius).

KANIWA (1987) desenvolveu um método de cromatografia de alta eficiência (CLAE) para determinação de fungicidas ditiocarbamatos de zinco após conversão destes em complexos metálicos de Co(III) correspondentes. Hutchins et al. (1982), citados por KANIWA (1987), verificaram que não houve formação de picos usando coluna de aço inox, em virtude da possível reação de substituição entre as partes metálicas dos fungicidas e constituintes da coluna. Hulanick (1967), citado por KANIWA (1987), concluiu que ditiocarbamatos de Co(III) são estáveis e não reagem com outros ligantes e outros íons metálicos. Smith et al. (1981), citados por KANIWA (1987), verificaram a conversão de ditiocar-bamatos de sódio em ditiocarbamatos de Co(III), quando injetados no sistema CLAE, usando fase móvel contendo Co(III). Também observaram uma

mistura de complexos de Co(III) quando dois ditiocarbamatos de sódio foram injetados juntos. No trabalho de KANIWA (1987) tem-se a separação dos complexos de Co(III) formados de diferentes ditiocarbamatos, tais como: dimetilditiocarbamato de zinco, dietilditiocarbamato de zinco, dibutilditiocarbamato de zinco, difenilditiocarbamato de zinco e pentametileno ditiocarbamato de zinco. Fez-se uso de coluna de fase reversa Nucleosil 5C18, fase móvel de metanol:água (85:15) e detector UV (320 nm).

LEHOTAY et al. (1992) identificaram e determinaram alguns produtos de degradação do mancozeb por CLAE e Espectrometria de Massa (EM). A identificação e a determinação basearam-se na separação semipreparativa do sulfeto de etilenobisdiisotiocianato (EBIS) e do etilenobistiuramdisulfeto (ETD). Esses compostos foram preparados pela reação de oxirredução entre o iodo e o etilenobisditiocarbamato de sódio. A espectrometria de massa foi aplicada para identificação de EBIS e ETD. CLAE de fase reversa foi usada para determinação destes dois produtos de degradação extraídos do mancozeb, utilizando metanol.

LEHOTAY e KISOVA (1993) estudaram a degradação do mancozeb, empregando CLAE, depois da aplicação da suspensão de mancozeb em pepinos. As extrações foram feitas com solução aquosa de EDTA. Os níveis de sal de sódio (nabam) formados foram diretamente determinados por CLAE em coluna de separação NH₂, solução aquosa de borato pH = 7,6 com acetonitrila 5 % e metanol 45 %, como fase móvel. A aplicação de níveis de 360 µg g⁻¹ em mancozeb apresentou tempo médio de persistência de 14 dias.

ROLAND et al. (1992) descreveram uma técnica de determinação do tiram na presença de fungicidas etilenobisditiocarbamato e propilenobisditiocarbamato, com base em suas solubilidades relativas em determinados solventes orgânicos. O tiram é extraído com diclorometano ou acetonitrila. Depois é purificado em microcoluna de C18, sendo determinado por CLAE com detector UV em 280 nm. A recuperação do tiram proveniente de morango e maçã foi maior que 90%, e o limite de detecção foi de 0,05 mg kg⁻¹

A separação de complexos metálicos de alguns ditiocarbamatos por CLAE é bastante eficiente. Estudando a conversão de dietilditiocarbamato de sódio (DDC) e pirrolidinaditiocarbamato de amônio em diversos complexos metálicos, WANG e WAI (1994) verificaram boa separação dos complexos de Co(III), Cr(III), Cu(II), Hg(II), Ni(II), Pd(II), Pt(II), Se(IV) e Te(IV), usando como fase móvel acetonitrila:água (70:30). A troca de ligantes com níquel (II), constituinte da coluna de aço inox, não permite a análise qualitativa de alguns complexos metálicos de DDC, incluindo As(III), Mn(II), Mo(VI), Sb(III), Tl(I) e Zn(II), em razão da menor constante de estabilidade destes complexos em relação ao complexo Ni-DDC. A reação pode ser eliminada com coluna sem metal PEEK. Os complexos de pirrolidinaditiocarbamato são menos estáveis que os de DDC e apresentam baixa solubilidade em metanol e acetonitrila, acarretando resultados inferiores.

A cromatografia em fase gasosa (CG) é também bastante utilizada, sendo baseada na degradação do fungicida, pela qual se detecta a formação do CS₂. Esta técnica não permite a identificação dos fungicidas presentes em amostras desconhecidas. Como exemplo de cromatografia gasosa tem-se a CG com “head space”, descrita por Macleod e Ritcey (1973), citados por MAINI e BONI (1986). Este método mostrou ser ineficiente em virtude da dificuldade na dissolução do CS₂ numa ordem linear de detecção. MAINI e BONI (1986) obtiveram uma melhor linearidade na faixa de 0-25 ng em CS₂, utilizando o solvente 2,2,4-trimetilpentano.

3. CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

3.1. Quimiometria

A quimiometria é uma técnica que aplica métodos estatísticos e matemáticos, baseados em lógica matemática, para solucionar problemas de origem química.

Com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, impulsionada com o advento do uso do computador em laboratório, cresceu a possibilidade de manipulação de grandes quantidades de dados obtidos de análises instrumentais.

Os sistemas multivariados vêm sendo bastante utilizados atualmente; nestes pode-se medir a concentração de muitas espécies simultaneamente, ao se analisar uma amostra qualquer. Programas matemáticos são usados para tratamento de dados mais complexos, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades, por exemplo) com os resultados desejados (concentrações). Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental num dado químico de interesse requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica (POPPI, 1993).

3.1.1. Matrizes: suas notações e representações

Aqui será empregada a notação normalmente usada em álgebra linear. Letras maiúsculas em negrito representarão matrizes, e letras minúsculas, também em negrito, representarão vetores (linhas ou colunas de matrizes). As letras minúsculas normais representarão escalares, que podem ser elementos de matrizes (a_{ij}), de vetores (a_j) ou constantes. A transposta de uma matriz ou vetor será representada por um sobrescrito “T”, como por exemplo \mathbf{X}^T . A operação da transposição é dada pela troca das linhas pelas colunas.

BEEB e KOWALSKI (1987) publicaram uma revisão sobre notações de matrizes que será descrita a seguir. Segundo estes autores, uma matriz pode ser representada graficamente tanto no espaço das linhas como no espaço das colunas. O espaço das linhas é formado com as linhas da matriz como eixos. Para n colunas, o espaço das linhas consiste em colocar em gráfico n pontos (cada ponto correspondendo a uma coluna). A Figura 12 ilustra uma matriz \mathbf{R} no espaço das linhas, sendo:

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} 2 & 3 & 4 \\ 1 & 0 & 6 \end{bmatrix}$$

Analogamente, a matriz representada no espaço das colunas apresenta dois pontos tridimensionais. A Figura 13 representa a matriz \mathbf{R} no espaço das colunas, no qual as colunas formam os eixos e as linhas, os pontos tridimensionais.

Um outro conceito importante é a projeção de um vetor sobre um plano. A Figura 14 ilustra a projeção de um vetor \mathbf{a} sobre um plano. A projeção de um vetor originado de uma matriz \mathbf{R} resulta em dois vetores: os “scores” e os “loadings”.

O último conceito básico importante é o de fator, porque os Métodos de Calibração Multivariada, que serão vistos a seguir, são processos de modelagem

de fatores. Segundo uma definição geral, fator é uma combinação linear de variáveis originadas de uma matriz \mathbf{X} ou \mathbf{Y} , as quais serão relacionadas.

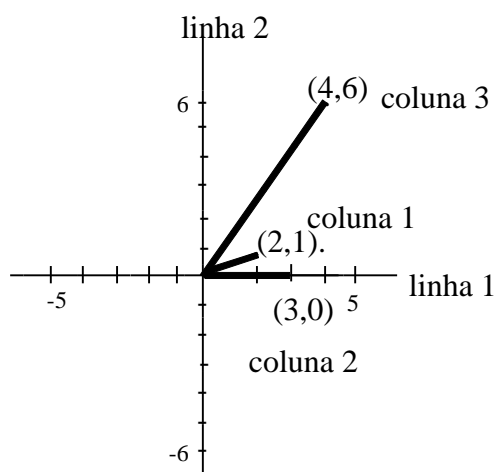


Figura 12 - Representação da matriz \mathbf{R} no espaço das linhas.

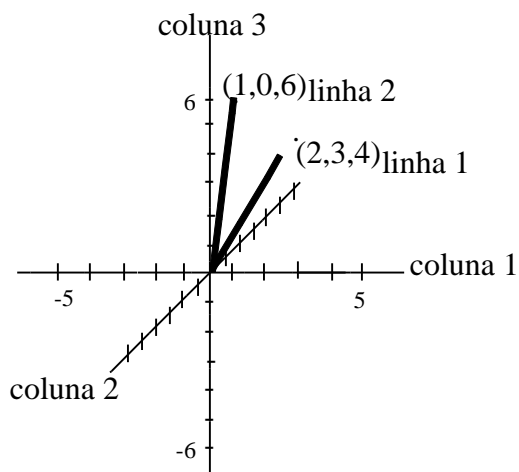


Figura 13 - Representação da matriz \mathbf{R} no espaço das colunas.

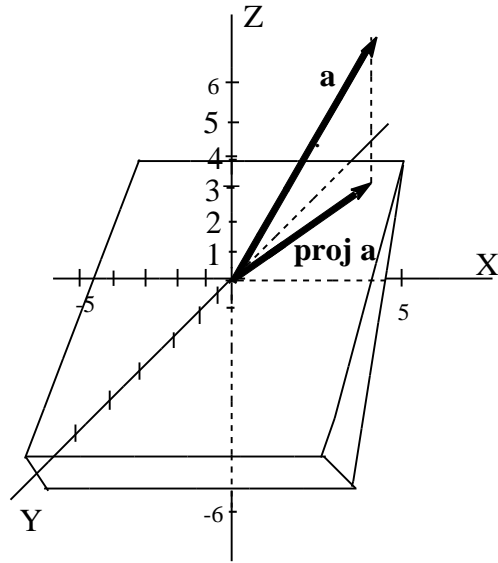


Figura 14 - Projeção de um vetor **a** sobre um plano.

Para ilustrar essas relações entre as variáveis originadas de uma matriz, supõe-se uma matriz **R** 5 x 2, que pode ser representada por um vetor que descreve toda sua variância, sendo:

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} 2 & 4 \\ 1 & 2 \\ 0 & 0 \\ -1 & -2 \\ -2 & -4 \end{bmatrix}$$

No espaço das colunas a matriz tem cinco pontos em duas dimensões, apresentando um primeiro vetor passando por seus pontos, como mostra a Figura 15.

Neste exemplo toda a variação nos dados pode ser descrita por apenas um vetor. Como todas as amostras de dados apresentam linhas decrescentes no espaço das colunas, toda variação segue em uma direção.

Quando toda variação não é estimada usando somente um vetor, um segundo vetor ortogonal ao primeiro pode ser estabelecido. A Figura 16 representa o gráfico de uma matriz 30 x 2, plotada no espaço das colunas,

associada aos dois primeiros vetores. A direção do primeiro vetor descreve o máximo da quantidade de variação ou espalhamento dos dados.

Para ilustrar como os vetores podem definir fatores para uma matriz \mathbf{R} , tem-se a seguinte combinação linear:

$$\mathbf{R}\mathbf{v} = \mathbf{u}$$

em que \mathbf{R} é a matriz original, \mathbf{v} é o primeiro vetor da combinação linear $\mathbf{R}^T\mathbf{R}$ e \mathbf{u} é o vetor "score" da projeção de \mathbf{v} .

Quando J vetores "scores" são calculados da combinação linear $\mathbf{R}^T\mathbf{R}$, formando uma matriz \mathbf{U} de vetores "scores", as variáveis em \mathbf{R} podem ser expressas como uma combinação linear de "scores":

$$\mathbf{R}\mathbf{V}\mathbf{V}^T = \mathbf{U}\mathbf{V}^T$$

$$\mathbf{R} = \mathbf{U}\mathbf{V}^T(\mathbf{V}\mathbf{V}^T)^{-1}$$

em que $\mathbf{V}^T(\mathbf{V}\mathbf{V}^T)^{-1}$ é denominado inversa geral de \mathbf{V} e seus elementos são denominados "loadings".

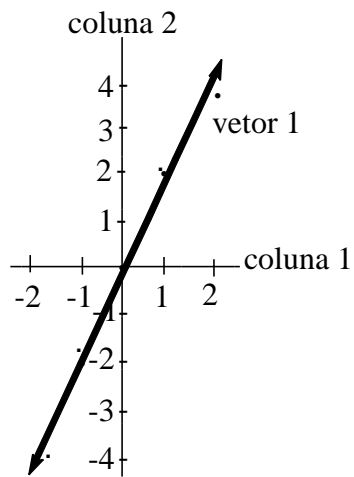


Figura 15 - Representação da matriz \mathbf{R} no espaço das colunas com seu primeiro vetor.

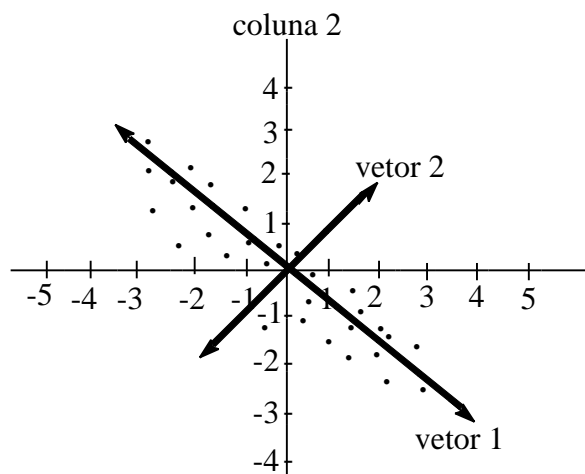


Figura 16 - Representação de uma matriz 30×2 em gráfico no espaço das colunas.

3.1.2. A relação entre duas matrizes de dados

Os dados químicos multivariados podem ser arranjados na forma de uma tabela de dados, onde objetos (geralmente compostos químicos e amostras) são dispostos em linhas e variáveis (geralmente valores de concentração, pH, condutividade, absorvância, etc.) são dispostas em colunas (POPPI, 1993).

A tabela de dados pode ser representada como uma matriz, do tipo mostrado na Figura 17, com n linhas e p colunas, em que o elemento x_{ki} indica o valor do k -ésimo objeto e da i -ésima variável.

	variáveis →		
	1	i	p
objetos ↓			
1	x_{11}	x_{1i}	x_{1p}
k	x_{k1}	x_{ki}	x_{kp}
n	x_{n1}	x_{ni}	x_{np}

Figura 17 - Matriz de dados químicos.

É possível estabelecer uma relação entre duas matrizes de dados \mathbf{X} e \mathbf{Y} , quando houver dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. A forma de estabelecer esta relação é a base da Calibração Multivariada (BEEB e KOWALSKI, 1987).

A estatística multivariada é um importante instrumento matemático que pode ser aplicado em análises químicas quando mais de uma medida é requerida para cada amostra.

A calibração multivariada consiste basicamente de duas fases: a Calibração e a Previsão. Na fase da Calibração toma-se como exemplo o caso a ser estudado neste trabalho: n espectros de soluções-padrões de CS_2 , contendo

Cu^{2+} numa concentração fixa, em p comprimentos de onda, formando uma matriz \mathbf{X} , com n linhas e p colunas; e também outra matriz, \mathbf{Y} , contendo n linhas, correspondendo às concentrações, e q colunas, indicando o número dos constituintes das soluções de CS_2 e Cu^{2+} .

O próximo passo é determinar o modelo matemático mais apropriado que melhor reproduza a relação entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Este modelo é usado na fase da Previsão, para estimar as concentrações dos constituintes de novas amostras a partir de seus espectros ($\mathbf{X}_{\text{teste}}$).

A Figura 18 ilustra a organização dos dados da Calibração Multivariada. Os valores de absorvância dos espectros, a cada comprimento de onda, são as variáveis independentes, e as concentrações dos constituintes, as variáveis dependentes.

Muitas vezes, antes que o modelo seja desenvolvido, é conveniente tratar os dados de modo a tornar os cálculos computacionais melhor condicionados. Normalmente, o primeiro passo envolve um escalonamento, fazendo com que cada variável tenha a mesma influência no estágio inicial dos cálculos. Essa operação é realizada pela divisão de todos os termos de uma certa variável pelo desvio-padrão, de forma que a variância se torna unitária. Isto assegura que as influências relativas das diferentes variáveis sobre os cálculos sejam independentes das suas unidades, já que passam a ser expressas em unidades de desvio-padrão (POPPI, 1993).

Métodos de calibração Multivariada têm sido cada vez mais empregados em química analítica, principalmente quando limitações analíticas estão presentes, como desvios de linearidade, interação entre componentes analíticos e bandas sobrepostas. Para solucionar esses problemas, o Método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS), do inglês “Partial Least Squares”, tem sido desenvolvido, sendo mais adaptável aos problemas de calibração do que à regressão linear comum (BEEB e KOWALSKI, 1987).

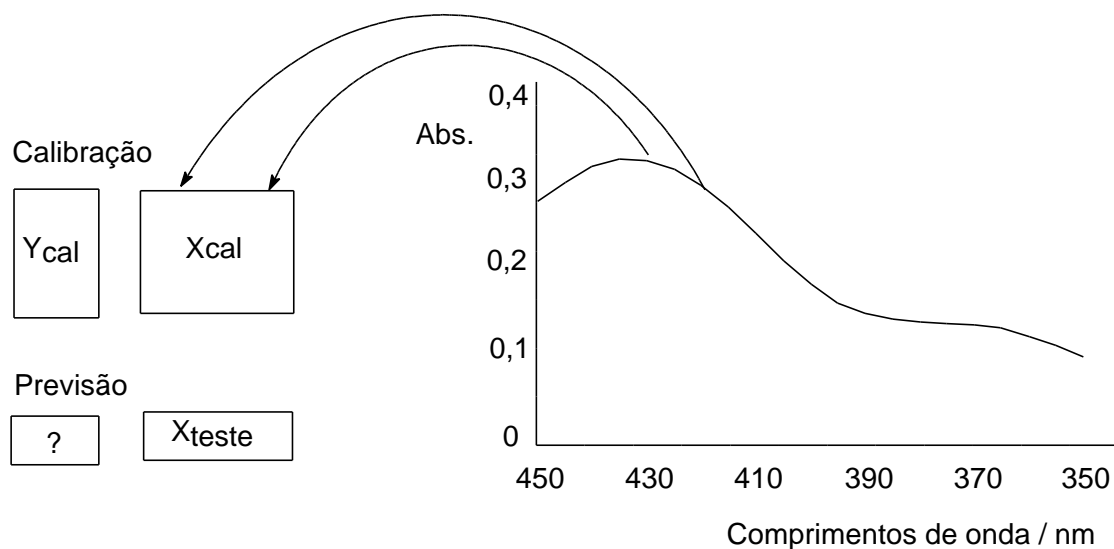


Figura 18 - Organização dos dados para calibração multivariada.

Para um entendimento do PLS, tópicos básicos de Análises de Componentes Principais (PCA) e Regressão de Componentes Principais (PCR) serão mostrados a seguir, sem a pretensão de fornecer um tratamento aprofundado dos mesmos.

3.2. Análise de componentes principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi introduzida na química no final dos anos 60 (MALINOWSKI, 1991).

Os principais objetivos desta técnica são encontrar relações entre os objetos e classificá-los de acordo com suas similaridades. Outro objetivo importante é a redução de dados, que é muito útil quando grandes quantidades de informações necessitam ser manipuladas.

A Análise de Componentes Principais (PCA) consiste na aproximação de uma tabela de dados, uma matriz \mathbf{X} , em termos da soma de várias matrizes \mathbf{M}_i , que não podem ser expandidas, e mais uma matriz de erros. As matrizes \mathbf{M}_i

constituem os chamados componentes principais e são formadas pelo produto de dois vetores, \mathbf{t} (os “scores”) e \mathbf{p} (os “loadings”):

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1 + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2 + \dots + \mathbf{t}_a\mathbf{p}_a + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$$

para “a” componentes principais. A Figura 19 ilustra a representação gráfica dessas simulações de matrizes (POPPI, 1993).

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em \mathbf{X} , ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes \mathbf{M}_i necessárias para descrever \mathbf{X} . Isto corresponde ao número de colunas em \mathbf{T} , ou linhas em \mathbf{P} . Por conseguinte, é possível descrever uma matriz \mathbf{X} , formada por muitas variáveis, por um número pequeno destas matrizes \mathbf{M}_i , havendo decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação.

Um operador deve ser encontrado, de modo que projete as linhas de \mathbf{X} em uma única dimensão (um vetor). Assim, cada uma das linhas passará a ser representada por um escalar. Outro operador também se faz necessário para projetar as colunas de \mathbf{X} da mesma forma que as linhas foram projetadas. Então, cada linha e cada coluna passarão a ser representadas por um escalar. Com a determinação destes operadores criam-se os “scores”, para os escalares das linhas, e os “loadings”, para os escalares das colunas. Esses vetores são ortogonais entre si. A Figura 20 representa a formação dos “loadings” e dos “scores”.

$$\begin{array}{c}
 \boxed{\mathbf{X}} = \boxed{\mathbf{M}_1} + \boxed{\mathbf{M}_2} + \dots + \boxed{\mathbf{M}_a} + \boxed{\mathbf{E}} \\
 \\
 \boxed{\mathbf{X}} = \begin{array}{c} \overline{\mathbf{p}_1} \\ | \\ \mathbf{t}_1 \end{array} + \begin{array}{c} \overline{\mathbf{p}_2} \\ | \\ \mathbf{t}_2 \end{array} + \dots + \begin{array}{c} \overline{\mathbf{p}_a} \\ | \\ \mathbf{t}_a \end{array} + \begin{array}{c} \overline{\mathbf{p}_e} \\ | \\ \mathbf{t}_e \end{array} \\
 \\
 \boxed{\mathbf{X}} = \boxed{\mathbf{T}} \quad \boxed{\mathbf{P}}
 \end{array}$$

Figura 19 - Representação gráfica do método PCA.

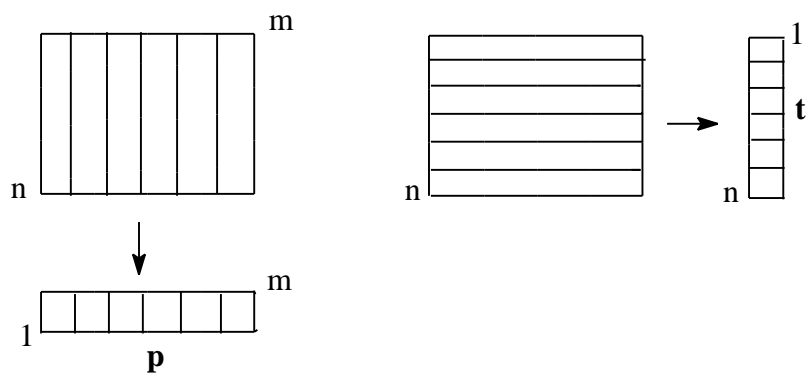


Figura 20 - Formação dos vetores projeções "scores" (\mathbf{t}) e dos "loadings" (\mathbf{p}).

3.3. Regressão de componentes principais (PCR)

Este método de Calibração Multivariada consiste inicialmente em aplicar a Análise de Componentes Principais à matriz de variáveis independentes \mathbf{X} , resultando na representação dos objetos (linhas de \mathbf{X}) como sua matriz de "scores" \mathbf{T} , formando um novo conjunto de variáveis independentes (POPPI, 1993).

Numa segunda etapa, utiliza-se a Regressão Linear Múltipla para estabelecer a relação entre o bloco das variáveis dependentes, a matriz \mathbf{Y} , e a matriz de "scores" \mathbf{T} , que é o novo bloco de variáveis independentes. A fórmula para a Regressão Linear Múltipla pode ser estabelecida como:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{TB} + \mathbf{E}$$

e a solução para os coeficientes de regressão baseados nos mínimos quadrados é :

$$\mathbf{B} = (\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^T\mathbf{Y}$$

em que $(\mathbf{T}^T\mathbf{T})^{-1}\mathbf{T}^T$ é a inversa geral de \mathbf{T} , sendo seus elementos constituídos de "loadings" \mathbf{p} .

3.4. Método dos mínimos quadrados parciais (PLS)

Os primeiros trabalhos utilizando PLS em química foram realizados no início dos anos 80 por Wold e Martens, citados por MALINOWSKI (1991).

Dentre as vantagens desse modelo sobre os modelos clássicos de Regressão Linear Múltipla e de Regressão de Componentes Principais está a facilidade na programação, pois seu algoritmo é relativamente curto e fácil de ser implementado.

A construção do modelo do PLS se faz inicialmente pela representação das variáveis independentes \mathbf{X} e das variáveis dependentes \mathbf{Y} , como na Análise de Componentes Principais:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ} + \mathbf{F}$$

em que os elementos de **T** e **U** são os "scores" de **X** e **Y**, respectivamente, e os elementos de **P** e **Q** são os "loadings" oriundos dessas matrizes. Os elementos das matrizes **E** e **F** são os erros associados com a modelagem de **X** e **Y** com o PLS.

Uma relação entre os dois blocos pode ser realizada correlacionando os "scores" para cada componente de cada vez, utilizando-se um modelo linear. Usando **X** e **Y** para estimar fatores, estes têm as seguintes correlações:

$$\mathbf{u} = \mathbf{b}\mathbf{t} + \varepsilon$$

em que **b** é uma condição de relação entre **u** e **t**, usado para calcular subseqüentes fatores de acordo com a dimensionalidade de **X**, e ε é o erro.

A Figura 21 representa um hipotético exemplo de uma matriz (BEEB e KOWALSKI, 1987) de resposta instrumental 6 x 3 e a correspondente matriz de concentração 6 x 3, grafadas em seus espaços das colunas. A direção dos primeiros fatores do PLS demonstra a variação das amostras nos respectivos espaços (Figura 21a). A habilidade do PLS é estabelecer uma relação linear entre **t** e **u** (Figura 21b). Esse modelo, entretanto, não é o melhor possível. Isto porque a Análise de Componentes Principais é realizada em cada matriz separadamente, podendo resultar numa relação não muito satisfatória (não-linear) entre os "scores" dos dois blocos. Deve-se buscar um modelo em que as matrizes de resíduos **E** e **F** sejam as menores possíveis e, ao mesmo tempo, obter uma relação linear entre **t** e **u**.

No PLS isto é realizado por uma leve mudança nos valores dos "scores", de forma a produzir a melhor relação possível. Como pode ser notado, há um compromisso entre a habilidade dos componentes principais em descrever as amostras nos espaços individuais (modelagem dos blocos **X** e **Y**) e o aumento na relação entre **t** e **u**.

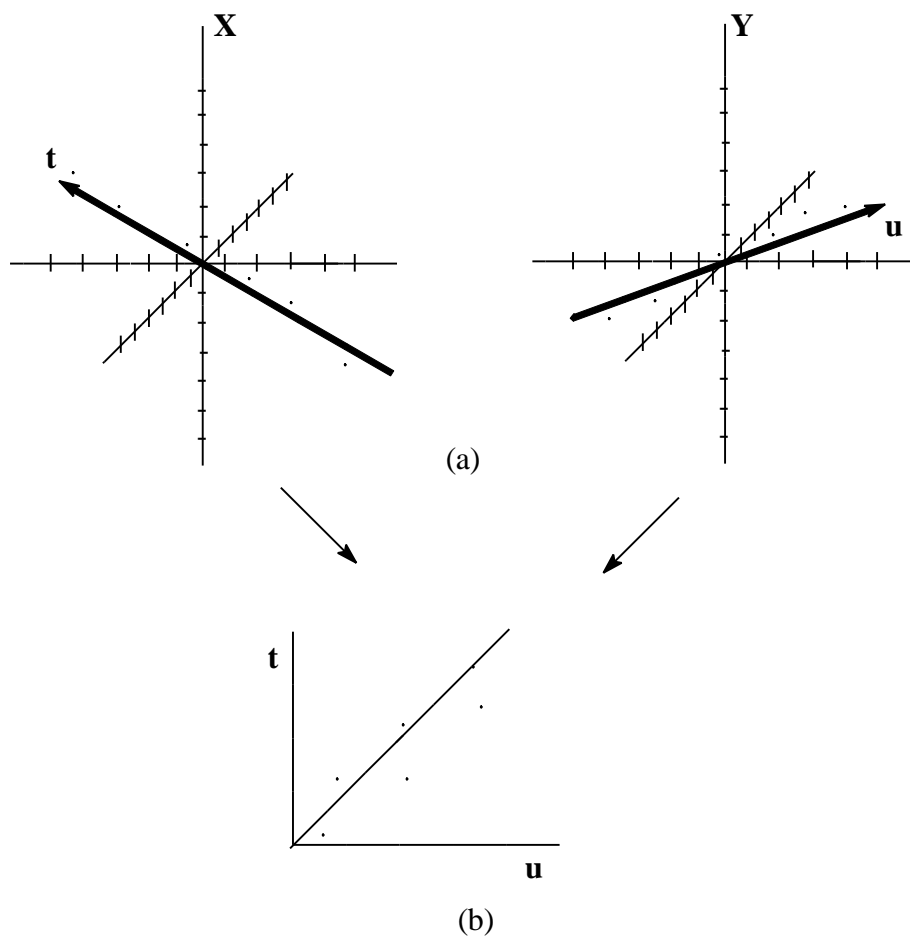


Figura 21 - Representação geométrica do PLS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

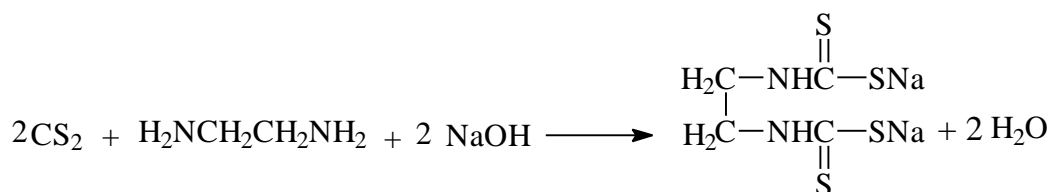
4.1. Síntese de etilenobisditiocarbamatos

Dois compostos etilenobisditiocarbamatos foram sintetizados: o nabam, etilenobisditiocarbamato de sódio, e o maneb, etilenobisditiocarbamato de manganês, sendo o nabam o precursor do maneb. A síntese do maneb foi feita com intuito de se obter um padrão desse composto para curva de calibração do método espectrofotométrico com PAN. Um padrão comercial, da marca Research Triagle Park (88,3%), foi adquirido e usado naquele método espectrofotométrico.

4.1.1. Síntese do nabam

O nabam, etilenobisditiocarbamato de sódio, foi obtido segundo método proposto por VAN DER KERK e KLÖPPING (1952). A 3,1 g (0,05 mol) de etilenodiamina, em balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados lentamente 6,1 g (0,08 mol) de dissulfeto de carbono. A mistura foi mantida a 40 °C em um banho de água sobre chapa aquecedora com agitação magnética. Adicionaram-se, gota a gota, sob agitação constante, 15 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 22% m/v (massa por volume), com auxílio de uma bureta. A

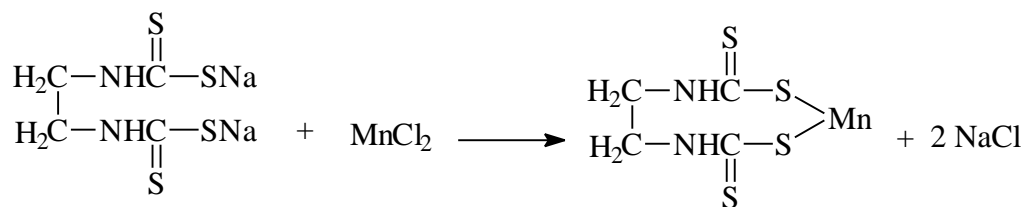
reação, conforme representada pela equação a seguir, completa-se após cerca de duas horas e meia.



A mistura foi transferida para funil de separação, no qual foram adicionados 10 mL de acetona, obtendo-se duas fases. A fase inferior foi tratada com excesso de acetona, para a precipitação do nabam. Como não houve precipitação, a solução foi submetida a fluxo de nitrogênio, para evaporação da acetona, dissolvendo em seguida o resíduo com água deionizada.

4.1.2. Síntese do maneb

O maneb, etilenobisditiocarbamato de manganês, foi obtido pela adição de uma solução de manganês (II) a uma solução de etilenobisditiocarbamato dissódico, nabam (RAO, 1993). A solução de nabam (obtida pela síntese descrita em 4.1.1.) foi transferida quantitativamente para béquer de 250 mL. A esta solução foram adicionados, sob agitação, 20 mL de solução de cloreto de manganês a 13% (m/v), ocorrendo a reação, conforme representado a seguir.



O precipitado amarelo-claro formado foi filtrado a vácuo, lavado com água deionizada e acetona e secado em dreno de nitrogênio.

O maneb sintetizado, por ser instável, foi guardado em frasco escuro dentro de dessecador, o qual foi mantido em freezer. O composto obtido foi

usado como teste, após determinação da sua pureza (item 4.1.3.), antes da obtenção do padrão comercial maneb (Resarch Triargle Park, 88,3%).

4.1.3. Determinação da pureza do maneb

A pureza do maneb, etilenobisditiocarbamato de manganês, foi determinada por titulação complexométrica do manganês, após decomposição ácida, usando Negro de Eriocromo T como indicador (VOGEL, 1981).

Pesou-se cerca de 0,5000 g do sal de maneb sintetizado, conforme descrito em 4.1.2., e transferiu-se para béquer de 250 mL. Foram adicionados 5 mL de ácido clorídrico concentrado e 20 mL de água deionizada. A solução foi aquecida até parcial secura, para total decomposição. O resíduo foi resfriado e dissolvido em água deionizada. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado em seguida com água deionizada.

Retirou-se alíquota de 10 mL desta solução (três repetições), a qual foi transferida para erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de água deionizada. Adicionou-se 0,08 g de cloridrato de hidroxilamina (para impedir a oxidação do Mn^{2+}). Ajustou-se o pH da solução para 10, com solução tampão NH_3/NH_4Cl .

Preparou-se uma solução de EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ previamente seco a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, por 48 horas.

Adicionaram-se, à solução a ser titulada, cinco gotas de solução de Negro de Eriocromo T 0,4% (m/v) em metanol, produzindo uma coloração vermelha. Em seguida fez-se a titulação com solução-padrão de EDTA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ até viragem para azul, determinando-se a pureza do maneb por cálculo estequiométrico.

4.2. Seqüência experimental

Os experimentos realizados no presente trabalho foram conduzidos de acordo com a seqüência de passos ilustrada pela Figura 22.

4.3. Amostras

Foram feitas amostragens aleatórias de tomates para avaliar os níveis de resíduos de fungicidas ditiocarbamatos comercializados e produzidos na região de Viçosa.

Cada amostra constou de 2 kg (aproximadamente 10 frutos grandes), sendo cada fruto recoberto com papel alumínio e transportado em caixa de isopor com gelo para o laboratório (EMPRESA CAPIXABA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMCAPA, 1987).

Foram selecionadas amostras de casca (contendo parte da polpa), polpa (contendo sementes) e fruto total. A seleção foi feita manualmente com material cortante inox, sendo a polpa de aproximadamente 2/3 do fruto total e a casca, de aproximadamente 1/3 do fruto total. As amostras foram homogeneizadas em liquificador e guardadas em freezer.

Amostras de tomates caseiros, isentos de agrotóxicos, foram usados como referência e denominadas amostras testemunhas.

4.3.1. Amostras de tomates prontos para consumo

Foram coletadas amostras aleatórias de tomates prontos para o consumo, no comércio varejista de Viçosa. Foram selecionados os seguintes estabelecimentos: Feira Livre, Mercado Santa Rita, Mercado Progresso e Mercado do Paulo.

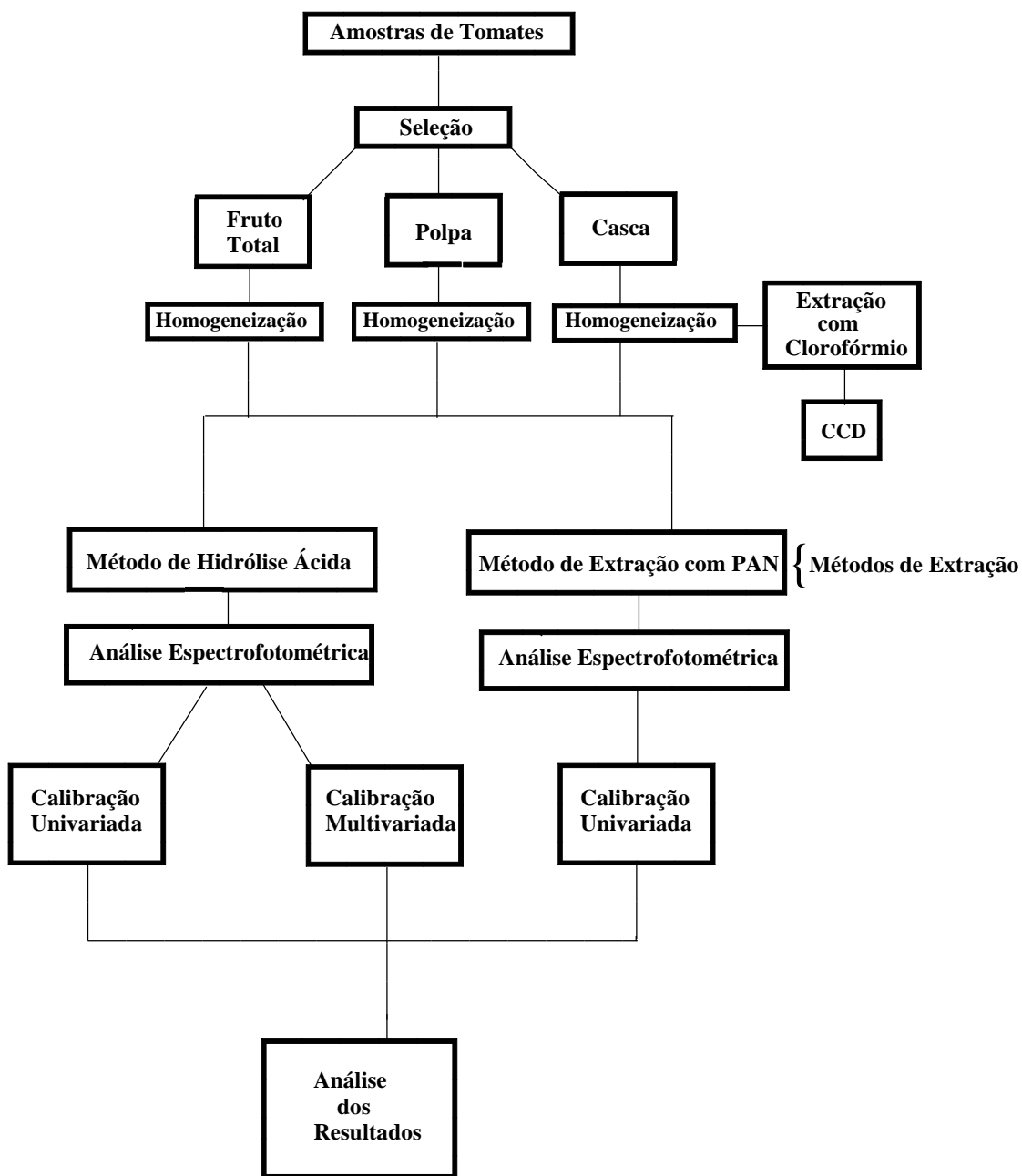


Figura 22 - Fluxograma da seqüência experimental.

4.3.2. Amostras para determinação da curva de persistência

Para determinação da curva de persistência, foram coletadas amostras de campo de um experimento, de 800 m², com 12 linhas duplas de 30 m de comprimento, cultivado na Horta Nova (Fundão - Universidade Federal de Viçosa). Delimitou-se um espaçamento de 12 metros no canteiro central para coletas das amostras. As amostras foram coletadas no dia da aplicação do fungicida CURZATE + Zn (solução de 40g/20L) e nos 1^o, 3^o, 6^o e 8^o dias decorrentes.

Determinou-se também a curva de persistência de amostras da Feira Livre, após serem adquiridas, por um intervalo de dez dias.

4.3.3. Nomenclatura das amostras

Amostra aleatórias (AL):

SR - Mercado Santa Rita

MP - Mercadinho do Paulo

FL - Feira Livre

Condição do fruto:

(v) - tomates verdes

(m) - tomates maduros

Amostragens:

(I) - primeira amostra coletada

(II) - segunda amostra coletada

(III) - terceira amostra coletada

Seleção da amostra:

cc - casca (com polpa)

rt - restante do fruto (polpa e sementes)

ft - fruto total

Amostra do Campo Experimental:

AC - Amostra do Campo

A - amostra testemunha, antes da segunda aplicação do fungicida

C₀ - amostra coletada no dia da aplicação

C₁ - amostra coletada um dia após a aplicação

C₃ - amostra coletada três dias após a aplicação

C₆ - amostra coletada seis dias após a aplicação

C₈ - amostra coletada oito dias após à aplicação

4.4. Técnicas de extração e análise

4.4.1. Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD)

A presença do ditiocarbamato maneb nas amostras de tomates foi detectada previamente por CCD. Esse método quantitativo foi feito em amostras de casca, onde ocorre maior acúmulo do fungicida, para facilitar a detecção.

Em 20,0000 g de amostra homogeneizada da casca de tomate fez-se extração do fungicida com 100 mL de clorofórmio (solvente usado para facilitar na posterior redução do volume). Após uma hora procedeu-se à filtração a vácuo. O volume foi reduzido a 10 mL em rota-vapor à temperatura ambiente e por fluxo de nitrogênio. Em seguida fez-se a eluição, utilizando como fases móveis benzeno e benzeno:metanol:ácido acético (48:8:4). Para fase estacionária utilizou-se sílica gel G-60, e para reagente revelador utilizou-se solução contendo 1,5 g de CuCl_2 , 3 g de NH_4Cl , 3 mL de NH_3 concentrada e 20,00 g de cloridrato de hidroxilamina em 150 mL de solução aquosa. Obteve-se o fator de retenção, R_f , comparando em seguida com os R_f s dos padrões. Os padrões utilizados, em solução de clorofórmio, da marca Research Triangle Park, N.C., foram: maneb 86,7% , zineb 91,4% , ziram 80% , mancozeb 88,3% e tiram 99,5%

Amostras cuja presença de maneb foi constatada foram submetidas às determinações pelo método de hidrólise ácida e pelo método espectrofotométrico de extração com PAN.

4.4.2. Método espectrofotométrico de hidrólise ácida

O método espectrofotométrico de hidrólise ácida foi proposto por CULLEN (1964), porém usado de acordo com metodologia da FUNED (1994), com as devidas modificações. Este método baseia-se na hidrólise ácida dos fungicidas ditiocarbamatos, pela qual há liberação quantitativa de CS_2 , medido

espectrofotometricamente, após desenvolvimento de cor amarela com reagente cromóforo de Cu(II) e dietanolamina.

Este método apresenta algumas limitações, como formação de duas espécies no desenvolvimento de cor e dependência da razão molar $[Cu^{2+}]/[CS_2]$ para uma maior absorção, as quais foram estudadas preliminarmente, como segue o item 4.4.2.1.

4.4.2.1. Estudos preliminares do método de hidrólise ácida

Em uma série de 14 balões volumétricos de 25 mL, fixou-se a concentração de CS_2 em $9,42 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com adição de 1,07 mL de solução de CS_2 $0,0022 \text{ mol L}^{-1}$ em etanol. Para estabelecer as concentrações de Cu^{2+} nas suas respectivas razões molares, $[Cu^{2+}]/[CS_2]$, adicionaram-se volumes de solução de reagente cromóforo (250 mL de solução alcoólica contendo $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em Cu^{2+} e 25 g de dietanolamina) e massas adicionais do sal de cobre, conforme necessário, de acordo com o Quadro 1. Os volumes foram completados para 25 mL com etanol, obtendo-se os espectros das soluções obtidas na faixa de 350 a 450 nm. As leituras dos espectros foram feitas em espectrofotômetro HITACHI U-2000 em célula de quartzo, contra branco contendo as mesmas quantidades de reagente cromóforo e massas de acetato de cobre em cada razão molar, em volumes de 25 mL em meio alcoólico.

Quadro 1 - Volumes de reagente cromóforo, massas de acetato de cobre, em uma quantidade fixa de $\text{CS}_2^{(*)}$, e suas respectivas concentrações de Cu^{2+} e razões molares $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{CS}_2]$

Balão	Volume de cromóforo	Massa de $(\text{Ac})_2\text{Cu}$	$[\text{Cu}^{2+}]$	Razão Molar
Nº	mL	g	mol L^{-1}	$[\text{Cu}^{2+}]/[\text{CS}_2]$
1	3,5	-	$2,83 \times 10^{-5}$	0,3
2	5,9	-	$4,71 \times 10^{-5}$	0,5
3	8,2	-	$6,59 \times 10^{-5}$	0,7
4	20	0,0020	$5,65 \times 10^{-4}$	6
5	20	0,0033	$8,20 \times 10^{-4}$	8,7
6	20	0,0039	$9,42 \times 10^{-4}$	10
7	20	0,0225	$4,52 \times 10^{-3}$	48
8	20	0,0227	$4,71 \times 10^{-3}$	50
9	20	0,0259	$5,18 \times 10^{-3}$	55

(*) $[\text{CS}_2]$ fixada em $9,42 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.2.2. Curva de calibração para CS₂

Em uma série de balões volumétricos de 25 mL, foram adicionados 15 mL da solução de reagente cromóforo ($2,56 \times 10^{-4}$ g de Cu(II) e 1,50 g de dietanolamina) em cada balão e 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 e 1,2 mL de solução de CS₂ 113,20 µg mL⁻¹. Os volumes foram completados logo em seguida com etanol. As concentrações de CS₂ foram de 0,453; 0,906; 1,358; 1,811; 2,264; 2,717; 3,170; 3,622; 4,075; 4,528; 4,981 e 5,434 µg mL⁻¹. Em seguida foram lidas as absorvâncias no comprimento de onda 435 nm, contra branco contendo 15 mL de reagente cromóforo e 10 mL de etanol. Obteve-se o gráfico absorvância x concentração de CS₂ (µg mL⁻¹).

4.4.2.3. Análise de resíduos pelo método da hidrólise ácida

As amostras de tomates coletadas tiveram os resíduos de fungicidas ditiocarbamatos submetidas ao método de hidrólise ácida, empregando o equipamento adequado, conforme ilustrado na Figura 23.

Foram homogeneizados 100,0000 g de amostra, pesados em balança analítica, e transferidos para balão A. Foram adicionados no frasco armadilha B 20 mL de solução de hidróxido de sódio 10% (m/v) e, no frasco armadilha C, 20 mL de solução de acetato de chumbo 30% (estes reagentes eliminam interferências de H₂S e SO₂). No frasco D foram adicionados 15 mL de solução alcoólica de reagente cromóforo (contendo $7,20 \times 10^{-4}$ g de acetato de cobre monoidratado e 1,50 g de dietanolamina). Ao balão A foram adicionados 20 mL de solução de cloreto estano 40% (m/v) (catalisador da hidrólise ácida) e 20 mL de solução de ácido clorídrico a 40% (m/v). O sistema foi hermeticamente fechado e o nitrogênio foi introduzido como gás de arraste. Aqueceu-se o balão A até ebulição. Após uma hora, a solução do frasco D foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com etanol. Procedeu-se à leitura em espectrofotômetro em 430 nm, contra

branco (contendo 15 mL do reagente cromóforo e 10 mL de etanol). Foram feitas três repetições para cada amostra analisada e, em determinadas amostras, foram obtidos os espectros de absorção para uso na análise multivariada PLS.

Os resultados foram expressos em teores de maneb, presentes em todas as amostras estudadas, detectado qualitativamente em experimento prévio por cromatografia em camada delgada (item 4.4.1.).

4.4.2.4. Determinação da eficiência do método de hidrólise ácida

Determinou-se a eficiência do método de hidrólise ácida de acordo com as alterações dos constituintes nos frascos armadilhas, do aparelho da Figura 23, propostas por CARVALHO e YOKOMIZO (1988). No frasco armadilha B foram adicionados 20 mL de NaOH 10% (m/v), para eliminar interferentes (H_2S e SO_2). Nos frascos armadilhas C e D foram adicionados, em cada frasco, 7,5 mL da solução de reagente cromóforo, para recuperação do CS_2 liberado da hidrólise ácida do fungicida ditiocarbamato.

Foram adicionados 100,0000 g de amostras testemunhas de tomates isentas de agrotóxicos com soluções-padrões de maneb (padrão EPA - Research Triangle Park, N.C.-88,3% de pureza). Estas soluções-padrões foram preparadas com diferentes solventes: em DMSO, de acordo com RAO et al. (1993), e em EDTA/NaOH, de acordo com CARVALHO e YOKOMIZO (1988). As fortificações das amostras testemunhas de tomates foram feitas em níveis de 1,0 e 1,5 $\mu g g^{-1}$ em maneb, utilizando solução-padrão de maneb em dimetil sulfóxido (DMSO). Outras amostras testemunhas foram fortificadas em níveis de 0,48 e 1,00 $\mu g g^{-1}$ em maneb, com solução-padrão de maneb em EDTA 0,2 mol L^{-1} , em NaOH 0,4 mol L^{-1} .

Após extração do CS_2 utilizando o aparelho da Figura 23, foram recuperadas quantitativamente as soluções dos frascos armadilhas C e D em balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com etanol. Determinaram-se os níveis de recuperação das fortificações pela hidrólise ácida, após leituras de

absorvância em 435 nm, feitas contra branco contendo 15 mL de reagente cromóforo e 10 mL de etanol.

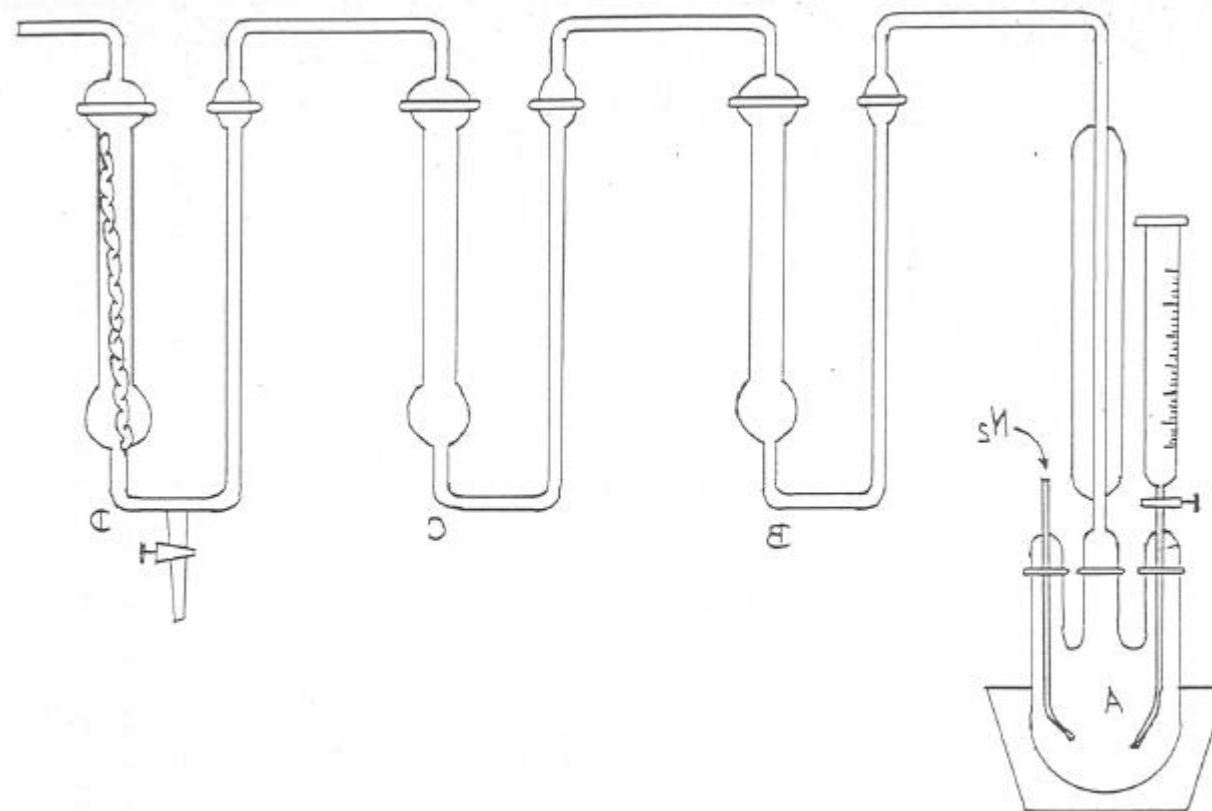


Figura 23 - Diagrama do equipamento usado na extração do CS₂ no método de hidrólise ácida. Balão A - amostra; B - frasco armadilha contendo NaOH 10% (m/v); C - frasco armadilha contendo acetato de chumbo (30% m/v); e D - frasco armadilha com reagente cromóforo de Cu(II) e dietanolamina.

4.4.3. Calibração multivariada (PLS)

4.4.3.1. Calibração e previsão

Para a Calibração Multivariada utilizou-se o programa PLS contido no pacote “Toolbox”, que trabalha no ambiente com MATLAB. Obtiveram-se os espectros da curva de calibração anteriormente preparada, no item 4.4.2.2., numa faixa de comprimento de onda de 350 a 450 nm, de 5 em 5 nm. As concentrações de CS₂ foram de 0,453; 0,906; 1,358; 1,811; 2,264; 2,717; 3,170; 3,622; 4,075; 4,528; 4,981 e 5,434 µg mL⁻¹, e a concentração de Cu²⁺ foi fixada em 10,237 µg mL⁻¹ pela adição de 15 mL de reagente cromóforo (contendo 2,56 x 10⁻⁴ g de Cu²⁺ e 1,50 de dietanolamina, em meio alcoólico), em todos os pontos da curva, após completar volume com etanol a 25 mL.

Primeiramente procedeu-se à fase de Calibração, em que os espectros de absorção obtidos da curva de calibração de CS₂ foram arranjados na forma de uma tabela de dados. Esta tabela foi convertida em uma matriz **X** 12 x 21, sendo 12 linhas correspondentes às concentrações e 21 colunas correspondentes às absorvâncias nos respectivos comprimentos de onda.

Outra matriz, **Y** 12 x 2, foi obtida com valores de concentrações-padrões de CS₂ e de Cu²⁺ em µg mL⁻¹, de acordo com o Quadro 2.

Nessa fase é obtido um modelo que correlaciona a matriz **X** com a matriz **Y**, que é utilizado na fase de previsão.

A fase de Previsão utiliza os coeficientes da correlação da fase de Calibração para determinar as concentrações de CS₂ nas amostras. Cada amostra foi analisada com três repetições, utilizando três espectros de absorção.

Quadro 2 - Dados da matriz **Y** 12 x 21 de concentrações das espécies Cu^{2+} e CS_2 para análise multivariada

$[\text{Cu}^{2+}]$ $\mu\text{g mL}^{-1}$	$[\text{CS}_2]$ $\mu\text{g mL}^{-1}$
10,237	0,453
10,237	0,906
10,237	1,358
10,237	1,811
10,237	2,264
10,237	2,717
10,237	3,170
10,237	3,622
10,237	4,075
10,237	4,528
10,237	4,981
10,237	5,434

4.4.4. Método espectrofotométrico com 1-(2'-piridilazo)-2-naftol (PAN)

Este método espectrofotométrico, desenvolvido por RAO et al. (1993), determina os níveis de resíduos de maneb pela complexação da parte inorgânica do fungicida, Mn(II), com o agente quelante PAN. O complexo Mn-PAN formado é medido espectrofotometricamente após sua extração.

4.4.4.1. Curva de calibração do método do PAN

Em uma série de oito tubos graduados adicionaram-se 0,0, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 e 0,35 mL de solução-padrão de maneb (padrão Research Triangle Park, 86,7%) $112,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO). Em cada tubo foi adicionado 1 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina 20% m/v (para evitar a oxidação do Mn(II) a Mn(III) em meio alcalino), neutralizando em seguida a mistura com solução de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Foram adicionados 2mL de tampão de ácido bórico pH 9,2 e, em seguida, 2,5 mL de solução de PAN 0,01% (m/v), mantendo em repouso por dois minutos. Em funil de separação promoveu-se a extração do complexo Mn-PAN com 10 mL de MIBC. Após extração obteve-se a leitura de absorvância da fase orgânica em 550 nm (valor obtido pelo espectro de absorção de um ponto da curva de calibração), contra branco preparado em condições similares. Obteve-se o gráfico absorvância x [maneb] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 36).

4.4.4.2. Determinação de resíduos de maneb em amostras de tomates pelo método do PAN

O método espectrofotométrico de extração com PAN foi utilizado em amostras cuja presença do fungicida maneb foi detectada por cromatografia em camada delgada (CCD), segundo técnica descrita no item 4.4.1., para determinação dos níveis de resíduos deste fungicida em tomates.

A 20,000 g de amostra foram adicionados 100 mL de acetonitrila, promovendo a extração do fungicida presente por uma hora. Em seguida recuperou-se o extrato por filtração a vácuo, o qual foi aquecido em banho-maria para redução de volume. Após resfriamento, adicionaram-se 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO), 1 mL de solução de NaF 5% (m/v) (para eliminar a possível interferência de zinco) e 0,5 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina 20% (m/v). A mistura foi neutralizada com solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹, adicionando em seguida 2 mL de solução tampão de ácido bórico pH 9,2. Logo após, foram adicionados 2,5 mL de solução de PAN 0,01% (m/v) em metanol. Fez-se a extração com 10 mL de metilisobutilcetona (MIBC), recuperando a fase orgânica com funil de separação. Obteve-se a leitura de absorvância em 550 nm contra branco preparado de amostras testemunhas, isentas de agrotóxicos, utilizando o mesmo procedimento analítico descrito anteriormente.

4.4.4.3. Interferência do zinco no método do PAN

O zinco (II) interfere no método espectrofotométrico de extração com PAN em razão da capacidade de reação com o agente complexante, nas condições de análise, formando um complexo Zn-PAN, o qual absorve na região do comprimento de onda de trabalho.

Determinou-se o espectro do complexo Zn-PAN adicionando-se primeiramente, em um tubo graduado, 0,35 mL de solução de acetato de zinco (II) 29,8 µg mL⁻¹ em Zn(II). Em seguida adicionaram-se 2 mL de solução tampão de ácido bórico pH 9,2 e 2,5 mL de solução de PAN 0,01% (m/v). Procedeu-se à extração em funil de separação com 10 mL de MIBC, recuperando a fase orgânica em tubo de ensaio. A seguir determinou-se o espectro de absorção do complexo formado na faixa de 350 a 600 nm.

Para eliminar a interferência do zinco utilizou-se o fluoreto como agente mascarador de Zn(II).

Uma amostra aleatória contendo maneb foi determinada sem adição de fluoreto, usando a metodologia descrita no item 4.4.4.2. Paralelamente, outra amostra semelhante foi determinada com adição de 1 mL de solução de NaF 5% (m/v). Desse modo, observa-se diminuição na absorvância da amostra determinada sem adição de fluoreto, comparada à amostra determinada com adição de fluoreto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese do maneb

O nabam, etilenobisditiocarbamato de sódio, composto solúvel em água e insolúvel em compostos orgânicos, é o precursor dos demais fungicidas do tipo etilenobisditiocarbamatos metálicos. Para síntese do maneb, etilenobisditiocarbamato de manganês, o nabam foi sintetizado primeiramente, segundo método proposto por VAN DER KERK e KLÖPPING (1952), pela reação do CS₂ com etilenodiamina em meio NaOH.

Na síntese do nabam observou-se a deposição dos cristais brancos nas paredes do balão de fundo redondo com a adição do NaOH. Conforme metodologia empregada por VAN DER KERK e KLÖPPING (1952), uma recristalização deveria ocorrer após tratamento com excesso de acetona, para purificação do sal formado. Porém, isto não ocorreu neste experimento, provavelmente em virtude da presença da água formada como produto da reação, solubilizando os cristais de nabam. Por causa da baixa estabilidade desse composto, após evaporação com fluxo de nitrogênio da acetona adicionada, o nabam foi dissolvido em água deionizada, para evitar sua degradação.

O maneb foi sintetizado adicionando-se solução de cloreto de manganês à solução de nabam. A formação do precipitado amarelo-claro é imediata, porém

esse composto é bastante instável. Esta instabilidade foi observada pelo escurecimento do precipitado, principalmente quando exposto à luz e umidade, de acordo com BARBERÁ (1974).

A determinação do grau de pureza do maneb obtido foi feita por titulação complexométrica com EDTA, utilizando Negro de Eriocromo T, de acordo com BASSET et al. (1981). Seu grau de pureza foi de $89 \pm 1\%$, e o maneb-padrão (EPA, Research Triangle Park, N.C.) apresenta 88,3% de pureza.

5.2. Resultados da identificação do maneb por CCD

Para identificação dos possíveis fungicidas ditiocarbamatos presentes nas amostras aleatórias de tomates, coletadas no comércio varejista de Viçosa, empregou-se o método de cromatografia em camada delgada (CCD), proposto por HYLIN (1966). O Quadro 3 apresenta os valores de Rfs obtidos pelos padrões dos fungicidas ditiocarbamatos nas respectivas fases móveis.

Quadro 3 - Valores de Rfs de alguns ditiocarbamatos obtidos por Cromatografia em Camada Delgada, usando como fases móveis benzeno e benzeno:metanol:ácido acético

Ditiocarbamato	Rf	
	Benzeno	Benzeno:metanol:ácido acético (48:8:4)
Tiram	0,2	0,8
Ziram	0,7	0,7
Zineb	0,9	0,4
Maneb	0,9	0,9
Mancozeb	ND	ND

ND - não-detectado

De acordo com os valores de Rf obtidos na fase móvel constituída de benzeno, os fungicidas do tipo ditiocarbamatos metálicos (ziram) e o tiram apresentaram valores de Rf pequenos comparados com os fungicidas do tipo EBTC, zineb e maneb, os quais apresentaram valores de Rf maiores. Por outro lado, o maneb apresentou grande Rf para fase móvel constituída de benzeno:metanol:ácido acético e desenvolvimento de cor marrom, peculiar ante o reagente cromóforo. Não foi possível detectar o mancozeb por essa metodologia. Esses resultados estão, de modo geral, de acordo com os resultados de HYLIN (1966).

O Quadro 4 apresenta os valores de Rf obtidos para algumas amostras nas mesmas fases móveis onde os padrões foram eluídos.

Quadro 4 - Valores de Rf de ditiocarbamatos em tomates por Cromatografia em Camada Delgada, usando como fases móveis benzeno e benzeno:metanol:ácido acético

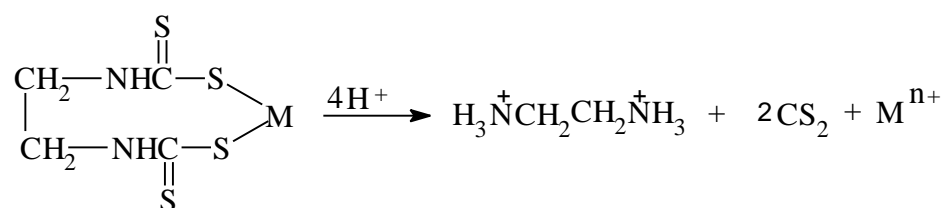
Amostra	Rf	
	Benzeno	Benzeno:metanol:ácido acético (48:8:4)
ALMP(v)cc	0,8	0,9
ALFL(II)(m)cc	0,9	0,9
ALFL(III)(m)cc	0,8	0,8
AC-B	0,9	0,9

De acordo com os resultados obtidos das amostras, os Rfs apresentados na fase móvel constituída de benzeno sugeriram a presença de maneb ou zineb. Porém, comparando os Rfs obtidos da fase móvel constituída de benzeno:metanol:ácido acético, pode-se sugerir a presença do maneb.

5.3. Resultados do método espectrofotométrico de hidrólise ácida

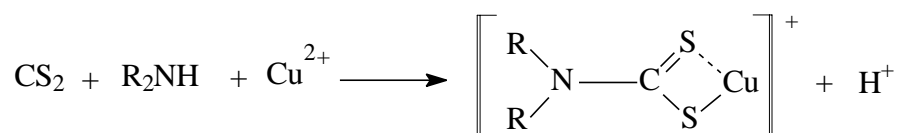
5.3.1. Estudos preliminares do método de hidrólise ácida

O método de hidrólise ácida baseia-se na formação quantitativa de CS₂ a partir da decomposição, em ácido diluído a 100 °C, do fungicida etilenobisditiocarbamato (CLARK et al., 1951). A decomposição ácida é ilustrada segundo a equação a seguir:

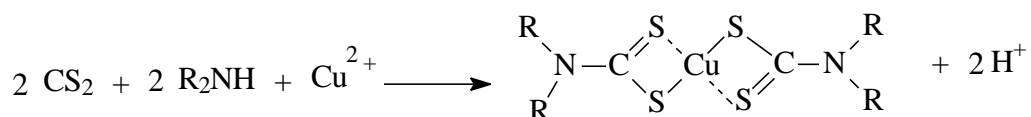


A reação do dissulfeto de carbono com as espécies Cu(II) e dietanolamina do reagente cromóforo pode levar à formação de dois complexos coloridos, complexo 1:1 e, ou, complexo 1:2, segundo equações a seguir, dependendo da razão molar [Cu²⁺]/[CS₂] (CULLEN, 1964). Com isto dificulta a escolha do λ preferencial de trabalho.

Equação de Formação do complexo 1:1:



Equação de Formação do complexo 1:2:



Neste trabalho, estudos preliminares foram feitos para verificar a formação dos dois complexos, responsáveis pelo desenvolvimento de cor, em função da razão molar entre as espécies Cu²⁺ e CS₂. Os espectros obtidos foram

feitos contra branco contendo as mesmas quantidades do sal de cobre adicionado para desenvolvimento de cor em cada razão molar.

A Figura 24 ilustra as razões molares principais, onde ocorrem as formações dos dois complexos. A Figura 25 ilustra a variação das absorvâncias em função das razões molares nos comprimentos de onda máximos (370 e 435 nm) dos dois complexos.

Para a obtenção do espectro de absorção do complexo 1:1 é necessário uma alta razão molar $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{CS}_2]$, além de o complexo mostrar baixo coeficiente de extinção molar. São necessárias ainda, concentração de CS_2 maior que $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e elevadas concentrações do sal de cobre. O sal de cobre também apresenta absorção em 370 nm, originando, desse modo, uma elevada linha de base. Torna-se, portanto, inviável a utilização desse complexo para construção da curva de calibração.

De acordo com KEPPEL (1971) e CARVALHO e YOKOMIZO (1988), a leitura de absorvância recomendada é em 435 nm, comprimento de onda máximo do complexo 1:2. A formação deste complexo apresenta maior sensibilidade, ocorrendo maior absorção já no primeiro ponto da curva de calibração (Figura 29), onde se tem o limite de detecção do método: de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ em CS_2 (LOWEN, 1951).

As condições ideais de trabalho seriam em razão molar 0,5, em que há maior formação do complexo 1:2 e maior absorção. Porém, uma faixa de razão molar entre 0,4 e 2 apresenta bons níveis de absorção, cerca de 85% da absorção da razão molar de 0,5 (CULLEN, 1964). Entretanto, para obtenção da curva de calibração deve-se ter a mesma quantidade de reagente cromóforo em todos os pontos da curva, impossibilitando a estratégia de se trabalhar com razões molares dos constituintes de interesse. A formação simultânea do complexo 1:1 pode causar desvio na curva de calibração, porém este desvio não comprometeu tanto a linearidade da curva de calibração de trabalho, como pode ser verificado pelo coeficiente r^2 da Equação 1.

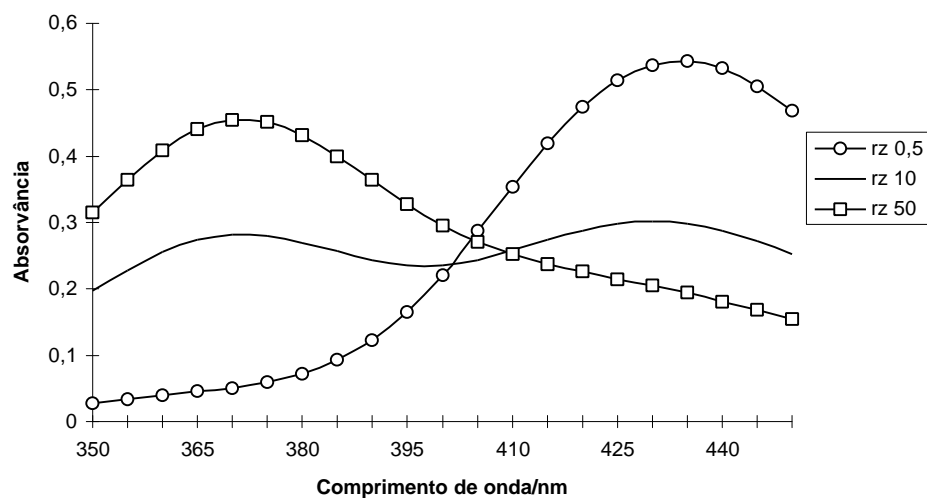


Figura 24 - Espectros de absorção dos complexos de Cu²⁺ com CS₂ em diferentes razões molares [Cu²⁺]/[CS₂]: complexo 1:1 com rz 50 e complexo 1:2 com rz 0,5.

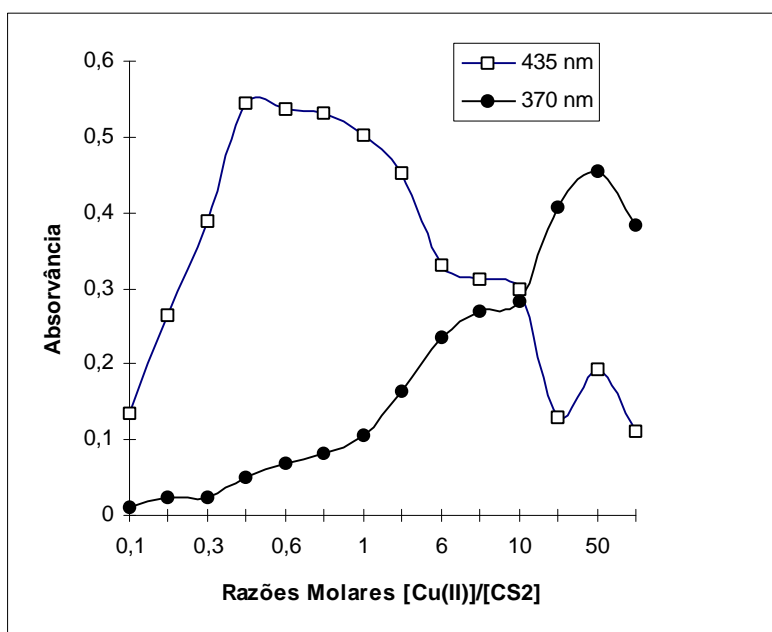


Figura 25 - Absorvâncias a 435 e 370 nm dos complexos 1:1 e 1:2 em função da razão molar [Cu²⁺]/[CS₂].

5.3.2. Curva de calibração do CS₂

Para determinação do comprimento de onda de trabalho, o espectro de um ponto da curva de calibração foi obtido. De acordo com os resultados obtidos, o λ_{max} de absorção é de 435 nm, como se verifica no espectro de absorção da Figura 26, com formação do complexo 1:2, o qual está de acordo com a metodologia da literatura consultada (FUNED, 1994).

A curva de calibração do CS₂ foi obtida e encontra-se ilustrada na Figura 27. De acordo com os parâmetros de linearização encontrados, a curva de calibração apresentou ótima linearidade, considerando as inúmeras limitações discutidas anteriormente: possibilidade de desvio de linearidade em virtude da formação do complexo 1:1; impossibilidade de se trabalhar na faixa ideal de razões molares, entre 0,4 e 2, evitando o efeito de matriz; instabilidade da solução-padrão de CS₂, por se tratar de uma substância altamente volátil; e instabilidade do complexo formado: complexo 1:2.

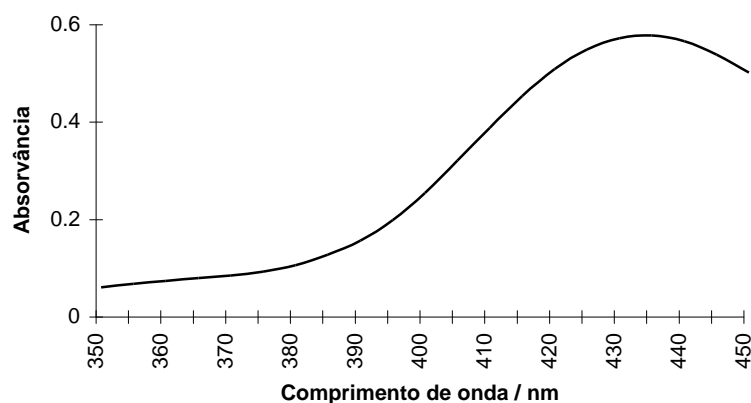


Figura 26 - Espectro de absorção do complexo 1:2 de uma solução a $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em Cu²⁺ e $5,96 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em CS₂.

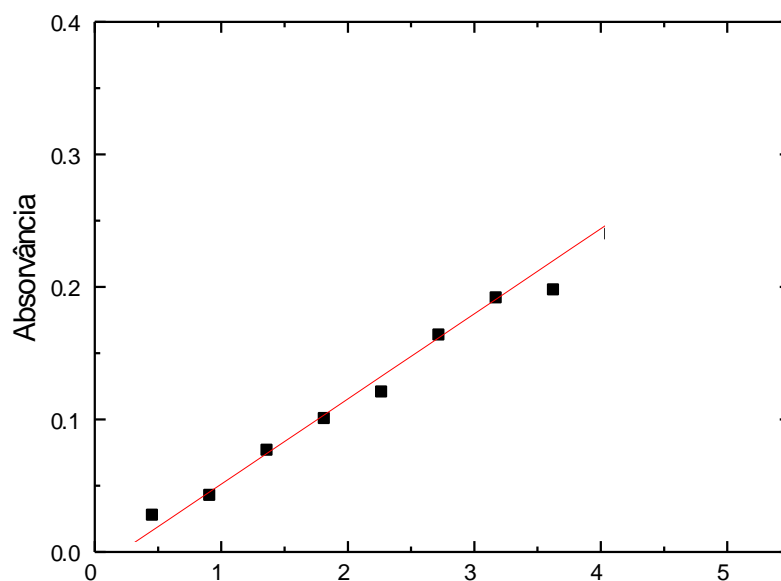


Figura 27 - Curva de calibração do CS₂, absorvância x concentração, obtida após formação do complexo 1:2 de Cu(II) e CS₂.

Equação da curva de calibração por regressão linear:

$$Y = 0,01048.X - 0,00656 \quad (\text{Eq. 1}), \quad r^2 = 0,99439$$

em que Y é a absorvância e X é a concentração de CS₂ em µg mL⁻¹.

5.3.3. Determinação de resíduos de maneb em tomates pelo método de hidrólise ácida por calibração univariada

A resposta obtida pelo método de hidrólise ácida se dá em níveis de CS₂, em µg mL⁻¹, oriundos da degradação dos resíduos do fungicida etilenobisdi-tiocarbamato presente na amostra. Como em todas as amostras analisadas constatou-se previamente a presença de maneb por CCD, os níveis de CS₂ determinados foram convertidos em níveis de maneb pelo fator de conversão, de 1,7424,

segundo FUNED (1994). O Quadro 5 apresenta os resultados das análises das amostras de tomates coletadas no comércio varejista de Viçosa.

Sistematicamente, a casca (contendo polpa) apresentou maiores níveis de resíduos acumulados. Somente amostras com níveis mais elevados (1,2; 1,3; 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, dados do Quadro 5) apresentaram níveis de resíduos no restante do fruto (polpa e sementes), os quais podem ser considerados inexpressivos e muito abaixo do limite máximo permitido pela legislação. Desse modo, pode-se dizer que a penetração do fungicida no interior do fruto é praticamente nula, em se tratando de tomates.

Esperava-se que os tomates verdes apresentassem níveis de resíduos de fungicidas ditiocarbamatos mais elevados que os tomates maduros. Isto se deve à suposição de que os tomates verdes estariam sob um controle mais recente, uma vez que as condições dos frutos estão mais próximas às condições de colheita. Porém, os resultados indicam que não há uma relação entre o grau de maturidade do fruto e os níveis de resíduos determinados, sendo estes apenas dependentes das aplicações, as quais não foram controladas. Quanto ao período de coleta, não houve um controle sistemático, pelo qual talvez se poderia obter a época em que há maior quantidade de aplicações feitas pelos produtores.

Os níveis de resíduos de maneb detectados estão dentro dos limites permitidos pela legislação, até 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ para maneb, em tomates (SUPAGRO, 1986).

Quadro 5 - Níveis de resíduos de maneb em amostras de tomate, determinados pelo método de hidrólise ácida utilizando calibração univariada

Amotras	Casca ^(**) $\mu\text{g g}^{-1}$	Restante do Fruto ^(*) $\mu\text{g g}^{-1}$	Fruto Total $\mu\text{g g}^{-1}$
ALSR(I)(v)	NF	NF	$0,4 \pm 0,1$
ALSR(II)(m)	NF	NF	$0,21 \pm 0,01$
ALMP(I)(v)	$2,76 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,2$
ALDP(I)(v)	$0,59 \pm 0,06$	ND	$0,35 \pm 0,01$
ALFL(I)(v)	$1,2 \pm 0,1$	ND	$0,67 \pm 0,02$
ALFL(II)(v)	$2,20 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,1$
ALFL(III)(v)	$0,41 \pm 0,05$	ND	$0,19 \pm 0,06$
ALFL(I)(m)	NF	NF	$0,88 \pm 0,07$
ALFL(II)(m)	$0,95 \pm 0,05$	ND	$0,41 \pm 0,05$
ALFL(III)(m)	$2,4 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,2$

AL - amostra aleatória; SR - Mercado Sta. Rita; MP - Merc. do Paulo; FL - Feira Livre; (I), (II) e (III) - primeira, segunda e terceira amostragens; (v) - tomates verdes; (m) - tomates maduros; (*) Restante do Fruto - polpa e sementes; (**) Casca - casca contendo polpa; ND - não-detectado; NF - análise que não foi feita

5.3.4. Curva de persistência do maneb pelo método de hidrólise ácida

Para avaliar o tempo médio de permanência do fungicida maneb em tomates determinou-se a curva de persistência deste fungicida em diferentes amostras coletadas mantidas em dois ambientes distintos. Foram determinadas as curvas de persistência do maneb (Figura 28), e uma curva foi obtida de amostras aleatórias coletadas no comércio varejista de Viçosa, mantidas em laboratório, e outra obtida de amostras do Campo Experimental (Horta Nova - Fundão, UFV). De acordo com os resultados obtidos, as amostras mantidas em laboratório e as amostras expostas no Campo Experimental apresentaram tempos médios de persistência do maneb de dez e oito dias, respectivamente (Figura 28); e o estipulado pelo fabricante é de sete dias em tomates.

As amostras do Campo Experimental foram pulverizadas de acordo as especificações técnicas recomendadas pelo fabricante, as quais apresentaram níveis de resíduos de maneb no primeiro dia da aplicação de $0,31 \mu\text{g g}^{-1}$. Amostras mantidas em laboratório, de procedência desconhecida quanto ao produtor, conseqüentemente sem informações das aplicações feitas, apresentaram níveis de resíduos iniciais de $1,05 \mu\text{g g}^{-1}$, bastante acima do detectado no primeiro dia da aplicação das amostras do Campo Experimental. Desse modo, não se pode comparar satisfatoriamente os dois resultados obtidos quanto às suas velocidades de degradação do fungicida, por se tratarem de amostras diferentes em termos de procedência, época de colheita (portanto, diferentes condições climáticas), especificações das aplicações feitas e níveis de resíduos iniciais da curva de persistência.

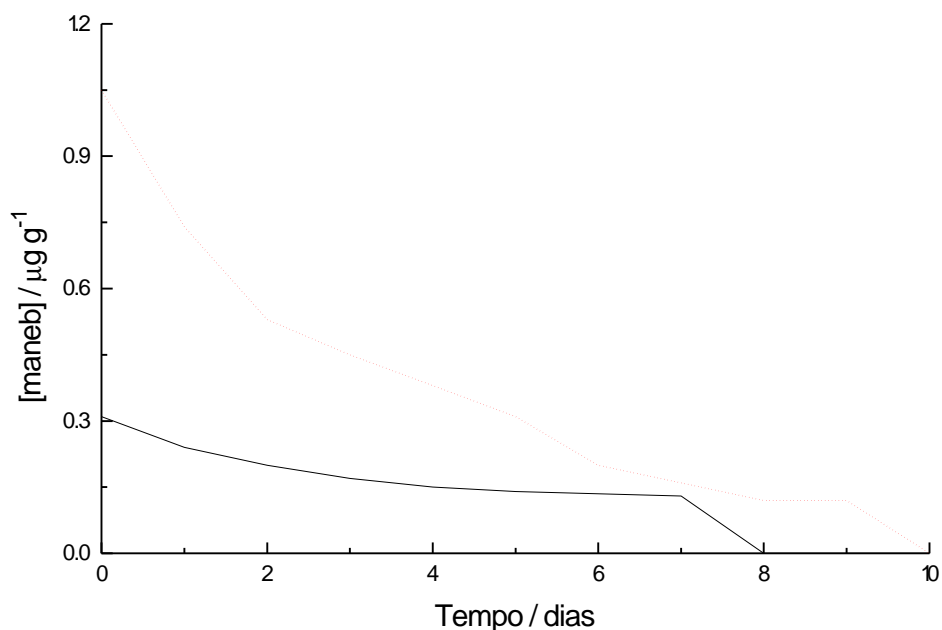


Figura 28 - Curvas de persistências do maneb em amostras de tomates com exposição no campo (.....) e em laboratório (—), pelo método de hidrólise ácida.

5.3.5. Eficiência do método de hidrólise ácida

Para determinação da eficiência do método espectrofotométrico de hidrólise ácida, foram feitas fortificações com maneb em amostras testemunhas de tomate, isentas de agrotóxico, de acordo com a preparação da solução deste fungicida em DMSO, segundo RAO et al. (1993). Como a recuperação obtida apresentou níveis muito baixos (Quadro 6), outra fortificação foi feita com solução-padrão de maneb em solução de EDTA 0,2 mol L⁻¹ em NaOH 0,4 mol L⁻¹, de acordo com CARVALHO e YOKOMIZO (1988). Desse modo, os níveis de recuperação obtidos foram maiores, como mostram os resultados no Quadro 6.

Quadro 6 - Recuperação do maneb em amostras isentas de agrotóxicos, fortificadas com diferentes soluções-padrões

Solução de maneb adicionada	Níveis de fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Média dos níveis recuperados ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
Maneb em DMSO	1,00	$0,45 \pm 0,06$	45,0
Maneb em EDTA e NaOH	1,50	$0,42 \pm 0,08$	28,0
Maneb em EDTA e NaOH	0,48	$0,37 \pm 0,01$	77,0
Maneb em EDTA e NaOH	1,00	$0,68 \pm 0,04$	68,0

Branco - Amostra testemunha de tomate isenta de agrotóxico; ND - não-detectado.
EDTA $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em NaOH $0,4 \text{ mol L}^{-1}$

O método espectrofotométrico de hidrólise ácida apresentou pouca exatidão, porém elevada precisão, conforme CARVALHO e YOKOMIZO (1988), e a melhor recuperação ocorreu com fortificações feitas da solução-padrão de maneb em EDTA/NaOH com 77,0% de recuperação.

5.4. Resultados do método de calibração multivariada (PLS)

O método de Calibração Multivariada (PLS) foi utilizado neste trabalho como alternativa para minimizar os possíveis erros apresentados pelo método clássico de hidrólise ácida usando Calibração Univariada. Como o PLS trabalha com todo o espectro da amostra e com várias variáveis que influenciam nos resultados, os erros, como desvios de linearidade, interação entre os componentes analíticos (possível formação dos dois complexos, 1:1 e 1:2, principalmente em baixas concentrações de CS_2), bandas superpostas (complexo 1:1 apresentando absorção em 435 nm), etc..., podem ser minimizados (BEEB e KOWALSKI, 1987).

5.4.1. Calibração e previsão

Na fase de Calibração definiu-se primeiramente no programa PLS Toolbox as variáveis dependentes, concentrações de CS₂ e Cu(II), e as variáveis independentes, absorvâncias dos espectros da curva de calibração. Os dados dos espectros da curva de calibração (Figura 29) foram arranjados na forma de tabela de dados, os quais foram convertidos em uma matriz de variáveis independentes **X** 12 x 21, com 12 linhas correspondendo às amostras em diferentes concentrações e 21 colunas correspondendo às absorvâncias dos respectivos comprimentos de onda. Outra matriz, **Y** 12 x 2, foi obtida de uma tabela de dados constituída das variáveis dependentes com seus respectivos valores de concentrações das soluções-padrões de CS₂ e de Cu(II), em µg mL⁻¹, sendo a concentração de Cu(II) fixada em 10,237 µg mL⁻¹.

A fase de Previsão determina o modelo matemático mais apropriado para reproduzir a relação entre **X** e **Y**, sendo determinado pelo programa por meio de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica (POPPI, 1993). Após a definição do modelo matemático deve-se escolher o componente principal de trabalho, o qual define a melhor combinação linear de todas variáveis, cada qual com seu peso de importância. O valor do componente principal de trabalho deve ser o mínimo possível, ou seja, em menores margens de erro, onde o programa apresenta elevado número de informações (definido pela sigla SQE - soma dos quadrados dos erros estimados) (DÍAZ et al., 1994), conseguidas de todos os dados fornecidos (comprimentos de ondas, concentrações, espécies presentes, etc.).

O Quadro 7 apresenta os componentes principais com suas respectivas informações obtidas (SQE), representadas em valores numéricos e percentagens. A Figura 30 ilustra essas quantidades de informações (SQE) colocadas em gráfico em relação aos respectivos componentes principais.

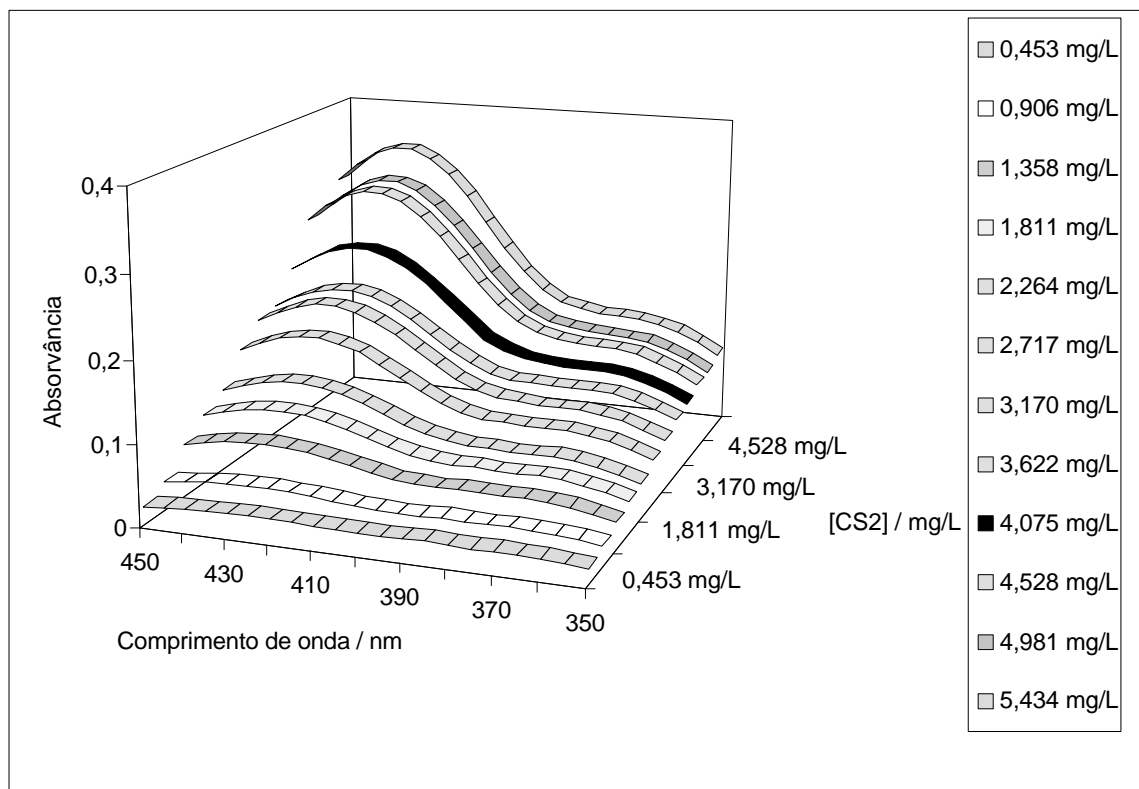


Figura 29 - Espectros de absorção da curva de calibração de CS₂ com formação do complexo 1:2.

Quadro 7 - Valores numéricos da soma dos quadrados dos erros estimados (SQE) e suas respectivas quantidades de informações, em percentagens, dos dados fornecidos em cada componente principal

Componente principal	SQE ^(*)	Informações %
1	4,4002	76,71
2	1,1460	96,69
3	0,1679	99,62
4	0,0126	99,84
5	0,0037	99,90
6	0,0019	99,94
7	0,0015	99,96
8	0,0011	99,98
9	0,0002	99,99
10	0,0002	99,99
11	0,0003	99,99
12	0,0003	100,00
Total	5,7359	

SQE - soma dos quadrados dos erros estimados.

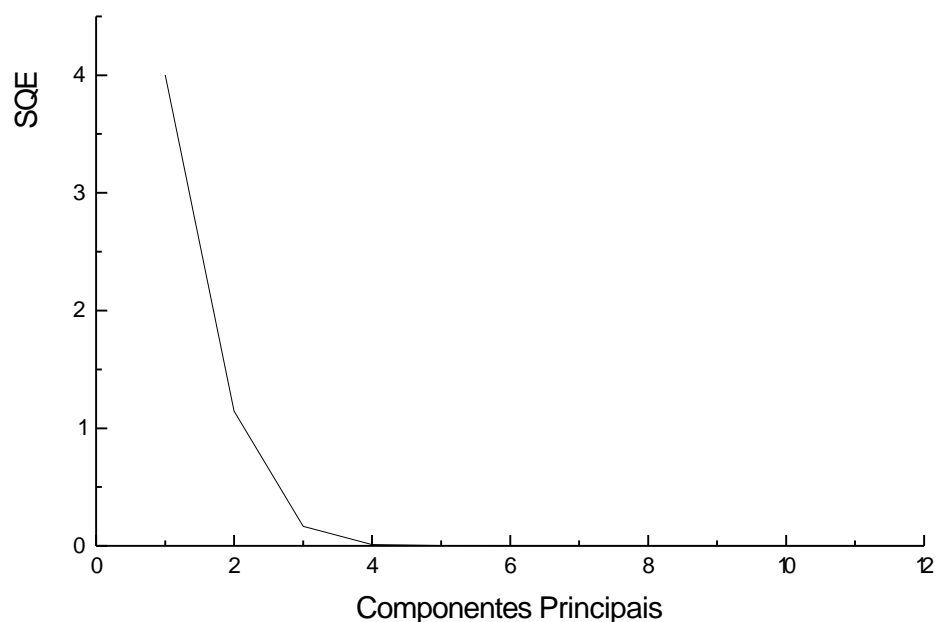


Figura 30 - Gráfico da soma dos quadrados dos erros estimados (SQE) obtidos em cada componente principal.

Avaliando os resultados obtidos, os menores valores de componentes principais que apresentaram as melhores quantidades de informações possíveis foram de 3, 4 e 5, com suas respectivas informações: 99,62%, 99,84% e 99,90%.

A principal concentração aqui estudada foi a concentração de CS_2 , porque é a partir dela que se determinam os níveis de resíduos de ditiocarbamatos nas amostras. A concentração de Cu(II) , fixada em $10,237 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi usada como referência em todos os pontos da curva, pois essa metodologia permite a determinação de uma ou mais espécies (GARTHWAITE, 1994). O ideal seria trabalhar com as concentrações dos complexos 1:1 e 1:2, formados no desenvolvimento de cor. Porém, estes complexos são obtidos em determinadas razões molares de Cu(II) e CS_2 , além de serem complexos bastante instáveis. Desse modo, o erro de matriz usando as razões molares das espécies de interesse, discutido anteriormente no item 5.3.1., e a dificuldade de obtenção de padrões

dos dois complexos, os quais forneceria uma melhor curva de calibração para o método de Calibração Multivariada, impossibilitam essa alternativa.

Uma outra consideração a ser feita para escolha dos componentes principais de trabalho é a relação entre as concentrações reais e as concentrações estimadas pelo programa, no caso as concentrações de CS_2 e Cu(II) (GARTHWAITE, 1994). O Quadro 8 apresenta os resultados das concentrações reais e das concentrações de CS_2 da curva de calibração, com as suas respectivas concentrações estimadas, em cada componente principal, menor ou igual a 5. As concentrações de Cu(II) determinadas, de modo geral, foram próximas ao valor fixado de $10,237 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Quadro 8 - Concentrações reais e estimadas de CS₂ usando os menores componentes principais pelo método de calibração multivariada PLS

[CS ₂] _{real} μg mL ⁻¹	[CS ₂] _{estimada} μg mL ⁻¹				
	1 compt.	2 compt.	3 compt.	4 compt.	5 compt.
0,453	0,569	0,656	0,454	0,450	0,405
0,906	0,826	0,925	0,840	0,833	0,845
1,358	1,377	1,475	1,447	1,444	1,463
1,811	1,761	1,850	1,847	1,846	1,857
2,264	2,059	2,129	2,108	2,113	2,151
2,717	2,728	2,776	2,802	2,805	2,832
3,170	3,174	3,207	3,163	3,176	3,161
3,622	3,330	3,411	3,605	3,613	3,577
4,075	3,940	3,958	4,097	4,081	4,065
4,528	4,880	4,823	4,744	4,744	4,730
4,981	4,955	4,890	4,870	4,868	4,902
5,434	5,492	5,400	5,333	5,334	5,324

[CS₂]_{real} = concentração real de CS₂; [CS₂]_{estimada} = concentração estimada de CS₂; compt. = componentes princi-pais.

A obtenção das concentrações estimadas de CS₂, oriundas da operação do programa, pode ser comparada com uma linearização obtida de concentrações-padrões e suas respectivas absorvâncias. Neste caso pode-se imaginar, grosso modo, uma linearização das concentrações-padrões de uma curva de calibração com os seus respectivos espectros. As Figuras 31, 32 e 33 ilustram as correlações entre as concentrações reais e as concentrações determinadas nos valores de componentes principais iguais a 3, 4 e 5, anteriormente definidos em termos de números de informações.

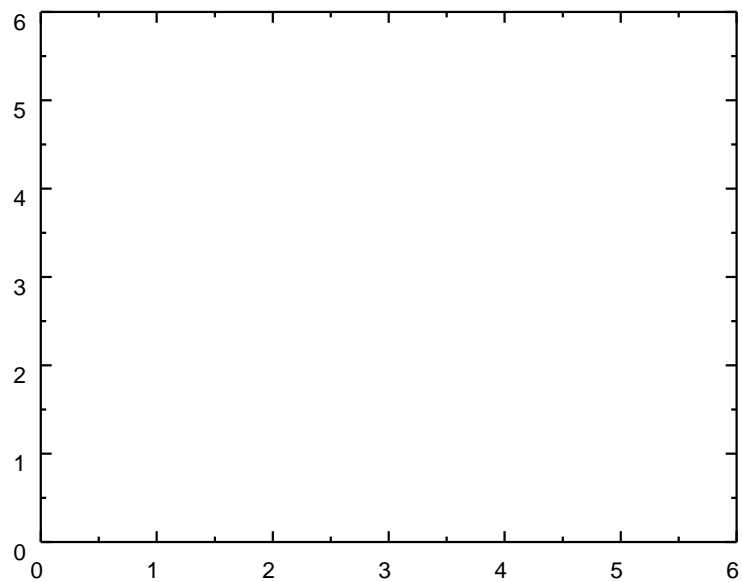


Figura 31 - Correlações entre [CS₂]_{real} e [CS₂]_{estimada} em três componentes principais, obtidas pelo método do PLS.

$$Y = 0,9976.X + 0,0058 \quad (\text{Eq. 2}), \quad r^2 = 0,9985$$

em que $Y = [\text{CS}_2]_{\text{real}}$ e $X = [\text{CS}_2]_{\text{estimada}}$.

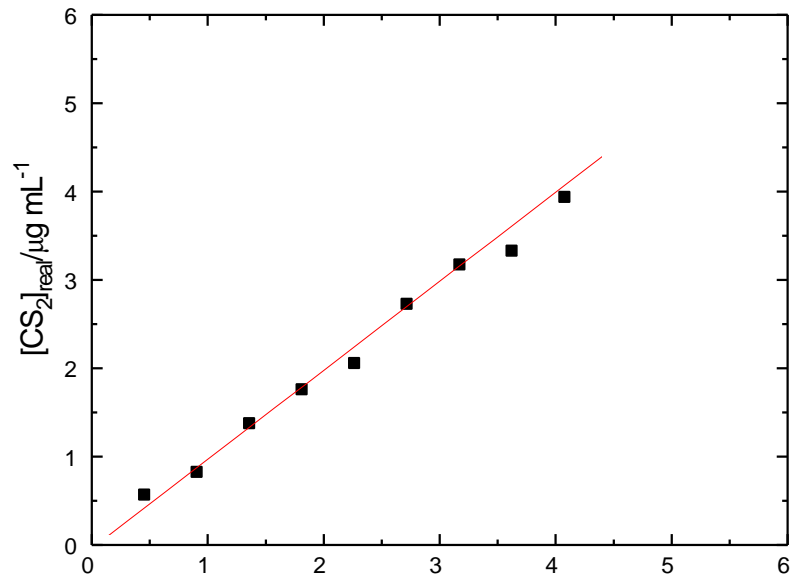


Figura 32 - Correlações entre as $[CS_2]_{real}$ e $[CS_2]_{estimada}$ em quatro componentes principais, obtidas pelo método do PLS.

$$Y = 0,9980.X + 0,0045 \quad (\text{Eq. 3}), \quad r^2 = 0,9985$$

em que $Y = [CS_2]_{real}$ e $X = [CS_2]_{estimada}$.

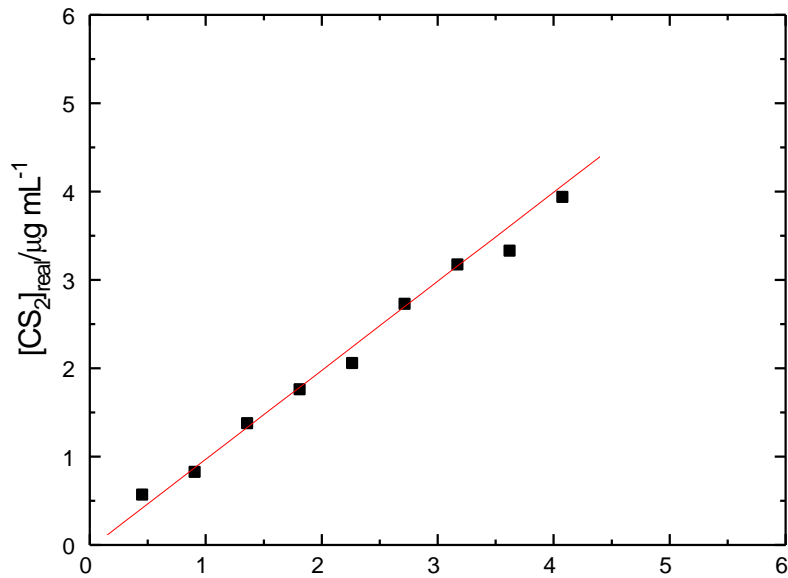


Figura 33 - Correlações entre $[CS_2]_{\text{real}}$ e $[CS_2]_{\text{estimada}}$ em cinco componentes principais, obtidas pelo método do PLS.

$$Y = 0,9977.X + 0,0056 \text{ (Eq. 4)}, \quad r^2 = 0,9986$$

em que $Y = [CS_2]_{\text{real}}$ e $X = [CS_2]_{\text{estimada}}$.

O valor do componente principal definido para as determinações das amostras foi escolhido de acordo com o número de informações obtidas pelos dados fornecidos ao programa e pela melhor correlação entre as concentrações reais e estimadas de CS_2 . Desse modo, o componente principal que melhor respeitou essas condições foi o de valor 3, o qual apresentou valores de informações maiores que 99% e correlações das concentrações reais e determinadas com r^2 próximo de 1.

5.4.2. Determinação dos níveis de resíduos de maneb em tomates por calibração multivariada

As concentrações de CS₂ determinadas pelo método de Calibração Multivariada foram convertidas em níveis de resíduos de maneb, assim como no método usando Curva de Calibração de CS₂. O Quadro 9 apresenta os níveis de resíduos médios de maneb, de amostras de tomate, determinados por Calibração Multivariada (PLS) em três componentes principais.

Quadro 9 - Média dos níveis de resíduos de maneb em amostras de tomates de acordo com os três componentes principais de trabalho, pelo método do PLS

	Maneb $\mu\text{g g}^{-1}$
Amostra	3 compt.
AISR(I)(v)ft	0,46 ± 0,05
ALMP(I)(v)ft	1,47 ± 0,07
ALFL(III)(v)cc	0,49 ± 0,04
ALFL(III)(v)ft	0,28 ± 0,01
ALFL(II)(m)ft	0,51 ± 0,05
ALFL(III)(m)ft	1,3 ± 0,1

compt = componentes principais. AL - amostra aleatória; SR - Merc. Sta Rita; MP - Merc. do Paulo; FL - Feira Livre; (v) - tomates verdes; (m) - tomates maduros; (I),(II) e (III) - primeira, segunda e terceira amostragem; ft - fruto total; cc - casca (contendo polpa).

Os resultados serão comparados com os resultados obtidos pelo método de hidrólise ácida usando Calibração Univariada, no item 5.6. Os resultados obtidos não foram comparados com os resultados do método espectrofotométrico de extração com PAN.

5.5. Resultados do método de extração espectrofotométrica com PAN

5.5.1. Determinação da interferência do Zn(II) no método do PAN

O fungicida Cuzate + Zn, cujo princípio ativo é o maneb, apresenta em sua composição 2% em sulfato de zinco (Compêndio de Defensivos Agrícolas, 1993), como agente estabilizante. O Zn(II) presente (cerca de 0,81% na formulação do fungicida) promove uma interferência no método em razão da sua capacidade de se complexar com o agente complexante PAN, juntamente com o Mn(II), nas condições de análise (pH 9,2) (DONALDSON e INMAN, 1966). A Figura 34 ilustra o espectro do complexo Zn-PAN.

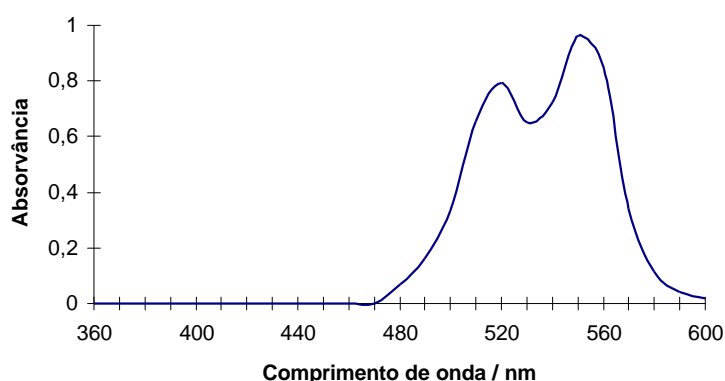


Figura 34 - Espectro de absorção do complexo Zn-PAN em solução contendo $1,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ em Zn(II).

De acordo com o espectro de absorção do complexo Zn-PAN da Figura 34, verifica-se uma elevada absorção em 550 nm, comprimento de onda de trabalho, apresentando grande coeficiente de extinção molar. Desse modo, a presença do Zn(II) resulta numa interferência, alterando os resultados no processo de determinação do maneb via complexação do Mn(II) com PAN.

Entretanto, a interferência do Zn(II) pode ser eliminada pela adição de fluoreto antes da adição do agente complexante PAN (RAO et al., 1993). O fluoreto é um agente mascarador de zinco, como se pode perceber nos resultados apresentados no Quadro 10.

Quadro 10 - Influência do fluoreto na absorvância e no nível de maneb em amostra de tomate

Adição de fluoreto	Absorvâncias médias	maneb $\mu\text{g g}^{-1}$
sem adição	0,526	2,77
com adição	0,288	1,91

A adição de fluoreto promove a eliminação da interferência do Zn(II), acarretando decréscimo da absorvância, de acordo com RAO et al. (1993). Por conseguinte, consegue-se uma resposta mais coerente do nível de maneb presente.

5.5.2. Curva de calibração do maneb

Para determinar o comprimento de onda de trabalho, obteve-se o espectro de absorção do complexo Mn-PAN e escolheu-se um ponto de máximo (Figura 35). O espectro obtido apresenta um λ_{max} em 550 nm para o complexo Mn-PAN.

A Figura 36 ilustra a curva de calibração do maneb, obtida em 550 nm. Os resultados apresentaram uma boa linearidade, sendo a equação da reta:

$$Y = 0,08168.X - 0,01942 \quad (\text{Eq.5}), \quad r^2 = 0,99313$$

em que Y é a absorvância e X a concentração de maneb em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O efeito da possível oxidação do Mn(II) a Mn(III), em meio alcalino, pelo oxigênio do ar, segundo Scribner (1960) e Tanaka et al. (1964), citados por DONALDSON e INMAN (1966), acarreta grande dificuldade para obtenção da linearidade. Entretanto, DONALDSON e INMAN (1966) citam em seu método de extração espectrofotométrica de Mn(II) com PAN a necessidade de adição de cloridrato de hidroxilamina. Em consequência disso, uma boa reprodutibilidade, conseqüentemente uma boa linearidade na curva de calibração, só foi possível com a adição desse agente redutor. Porém, este agente redutor apresenta sérios problemas em amostras a serem analisadas, onde o fungicida maneb já sofreu degradação. Estes problemas serão discutidos no item 5.5.4.

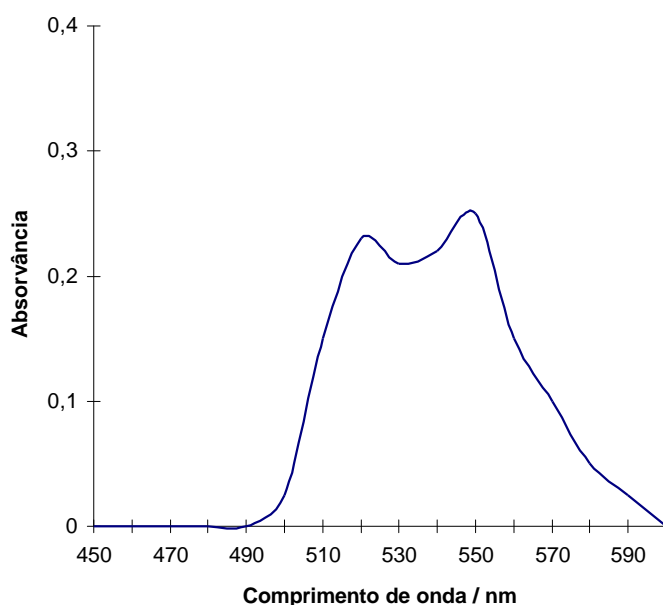


Figura 35 - Espectro de absorção do complexo Mn-PAN, de uma solução contendo maneb na concentração de $3,372 \mu\text{g mL}^{-1}$ (correspondendo a $0,88 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em Mn^{2+}).

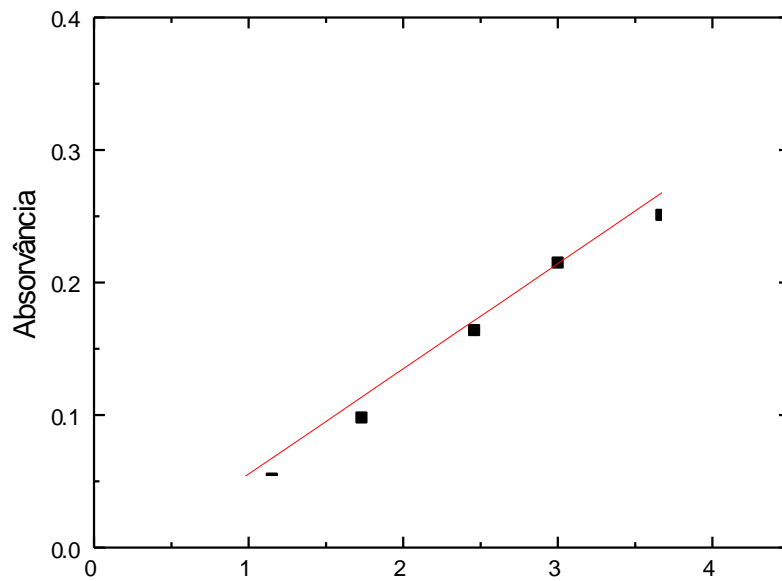


Figura 36 - Curva de calibração do maneb obtida da complexação do Mn(II) com PAN, em 560 nm.

5.5.3. Determinação de resíduos de maneb em tomates pelo método do PAN

O Quadro 11 apresenta os resultados dos níveis de resíduos de maneb em amostras de tomates, pelo método do PAN e pelo método de hidrólise ácida (usando Calibração Univariada), cuja presença do fungicida foi identificada previamente por Cromatografia em Camada Delgada.

Quadro 11 - Maneb em amostras de tomates determinado pelo método do PAN

	Maneb $\mu\text{g g}^{-1}$
Amostras	Método do PAN
AC-A	ND
AC-B	$0,39 \pm 0,01$
AC-C ₁	$0,29 \pm 0,01$
AC-C ₃	$0,22 \pm 0,02$
AC-C ₆	$0,22 \pm 0,02$
AC-C ₈	$0,21 \pm 0,03$
ALSR(I)(v)ft	$0,95 \pm 0,06$
ALFL(I)(v)cc	$1,8 \pm 0,1$
ALFL(I)(v)ft	$0,93 \pm 0,07$
ALFL(I)(m)ft	$1,68 \pm 0,04$
ALFL(II)(m)ft	$0,73 \pm 0,08$

AC-A - amostra do Campo Experimental coletada antes da aplicação do fungicida CURZATE + Zn; AC-C₀, C₁, C₃, C₆ e C₈ - amostras coletadas no dia da aplicação e 1, 3, 6 e 8 dias após a aplicação; ALSR (Merc. Sta Rita), ALFL (Feira Livre); (I), (II) e (III) - 1^a, 2^a e 3^a amostragens; (v) e (m) - tomates verdes e maduros; ft, cc - fruto total e casca (com polpa).

Os resultados dos níveis de resíduos de maneb apresentaram, de modo geral, desvios-padrões pequenos, os quais indicam boa reprodutibilidade, ou seja, boa precisão. Os níveis de resíduos de maneb em tomates determinados pelo método do PAN foram sempre maiores do que aqueles determinados pelo método de hidrólise ácida. Os resultados mais compatíveis foram nas amostras AC-C₀ e AC-C₁, amostras cujos resíduos sofreram os menores efeitos da degradação do fungicida, não considerando, entretanto, a possível degradação do fungicida aplicado, CURZATE + Zn, nas condições de armazenagem do produto. Desse modo, pode-se dizer que o efeito da degradação do fungicida pode ter contribuído para os resultados divergentes entre o método do PAN e o método de hidrólise ácida.

Os resultados do método espectrofotométrico com PAN serão discutidos a seguir, no item 5.5.4., e as comparações dos métodos serão discutidas no item 5.6.

5.5.4. Curva de persistência do maneb pelo método do PAN

Para avaliar o tempo de permanência do fungicida CURZATE + Zn, cujo princípio ativo é o maneb, em tomates expostos no Campo Experimental, determinou-se a curva de persistência (Figura 37) pelo método do PAN. Os níveis de resíduos das amostras do Campo Experimental (amostras AC, no Quadro 11) foram colocados em gráfico, em função do tempo de coleta das amostras, a partir da aplicação do fungicida.

Os resultados indicam queda significativa nos níveis de maneb detectados um dia após a aplicação do fungicida CURZATE + Zn. A partir do primeiro dia em diante os níveis de resíduos detectados foram praticamente iguais. A queda nos níveis de resíduos após um dia da aplicação pode estar relacionada com o efeito de lixiviação causado pela exposição à chuva do experimento da Horta Nova (Fundão-UFV). A partir do primeiro dia em diante,

sem a presença de chuva, os níveis de resíduos foram, de modo geral, constantes. Com isso, algumas considerações devem ser feitas, e serão discutidas a seguir.

De acordo com os resultados obtidos até aqui pelo método do PAN, das amostras analisadas e da curva de persistência do maneb, devem-se considerar dois fatores interferentes: a degradação do fungicida e a adição do reagente redutor no processo de análise das amostras (cloridrato de hidroxilamina, para evitar a oxidação do Mn(II) a Mn(III) em meio alcalino).

A degradação dos fungicidas ditiocarbamatos do tipo EBTC leva à formação de sulfetos; portanto, a degradação do maneb leva à formação de sulfeto de manganês (MnS) (FISHBEIN e FAWKES, 1965). O sulfeto de manganês é oxidado a dióxido de manganês (MnO₂) por exposição ao ar (VOGEL, 1981).

O método usado neste trabalho baseia-se na determinação do maneb por meio da complexação do Mn(II), presente na constituição deste fungicida. Segundo investigações de Scribne (1960) e Tanaka et al. (1964), citados por DONALDSON e INMAN (1966), o Mn(II) da espécie não-degradada do fungicida maneb (espécie de interesse a ser dosada) é oxidado a Mn(III) pelo oxigênio do ar em meio alcalino. As determinações aqui realizadas, feitas em pH 9,2, seguiram as recomendações de Oelschlagër (1955) e Sary (1963), citados por DONALDSON e INMAN (1966), adicionando excesso de cloridrato de hidroxilamina, agente redutor, para evitar aquela oxidação e, assim, melhorar a reprodutibilidade dos resultados, principalmente da curva de calibração do maneb (Figura 36).

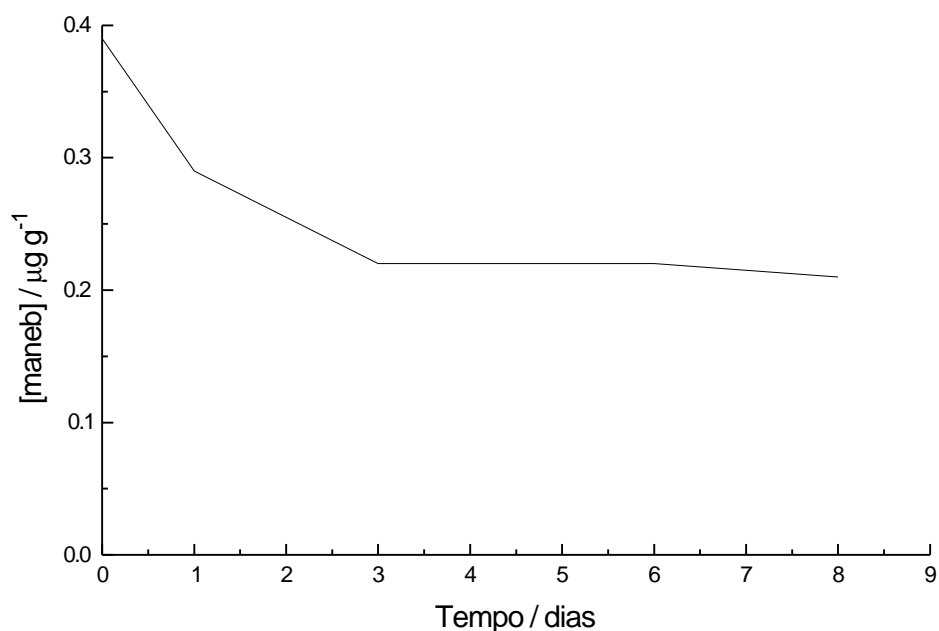


Figura 37 - Curva de persistência do maneb em tomates do Campo Experimental pelo método do PAN.

A curva de persistência apresentou constância nos resultados após o primeiro dia da aplicação do fungicida, e os níveis determinados em amostras do comércio varejista (AL's) foram bem mais elevados do que os obtidos pelo método de hidrólise ácida (Quadro 11). Portanto, os produtos da degradação do fungicida MnS e, ou, MnO₂, possivelmente extraídos com acetonitrila, juntamente com o fungicida maneb das amostras de tomate, podem fornecer Mn(II) ao meio no processo de análise. Desse modo, um excedente de Mn(II) pode complexar com PAN, superestimando os resultados. Devem-se, então, considerar os resíduos dos produtos de degradação presentes, MnS e MnO₂, como possíveis fontes de Mn²⁺ nas condições de análise. Tem-se, então, uma provável explicação quanto ao fato de as amostras coletadas do comércio apresentarem resultados mais elevados nos níveis de maneb pelo método do PAN, comparado ao método de hidrólise ácida, e de as amostras AC-C₁, AC-C₃, AC-C₆ e AC-C₈, da curva de persistência, apresentarem resultados estatisticamente iguais.

Desse modo, o ideal seria fazer um tratamento prévio das amostras coletadas, para eliminar a interferência dos possíveis produtos da degradação do fungicida, como por exemplo alguma técnica cromatográfica.

5.5.5. Eficiência do método do PAN

Para determinação da eficiência do método, amostras testemunhas foram fortificadas com solução-padrão de maneb em DMSO. O Quadro 12 apresenta os resultados dos níveis de resíduos das amostras testemunhas fortificadas com diferentes quantidades de maneb.

Os resultados obtidos indicam que o método espectrofotométrico de extração com PAN é bastante preciso e apresenta ótima exatidão, de acordo com estudos feitos por RAO et al. (1993). Tanto a exatidão como a precisão do método foram independentes das quantidades fortificadas de maneb.

Quadro 12 - Recuperação do maneb determinada pelo método do PAN com fortificação de amostras testemunhas de tomates

maneb fortificado μg	maneb recuperado μg	% de recuperação
10	$9,7 \pm 0,1$	97
20	$19,1 \pm 0,4$	95,5
30	$29,2 \pm 0,3$	97,3
40	$38,7 \pm 0,5$	96,8

5.6. Comparação dos resultados

Os três métodos espectrofotométricos utilizados foram: métodos de hidrólise ácida, usando Calibração Univariada e Calibração Multivariada, e o Método do PAN. Não foi feita comparação sistemática dos três métodos aplicados para determinações de fungicidas ditiocarbamatos em tomates. As comparações feitas foram entre os resultados apresentados pelo método de hidrólise ácida usando Calibração Univariada e os resultados usando Calibração Multivariada, e entre os resultados do método de hidrólise ácida usando Calibração Univariada e os resultados do Método do PAN.

Comparando a sensibilidade do Método do PAN com o método de hidrólise ácida usando Calibração Univariada, o primeiro apresentou média de recuperação do maneb de 96,7%, superior à melhor recuperação conseguida pelo método de hidrólise ácida usando Calibração Univariada, que foi de 77,0%. Isto porque a detecção espectrofotométrica feita pelo método do PAN da parte inorgânica do fungicida, no caso o manganês presente em sua formulação, é mais sensível. Dessa forma, pelo Método do PAN obtêm-se melhores resultados para analisar fungicidas ditiocarbamatos, desde que se faça um pré-tratamento das amostras a serem analisadas, para eliminar os possíveis interferentes.

A curva de persistência mede o decaimento dos níveis de resíduos do fungicida com o tempo, ou seja, são os níveis de resíduos não-degradados colocados em gráfico em função do tempo. Desse modo, a curva de persistência foi melhor obtida pelo método de hidrólise ácida, porque apenas o CS₂ liberado após a hidrólise ácida da parte orgânica do resíduo não-degradado é extraída e determinada no processo de análise. O CS₂, formado dos resíduos que já sofreram o processo de degradação antes da amostragem, não interfere na determinação dos resíduos não-degradados em razão da sua alta volatilidade, conseqüentemente ausente na amostra. Por conseguinte, o decaimento na curva de persistência é obtido sem interferências, uma vez que o processo de degradação não interfere. Porém, como esse método tem baixa sensibilidade provavelmente os tempos

máximos de permanência do fungicida obtidos, de oito e dez dias, podem não ser os tempos reais.

Por sua vez, o Método do PAN apresentou problemas na determinação da curva de persistência. Como a parte inorgânica, Mn(II), permanece tanto no fungicida não-degradado (constituente de interesse para determinação da curva de degradação) como nos produtos de degradação no meio de análise (MnO₂ e, ou, MnS), percebeu-se determinação constante nos níveis de resíduos. Como citado anteriormente, um pré-tratamento nas amostras é recomendado, para tentar obter melhores resultados, uma vez que se trata de um método mais sensível. A Figura 38 ilustra as duas curvas de persistência obtidas pelos dois métodos, sendo obtido o melhor decaimento dos níveis de resíduos pelo método de hidrólise ácida.

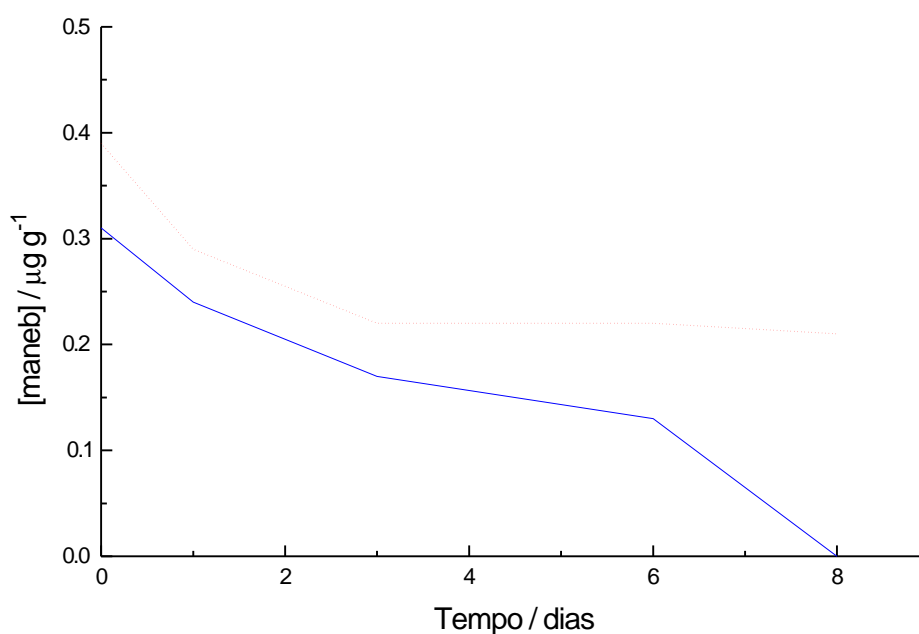


Figura 38 - Curvas de persistência do maneb em tomates expostos no Campo Experimental pelo método do PAN (.....) e pelo método de hidrólise ácida (—).

A determinação dos níveis de resíduos pelo método de hidrólise ácida usando Calibração Multivariada apresentou resultados superiores, comparado com a determinação por Calibração Univariada, na qual se usa apenas uma leitura de comprimento de onda: o λ_{\max} . O Quadro 13 apresenta os níveis determinados de maneb em amostras de tomate pelos dois métodos estudados.

A Calibração Multivariada trabalha com maior número de informações de maneira mais simples possível e ainda minimiza problemas comuns, próprios da determinação pelo método de Calibração Univariada, como desvio na linearidade, interação entre as espécies de análise (complexo 1:1 e complexo 1:2), etc. Desse modo, os resultados do método de Calibração Multivariada são mais confiáveis, apresentando respostas nos níveis de resíduos ligeiramente maiores, comparadas aos resultados obtidos pela Calibração Univariada, principalmente em amostras com níveis de resíduos mais baixos (0,4, 0,41, 0,19, e 0,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ em maneb, pela Calibração Univariada) (Quadro 13), onde há maior possibilidade de interferência pela formação do complexo 1:1. Todos os resultados estão dentro do limite máximo permitido pela legislação, de 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ em tomates.

Quadro 13 - Resíduos de maneb em amostras de tomates, determinados pelo método de hidrólise ácida por Calibração Univariada e por Calibração Multivariada

Amostra	Maneb $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Calibração Univariada	Calibração Multivariada*
ALSR(I)(v)ft	$0,4 \pm 0,1$	$0,46 \pm 0,05$
ALMP(I)(v)ft	$1,5 \pm 0,2$	$1,47 \pm 0,07$
ALFL(III)(v)cc	$0,41 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,04$
ALFL(III)(v)ft	$0,19 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,01$
ALFL(II)(m)ft	$0,41 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,05$
ALFL(III)(m)ft	$1,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$

* Com três componentes principais; AL - amostra aleatória; SR - Merc. Sta Rita; MP - Merc. do Paulo; FL - Feira Livre; (v) - tomates verdes; (m) - tomates maduros; (I),(II) e (III) - primeira, segunda e terceira amostragem; ft - fruto total; cc - casca (contendo polpa).

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O uso excessivo de agrotóxicos, em particular os fungicidas etilenobisditiocarbamatos, pode afetar diretamente o homem, tanto pela contaminação causada pelo próprio fungicida, como pela contaminação causada por seus produtos de degradação, como a etilenotiouréia (ETU).

Neste trabalho os níveis de resíduos e a curva de persistência do fungicida etilenobisditiocarbamato de manganês (maneb) em tomates, comercializados e produzidos na região de Viçosa, foram determinados por dois métodos espectrofotométricos: método de hidrólise ácida (Calibração Univariada e Calibração Multivariada) e Método Espectrofotométrico com PAN.

O método espectrofotométrico de hidrólise ácida apresentou níveis de recuperação em torno de 77%, mostrando-se adequado para análise do fungicida maneb em tomates.

A análise do fungicida fazendo uso da Calibração Multivariada possibilitou estudos de uma técnica computacional de determinação complementando o método citado. Os resultados obtidos de amostras com níveis de resíduos próximos ao limite de detecção do método ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ em CS_2) foram bastante confiáveis em razão da capacidade da Calibração Multivariada de minimizar as interferências daquele método espectrofotométrico. Para amostras com níveis de resíduos próximos deste limite, a Calibração Univariada tem

respostas ligeiramente menores que aquelas obtidas pelo método de Calibração Multivariada.

A curva de persistência do fungicida no tomate, determinada pelo método de hidrólise ácida, demonstra que o tempo de permanência do mesmo é ligeiramente maior que o estipulado pelo fabricante.

O método do PAN apresentou nível de recuperação de 96,7% e, conseqüentemente, mostrou resultados de análises significativamente superiores aos encontrados pelo método de hidrólise ácida.

A curva de persistência do fungicida em tomates, determinada pelo método do PAN, mostra resultados constantes a partir do terceiro até o oitavo dia após a aplicação.

Esse resultado constante na curva de persistência e os valores significativamente maiores dos níveis de resíduos encontrados, quando comparados com o método de hidrólise ácida, retratam as diferenças dos parâmetros de análise. O método do PAN baseia-se na extração e análise espectrofotométrica do fungicida pela formação do complexo Mn-PAN. Desse modo, o método pode apresentar importantes interferências em razão da presença de manganês, nas formas de MnS e MnO₂, os quais são produtos da degradação do fungicida, superestimando os resultados.

O método do PAN apresentou melhor capacidade de detecção do fungicida maneb, porém as amostras a serem analisadas devem sofrer um pré-tratamento, para eliminar os interferentes produzidos na degradação do fungicida.

De modo geral, os resultados das análises dos resíduos de pesticidas em tomates estão abaixo dos níveis permitidos pela legislação ($2 \mu \text{g}^{-1}$). Observa-se que os maiores níveis de resíduos estão concentrados na casca, mostrando que pode ser desprezada a penetração do fungicida maneb no fruto. Porém, há grande necessidade de determinar os níveis de resíduos da ETU, principal produto de degradação dos fungicidas ditio carbamatos, por se tratar de um agente com grande potencial cancerígeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, V., SHIVHARE, P., GUPTA, V.K. Spectrophotometric determination of zineb (a dithiocarbamate fungicide) by their methylene bleu method. **F.J.A.C.**, v.344, n. 7, p. 344 - 352, 1992.
- ANDREI, E. (Org.). **COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, Revista e Atualizada**. 4. ed. São Paulo: Organização ANDREI, 1993. 448 p.
- BARBERÁ, C. **Pesticidas agrícolas**. 2.ed. Barcelona: Omega, 1974. 569 p.
- BASSET, J. et al. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. 690 p.
- BEEB, K.R., KOWALSKI, B.R. An introduction to multivariate calibration and analysis. **Anal. Chem.**, v. 59, n. 17, p. 1007-1117, setembro/setembro. 1987.
- BRANDSTETEROVA, E., LEHOTAY, J., LISKA, O. et al. Application of high-performance liquid chromatography in the trace analysis of some fungicides. **J. Chromatogr.**, v. 286, p. 339-345, 1984a.
- BRANDSTETEROVA, E., LEHOTAY, J., LISKA, O. et al. Liquid chromatography of dimethyldithiocarbamate degradation products. **J. Chromatogr.**, v. 291, p. 439-444. 1984b.

- BRANDSTETEROVA, E., LEHOTAY, J., LISKA, O. et al. High-performance liq. chrom. determination of dimethyldithiocarbamate residues in some agricultural products. **J. Chromatogr.**, v. 354, p. 375-381. 1986.
- CAIRNS, T., SHERMA, J. **Emerging strategies for pesticide analysis**. New York: CRC Press, 1993. 352 p.
- CAMONI, I., MUCCIO, A.D., PONTECORVO, D. et al. Survey of ethylenethiourea (ETU) in ethylenebis(dithiocarbamate) (EBTC) fungicides. **Ecotox. Env. Safety**, v. 16, p. 176-179, dezembro/dezembro. 1988.
- CARVALHO, P.R.N., YOKOMIZO, Y. Estudo da recuperação dos resíduos de propilenobisditiocarbamatos em produtos agrícolas pelo método colorimétrico. **ITAL**, v. 18, n. 2, p. 171-176, julho/dezembro. 1988.
- CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS, Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. **Ditiocarbamatos**. Porto Alegre, 1984. 10 p.
- CLARKE, D.G., BAUM, H., STANLEY, E.L. et al. Determination of dithiocarbamates. **Anal. Chem.**, v. 23, n. 12, p. 1842-1843, dezembro/dezembro. 1951.
- CULLEN, T.E. Spectrophotometric determination of dithioc. residues on food crops. **Anal. Chem.**, v. 36, p. 221-224, janeiro/janeiro. 1964.
- DÍAZ, T.G., VALENZUELA, M.I.A., SALINAS, F. Multicomponent determination of the pesticide naptalam and its metabolites in river water, by appying partial least square calibration to the derivative spectrophotometric signals. **J. Anal. Chem.**, v. 350, p. 692-701, abril/abril. 1994.
- DONALDSON, E.M.P., INMAN, W.R. Determination of manganese in high-purity niobium, tantalum, molybdenum and tungsten metals with PAN. **Tal.**, v. 13, p. 489-497, novembro/novembro. 1966.
- EMPRESA CAPIXABA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMCAPA. **Coleta de amostras para análise de resíduos de pesticidas**. Vitória, ES, 1987. 44 p.(Documento, 39)
- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - EMATER - MG. **Programa de assistência técnica e extensão rural ano 1993-PROATER - 93**. Viçosa, MG, 1993. 85 p.

- FISHBEIN, L., FAWKES, J. Thin layer Chromatogr. of metallic derivatives of ethylenbis(dithiocarbamic acid) and their degradation products. **J. Chromatog.**, v. 19, p. 364-369, dezembro/dezembro. 1965.
- FREAR, D.E.H. **Chemistry of the pesticides**. 3.ed. Toronto: D. Van Nostrand, 1955, 469 p.
- FREITAS, J.B. **Dissipação dos resíduos do inseticida metamidofos em frutos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill)**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1992. Dissertação (Mestrado em Agroquímica).
- FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED. **Ditiocarbamatos, determinação de resíduos em frutas, verduras e legumes**. Belo Horizonte, 1994. 12 p.
- GARTHWAITE, P.H. An interpretation of partial least square. **J. Am. Statistical Assoc.**, v. 89, n. 425, p. 122-127, março/março. 1994.
- GRISOLIA, C.K. Fungicidas etilenobisditiocarbamatos: aspectos de genotoxicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. **R. Tec. Cient.**, v. 5, p. 19-32. 1995.
- GUSTAFSSON, K.H., THOMPSON, R.A. Hight-Pressure Chromatographic determination of fungicidal dithiocarbamates. **J. Agric. and Food Chem.**, v. 29, n. 4, p. 729-732. 1981.
- HYLIN, J.W. Thin layer chromatography of dithiocarbamate fungicides. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 1, p. 76-77. 1966.
- KANIWA, M.A. Hight-perform. liq. chrom. identification and determination of dithiocarbamates in vulcanized rubber products. **J. Chromatogr.**, v. 405, p. 263-271, maio/maio 1987.
- KAPOOR, J., RAO, A.L.J. Spectrophotometric determination of ziram and zineb using 4-(2-pyridylazo)resorcinol. **Pest. Sci.**, v. 42, n. 2, p. 102-112. 1994.
- KEPPEL, G.E. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithioc. residues. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 52, n. 1, 162-167. 1969.
- KEPPEL, G.E. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residue by a modified carbon disulfide method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 54, n. 3, p. 528-532. 1971.

- LEHOTAY, J., HOLOTIK, S., BRANDSTETEROVA, E. Identification products of mancozeb by HPLC and MS. **J. Liquid Chromatogr.**, v. 15, n. 13, p. 2397-2405. 1992.
- LEHOTAY, J., KISOVA, D. HPLC study of mancozeb degradation on leaves. **J. Liquid Chromatogr.**, 16 (5): 1015-1022, 1993.
- LOWEN, W.K. Determination of dithiocarbamate residues on food crops. **Anal. Chem.**, v. 23, n. 12, p. 1846-1850. 1951.
- MACKINLEY, W.P., MAGARVEY, S.A. Paper chromatography of ferbam, maneb, nabam, thiram, zineb, and ziram. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 43, n. 3, p. 717-720. 1960.
- MAINI, P., BONI, R. Gas chromatographic determination of dithiocarbamate fungicides in workroom air. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 37, p. 931-937. 1986.
- MALIK, A.K., RAO, A.L.J. Spectrophotometric determination of some dithiocarbamates. **Tal.**, v. 37, n. 12, p. 1205-1207, junho/junho. 1990.
- MALIK, A.K., RAO, A.L.J. Spectrophotometric determination of ziram, ferbam and zineb with diphenylcarbazone. **Tal.**, v. 38, n. 8, p. 941-944, agosto/agosto. 1991.
- MALIK, A.K., PAUL, Y., RAO, A.J.L. et al. Spectrophotometric determination of some dithiocarbamates after extraction of their chromium (III) complexes into molten naphthalene. **Int. J. Environ. Studies**, v.38, p.199-200. 1991.
- MALINOWSKI, E. R. **Factor analysis in chemistry**. 2. ed. New York: J. W. & Sons, 1991. 510 p.
- MARTINEZ, V.J.L., CERVANTES, O.D., FERNANDEZ, A.A.R. et al. Determination of metham and thiram in soils and vegetables grown in greenhouses. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** v. 56, n. 1, p. 1-10. 1994.
- MARTY, J.L., MIONETTO, N., NOGUER, T. et al. Enzyme sensors for the detection of pesticide. **Biosen. Bioelectr.**, v. 8, n. 6, p. 273-280. 1993.
- PONTE, J.J. **Fitopatologia: princípios e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1986. 250 p.

- POPPI, R.J. **Construção de um espectrofotômetro com transformada de Hadamard e sua aplicação na análise por injeção em fluxo.** Campinas: Universidade de Campinas, 1993. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de Campinas, 1993.
- QUINTERO, M.C., SILVA, M., BENDITO, D.P. Stopped-flow determination of maneb in formulations and its residues on grain. **Anal. Chim. Acta**, v. 222, p. 269-277, janeiro/janeiro 1989.
- RAO, A.L.J., MALIK, A.K., KAPOOR, J. Extration spectrophotometric determination of maneb with 1-(2'-pyridylazo)-2-naphthol (PAN). **Tal.**, v. 40, n. 2, p. 201-203, junho/junho. 1993.
- ROLAND, L., GOCHA, N., NENOIR, L., FRENNET, M., HACOURT, P. Selective method for the determination of residues of thiram in crops. **Mededelingen van de faculteit Landbouwwetenschappen**, Universiteit Gent, v. 57, n. 3b, p. 1255-1260. 1992.
- SHARVELLE, E.G. **The nature and uses of modern fungicides.** Minneapolis: Burgess, 1961. 308 p.
- SUPERINTENDÊNCIA AGROPECUÁRIA - SUPAGRO. **Resíduos de fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos em frutas e hortaliças.** Contagem, 1986. 12 p.
- TOMLIN, C. (Org.). **A WORLD COMPENDIUM. The Pesticide Manual. Incorporating the Agrochemicals Handbook.** 10. ed. Surrey: The Royal Society of Chemistry, 1994. 1341 p.
- VAN DER KERK, G.J.M., KLÖPING, **Investigations on organic fungicides. VII. Further considerations regarding the relations between chemical structure and antifungal action of dithiocarbamate and bisdithiocarbamate derivatives.** RECUEL, v. 71, p. 1179-1197. 1952.
- VERMA, B.C., SHARMA, D.K., PANDE, A. et al. A new colorimetric method for the determination of carbon disulphid and its application to the analysis of some dithiocarbamate fungicides. **Tal.**, v. 30, n. 10, p. 787-788. 1983.
- VERMA, B.C., SHARMA, D.K., PANDE, A., et al. Rapid spectrophotometric methods for the determination of zineb and mancozeb in commercial formulation and residues on grains. **Nat. Acad. Scien. Lett.**, v. 15, n. 3, p. 73-76. 1992.

VOGEL, A.I. **Química analítica qualitativa**. 5. ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981. 298 p.

WALASH, M.I., BELAL, F., METWALLY, M.E. Spectrophotometric determination of maneb, zineb and their decomposition products in some vegetables and its application to kinetic studies after greenhouse treatment. **Food Chem.**, v.47, n. 4, p.411-416. 1993.

WANG, S.F., WAI, C.M. Separation of metaldithiocarbamate complexes by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. Science**, v.32, p. 506-510, novembro/novembro. 1994.