

R. B. Abakerli¹, E. F. Fay¹, A. J. B. Luiz¹, N. R. Rodrigues², H. H. B. Toledo³, T. D. L. Galvão⁴, V. M. Medina⁵, D. S. Martins⁶, O. K. Yamanishi⁷, D. R. C. Souza¹, M. A. Rosa¹, E. G. R. Rodrigues², A. C. Molena³ y A. Bonifácio⁸.

- 1- Embrapa Meio Ambiente - CP. 69, Jaguariúna, SP, Brasil, CEP 13820-000. E-mail: abakerli@cnpma.embrapa.br
 2- CPQBA-UNICAMP Campinas, SP, Brasil. 3- IAL, São Paulo, SP, Brasil. 4- EBDA, Teixeira de Freitas, BA, Brasil. 5- Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brasil. 6- INCAPER, Vitória, ES, Brasil.
 7- FMAV- UnB, Brasília, DF, Brasil. 8- CFA-MAPA, Brasília, DF, Brasil.

RESUMO. Neste trabalho foram utilizados três métodos para análise de ditiocarbamatos em amostras testemunha de mamão das variedades *Golden*, *Sunrise solo* e *Tainung*. Os mamões foram cultivados em áreas experimentais sem utilização, durante todo o ciclo da cultura, de agrotóxicos ou fertilizantes sulfurados. O CS₂ foi quantificado por espectrofotometria e por cromatografia gasosa utilizando detector fotométrico de chama no modo enxofre, tanto no método por *headspace* quanto por partição em iso-octano. Todos os métodos forneceram resultados positivos de CS₂ no mamão, independentemente da variedade avaliada. As concentrações de CS₂ observadas foram comparadas com o limite máximo de resíduos de etilenobis(ditiocarbamatos) (EBDCs), estabelecido na Comunidade Européia em 0,05mg kg⁻¹. A probabilidade de ser encontrada uma amostra de mamão com concentração de CS₂ igual ou acima de 0,05 mg kg⁻¹ foi de 12 % pelo método de iso-octano, 55 % pelo método de *headspace* e 94 % pelo método espectrofotométrico. Desse modo, os resíduos de EBDCs quantificados como CS₂, devem ser cuidadosamente interpretados em culturas com geração fitogênica de CS₂, pois a presença deste não confirma a utilização de fungicidas EBDCs.

ABSTRAC. Three dithiocarbamate analytical methods were used to analyze papaya check samples of *Golden*, *Sunrise solo* and *Tainung* varieties. Papaya trees were cultivated in experimental areas and were not treated, during all the culture cycle, with sulfured pesticides or fertilizers. CS₂ was quantified by spectrophotometry and by gas chromatography with flame photometric detection in sulfur mode in both headspace and isooctane methods. All methods gave CS₂ positive results for all papaya varieties. CS₂ concentrations were compared with the EBDCs maximum residue limits of 0.05 mg kg⁻¹, established in European Union. The probability of finding papaya samples with CS₂ concentration above 0.05 mg kg⁻¹ were 12 % by iso-octane method, 55 % by headspace method and 94 % by spectrophotometric method.

EBDCs (Brasil, 2000). Para a Europa são exportados 70% da produção nacional, o que a torna o principal mercado consumidor do mamão brasileiro.

Todos os métodos de análise de resíduos de EBDCs são uma variação do método de Keppel (1969; 1971), no qual o CS₂ liberado é absorvido numa solução contendo amina e o complexo formado é medido por espectrofotometria. A análise também pode ser feita por cromatografia gasosa, utilizando-se a técnica de análise do *headspace* no frasco de hidrólise (McLeod *et al.*, 1969; Hill y Edmunds, 1982). Uma modificação desse método envolve a dissolução do CS₂ em uma camada de solvente orgânico (iso-octano), com análise subsequente por cromatografia gasosa (Harrington *et al.*, 1998).

Legalmente os níveis de resíduos de agrotóxicos são controlados pelos limites máximos de resíduos (LMR) que são estabelecidos para um par agrotóxico/cultura, e podem ser inexistentes ou diferentes entre diversos países. Essas diferenças podem gerar conflitos quando os níveis aceitos em um determinado país não são aceitos em outros. Por exemplo, na Comunidade Européia, o LMR para (EBDCs) em mamão é o limite de quantificação do método (0,05 mg kg⁻¹) ao passo que no Brasil é de 3 mg kg⁻¹ e nos Estados Unidos é 10 mg kg⁻¹.

O mancozebe, fungicida amplamente usado na cultura do mamão, é um complexo polimérico de EBDC com sais de manganês e zinco, de difícil solubilização em água e em solventes orgânicos. A sua análise é realizada de maneira indireta envolvendo a dosagem de CS₂. Desse modo, algumas plantas que geram fitogenicamente CS₂, como as Brassicaceas (Perz *et al.*, 2000) e Caricaceas (Abakerli *et al.*, 2004), podem fornecer resultados falso positivos.

Os métodos espectrofotométrico e cromatográfico (*headspace* e isooctano) mostram resultados que se correlacionam para culturas que não geram dissulfeto de carbono (Abakerli *et al.*, 2003, dados não publicados).

O objetivo deste estudo foi analisar, em amostras testemunha de mamão, isentos de tratamento com agroquímicos sulfurados, o nível de CS₂ endógeno, nas condições analíticas de determinação de resíduos de ditiocarbamatos por três diferentes métodos: iso-octano, *headspace* e espectrofotométrico.

2.- Material e métodos

2.1 Ensaios de campo

Os experimentos de campo para obtenção de amostras de testemunha de mamão foram efetuados nas áreas

1.- Introdução

O Brasil tem enfrentado o rechaço de mamão no mercado internacional por causa de resíduos não conformes de

representativas da produção brasileira nos estados da Bahia e Espírito Santo. Os experimentos foram conduzidos tanto em áreas virgens de produção comercial quanto em campos experimentais de Instituições de Pesquisa ou Ensino. As mudas das variedades *Golden* e *Sunrise solo* foram obtidas no Centro de Mandioca e Fruticultura da Embrapa ou das fazendas produtoras de mamão., a partir de sementes que não receberam qualquer tratamento químico com compostos sulfurados. A semeadura foi feita em solo também sem tratamento com agroquímico sulfurado. Aos 50 dias da semeadura as mudas foram transplantadas para áreas experimentais. Amostras das variedades *Golden*, *Sunrise solo* e *Tainung* foram coletadas aleatoriamente na fase comercial de maturação.

2.2 Análise de CS₂

2.2.1 Processamento de amostras

Tão logo foram recebidas, as amostras de mamão foram mantidas em temperatura entre 5 e 10°C para retardar o amadurecimento dos frutos até a etapa de processamento. Todas as amostras utilizadas eram sadias e foram picadas antes da análise.

2.2.2 Método analítico para determinação de CS₂ por partição em iso-octano

Foram pesadas diretamente nos frascos de reação, 50 g de amostra, adicionadas de 150 mL de solução de cloreto estano 1,5 % em 12 % de ácido clorídrico e 25 mL de iso-octano. O frasco foi tampado e incubado por duas horas a 80 °C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, uma alíquota da camada de iso-octano foi transferida para frasco de injeção e analisada contra uma curva de calibração obtida com dissulfeto de carbono em iso-octano, na faixa de concentração de 0,03 até 0,8 µg mL⁻¹.

O dissulfeto de carbono foi analisado em cromatógrafo gasoso HP-6890 equipado com detector fotométrico de chama com filtro no modo enxofre, coluna HP-Plot Q de 30 m x 0,53 mm x 40 µm. Fluxo de gás de arraste 7,0 mL min⁻¹; temperatura do injetor 150 °C; temperatura do detector 200 °C; programação do forno 80 °C por 3 min, 10 °C min⁻¹ até 250 °C. Os reagentes CS₂, iso-octano, cloreto estano e ácido clorídrico foram grau analítico ou grau resíduo. O LOQ, limite de quantificação, foi de 0,02 mg kg⁻¹.

2.2.3 Método analítico para determinação de CS₂ por *headspace*

Foram pesadas diretamente nos frascos de reação, 4 g de amostras e nestas foram adicionadas 15 mL de uma solução de cloreto estano a 3 % em ácido clorídrico 8 N e 6 mL de EDTA a 10 % em água. Os frascos foram selados e incubados por duas horas a 90 °C em banho de areia. As quantificações foram realizadas usando curva de calibração obtida com injeções de 0,75 ng até 30 ng de CS₂ em iso-octano. Volumes de 100 a 1000 µL do *headspace* foram injetados.

O dissulfeto de carbono foi analisado em cromatógrafo gasoso Varian 3700 equipado com detector fotométrico de chama com filtro no modo enxofre, coluna de 2 m x 3 mm com PT 28 % Alltech 223 + 4 % KOH em Chromosorb R 80/100 mesh. Fluxo de hélio 40 mL min⁻¹, ar sintético (1) 120 mL min⁻¹, ar sintético (2) 195 mL min⁻¹, hidrogênio 150 mL min⁻¹, temperatura do injetor 210 °C, temperatura do detector 210 °C e temperatura do forno da coluna 115 °C. O limite de quantificação foi de 0,02 mg kg⁻¹.

2.2.4 Método analítico para determinação de CS₂ por espectrofotometria

Foi utilizado o método S 15 do Manual de Métodos (Alemanha, 1987) cujo princípio se baseia em metodologia clássica de análise de ditiocarbamatos (Keppel, 1969; 1971). O limite de quantificação foi de 0,10 mg kg⁻¹.

3.- Resultados e discussão

O método de partição em iso-octano foi aplicado em 65 amostras de mamão provenientes de três variedades, obtidas de quatro locais de experimentação em campo. As análises por *headspace* foram efetuadas em 51 amostras das variedades *Golden* e *Sunrise solo* e o método por espectrofotometria foi aplicado em 16 amostras das variedades *Golden* e *Tainung*.

A Tabela 1 resume os resultados das concentrações médias de dissulfeto de carbono nas variedades *Golden*, *Sunrise solo* e *Tainung*. Em todas elas foi observada a presença de CS₂, independentemente do método de análise utilizado. Os valores na Tabela 1 representam as médias aritméticas das concentrações de CS₂. Para o cálculo das médias foi considerado o valor zero quando o CS₂ não foi detectado e a metade do valor do limite de quantificação para as amostras com valores abaixo do LOQ. O coeficiente de variação para as concentrações de CS₂ foi de 39 a 200%, o que é esperado nesse tipo de trabalho, realizado com frutos individuais.

Tabela 1. Concentração média de CS₂ em testemunhas de mamão por três métodos (mg kg⁻¹).

Variedade	Local	Iso-octano	Headspace	Espectro fotométrico
Golden	Barreiras	0,03±0,03	-	0,50±0,66
	Linhães	0,03±0,02	0,21±0,25	0,79±0,31
	Cruz das Almas	0,21±0,15	-	-
	Teixeira de Freitas	0,02±0,02	0,06±0,03	-
Tainung	Barreiras	0,01±0,02	-	0,24±0,25
Sunrise solo	Cruz das Almas	0,02±0,01	-	-
	Almas	0,02±0,01	-	-
	Teixeira de Freitas	0,02±0,01	0,03±0,02	-

n = três a dezoito determinações

Com o método de iso-octano, as maiores concentrações de dissulfeto de carbono foram observadas nas amostras de Cruz das Almas. Os valores bem maiores para essas amostras podem estar relacionados à ocorrência de doenças no mamão. É descrito que, quando a sanidade da planta é afetada, um processo de autoproteção ocorre, liberando isotiocianatos naturais que são precursores do CS₂ (Nascimento et al., 2003). As concentrações de CS₂ são da mesma ordem de grandeza para os demais locais, independentemente da variedade avaliada (Tabela 1).

Para cada um dos métodos de análise utilizados foram calculadas as probabilidades de se observar concentrações de CS₂ maiores que 0,05 mg kg⁻¹, que é o LMR de EBDCs em mamão na União Européia. Assumida uma distribuição normal, essas probabilidades seriam de 61 % para o método por *headspace*, 88 % para o método espectrofotométrico e 35 % para o método por iso-octano (Figuras 1, 2, e 3).

No entanto, a suposição de que os resultados seguem uma distribuição normal, não reflete uma situação real porque a concentração é sempre uma grandeza positiva e a distribuição normal aceita valores negativos.

Dessa forma, foi calculada a distribuição empírica de probabilidade acumulada a partir dos dados observados. Nesse caso, pode-se afirmar que a probabilidade de se encontrar uma amostra de mamão com concentração de dissulfeto de carbono igual ou maior que 0,05 mg kg⁻¹ é de 55 % pelo método de *headspace*, 94 % para o método espectrofotométrico e 12 % pelo método do iso-octano. Das 16 amostras analisadas pelo método espectrofotométrico somente uma forneceu resultado <0,05 mg kg⁻¹ o que representou apenas 6 % das amostras (Figuras 1, 2, e 3).

As figuras abaixo apresentam a curva empírica da frequência acumulada (*freq_acum*) e a curva estimada da normal acumulada (*norm_acum*) para os três métodos de análise.

As diferenças nas concentrações de CS₂, verificadas entre os métodos utilizados, estão relacionadas com determinados parâmetros dos mesmos. O conhecimento desses parâmetros é de extrema importância na análise de resíduos de EBDCs em plantas com formação endógena de CS₂. Segundo Schwack & Nyanzi, (1993), a utilização de dietanolamina no procedimento da análise de ditiocarbamatos por espectrofotometria, não permite a discriminação entre dissulfeto de carbono (CS₂) e sulfeto de carbonila (COS). Esta condição analítica foi utilizada nas análises por espectrofotometria, podendo ter sido a razão dos altos valores

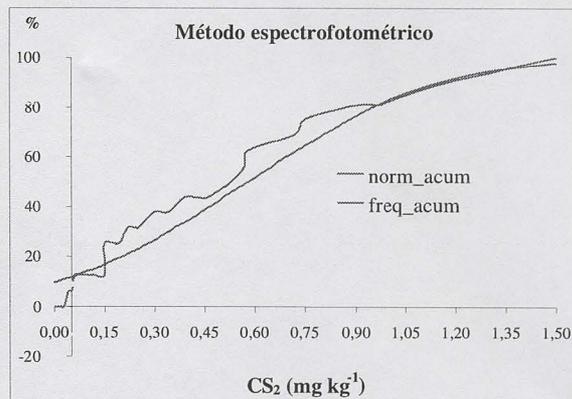
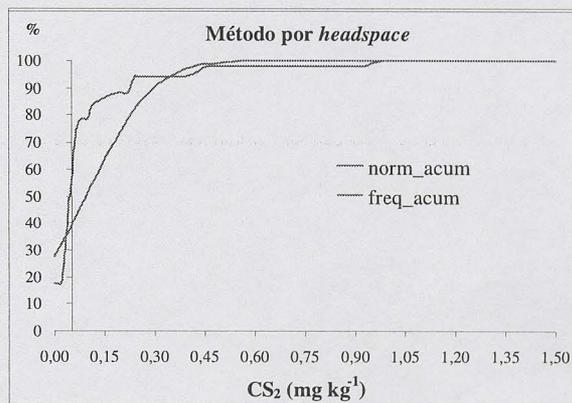
observados.

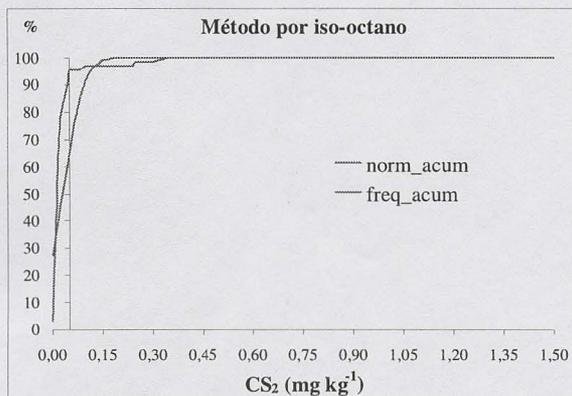
Os métodos por *headspace* e iso-octano fizeram uso de diferentes temperaturas de hidrólise. Isso pode ter sido uma provável causa para a obtenção de concentrações maiores de CS₂ para as análises efetuadas por *headspace* (90°C) quando comparado às por partição em iso-octano (80°C).

Em decorrência desse fator, foi feita a hidrólise de uma mesma amostra de casca e sementes de mamão em dois laboratórios distintos, utilizando os métodos por *headspace* e partição em iso-octano (dados não apresentados). As condições experimentais, em relação à temperatura, foram as mesmas para ambos os métodos, em cada laboratório, e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

4.- Conclusão

Podemos concluir pelos resultados encontrados que o controle de parâmetros das metodologias utilizadas é fundamental na análise de EBDCs em culturas que geram CS₂. A presença de dissulfeto de carbono em mamão, mesmo em concentrações acima de 0,05 mg kg⁻¹ não indica a utilização de fungicidas EBDCs na cultura. Fatos como este, devem ser levados em conta quando do estabelecimento de LMRs de EBDCs em culturas com geração fitogênica de CS₂.





Agradecimentos. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) processo 480082/01-4 e ao Programa de Produção Integrada de Frutas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil.

Bibliografia

- Abakerli, R. B., Rodrigues, N. R., Medina, V. M., Fay, E.F., Sparrapan, R., Eberlin, M. N., Souza, D. R. C. de, Rodrigues, E. G. R., Galvão, T. D. L. y Rosa, M. A. Endogenous generation of CS_2 during dithiocarbamate residue analysis in *Carica papaya* L. In: *EPRW 2004 - 5th European Pesticide Residue Workshop Pesticides in Food and Drink*, Stockholm, Sweden, June 13-16, 2004.
- Alemanha. Manual of Pesticide Residue Analysis, vol. 1, 1987. IN: Their, H & Zeumer, H. Working Group 8 - dithiocarbamate and thiram, disulfide fungicide S15.
- Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Comunicação particular. 2000.
- Harrington, P., Horner, J., Hird, S. Griffiths, T. y Reynolds, S.L. *Modification of the method for measurement of dithiocarbamate residues as carbon disulfide in fruit and vegetables - Final Report*, FD 98/46. New York: CSL, 1998. 34p.
- Hill, A.R.C., Edmunds, J.W. Headspace methods for the analysis of dithiocarbamate pesticide residues in foodstuffs. *Analytical Proceedings*, p. 433-435, 1982.
- Keppel, G.E. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 52, p. 162-167, 1969.
- Keppel, G.E. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by a modified carbon disulfide evolution method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 54, p. 528-532, 1971.
- MacLeod, H.A., McCully, K.A. Head space procedure for screening food samples for dithiocarbamate residues. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 52, p. 1226, 1969.
- Nascimento, A.S., Frighetto, R.T.S., Malavasi, A. y Habibe, T.C. Avaliação dos teores de benzil isotiocianato (BITC) em mamoeiros sadios e infectados pela meleira em condições de campo e telado. IN: *Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*. Martins, D dos S (Ed.). Vitória, ES: Incaper, 2003. 714p.
- Perz, R. C., Lishaut, H. van y Schwack, W. CS_2 blinds in Brassica crops: false positive results in the dithiocarbamate residue analysis by the acid digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 792-796, 2000.