



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

REGINALDO CARLYLE SILVA DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM MARACUJÁS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

BRASÍLIA

2017

REGINALDO CARLYLE SILVA DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM MARACUJÁS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eloisa Dutra Caldas

Coorientadora: MSc. Joseane de Oliveira Mozzaquatro

BRASÍLIA

2017

REGINALDO CARLYLE SILVA DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS EM MARACUJÁS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Brasília, 29 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

MSc. Joseane de Oliveira Mozzaquatro

Prof.^a Dr. Maria Hosana

Á minha avó, Maria Conceição, com todo o meu amor, saudade e respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Arlete, que sempre me ensinou a buscar o melhor de mim em todas as situações, me ensinou a ser forte e conquistar os meus sonhos. Você sempre esteve ao meu lado e nunca deixou que eu desistisse mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço também ao meu irmão, Leonardo, e todas as tias e tios, prima e primos que sempre me deram apoio e acreditaram em mim.

Ao Fabrício, meu companheiro e porto-seguro, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigado por todo o carinho e amor que tornaram essa caminhada muito mais suportável.

À minha querida orientadora, Eloisa Dutra Caldas, que acreditou no meu potencial, me abriu as portas e me acolheu em seu laboratório para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Obrigado pela oportunidade e confiança.

Agradeço também à Joseane Mozzaquatro, minha coorientadora, que me guiou durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado por todo o conhecimento transmitido e as horas dedicadas.

À professora Maria Hosana, obrigado por aceitar de tão bom grado fazer parte da minha banca avaliadora.

Aos meus companheiros de LabTox, André, Denise, Gabriel, Nathalya e Tatiana muito obrigado por toda a ajuda e pelos momentos juntos.

À Embrapa Cerrados e a pesquisadora Ana Maria, por fornecer as amostras que foram analisadas no presente trabalho.

Agradeço à todos os meus amigos, em especial Hanna, Isabela Parucker, Izabela Henrique, Karine, Luana, Maria Eduarda, Maria Isadora, Muriel, Raul Nunes, Rhaul de Oliveira, Stefanny e Vanessa, por compartilhar tantos momentos comigo, a amizade de vocês se fez presente nos momentos mais difíceis e nos momentos de extrema alegria também, obrigado por tudo ao longo dessa jornada.

Lá no avarandado na luz do meio dia

O segredo dos teus olhos tanta coisa me dizia

O cabelo solto ao vento, o teu jeito de olhar

E no seu corpo moreno, a flor de maracujá.

Flor de Maracujá – João Donato / Lysias Enio

RESUMO

O Brasil abriga cerca de 150 espécies de maracujá, sendo considerado um dos países de maior diversidade do gênero *Passiflora*. O maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*) é a variedade mais produzida no Brasil e no mundo todo. A quantidade de subprodutos do processamento do suco de maracujá é bastante expressiva, correspondendo a 65-70% do peso total dos frutos, com algumas variações dependendo da espécie. O aproveitamento desses subprodutos vem gerando um grande interesse para a produção e desenvolvimento de novos produtos à base de maracujá, tanto pela indústria de alimentos como de fitoterápicos. O uso de pesticidas é necessário para garantir boa produção e qualidade dos frutos, mas estes produtos podem deixar resíduos nos alimentos. Dentre os pesticidas com uso permitido para a cultura do maracujá, encontram-se os ditiocarbamatos, fungicida não-sistêmico e os mais utilizados no Brasil. Esse trabalho tem como objetivo validar o método analítico para determinar fungicidas ditiocarbamatos em casca de maracujá, como CS₂, e analisar amostras da cultura de maracujá (casca e folhas) coletadas em diferentes regiões do país (Rio de Janeiro, Bahia, Distrito Federal e Goiás) no ano de 2016. O método foi validado satisfatoriamente, com limite de quantificação estabelecido como 0,1 mg CS₂/kg e o limite de detecção como ½ LOQ, 0,05 mg CS₂/kg. Os resultados da análise das amostras de folhas (20 amostras) e casca de maracujá (22 amostras) mostraram que 35,7% das amostras continham resíduos de ditiocarbamatos, com as maiores concentrações encontradas nas folhas (até 8,59 mg CS₂/kg). O Centro-Oeste foi a região com maior número de amostras positivas. Quando os valores encontrados na casca foram expressos em termos de fruto total, o maior valor encontrado foi de 0,41 mg CS₂/kg, não ultrapassando o LMR para o maracujá. O método utilizado foi eficiente para a matriz validada, casca de maracujá, porém, se faz necessária uma determinação direta de ditiocarbamatos para identificar se o ditiocarbamato presente é o metiram, o único permitido para esta cultura.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*, maracujá, ditiocarbamatos, folhas, frutos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Preparo da curva de calibração de CS ₂	24
Figura 2 - Sistema vertical utilizado para a digestão da amostra para análise de ditio-carbamatos, como CS ₂ (MELLO, 2014)	27
Figura 3 - Hidrólise ácida de ditio-carbamatos (CONCEIÇÃO, 2002)	29
Figura 4 - Curva de Calibração de CS ₂	30
Figura 5 - Concentração de ditio-carbamatos (CS ₂) em amostras positivas de folhas e fruto total do mesmo produtor	35

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - Estrutura química dos ditiocarbamatos registrados no Brasil.....	17
Tabela 1 - Amostras de frutos e folhas de maracujá de cada região	23
Tabela 2 - Precisão e exatidão da validação.....	31
Tabela 3 - Resultados das análises de ditiocarbamatos em amostras de maracujás (casca e fruto total) e folhas por espectrofotometria (CS ₂)	32

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivos	13
2.1. Geral	13
2.2. Específicos	13
3. Referencial Teórico	14
4. Materiais e Métodos	21
4.1. Padrões e Reagentes	21
4.2. Soluções de análise	21
4.3. Coleta e processamento das amostras	22
4.4. Validação do método espectrofotométrico para matriz maracujá	23
4.5. Determinação de ditiocarbamatos por espectrofotometria	26
5. Resultados e Discussão	29
5.1. Validação do método analítico espectrofotométrico	29
5.2. Análise das amostras de maracujá (cascas) e folhas pelo método espectrofotométrico	31
6. Conclusão	36
7. Referências	37

1. Introdução

O maracujá (*Passiflora* sp) está entre as frutas mais consumidas no Brasil (IBGE, 2012a). O País abriga cerca de 150 espécies de maracujá das 520 existentes, sendo considerado um dos países de maior diversidade do gênero (AHUJA; MOHAN JAIN, 2016). O maracujá-amarelo ou azedo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*) é a variedade mais produzida no Brasil e no mundo todo (BELLON et al., 2007). O suco integral é o principal produto comercializado e suas folhas são comumente utilizadas na medicina popular e na produção de fitoterápicos devido às propriedades benéficas à saúde, como calmante, ansiolítico e sedativo suave (COLETA et al., 2006; DE-PARIS et al., 2002; DENG et al., 2010; LORENZI; DE ABREU MATOS, 2008), que são conhecidas desde a antiguidade.

A quantidade de subprodutos do processamento do suco de maracujá é bastante expressiva, e correspondem a 65-70% do peso total dos frutos, com algumas variações dependendo da espécie (CARVALHO, 1968; MEDINA et al., 1980; RUGGIERO, 1987). O aproveitamento desses subprodutos vem gerando um grande interesse na indústria de alimentos e produtos farmacêuticos, utilizando folhas, cascas e sementes.

A área de cultivo do maracujá vem crescendo no Brasil, e para garantir boa produção e qualidade dos frutos, bem como controlar e prevenir a incidência de pragas, o uso de pesticidas é necessário. Entretanto, o uso inadequado destes produtos pode deixar resíduos nos frutos em quantidades que ultrapassam o limite máximo de resíduos permitido pela legislação (LMR) ou podem ser prejudiciais à saúde do consumidor. Dentre os pesticidas com uso permitido para a cultura do maracujá, encontram-se os fungicidas ditiocarbamatos, os mais utilizados no Brasil e os mais detectados em alimentos em programas de monitoramento no país (JARDIM; CALDAS, 2012). São fungicidas não sistêmicos, cujos resíduos são

encontrados principalmente na casca dos frutos e nas folhas. A maior preocupação em relação à saúde da população que consome alimentos tratados está nos produtos de degradação dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e do propinebe (etilenotiouréia e propilenotiouréia, respectivamente) (KAZOS et al., 2007; OPACKA; WROŃSKA-NOFER, 1984; RUBINO; MREMA; COLOSIO, 2014).

Desta maneira, torna-se necessário a determinação de fungicidas ditiocarbamatos nos frutos e folhas do maracujá, e avaliar a segurança de seus produtos para garantir que o setor produtivo disponibilize ao consumidor uma maior oferta de ingredientes com aplicação industrial e propriedades funcionais benéficas à saúde da população.

2. Objetivos

2.1. Geral

Determinar fungicidas ditiocarbamatos em amostras de maracujás (cascas) e folhas de diferentes regiões do país.

2.2. Específicos

- Validar o método espectrofotométrico (CS_2) para análise de ditiocarbamatos em casca de maracujá-amarelo.
- Analisar amostras de maracujá (cascas e folhas) obtidas de produtores dos Estados da Bahia, do Rio de Janeiro, de Goiás e do Distrito Federal quanto à presença de ditiocarbamatos.
- Comparar a presença dos fungicidas ditiocarbamatos nas amostras de cascas e folhas entre as regiões e os períodos de coleta.

3. Referencial Teórico

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de maracujá-amarelo, com aproximadamente 694 mil toneladas cultivadas em uma área de 51 mil hectares (IBGE, 2015). A região Nordeste é responsável por mais da metade da produção nacional, e a Bahia responsável por 65,6% da produção nordestina. A segunda região de maior produção é a Sudeste, seguida das regiões Norte, Centro-Oeste e Sul (IBGE, 2012b).

A principal espécie comercial é a *P. edulis*, consumida principalmente pela qualidade de seus frutos. A polpa é empregada na elaboração de sucos e concentrados que atendem principalmente o segmento de bebidas e doces, e representa aproximadamente 33% do peso total do fruto. Esta espécie, juntamente com *P. alata* e *P. incarnata* foram relacionadas pelo Ministério da Saúde como apropriadas para uso fitoterápico (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; PAULO, 2009). As folhas são utilizadas no preparo de chás e no medicamento fitoterápico passiflora devido às propriedades calmantes que apresenta.

De acordo com OLIVEIRA et al. (2002), os subprodutos da indústria de suco de maracujá correspondem a cerca de 65 a 70% do peso do fruto, que normalmente não são aproveitados. A casca ocupa em torno de 60% do seu peso, e tem sido foco de estudos por apresentar bom valor nutricional, podendo servir de ingrediente para incorporação em outros produtos, como iogurtes e sorvetes, conferindo-lhes uma melhor textura e consistência. Além disso, seu uso é utilizado para produção de farinha de maracujá. As cascas de *P. edulis* são ricas em fibras solúveis (pectinas e mucilagens), vitamina B3, cálcio e fósforo (CÓRDOVA et al., 2005). JUNQUEIRA-GUERTZENSTEIN; SRUR (2002) realizaram estudos que mostraram efeito positivo relacionado ao consumo de farinha da casca de maracujá por ratos (*Rattus norvegicus*) nos níveis de diabetes e obesidade. RAMOS

et al. (2007) demonstraram em humanos que a farinha de maracujá foi capaz de reduzir os níveis de colesterol total e colesterol transportado por LDL (*low density lipoprotein*), dito o colesterol ruim, mas não alterou os valores do colesterol transportado por HDL (*high density lipoprotein*). Estudos clínicos conduzidos com voluntários saudáveis onde houve suplementação da dieta com farinha da casca de *P. edulis* indicaram redução média da glicemia na ordem de 5%, no colesterol total de 18%, no LDL na faixa de 19% e de triglicerídeos totais em média de 15% (MEDEIROS et al., 2009).

O óleo da semente é rico em compostos emolientes e atuam na reposição e restauração das frações lipídicas da pele. Sua aplicação tem ganhado importância na indústria cosmética, sendo encontrado em formulações de cremes hidratantes para aumento da sedosidade da pele (PEREIRA, 2011), além disso, as sementes são uma rica fonte de fibras insolúveis e mostraram ter um potencial para o controle de glicose (CHAU; HUANG, 2004).

A cultura do maracujá, assim como de outras frutas tropicais, requer cuidados ao longo da produção, e o uso de pesticidas é necessário para o controle e prevenção de pragas e doenças que ocorrem no campo. Entre as doenças que acometem o maracujázeiro estão a Fusariose, descrita pela primeira vez na Austrália em 1941 e causada pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. *passiflorae*, a Podridão do Pé, causada por fungos do gênero *Phytophthora* e a Atracnose causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, que ocorre em quase todos os cultivos de maracujá do Brasil (EMBRAPA, 2000). FISCHER et al. (2007) discute sobre a importância de medidas fitossanitárias para a obtenção de frutos de maior qualidade, no campo e na pós-colheita.

Porém, a não aplicação de boas práticas agrícolas, que inclui o uso de pesticidas em concentrações e frequência acima do estabelecido no rótulo do produ-

to, pode gerar resíduos em quantidades significativas nos frutos e folhas destinados ao consumidor, podendo ser prejudiciais à saúde. Um estudo realizado por CAVALCANTE et al. (2015) em uma comunidade de agricultores familiares, mostrou que todos os 40 agricultores de 12 assentamentos utilizaram pesticidas sem manejo adequado, tanto do produto como da embalagem, a maioria não utilizava equipamento de proteção individual (EPI) e nenhum deles possuía alguma recomendação técnica eficiente. De todas as culturas analisadas no estudo, a graviola e o maracujá foram as que receberam as maiores quantidades de pesticidas.

Os fungicidas ditiocarbamatos são pesticidas não sistêmicos amplamente utilizados na produção agrícola de frutas e vegetais, para o tratamento do solo, sementes, aplicação foliar e pós-colheita (SCHMIDT et al., 2013), devido a sua baixa toxicidade aguda, baixo custo de produção e baixa persistência ambiental. São divididos em subclasses a partir do elemento químico que forma um complexo com seu esqueleto organosulfurado (CRNOGORAC; SCHWACK, 2009; VAN LISHAUT; SCHWACK, 2000): Metilditiocarbamatos (MDTC): metam-sódico (Na); Dimetilditiocarbamatos (DMD): ziram (Zn), ferbam (Fe) e tiram (não contem elementos de coordenação); Etilenobisditiocarbamatos (EBDC): manebe (Mn), zineb (Zn), nabam (Na), metiram (Zn) e mancozebe (Zn e Mn); Propilenobisditiocarbamatos (PBDC): propinebe (Zn).

O Brasil permite o uso de cinco ditiocarbamatos para 53 culturas de alimentos, sendo eles, o mancozebe, metam-sódico, metiram, propinebe e tiram (ANVISA, 2017a). A Tabela 1 mostra a estrutura química dos ditiocarbamatos registrados para uso no Brasil.

Quadro 1 - Estrutura química dos ditiocarbamatos registrados no Brasil

Ditiocarbamatos	Estrutura
Mancozebe ¹ $(C_4H_6N_2S_4Mn)_x (Zn)_y$	
Metam-sódico ¹ $C_2H_4NaNS_2$	
Metiram ¹ $(C_{16}H_{33}N_{11}S_{16}Zn_3)_x$	
Propinebe ¹ $(C_5H_8N_2S_4Zn)_x$	
Tiram ¹ $C_6H_{12}N_2S_4$	

1 - ANVISA, 2017a

No ano de 2014, os ditiocarbamatos encontraram-se entre os mais comercializados no Brasil, com mais de 12 toneladas de mancozebe (IBAMA, 2014). A grande preocupação referente a essas substâncias para a população que consome alimentos tratados está nos produtos de degradação dos etilenobisditiocarbamatos (EBDC), como mancozebe e metiram e do propinebe (etilenotiouréia e pro-

pilenotiouréia, respectivamente), além do dissulfeto de carbono (CS_2) que estão associados às causas de toxicidade crônica dos ditiocarbamatos (KAZOS et al., 2007; OPACKA; WRÓŃSKA-NOFER, 1984; RUBINO; MREMA; COLOSIO, 2014). Os EBDC, juntamente com o propinebe, representam mais de 90% do uso de ditiocarbamatos no Brasil (REBELO et al., 2010). Estudos crônicos conduzidos em animais de laboratório mostraram que a etilenotiouréia (ETU) é carcinogênica (DOERGE; TAKAZAWA, 1990; MULKEY, 2001), causa efeitos na tireoide e é teratogênica em ratos expostos por via cutânea ou oral (EPA, 2000), causa redução na quantidade de ninhadas viáveis, tamanho da ninhada e peso dos filhotes (DEARFIELD, 1994; HARDIN et al., 1987), além de interferir no perfil do hormônio reprodutivo de ratos e na homeostase da tireoide (MARANGHI et al., 2013). Ratos expostos à propilenotiouréia (PTU) mostraram efeitos na tireoide e efeitos goitrogênicos, e camundongos machos ostraram aumento na incidência de adenomas hepatocelulares e carcinoma hepatocelulares (FAO; WHO, 1997).

No Brasil existem dois programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), coordenados pela ANVISA e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), respectivamente. Jardim e Caldas (2012) analisaram os resultados obtidos pelos dois programas no período de 2001 e 2010, onde foram analisadas um total de 13.556 amostras de 22 tipos de alimentos. Os fungicidas ditiocarbamatos foram os mais frequentes, presentes em mais de 40% das amostras analisadas. As culturas que apresentaram maior porcentagem de amostras positivas para ditiocarbamatos foram de alface (71,3%), maçã (67,7%) e tomate (56,4%). O maracujá não está incluído entre os alimentos analisados nesses programas. JARDIM et al. (2014) analisaram amostras de caqui, caju, goiaba e pê-

sego, para determinação de ditiocarbamatos e outros pesticidas multiclassas. Os ditiocarbamatos obtiveram maior frequência, detectados em todas as culturas analisadas (33,2 % do total de amostras), com a maior concentração em uma amostra de caqui (7,09 mg CS₂/kg). A porcentagem de amostras de caju e goiaba contendo resíduos de ditiocarbamatos foi superior a 15%, enquanto que nas amostras de caqui e pêssigo foi superior a 40%. O uso de ditiocarbamatos em caqui, caju e goiaba não é permitido no Brasil.

Poucos pesticidas possuem uso permitido pela ANVISA para a cultura do maracujá, e incluem abuprofezina, clorfenapir, indoxacarbe, fentiona, azoxistrobina, boscalida, difenoconazol, lambda-cialotrina, imidacloprido, clorfenapir, cazugamicin, cloreto de benzalcônico e o EBDC metiram. Cada composto possui um limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido para a cultura como ela é comercializada, modo de aplicação e intervalo de carência. O metiram pode ser utilizado no cultivo do maracujá com aplicação foliar e um intervalo de segurança de sete dias, que representa o intervalo entre a última aplicação e a colheita do fruto (ANVISA, 2017b). O LMR de metiram em maracujá é definido como ditiocarbamatos, em mg/kg de CS₂, já que não existe método de rotina para determinar o composto específico.

CULLEN (1964) e KEPPEL (1969) descreveram o método clássico para a determinação de ditiocarbamatos, que se baseia na determinação do CS₂ liberado durante a decomposição ácida do composto presente na amostra na presença de cloreto de estanho. O CS₂ liberado é complexado em uma solução de acetato cúprico, dietanolamina e etanol e o complexo é analisado por espectrofotometria, e expressos em mg CS₂/kg da amostra. Porém, essa metodologia não possibilita que se faça a distinção entre os diferentes compostos de ditiocarbamatos presentes na amostra e pode dar resultado falso positivo para algumas culturas, como

cebola, couve, brócolis e repolho, que possuem geração fitogênica de CS₂ (STERTZ; FREITAS, 2003).

HJORTH et al. (2011) investigaram resíduos de pesticidas em 724 frutas e vegetais provenientes da América do Sul, que incluíam 18 amostras de maracujás originárias da Colômbia para determinação de ditiocarbamatos (CS₂). Duas amostras excederam o LMR determinado pela União Europeia para ditiocarbamatos, com 1,9 e 0,34 mg CS₂/kg.

Partindo das limitações que o método indireto apresenta, outros métodos foram sendo desenvolvidos para a determinação direta dos ditiocarbamatos utilizando técnicas como cromatografia em gel e espectrofotometria (PFLUGMACHER; EBING, 1980), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando colunas de fase reversa (GUSTAFSSON; FAHLGREN, 1983; LO; HO; HUNG, 1996), cromatografia de troca iônica (BARDAROV; ZAIKOV; MITEWA, 1989), cromatografia de par iônico (IRTH et al., 1986; NAKAZAWA et al., 2005; VAN LISHAUT; SCHWACK, 2000), CLAE com detector UV (GARCINUÑO; FERNÁNDEZ-HERNANDO; CÁMARA, 2004; LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012) e cromatografia líquida acoplada a detectores de massas (BLASCO; FONT; PICÓ, 2004; CAJKA et al., 2011; CRNOGORAC; SCHMAUDER; SCHWACK, 2008; HAYAMA; TAKADA, 2008; SCHMIDT et al., 2013).

Há um grande interesse por parte dos pesquisadores em utilizar os subprodutos do processo industrial do suco de maracujá (cascas e sementes) a fim de gerar novos ingredientes, proporcionando um maior incentivo a este setor produtivo, além do aproveitamento de uma matéria-prima que seria desperdiçada. Logo, assume-se a importância de avaliar a segurança dessa matéria-prima com relação à presença de fungicidas ditiocarbamatos. Não há estudos na literatura que investigam os níveis de ditiocarbamatos nas folhas de *Passiflora* utilizados

para uso medicinal. Visto que o maracujá tem uma importância econômica para o país, é necessário garantir que o fruto e as formulações desenvolvidas a partir dele tenham sua segurança e qualidade comprovadas quanto à presença desses resíduos, o que garante sua comercialização no mercado interno e externo.

4. Materiais e Métodos

4.1. Padrões e Reagentes

Dissulfeto de carbono grau HPLC foi obtido da marca Vetec®. Dietanolamina (pureza 99%), acetato de cobre II monohidratado (pureza 98-102%), álcool etílico (pureza 95%), hidróxido de sódio (pureza 99%), ácido clorídrico (pureza 32%), cloreto de estanho (pureza 98-103%), foram obtidos da marca Vetec®; Tiram obtido da marca AccuStandard® (pureza 97,1%).

4.2. Soluções de análise

Solução de digestão: Em um erlenmeyer de 4L contendo, aproximadamente, 200 mL de água destilada foram adicionados 500 mL de HCl 32% e 31,25 g de SnCl_2 . Após a completa dissolução do SnCl_2 , o volume foi completado para 2,5 L com água destilada.

Solução de hidróxido de sódio 10% (m/v): Em um balão de 1 L, foram adicionados 100 g de NaOH e o volume foi completando com água destilada.

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

Soluções padrão de dissulfeto de carbono (CS_2):

Solução Mãe 1: Foram adicionados 5 mL de etanol em um balão volumétrico de 25 mL com tampa e pesados na balança analítica e a massa (M1) foi anotada. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de CS₂ no balão, que foi imediatamente fechado, pesado e a massa (M2) foi anotada. O volume do balão foi completado com etanol.

Solução Mãe 2: Em um balão volumétrico de 50 mL, transferiu-se 1 mL da solução Mãe 1 e o volume foi completado com etanol. A solução Mãe 2 foi utilizada para a construção da curva analítica e se manteve estável apenas no dia do preparo.

4.3. Coleta e processamento das amostras

O presente estudo foi realizado em parceria com a EMBRAPA CERRADOS, responsável pela coleta e transporte das amostras até o Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília para análise. As amostras de frutos e folhas de maracujás foram coletadas diretamente nos locais de cultivo em três diferentes regiões produtoras do país: Sudeste, representada pelo estado do Rio de Janeiro, Centro-Oeste, representada pelo estado de Goiás e o Distrito Federal e a região Nordeste, representada pelo estado da Bahia. As coletas foram realizadas em dois períodos durante o ano de 2016, sendo a primeira safra correspondente aos meses 02 e 03 e a segunda safra correspondente aos meses de 10 e 11. A Tabela 1 mostra a distribuição das amostras coletadas em cada região de cultivo.

Tabela 1 - Amostras de frutos e folhas de maracujá de cada região

Região	Produtores (nº)	Maracujá (n)	Folhas de Maracujá (n)
Centro-Oeste (DF)	6	7	6
Centro-oeste (GO)	6	7	7
Nordeste (BA)	6	6	4
Sudeste (RJ)	3	2	3
Total	21	22	20

Na chegada ao laboratório, todas as amostras foram identificadas, pesadas, armazenadas em freezer a temperaturas -15°C e processadas no dia seguinte. As amostras do fruto de maracujá, depois de congeladas, foram fracionadas em casca, polpa e sementes. Neste estudo, foram analisadas as cascas e folhas, as quais foram cortadas em pequenos pedaços e armazenadas a -15°C até o momento da análise. O processamento das amostras para determinação de ditio-carbamatos deve ser rápido, de maneira que a amostra permaneça ainda congelada, a fim de evitar a degradação do analito de interesse.

4.4. Validação do método espectrofotométrico para matriz maracujá

A validação do método de análise de ditio-carbamato na casca de maracujá foi feita avaliando os parâmetros: linearidade, seletividade/especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

Linearidade:

A linearidade é a capacidade do método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (MAPA, 2011). Foi analisada por meio de uma curva de calibração (Figu-

ra 1) e avaliada por meio da regressão linear. A regressão linear foi avaliada pelo coeficiente de correlação (r), parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, já que quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

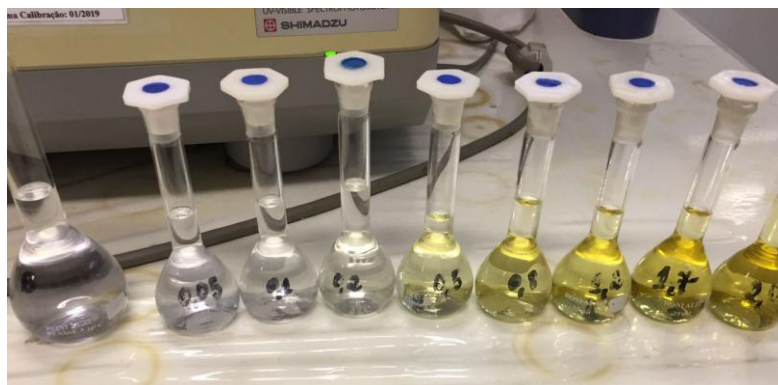


Figura 1 - Curva de calibração de CS_2

Para a construção da curva de calibração foi utilizada uma solução de CS_2 (solução Mãe 2, item 4.2), preparada a partir de uma solução mais concentrada (solução Mãe 1, item 4.2). Em um conjunto de 8 balões volumétricos de 25 mL, foram adicionados 5 mL de etanol, 15 mL da solução complexante e volumes conhecidos da solução Mãe 2, sendo eles: 0,05 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,5 mL; 0,8 mL; 1,2 mL; 1,7 mL e 2 mL. Os volumes dos balões foram completados com etanol e fechados logo em seguida. A solução branco (isenta de CS_2) foi preparada utilizando um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se 30 mL da solução complexante e o volume foi completado com etanol. A partir das massas pesadas da solução Mãe 1 (descrito no item 4.2 d) foram calculadas as concentrações teóricas da solução Mãe 2 e de cada ponto da curva.

A solução branco foi utilizada para zerar o espectrofotômetro, ajustado para realizar as leituras em 435 nm. A leitura de cada ponto da curva foi feita em tripli-

cata e a cada três pontos, a solução branco foi utilizada para purgar o equipamento até zerá-lo. Com os valores de concentração e absorvância média de cada ponto, construiu-se o gráfico da curva de calibração.

Seletividade/especificidade:

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI et al., 2004). No presente estudo, uma amostra de casca de maracujá orgânico foi analisada em duplicata para que fosse verificado a presença de interferentes.

Precisão e exatidão:

A precisão do método foi avaliada pela repetitividade, definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI et al., 2004).

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação encontrados para cada amostra branco fortificada, é a relação que existe entre a quantidade do analito detectada, obtida após seguir o procedimento analítico completo, e a quantidade adicionada no início do procedimento, expressa em porcentagem. A porcentagem de recuperação (% recuperação) foi dada através da seguinte equação:

$$\%recuperação = \frac{\text{concentração experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Onde:

Concentração experimental = valor em mg de CS₂ recuperado da amostra;

Concentração teórica = valor em mg de CS₂ adicionada à amostra.

A precisão foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV):

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

Onde:

CV = Coeficiente de variação, expresso em %;

Desvio padrão = Desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado;

Média = Média dos resultados obtidos.

Para a avaliação da precisão e exatidão, a matriz branco (casca de maracujá orgânica) foi fortificada em quatro níveis diferentes (0,05; 0,1; 0,2 e 1,0 mg/kg), cada um realizado em quintuplicata. São considerados valores aceitáveis de precisão quando o coeficiente de variação for $\leq 20\%$ e a porcentagem de recuperação estiver entre 70% e 120% (EUROPEAN COMMISSION, 2013).

Limite de quantificação (LOQ) e Limite de detecção (LOD):

O Limite de quantificação (LOQ) é definido como o menor nível de concentração na qual a amostra controle foi fortificada durante o processo de validação do método, que forneceu dados de precisão e exatidão aceitáveis. O Limite de detecção do método (LOD) foi definido como sendo o valor correspondente a $\frac{1}{2}$ LOQ (EUROPEAN COMMISSION, 2013).

4.5. Determinação de ditiocarbamatos por espectrofotometria

A determinação dos fungicidas ditiocarbamatos na matriz de estudo foi feita pelo método espectrofotométrico utilizando o sistema vertical desenvolvido por

CALDAS et al., (2001) (Figura 2). A análise é realizada pela determinação do dissulfeto de carbono (CS_2) liberado pela hidrólise ácida de ditiocarbamatos, ou seja, trata-se de uma análise indireta, a qual não distingue qual ditiocarbamato está presente na amostra (FIGURA 3).

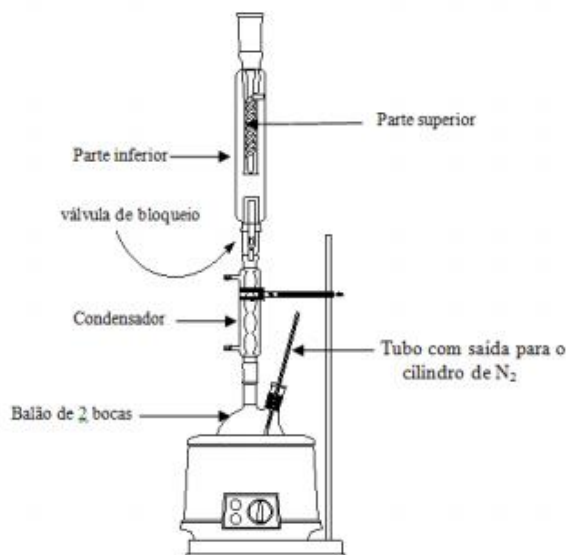


Figura 2 - Sistema vertical utilizado para a digestão da amostra para análise de ditiocarbamatos, como CS_2 (MELLO, 2014).

Cerca de 150 g da amostra foi pesada em um balão de duas bocas utilizando uma balança semi-analítica. Com auxílio de uma proveta, 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio 10% m/v (item 4.2) foram medidos e colocados na parte inferior do sistema móvel (Figura 2). A solução de NaOH tem por função reter os vapores ácidos liberados da digestão do alimento (H_2S , SO_2 , HCl, etc.). Na parte superior do sistema móvel (Figura 2) foram adicionados 15 mL da solução complexante (item 4.2), onde ocorre a complexação do CS_2 liberado na digestão da amostra.

Foram transferidos 175 mL de solução de digestão (item 4.2) para o balão contendo a amostra, que por sua vez foi colocado em uma manta aquecedora

revestida com papel alumínio e conectado ao condensador. A parte superior foi acoplada à inferior e ambos conectados ao condensador. Uma válvula de N_2 (Figura 2) que se conecta à mangueira do gás foi acoplada ao balão. Todas as conexões foram vedadas com graxa de silicone.

Para o início da digestão, a válvula do gás foi aberta vagarosamente até se obter um fluxo contínuo e suave. A válvula de água ligada ao condensador foi aberta para garantir que o sistema permanecesse resfriado e o reostato da manta aquecedora foi ajustado ao máximo. Quando o refluxo do vapor foi observado no interior do condensador, reajustou-se o reostato para a metade da capacidade de aquecimento da manta e a digestão seguiu por 45 minutos.

Ao fim dos 45 minutos de digestão, a manta aquecedora foi desligada e a válvula de gás foi fechada. Imediatamente a parte inferior e superior (Figura 2) foram desacopladas do sistema. O conteúdo da parte superior (Figura 2) foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL lavando-se quantitativamente com álcool etílico absoluto PA, com auxílio de uma pipeta Pasteur até completar o volume do balão.

A absorbância foi lida a 435 nm em um espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV-1650 PC, zerado com uma solução branco preparada em balão de 25 mL contendo 15 mL de solução complexante (item 4.2) e o volume completado com álcool etílico absoluto PA. A Figura 3 mostra as reações que ocorrem no método analítico.

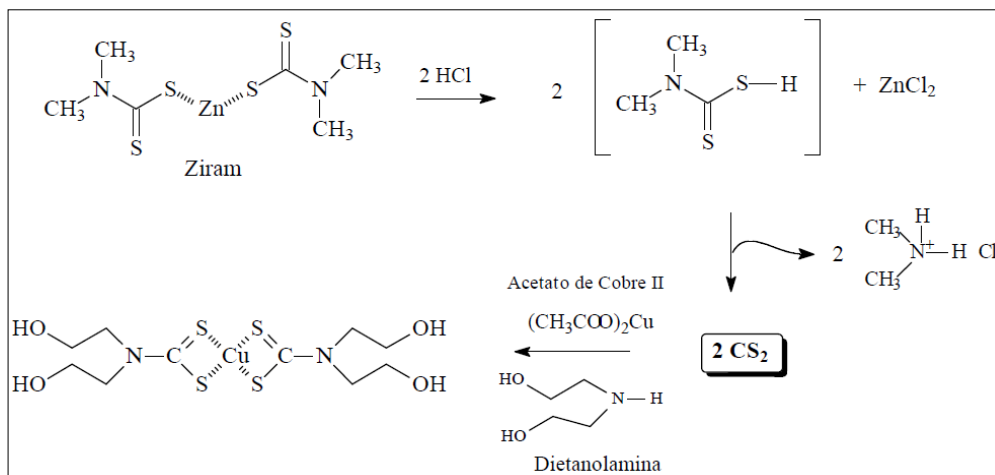


Figura 3 - Hidrólise ácida de ditiocarbamatos (CONCEIÇÃO, 2002).

O método para determinação de ditiocarbamatos foi validado anteriormente no Laboratório de Toxicologia (LabTox) para a matriz alface, devido a isso não foi necessária realizar uma outra validação para as folhas de maracujazeiro. O Lab-Tox é acreditado junto ao INMETRO pela ISO 17025 (número da acreditação: CRL 0447).

5. Resultados e Discussão

5.1. Validação do método analítico espectrofotométrico

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de uma curva de calibração, que mostrou o coeficiente de correlação da regressão linear maior que 0,99 ($r=0,997$) o que demonstra uma boa linearidade. A Figura 4 mostra a curva de calibração obtida.

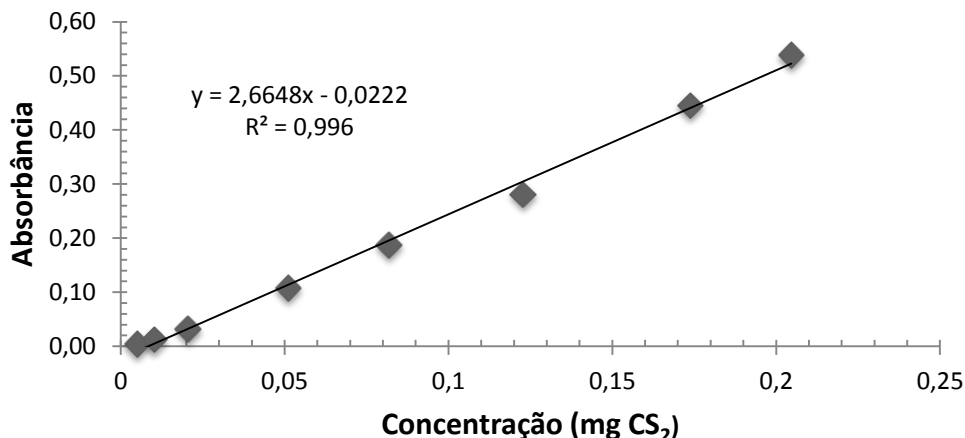


Figura 4 - Curva de calibração de CS₂

A seletividade avaliada a partir da análise da casca do maracujá de uma amostra orgânica demonstrou que não havia interferentes que possam resultar em falso-positivo, a média de absorbância foi de 0,0018 sendo abaixo do menor ponto da curva de calibração.

A precisão e exatidão foram definidas a partir de ensaios de recuperação, onde uma amostra de casca de maracujá orgânica (“branco”) foi fortificada com uma solução de tiram em quatro níveis (0,05; 0,1; 0,2 e 1,0 mg CS₂/kg), em quintuplicata. Os valores de recuperação para o nível 0,05 mg CS₂/kg não foram aceitáveis, pois apesar do coeficiente de variação apresentar-se baixo (0,86%), a média da recuperação foi de 136,6%, valor acima do permitido para essa análise (70 – 120%). O coeficiente de variação no nível 0,1 mg CS₂/Kg foi de 2,12% e a recuperação média de 95,95%. No nível 0,2 mg CS₂/Kg o coeficiente de variação e a média de recuperação foram de 12,2% e 78,6%, respectivamente. No nível 1,0 mg CS₂/Kg, os resultados foram 6,0% de coeficiente de variação e 102,2% de recuperação (Tabela 2).

Tabela 2 – Precisão e exatidão da validação, n=5

mg CS₂/Kg	0,05	0,1	0,2	1,0
Recuperação média (%)	136,6	95,9	78,6	102,2
Coeficiente de Variação (%)	0,86	2,12	12,2	6,0

O Limite de Quantificação do Método (LOQ) foi definido como sendo 0,1 mg CS₂/Kg e o Limite de Detecção do Método (LOD) como sendo 0,05 mg CS₂/Kg.

5.2. Análise das amostras de maracujá (casca) e folhas pelo método espectrofotométrico

Como os ditiocarbamatos são fungicidas não sistêmicos, ou seja, a sua presença é encontrada principalmente na superfície, assume-se que todo resíduo de ditiocarbamatos no fruto está presente apenas na casca, porção que foi analisada neste estudo. Amostras (casca) que continham resíduos de ditiocarbamatos (\geq LOQ) foram reanalisadas para confirmação do resultado, e a média dos dois valores reportada.

A concentração estimada de ditiocarbamatos, como CS₂, no fruto total foi estimada multiplicando o valor da concentração encontrada na casca (C) pelo valor em porcentagem que o peso da casca representa em relação ao peso total do fruto todo (P) e o resultado foi dividido por 100.

$$Fruto\ total = \frac{C \times P}{100}$$

Por exemplo, a amostra de casca do produtor 1 Centro-Oeste (DF) tem 0,55 mg CS₂/kg, e o peso da casca corresponde a 57,39% do peso do fruto total. A concentração de CS₂ estimada no fruto foi de 0.31 mg CS₂/kg

$$Fruto\ total = \frac{0,55 \times 57,39}{100} = 0,31\ mg\ CS_2/kg$$

A Tabela 3 apresenta os resultados das análises de maracujás (casca e fruto total) e folhas quanto à presença de fungicidas ditiocarbamatos.

Tabela 3 - Resultados das análises de ditiocarbamatos em amostras de maracujás (casca e fruto total) e folhas por espectrofotometria (CS₂)

Produtor	Região	Coleta	Amostras	Concentração (mg CS ₂ /Kg)
1	Centro-Oeste (DF)	02/ 2016	Folha	4,72
			Casca	0,55
			Fruto total	0,31
1	Centro-Oeste (GO)	02/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
2	Centro-Oeste (GO)	02/ 2016	Folha	5,37
			Casca	0,09
			Fruto total	0,05
2	Centro-Oeste (DF)	02/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
3	Centro-Oeste (DF)	03/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
1	Nordeste	03/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
2	Nordeste	03/ 2016	Folha	-
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
3	Nordeste	03/ 2016	Folha	-
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
3	Centro-Oeste (GO)	05/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
4	Centro-Oeste (GO)	05/ 2016	Folha	0,15

Tabela 3 - Resultados das análises de ditiocarbamatos em amostras de maracujás (casca e fruto total) e folhas por espectrofotometria (CS₂)

Produtor	Região	Coleta	Amostras	Concentração (mg CS ₂ /Kg)
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
4	Centro-Oeste (DF)	05/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
4	Nordeste	06/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
5	Nordeste	06/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
6	Nordeste	06/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
1	Sudeste	06/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
2	Sudeste	06/ 2016	Folha*	5,33
			Casca	0,18
			Fruto total	0,10
3	Sudeste	06/ 2016	Folha*	0,08
			Casca	-
			Fruto total	-
5	Centro-Oeste (GO)	11/ 2016	Folha	<LOQ
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
2	Centro-Oeste (GO)	11/ 2016	Folha	-
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ
6	Centro-Oeste (GO)	11/ 2016	Folha*	0,20
			Casca	0,06
			Fruto total	0,04
5	Centro-Oeste (DF)	11/ 2016	Folha*	8,59
			Casca	0,23
			Fruto total	0,13
6	Centro-Oeste (DF)	12/ 2016	Folha*	5,24
			Casca	0,79
			Fruto total	0,42
2	Centro-Oeste (DF)	12/ 2016	Folha*	0,11
			Casca	<LOQ
			Fruto total	<LOQ

* Amostras com quantidade insuficiente para segunda análise

As quarenta e duas amostras de maracujás (cascas) e folhas analisadas nesse trabalho vieram de quatro regiões diferentes do Brasil. O estado de Goiás e o Distrito Federal representaram a região com maior número de amostras (64,3%), seguido da região Nordeste (23,81%) e Sudeste (11,90%). De todas as amostras analisadas no presente estudo, a porcentagem de amostras positivas advindas da região Centro-oeste foi de 28,6%, sendo 16,7% folhas e 11,9% frutos de maracujá. Essas amostras corresponderam a 80% de todas as amostras que obtiveram resultados positivos. As amostras positivas do Centro-oeste tiveram sua colheita nos meses de fevereiro, maio, novembro e dezembro. É necessário levar em consideração a estação do ano em que as amostras foram coletadas, em sua maioria, no final da primavera e durante o verão onde o índice de precipitação foi maior no Centro-Oeste para o ano de 2016 no Distrito Federal e Goiás (INMET, 2016). Com a maior incidência de chuva, a proliferação de fungos causadores de doenças também pode aumentar, levando a uma maior necessidade da aplicação de fungicidas, como os ditiocarbamatos.

A região Sudeste contou com 7,1% de amostras positivas de todas as amostras analisadas no estudo, sendo 4,8% folhas e 2,4% frutos de maracujá. Essas amostras corresponderam a 20% de todas as amostras que obtiveram resultados positivos neste estudo e, diferentemente do Centro-oeste, a colheita dessas amostras ocorreu nos meses de junho e julho. Apesar de contribuir com o segundo maior número de amostras analisadas, a região Nordeste não apresentou nenhum resultado positivo.

Ao todo, quinze amostras (35,7%, incluindo folhas e frutos de maracujá) analisadas foram positivas para resíduos de ditiocarbamatos. Mais da metade das amostras de frutos (casca) e folhas não apresentaram resíduos de ditiocarbama-

tos detectáveis apesar de esta ser uma das classes de pesticidas mais detectadas em programas de monitoramento (JARDIM e CALDAS, 2012). Duas amostras do mesmo produtor advindos do Rio de Janeiro apresentaram resultados positivos e treze amostras positivas vieram do Centro-Oeste. A Figura 5 relaciona folhas e o fruto total de um mesmo produtor em que foram detectados os fungicidas. A variação de concentração de CS₂ presente em amostras de folha e fruto é grande, chegando a 37,7 vezes maior a presença em folhas. Isso se dá devido o modo da aplicação dos compostos de ditiocarbamatos ser foliar. Os resultados mostraram que, ao todo, 27,3% das amostras de fruto e 42,9% das amostras de folhas apresentaram resíduos de ditiocarbamatos.

A ANVISA estabelece que o limite máximo de resíduo (LMR) de metiram seja de 1,0 mg de CS₂/kg (ppm) com intervalo de segurança de sete dias (ANVISA, 2017b). Nenhuma das amostras de fruto apresentou valor acima do LMR, ao contrario do estudo conduzido por HJORTH et al. (2011), onde foram detectados resíduos de ditiocarbamatos acima do LMR europeu em amostras da Colômbia.

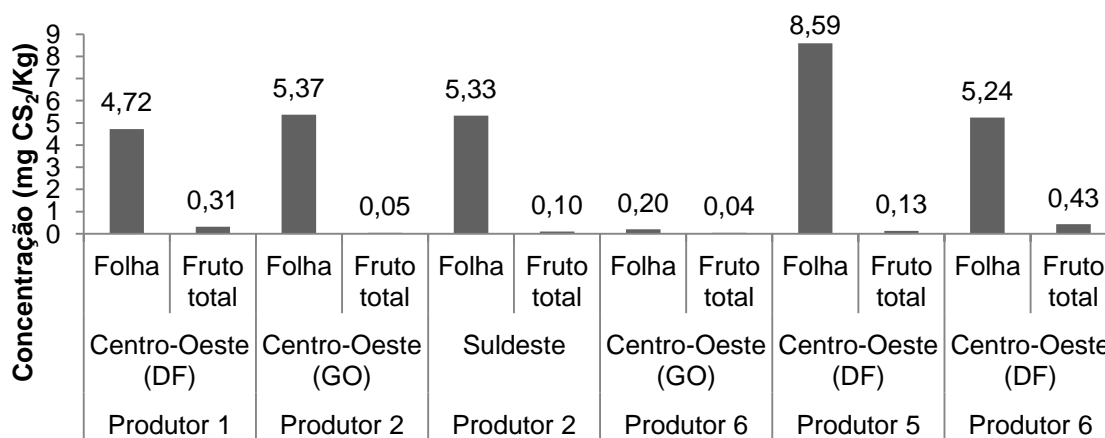


Figura 5 - Concentração de ditiocarbamatos (CS₂) em amostras positivas de folhas e fruto total do mesmo produtor.

As folhas foram as amostras que apresentaram as concentrações mais altas que variaram de 0,11 a 8,59 mg CS₂/Kg, porém, não existe um LMR estabelecido para as folhas de maracujá. Estas são comumente utilizadas para o preparo de chás pela população por suas propriedades calmantes, apesar do processo que as folhas possam sofrer, a quantidade de ditiocarbamatos presente é bastante alta e o risco associado aos metabólitos dos EBDC já foram descritos. As amostras de cascas analisadas separadamente mostraram ser seguras para a produção de ingredientes e produtos, como por exemplo, a farinha de maracujá, que além de enriquecer a dieta, por ser rica em fibras solúveis, foi demonstrado em ratos que pode atuar no controle glicêmico, como também diminuir os níveis de colesterol em humanos.

6. Conclusão

Neste trabalho, foi realizada a validação do método de detecção indireta de ditiocarbamatos pela liberação de CS₂ para a matriz de casca de maracujá que se mostrou satisfatória e a análise de diversas amostras de frutos (cascas) e folhas de diferentes regiões do país. A cultura do maracujá é economicamente importante para o país e apesar disso não se encontra presente em nenhum programa de monitoramento do governo brasileiro, sendo necessária sua inclusão e que se façam avaliações de exposição na dieta. Portanto, a importância deste trabalho está no fato de validar um método analítico para esse cultivo tão relevante no país, visto que não foi encontrada na literatura nenhuma validação para o maracujá através do método indireto de detecção de ditiocarbamatos, e de demonstrar a presença de altas concentrações destes pesticidas nas folhas, utilizada na preparação de chás e fitoterápicos.

Apesar da baixa toxicidade aguda para mamíferos, os ditiocarbamatos como metiram, mancozebe, manebe e propinebe produzem metabólitos que possuem efeitos reprodutivos e câncer de tireoide como foi demonstrado em animais de laboratório, algumas amostras a concentração de CS₂ encontrada é bastante elevada.

O método utilizado foi eficiente para a matriz validada, casca de maracujá, mas sendo o metiram o único composto permitido para uso na cultura do maracujá, não se pode garantir que outros compostos não estejam sendo utilizados de forma irregular sendo necessária uma determinação direta de ditiocarbamatos para que se possa fazer uma avaliação do risco que esses produtos apresentam.

7. Referências

- AHUJA, M.; MOHAN JAIN, S. **Genetic Diversity and Erosion in Plants**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 8
- ANVISA. **Monografias Autorizadas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 28 maio. 2017a.
- ANVISA. **Metiram**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M15%2B%2BMetiram.pdf/447ebf57-d6ec-482e-8302-cd599829bc73>>. Acesso em: 7 maio. 2017b.
- BARDAROV, V.; ZAIKOV, C.; MITEWA, M. Application of high-performance liquid chromatography with spectrophotometric and electrochemical detection to the analysis of alkylenebis (dithiocarbamates) and their metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 479, p. 97–105, 1989.
- BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, N.T.; SANTOS, E.C.; BRAGA, M.F.; GUIMARÃES, C.T. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 124–127, 2007.
- BLASCO, C.; FONT, G.; PICÓ, Y. Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, n. 2, p. 267–276, 2004.
- CAJKA, T.; RIDDELLOVA, K.; ZOMER, P.; MOL, H.; HAJŠLOVA, J. Direct analysis of dithiocarbamate fungicides in fruit by ambient mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 28, n. 10, p. 1372–1382, 2011.
- CALDAS, E.D.; CONCEIÇÃO, M.H.; MIRANDA, M.C.C.; DE SOUZA, L.C.K.R.;

- LIMA, J.F. Determination of dithiocarbamate fungicide residues in food by a spectrophotometric method using a vertical disulfide reaction system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4521–4525, 2001.
- CARVALHO, A. M. DE. Aproveitamento da casca do maracujá para fabricação de doces. **O Agrônomo, São Paulo: Ciência e Cultura**, v. 20, n. 2, p. 43, 1968.
- CAVALCANTE, M.; SANTOS, F.X.; PEREIRA, D.A.; BARBOSA, T.J.A.; SILVA NETO, J.V. Diagnóstico do uso de agrotóxicos por agricultores familiares de Maragogi/AL. **Cadernos de Agroecologia**, v. 10, 2015.
- CHAU, C. F.; HUANG, Y. L. Characterization of passion fruit seed fibres - A potential fibre source. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 189–194, 2004.
- COLETA, M.; BATISTA, M.T.; CAMPOS, M.G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M.D.; LIMA, T.C.M.; CUNHA, A.P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 12, p. 1067–1073, dez. 2006.
- CONCEIÇÃO, M. H. **Resíduos de pesticidas em tomates: metodologia analítica e avaliação da exposição humana**. Brasília: Universidade de Brasília, 2002.
- CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; NETO, G.K.; FREITAS, R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. **B. CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 221–230, 2005.
- CRNOGORAC, G.; SCHMAUDER, S.; SCHWACK, W. Trace analysis of dithiocarbamate fungicide residues on fruits and vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 16, p. 2539–2546, 30 ago. 2008.
- CRNOGORAC, G.; SCHWACK, W. Residue analysis of dithiocarbamate fungicides. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 40–50, 2009.
- CULLEN, T. E. Spectrophotometric Determination of Dithiocarbamate Residues in Food Crops. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 221–224, 1964.
- DE-PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZALEZ ORTEGA, G.; SCHENKEL, E.P. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 5–8, 2002.
- DEARFIELD, K. L. Ethylene thiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 317, n. 2, p. 111–132, 1994.
- DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 148–153, 2010.
- DOERGE, D. R.; TAKAZAWA, R. S. Mechanism of thyroid peroxidase inhibition by ethylenethiourea. **Chemical research in toxicology**, v. 3, n. 2, p. 98–101, 1990.
- EMBRAPA. **A Cultura do maracujazeiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2000. v. 21
- EPA. **Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/haps/health-effects-notebook-hazardous-air->

- pollutants>. Acesso em: 11 jun. 2017.
- EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. **SANCO/12571/2013**, p. 1–46, 2013.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**. 1ª impress ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005.
- FAO; WHO. **Pesticide Residues in Food-1996: Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues**. Roma: Food & Agriculture Org., 1997.
- FISCHER, I.H.; ARRUDA, M.C.; ALMEIDA, A.M.; GARCIA, M.J.M.; JERONIMO, E.M.; PINOTTI, R.N.; BERTANI, R.M.A. Doenças e características físicas e químicas pós-colheita em maracujá amarelo de cultivo convencional e orgânico no centro oeste paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 254–259, 2007.
- GARCINUÑO, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; CÁMARA, C. Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, n. 2, p. 225–229, 2004.
- GUSTAFSSON, K. H.; FAHLGREN, C. H. Determination of dithiocarbamate fungicides in vegetable foodstuffs by high-performance liquid chromatography. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 31, n. 2, p. 461–3, 1983.
- HARDIN, B.D.; SCHULER, R.L.; BURG, J.R.; BOOTH, G.M.; HAZELDEN, K.P.; MACKENZIE, K.M.; SMITH, K.N. Evaluation of 60 chemicals in a preliminary developmental toxicity test. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, v. 7, n. 1, p. 29–48, 1987.
- HAYAMA, T.; TAKADA, M. Simple and rapid method for the determination of ethylenebisdithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, n. 5, p. 969–976, 2008.
- HJORTH, K.; JOHANSEN, K.; HOLEN, B.; ANDERSSON, A.; CHRISTENSEN, H.B.; SIIVINEN, K.; TOOME, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America - A Nordic project. **Food Control**, v. 22, n. 11, p. 1701–1706, 2011.
- IBAMA. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: 21 maio. 2017.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares 2008/2009, Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Microdados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 2012a.
- IBGE. Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes. **Produção Agrícola Municipal**, v. 39, n. 0101–3963, p. 101, 2012b.
- IBGE. Produção Agrícola Municipal: Culturas temporárias e permanentes. **Produção Agrícola Municipal**, v. 42, n. 0101–3963, p. 1–57, 2015.
- IRTH, H.; DE JONG, G.J.; BRINKMAN, U.A.T.; FREI, R.W. Metallic copper-containing post-column reactor for the detection of thiram and disulfiram in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 370, n. C, p. 439–447, 1986.

- JARDIM, A. N. O.; MELLO, D. C.; GOES, F. C. S.; FROTA, E. F.; CALDAS, E. D. Pesticide residues in cashew apple, guava, kaki and peach: GC-uECD, GC-FPD and LC-MS/MS multiresidue method validation, analysis and cumulative acute risk assessment. **Food Chemistry**, v. 164, p. 195–204, 2014.
- JARDIM, A.N.O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607–616, 2012.
- JUNQUEIRA-GUERTZENSTEIN, S. M.; SRUR, A. Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*, Deg.) cv amarelo na alimentação de ratos (*rattus norvergicus*) normais e diabéticos. **Revista Cadernos do Centro Universitário São Camilo**, v. 10, p. 213–218, 2002.
- KAZOS, E. A.; STALIKAS, C. D.; NANOS, C. G.; KONIDARI, C. N. Determination of dithiocarbamate fungicide propineb and its main metabolite propylenethiourea in airborne samples. **Chemosphere**, v. 68, n. 11, p. 2104–2110, 2007.
- KEPPEL, G. E. Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues. **J. assoc. Off. anal. Chem**, v. 52, p. 162–167, 1969.
- LO, C.-C.; HO, M.-H.; HUNG, M.-D. Use of High-Performance Liquid Chromatographic and Atomic Absorption Methods To Distinguish Propineb, Zineb, Maneb, and Mancozeb Fungicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 2720–2723, 1996.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O.; RIAL-OTERO, R.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; SIMAL-GÁNDARA, J. Surveillance of fungicidal dithiocarbamate residues in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 366–374, 2012.
- LORENZI, H.; DE ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
- MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica - Resíduos e contaminantes em alimentos**. 1. ed. Brasília: Biblioteca Nacional de Agricultura, 2011.
- MARANGHI, F.; DE ANGELIS, S.; TASSINARI, R.; CHIAROTTI, F.; LORENZETTI, S.; MORACCI, G.; EUSEPI, A. Reproductive toxicity and thyroid effects in Sprague Dawley rats exposed to low doses of ethylenethiourea. **Food and chemical toxicology**, v. 59, p. 261–271, 2013.
- MEDEIROS, J. S.; SRUR, A. U. O. S.; PESSOA, M. B.; DINIZ, M. F. F. M. Avaliação das atividade hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). **Rev. bras. anal. clín**, v. 41, n. 2, p. 99–101, 2009.
- MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; LARA, J. C. C.; TOCCHINI, R. P.; HASHIZUME, T.; MORETTI, V. A.; CANTO, W. L. **Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização**. 1. ed. Campinas: ITAL, 1980.
- MELLO, D. C. **Determinação dos fungicidas ditiocarbamatos etilenobisditiocarbamatos (EBDC) e propinebe em alimentos por HPLC-UV**. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, 2014.
- MULKEY, M. E. The Determination of whether Diothiocarbamate Pesticides Share a Common Mechanism of Toxicity. **Memorandum: EPA's Office of Pesticides Programs (OPP)**, 2001.
- NAKAZAWA, H.; TSUDA, Y.; ITO, K.; YOSHIMURA, Y.; KUBO, H.; HOMMA, H. Determination of Dithiocarbamate Fungicides by Reversed-Phase Ion-Pair

- Liquid Chromatography with Chemiluminescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 4, p. 705–713, 2005.
- OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. D. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259–262, 2002.
- OPACKA, J.; WRÓŃSKA-NOFER, T. Effect of alcohol intake on some disturbances induced by chronic exposure to carbon disulphide in rats I. Behavioural alterations. **Toxicology letters**, v. 23, n. 1, p. 91–97, 1984.
- PAULO, F. DE S. **Governo lista plantas que poderão virar fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2009/02/503737-governo-lista-plantas-que-poderao-virar-fitoterapicos.shtml>>. Acesso em: 3 jun. 2017.
- PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2011.
- PFLUGMACHER, J.; EBING, W. Eine neue Schnellmethode zur Bestimmung von Alkylen-bis-dithiocarbamat-Fungicid-Rückständen. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 170, n. 5, p. 349–354, 1980.
- RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; PIRES, V. C. F.; CARDOSO, M. A. A.; DINIZ, M. D. F. M.; MEDEIROS, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis* f. flavicarpa na redução do colesterol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 592–597, 2007.
- REBELO, R. M.; VASCONCELOS, R. A.; BUYS, B.; REZENDE, J. A.; MORAES, K. O. C.; OLIVEIRA, R. P. **Pesticides and related products commercialized in Brazil in 2009 - An environmental approach**. 2. ed. Brasília: IBAMA, 2010.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.
- RUBINO, F. M.; MREMA, E. J.; COLOSIO, C. Pesticide Residues: Dithiocarbamates. **Encyclopedia of Food Safety**, v.3, p.5-10. Elsevier, , 2014. (Nota técnica).
- RUGGIERO, C. **Maracujá**. 1. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987.
- SCHMIDT, B.; CHRISTENSEN, H. B.; PETERSEN, A.; SLOTH, J. J.; POULSEN, M. E. Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 7, p. 1287–1298, 2013.
- STERTZ, S. C.; FREITAS, R. J. S. DE. Teor de dissulfeto de carbono em agrião d'água (*Nasturtium officinale* R. BE.) obtido pelos sistemas de cultivo orgânico, convencional e hidropônico. **Pesticidas**, v. 13, p. 45–52, 2003.
- VAN LISHAUT, H.; SCHWACK, W. Selective trace determination of dithiocarbamate fungicides in fruits and vegetables by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 3, p. 720–727, 2000.