



UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**CONTRIBUTO PARA A IMPLEMENTAÇÃO DO  
MÉTODO NORMALIZADO EN 12396-1:  
DETERMINAÇÃO DE DITIOCARBAMATOS E  
TIRAME EM ALIMENTOS NÃO-GORDOS,  
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO**

**MESTRADO EM QUALIDADE EM ANÁLISES**

**JOÃO LEONEL PIRES COSTA**

FARO

2006

---

NOME: JOÃO LEONEL PIRES COSTA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA MARIA DA  
CONCEIÇÃO MATEUS

DATA: 21/12/2006

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:  
CONTRIBUTO PARA A IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO  
NORMALIZADO EN 12396-1:DETERMINAÇÃO DE  
DITIOCARBAMATOS E TIRAME EM ALIMENTOS NÃO-  
GORDOS, MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

JÚRI:

PROFESSORA DOUTORA  
**ISABEL MARIA PALMA ANTUNES CAVACO**  
PROFESSORA AUXILIAR  
DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA  
DA UNIVERSIDADE DO ALGARVE

PROFESSORA DOUTORA  
**MARIA DA CONCEIÇÃO DOMINGUES AMADO MATEUS**  
PROFESSORA AUXILIAR  
DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA  
DA UNIVERSIDADE DO ALGARVE

PROFESSORA DOUTORA  
**CELESTE MATOS LINO**  
PROFESSORA ASSOCIADA COM AGREGAÇÃO  
DA FACULDADE DE FARMÁCIA  
DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

---

---

### *Agradecimentos*

▫ À Professora Doutora Maria da Conceição Mateus pelo apoio, amizade e compreensão que me deu ao longo do desenvolvimento desta dissertação.

▫ À Direcção Regional de Agricultura do Algarve por ter possibilitado a realização deste trabalho.

▫ Às Professoras Doutoradas Isabel Cavaco e Ana Rosa Garcia, à Eng<sup>a</sup> Júlia Santos e Doutor Ricardo Silva pela disponibilidade sempre demonstrada e pelas proveitosas sugestões.

▫ Aos amigos que directa ou indirectamente estiveram presentes nesta caminhada, simplesmente pela amizade, tão simples mas tão importante.

▫ Um agradecimento especial à minha família, pelo amor, carinho e amizade que sempre me dedicaram e por me ampararem nos momentos difíceis ao longo desta caminhada.

Ao meu pai que deixou de estar entre nós. Tudo fez e me deu para que fosse o que sou.

À minha esposa, um agradecimento muito especial, por tudo.

A todos, aqui fica o meu sincero, OBRIGADO!

**Dedico este trabalho às minhas filhas Sara e Rute.**

---

---

## RESUMO

O método estudado, descrito na norma europeia EN 12396-1, quantifica os resíduos dos pesticidas do grupo químico dos ditiocarbamatos e tirame, em alimentos não-gordos, por hidrólise ácida destas substâncias, evolução num aparelho de vidro específico e recolha do sulfureto de carbono ( $\text{CS}_2$ ) libertado com formação de dois complexos corados com relação molar  $\text{Cu}^{2+}:\text{CS}_2$  de 1:1 e 1:2. Estes são quantificados por espectrofotometria de absorção molecular a 435 nm.

Apresentam-se os dados de validação, obtidos em rotina, na gama de trabalho estabelecida pela norma, 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$  a 250  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ . Estimaram-se os parâmetros característicos, por avaliação indirecta e verificou-se a exactidão por avaliação directa, pela participação em ensaios interlaboratoriais de aptidão e por ensaios em materiais de referência.

No âmbito exclusivo desta dissertação, foram estudados alguns aspectos práticos do método:

Redução do limite de quantificação, pelo estudo da aplicabilidade na gama de trabalho de 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$  a 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ . Observou-se a necessidade de utilizar um novo comprimento de onda, 382 nm, para compensar a alteração do equilíbrio entre os dois complexos formados.

Foi definida uma alteração ao procedimento no sentido de termostatar a 0 °C a solução de recolha do  $\text{CS}_2$  proveniente das amostras e os padrões de calibração. Verificou-se uma maior estabilidade na comparação das respostas (absorvência) nestas condições.

Avaliação da contaminação provocada por vários tipos de luvas de protecção individual tendo sido possível identificar que as luvas fabricadas em vinilo, segundo o normativo AQL 1.5 – EN 455-1/2, não afectam o método.

Palavras-chave: ditiocarbamato, sulfureto de carbono, pesticida, resíduos, alimentos não-gordos.

---

---

## TÍTULO DA DISSERTAÇÃO EM INGLÊS

# CONTRIBUTION TO THE IMPLEMENTATION OF THE STANDARD METHOD EN 12396-1 – DETERMINATION OF DITHIOCARBAMATES AND THIURAM IN NON-FATTY FOODS, SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

## ABSTRACT

The method studied, described in the european standard EN 12396-1, quantificates the residues of dithiocarbamates and thiuram group of pesticides in non-fatty foods, by acid hydrolysis of these substances, evolution in a specific glass equipment and collection of the carbon disulfide released (CS<sub>2</sub>) in a solution where two coloured complexes, with a molar ratio of Cu<sup>2+</sup>:CS<sub>2</sub> of 1:1 and 1:2, are formed. These are quantified by molecular absorption spectrophotometry at 435 nm.

Validation results are presented, in the routine application of this methodology, in the working range established by the standard, 50 µg of CS<sub>2</sub> to 250 µg of CS<sub>2</sub>. The characteristic parameters were, estimated by indirect evaluation and, by direct evaluation, the trueness, by the participation in interlaboratory assessment schemes and by assays in reference standard materials.

In the exclusive context of this dissertation, some practical aspects of the method were studied:

To reduce the limit of quantification, the applicability of the working range 10 µg of CS<sub>2</sub> to 50 µg of CS<sub>2</sub> was studied. The need to use a new wavelength, 382 nm, was observed, to compensate the equilibrium between the two complexes formed.

An alteration to the methodology was defined, regarding the collection solution, which was thermostated at 0° C. In these conditions, more stability in the comparison of response (absorbance) was verified.

The contamination by several types of protection gloves was also studied, being possible to identify that the vinyl gloves, made according to the AQL 1.5 – EN 455-1/2 standard don't affect the method.

Key-words: dithiocarbamate, carbon disulfide, pesticide, residues, non-fatty foods.

---

---

## *Índice Geral*

<b>I – Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1. Aspectos físico-químicos, biológicos e ambientais dos ditiocarbamatos</b>	<b>3</b>
1.1. O grupo dos ditiocarbamatos	3
1.2. Características Físico-química	9
1.3. Toxicidade	10
1.4. Destino no meio ambiente	11
<b>2. Métodos de análise de ditiocarbamatos</b>	<b>12</b>
2.1. Métodos espectrofotométricos	12
2.1.1. Princípios teóricos de espectroscopia	12
2.1.1.1. Absorção molecular	13
2.1.1.2. Absorção em metais de transição	14
2.1.1.3. Absorção por transferência de carga	16
2.1.1.4. Lei de Lambert- Beer	16
2.1.2. Princípios instrumentais	17
2.1.3. Métodos selectivos	18
2.1.4. Métodos não selectivos	23
2.2. Métodos cromatográficos	24
2.2.1. Métodos selectivos	24
2.2.2. Métodos não selectivos	24
2.3. Métodos polarográficos	25
2.4. Fluorimetria de injeção de fluxo	25
2.5. Biosensores	26
<b>3. Validação interna do método de ensaio</b>	<b>26</b>
3.1. Resumo do método de ensaio	27
3.2. Especificidade	27
3.3. Selectividade	28
3.4. Quantificação	29
3.4.1. Calibração	29
3.4.2. Gama de trabalho	30
3.4.2.1. Homogeneidade de variâncias	31
3.4.2.2. Linearidade	31

3.4.2.3. Limiares analíticos	32
3.4.2.4. Sensibilidade	32
3.4.3. Precisão	33
3.4.3.1. Repetibilidade	34
3.4.3.2. Reprodutibilidade	34
3.4.3.3. Precisão intermédia	35
3.4.3.4. Relação funcional entre precisão e concentração	35
3.4.4. Exactidão	36
3.4.4.1. Ensaio de recuperação	36
3.4.4.2. Materiais de referência certificados	37
3.4.4.3. Ensaio interlaboratoriais	37
<b>4. Controlo de qualidade interno</b>	<b>38</b>
4.1. Brancos	38
4.2. Replicados	39
4.3. Materiais de referência internos	39
4.4. Calibração química	39
<b>5. Introdução de novos aspectos</b>	<b>40</b>
5.1. Calibração química	40
5.2. Estabilidade térmica do complexo de quantificação	40
5.3. Utilização de luvas de protecção individual	41
<b>II – Materiais e método</b>	<b>42</b>
<b>1. Reagentes e soluções</b>	<b>42</b>
<b>2. Materiais volumétricos</b>	<b>43</b>
<b>3. Equipamentos</b>	<b>44</b>
<b>4. Resumo do método de ensaio</b>	<b>45</b>
4.1. Preparação da toma para análise	45
4.2. Montagem do aparelho extractor	47
4.3. Quantificação	50
4.4. Aspectos práticos	50
4.5. Diagrama de aplicação	51
<b>5. Controlo de qualidade interno</b>	<b>53</b>
5.1. Brancos	53
5.2. Replicados	53

---

---

5.3. Materiais de referência internos	54
5.4. Calibração química	54
<b>6. Estabilidade dos complexos em função da temperatura</b>	<b>55</b>
<b>III - Apresentação e discussão de resultados</b>	<b>56</b>
<b>1. Validação interna do método</b>	<b>56</b>
1.1. Especificidade	56
1.2. Calibração e gama de trabalho	58
1.3. Precisão	61
1.3.1. Repetibilidade	61
1.3.1.1. Ensaio interlaboratorial	61
1.3.1.2. Réplicas em amostras reais	63
1.3.2. Reprodutibilidade	64
1.3.3. Precisão intermédia	65
1.3.4. Relação funcional entre precisão e concentração	67
1.4. Exactidão	68
1.4.1. Ensaios de recuperação	68
1.4.2. Materiais de referência	69
1.4.3. Ensaios interlaboratoriais	70
1.5. Controlo de qualidade interno	71
1.5.1. Brancos	71
1.5.2. Replicados	71
1.5.3. Materiais de referência internos	71
1.5.4. Calibração química	71
1.5.4.1. Declive	71
1.5.4.2. Abcissa na origem	75
1.6. Estimativa da incerteza	78
1.6.1. Identificação das fontes de incerteza	78
1.6.2. Modelo de estimativa da incerteza	79
1.6.3. Associação e quantificação	80
1.6.4. Incerteza combinada	82
1.6.5. Graus de liberdade efectivos e coeficiente de expansão	82
1.6.6. Cálculo da incerteza expandida	83

---

---

<b>2. Aumento da gama de trabalho</b>	83
2.1. Estudo da relação funcional entre 10 e 250 µg de CS <sub>2</sub>	83
2.2. Estudo da inflexão da função de calibração	86
2.3. Desenvolvimento da metodologia de calibração	90
2.3.1. Escolha do comprimento de onda	90
2.3.2. Comparação entre 382 e 435 nm	91
2.3.2.1. Função de calibração e homogeneidade de variâncias	94
2.3.2.2. Observação visual do ajuste linear aos pontos de calibração	100
2.3.2.3. Comparação com o ajuste não linear	101
2.3.2.4. Limites da gama de trabalho	103
2.4. Aplicação da nova metodologia de quantificação	105
2.4.1. Ensaios de recuperação	105
2.4.2. Ensaios em amostras reais	107
2.4.3. Materiais de referência	108
<b>3. Estabilidade dos complexos em função da temperatura</b>	109
<b>4. Utilização de luvas de protecção individual</b>	114
<b>IV- Conclusão</b>	116
<b>V - Considerações finais</b>	118
<b>VI – Bibliografia</b>	120

---

---

## *Índice de tabelas*

<b>Tabela 1</b>	
Nomes e fórmulas dos alquilenobis(ditiocarbamatos)	4
<b>Tabela 2</b>	
Nomes e fórmulas dos dialquilditiocarbamatos	6
<b>Tabela 3</b>	
Características físico-químicas mais relevantes dos ditiocarbamatos	9
<b>Tabela 4</b>	
Parâmetros toxicológicos mais relevantes dos ditiocarbamatos	10
<b>Tabela 5</b>	
Parâmetros ambientais mais relevantes dos ditiocarbamatos	11
<b>Tabela 6</b>	
Energias associadas às transições electrónicas entre orbitais moleculares	14
<b>Tabela 7</b>	
Métodos espectrofotométricos. Aspectos operacionais	19
<b>Tabela 8</b>	
Modo de preparação da toma para análise	45
<b>Tabela 9</b>	
Percentagem de amostras em que não foi detectada a presença de ditiocarbamatos. Análises realizadas em 1999, 2000, 2004 e 2005	57
<b>Tabela 10</b>	
Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos para a calibração na gama de trabalho definida na norma NP EN 12396-1	59
<b>Tabela 11</b>	
Estimativa do desvio padrão da repetibilidade com base em resultados do ensaio interlaboratorial TESTQUAL 10 para o método em estudo	61
<b>Tabela 12</b>	
Estimativa do desvio padrão da repetibilidade para a técnica cromatográfica	62
<b>Tabela 13</b>	
Comparação das variâncias de repetibilidade obtidas para as técnicas utilizadas no ensaio interlaboratorial TESTQUAL10 – espectrofotometria e cromatografia	62

---

---

<b>Tabela 14</b>	
Estimativa da repetibilidade em amostras reais_____	63
<b>Tabela 15</b>	
Resultados da aplicação dos testes de valores aberrantes_____	64
<b>Tabela 16</b>	
Estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade com base em resultados do ensaio interlaboratorial TESTQUAL 10_____	64
<b>Tabela 17</b>	
Desvio padrão obtido nos ensaios de recuperação realizados para estimar a precisão intermédia do método de ensaio_____	65
<b>Tabela 18</b>	
Aplicação do teste de Cochran na estimativa da precisão intermédia_____	66
<b>Tabela 19</b>	
Ensaio de recuperação efectuados para avaliação da exactidão do métodos_____	68
<b>Tabela 20</b>	
Resultados da avaliação da exactidão com base em Materiais de Referência. Os valores apresentados encontram-se em mg/kg de CS <sub>2</sub> _____	70
<b>Tabela 21</b>	
Resultados da avaliação da exactidão com base na participação em ensaios interlaboratoriais de aptidão organizados pela empresa TESTQUAL. Os valores apresentados encontram-se em mg/kg de CS <sub>2</sub> _____	70
<b>Tabela 22</b>	
Estimativa dos valores de referência para o estabelecimento dos limites da carta de controlo do declive das curvas de calibração_____	72
<b>Tabela 23</b>	
Estimativa dos valores de referência para o estabelecimento dos limites da carta de controlo da abcissa na origem das curvas de calibração_____	75
<b>Tabela 24</b>	
Resumo do processo de quantificação dos componentes individuais da incerteza. Determinação única e em triplicado_____	81
<b>Tabela 25</b>	
Graus de liberdade efectivos calculados pela equação de Welch-Satterwaite_____	83

---

---

<b>Tabela 26</b>	
Estimativa final da incerteza relativa expandida_____	83
<b>Tabela 27</b>	
Comparação estatística dos declives das duas gamas de trabalho_____	85
<b>Tabela 28</b>	
Relação $\text{Cu}^{2+}/\text{CS}_2$ calculada_____	87
<b>Tabela 29</b>	
Valores descritos na bibliografia e efeitos no equilíbrio_____	87
<b>Tabela 30</b>	
Homogeneidade de variância para a gama de trabalho seleccionada, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm) e a resposta média_____	94
<b>Tabela 31</b>	
Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm e resposta média aos 2 referidos). m, b e r são respectivamente o declive, a ordenada na origem, a abcissa na origem e o coeficiente de correlação_____	96
<b>Tabela 32</b>	
Comparação estatística entre o ajuste linear e não-linear_____	102
<b>Tabela 33</b>	
Limites de Detecção e Quantificação para as rectas estudadas, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm) e a média da respostas. Os limites expressos em mg/kg consideram uma toma para análise de 200 g_____	103
<b>Tabela 34</b>	
Ensaio de recuperação - comparação entre metodologias de calibração_____	106
<b>Tabela 35</b>	
Análise de amostras reais - comparação entre metodologias de calibração_____	107
<b>Tabela 36</b>	
Ensaio de material de referência interno - calibração com absorvência média_____	108
<b>Tabela 37</b>	
Teste de Cochran para verificar a homogeneidade de variâncias intra-leituras_____	112
<b>Tabela 38</b>	
Resultados da análise de variância aplicada ao estudo da estabilidade dos complexos $\text{Cu}^{2+}:\text{CS}_2$ ao longo do tempo (minutos) para diferentes ambientes_____	113

---

---

**Tabela 39**

Resultados obtidos na aplicação do método de ensaio em estudo a diferentes tipos de luvas de protecção individual\_\_\_\_\_115

---

---

## *Índice de Figuras*

<b>Figura 1</b>	
Diagrama de energia de orbitais moleculares $\sigma$ , $\pi$ e $n$ _____	13
<b>Figura 2</b>	
Representação de orbitais atómicas d, em termos de distribuição de densidade de probabilidade electrónica_____	15
<b>Figura 3</b>	
Desdobramento energético das orbitais d em função do ambiente ligante_____	15
<b>Figura 4</b>	
Representação dos componentes principais de um espectrofotómetro de duplo feixe_____	18
<b>Figura 5</b>	
Aparelho em vidro para extracção, purificação e recolha do $CS_2$ produzido na hidrólise ácida dos ditiocarbamatos presentes na amostra_____	47
<b>Figura 6</b>	
Balão reactor_____	48
<b>Figura 7</b>	
Recipientes com dispersores onde se encontra o reagente de cor_____	49
<b>Figura 8</b>	
Peneiro químico, onde se encontra a solução de hidróxido de sódio_____	49
<b>Figura 9</b>	
Fluxograma de aplicação da metodologia em estudo nesta dissertação_____	52
<b>Figura 10</b>	
Os recipientes que contêm o reagente de cor foram colocados em copos de vidro onde será introduzido gelo durante o ensaio_____	55
<b>Figura 11</b>	
Representação gráfica entre o desvio padrão da repetibilidade e a massa de $CS_2$ _____	67
<b>Figura 12</b>	
Representação gráfica entre o logaritmo do desvio padrão da repetibilidade e o logaritmo da massa de $CS_2$ _____	67
<b>Figura 13</b>	
Carta de Controlo do declive na gama 10 a 50 $\mu g$ de $CS_2$ _____	73

---

---

<b>Figura 14</b>	
Carta de Controlo da abscissa na origem na gama 10 a 50 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	74
<b>Figura 15</b>	
Carta de Controlo do declive na gama 50 a 250 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	76
<b>Figura 16</b>	
Carta de Controlo da abscissa na origem na gama 50 a 250 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	77
<b>Figura 17</b>	
Diagrama de causa/efeito reflectindo a influência de cada factor de variabilidade no resultado	79
<b>Figura 18</b>	
Representação gráfica da absorvência em função da massa de $\text{CS}_2$ , entre 10 e 250 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	84
<b>Figura 19</b>	
Recta de calibração para a gama 10 a 50 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	85
<b>Figura 20</b>	
Recta de calibração para a gama 50 a 250 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	86
<b>Figura 21</b>	
Equilíbrio entre os complexos de razão molar $\text{Cu}^{2+}/\text{CS}_2$ , 1:1 e 1:2	86
<b>Figura 22</b>	
Espectro de absorção do padrão 50 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	88
<b>Figura 23</b>	
Espectro de absorção do padrão 30 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	89
<b>Figura 24</b>	
Espectro de absorção do padrão 10 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	89
<b>Figura 25</b>	
Ampliação do espectro de absorção do padrão 30 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	91
<b>Figura 26</b>	
Representação gráfica da função de calibração a 382 nm, 435 nm e média aritmética da resposta a estes comprimentos de onda	92
<b>Figura 27</b>	
Representação gráfica da função de calibração a 382 nm	100
<b>Figura 28</b>	
Representação gráfica da função de calibração a 435 nm	100

---

---

---

---

**Figura 29**

Representação gráfica da função de calibração com base na média das respostas\_\_101

**Figura 30**

Variação da absorvência do padrão 50 µg de CS<sub>2</sub> a 435 nm, comparando os diferentes ambientes definidos. (BV – balão volumétrico; EXT – aparelho extractor).\_\_\_\_\_110

**Figura 31**

Variação da absorvência do padrão 50 µg de CS<sub>2</sub> a 382 nm, comparando os diferentes ambientes definidos. (BV – balão volumétrico; EXT – aparelho extractor)\_\_\_\_\_111

---

---

## *Lista de Abreviaturas*

- A<sub>382</sub> e A<sub>435</sub> – Absorvências a 382 nm e 435 nm.
- ADI – Acceptable Daily Intake; Ingestão Diária Aceitável.
- ANOVA – Análise de Variâncias.
- AQL – Acceptable Quality Level; Nível de Qualidade Aceitável.
- CEN – Comité Europeu de Normalização.
- CS<sub>2</sub> – Sulfureto de Carbono.
- Cu<sup>2+</sup> - Ião Cobre (II).
- DMS – Diferença Mínima Significativa.
- DRAALG – Direcção Regional de Agricultura do Algarve.
- DT<sub>50</sub> – Tempo de meia-vida.
- EBDC – Etilinobisditiocarbamatos.
- ECD – Electron Capture Detector; Detector de Captura Electrónica.
- EDTA – Etilenodiaminatetracetato.
- EMA – Erro Máximo Admissível.
- EN – Europäische Norm; Norma Europeia.
- ETU – Etilenotioureia.
- F – Valor estatístico associado a uma distribuição de Fischer, usada como referência na aplicação do teste de Fischer para comparação de variâncias.
- FPD – Flame Photometric Detector; Detector Fotométrico de Chama.
- H<sub>2</sub>S – Sulfureto de Hidrogénio.
- HCl – Ácido clorídrico.
- IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry.
- Kow – Coeficiente de partição octanol/água.
- LAI e LAS – Limites de Aviso Inferior e Superior.
- LC – Limite Central.
- LC<sub>50</sub> – Letal Concentration.
- LCI e LCI – Limites de Controlo Inferior e Superior.
- LD – Limite de Detecção.
- LD<sub>50</sub> – Letal Dose; Dose Letal.
- LDA – Limite de Determinação Analítica.

---

LMR – Limite Máximo de Resíduo.

LQ – Limite de Quantificação.

NaOH – Hidróxido de sódio.

NOEL – Non Observable Effect Level; Nível sem Efeito Observável.

PG – Valor calculado no teste de Fischer para comparação de variâncias.

SnCl<sub>2</sub> – Cloreto de Estanho (II).

UV/Vis – Ultravioleta/Visível.

WHO – World Health Organization; Organização Mundial de Saúde.

Z – Valor estatístico associado a uma distribuição normal, com variância conhecida.

Normalmente usado para avaliar o desempenho de laboratórios na participação em ensaios interlaboratoriais.



## I. Introdução

Os ditiocarbamatos são uma família de compostos orgânicos sulfurados, usados na agricultura, como fungicidas e na indústria da borracha, como aceleradores do processo de vulcanização e como anti-oxidantes<sup>[1]</sup>.

Na agricultura são largamente utilizados por apresentarem um baixo custo, boa eficácia e por possuírem um largo espectro de acção anti-fúngica<sup>[2]</sup>.

Toxicologicamente, um dos aspectos mais importantes a considerar, relaciona-se com os resíduos destas substâncias, que permanecem nos produtos vegetais apresentados ao consumidor final, os quais poderão ter efeitos carcinogénicos e teratogénicos, afectar o sistema nervoso central e a tiróide<sup>[3]</sup>.

Pelos efeitos acima referidos, a monitorização dos resíduos destas substâncias em produtos vegetais para consumo humano assume importância relevante ao nível da saúde pública.

Embora existam métodos selectivos para a determinação individual dos diversos ditiocarbamatos, a maioria dos laboratórios ligados ao controlo oficial destas substâncias em produtos vegetais, usam uma metodologia baseada na quantificação instrumental do sulfureto de carbono (CS<sub>2</sub>) libertado na hidrólise ácida do conjunto dos ditiocarbamatos<sup>[4]</sup>.

As razões que sustentam este facto têm a ver com:

- a vantagem que advém da aplicação de uma única metodologia de análise;

- apenas estarem estudados e definidos Limites Máximos de Resíduos (LMR) para o subgrupo dos etilenobisditiocarbamatos e para o tirame. Na prática, com excepção do tirame, os limites estabelecidos para o subgrupo dos etilenobisditiocarbamatos serve de valor guia para todo o conjunto dos ditiocarbamatos;

Relativamente à metodologia em estudo nesta dissertação <sup>[5]</sup>, para além destes aspectos, realçam-se os seguintes:

- não envolver um grande investimento ao nível de equipamento, comparativamente com as técnicas cromatográficas;
- usar reagentes menos tóxicos que alguns métodos similares, designadamente o uso de etanol em vez de metanol<sup>[6]</sup>.

Este método encontra-se descrito na norma EN 12396-1. A quantificação do CS<sub>2</sub> é realizada por espectrofotometria na região visível do espectro electromagnético, a 435 nm.

Descreve-se neste trabalho, a sua implementação prática no Laboratório da Direcção Regional de Agricultura do Algarve (DRAALG), local onde foi desenvolvido este trabalho e apresentam-se os resultados obtidos na validação do mesmo, em diversas matrizes vegetais.

Este trabalho teve por objectivo demonstrar a validação interna da sua aplicação no Laboratório da DRAALG e com base em resultados experimentais, introduzir melhorias nos procedimentos analíticos, designadamente nos seguintes aspectos:

- verificar a possibilidade de aplicação deste método, abaixo do limite de quantificação referido no documento normativo que o descreve, com a finalidade de adequá-lo aos Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos na legislação em vigor.
- estudar a estabilidade das soluções contendo o complexo corado, elemento base da quantificação deste método no sentido de definir as condições de análise mais adequadas;
- considerando a utilização de ditiocarbamatos no fabrico das luvas de protecção usadas em laboratório, estudar a possibilidade de contaminação por parte destes equipamentos de protecção individual;

## **1. Aspectos fisico-químicos, biológicos e ambientais dos ditiocarbamatos**

### **1.1. O grupo dos ditiocarbamatos**

Os ditiocarbamatos, no contexto da análise de resíduos de pesticidas, são um conjunto de substâncias e misturas de substâncias que integram o grupo funcional ditiocarbamato e que possuem uma forte capacidade de ligação a iões metálicos <sup>[1]</sup>. Esta capacidade confere-lhes efeitos ao nível da inibição enzimática justificando a sua larga aplicabilidade ao nível da agricultura e da medicina <sup>[1]</sup>.

Podemos subdividir este grupo em 2 subgrupos;

- a) alquilenobis(ditiocarbamato) apresentados na tabela 1.
- b) dialquilditiocarbamatos apresentados na tabela 2.

Tabela 1: Nomes e fórmulas dos alquilenobis(ditiocarbamatos)<sup>[7]</sup>.

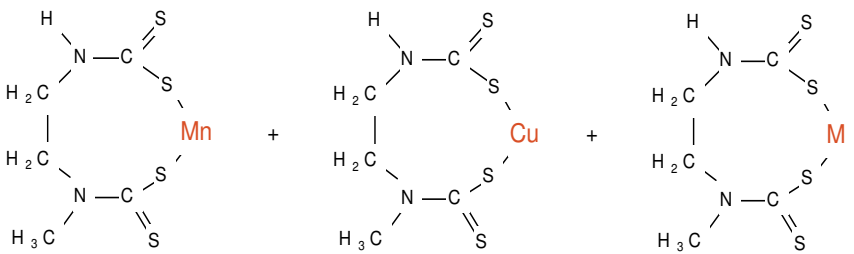
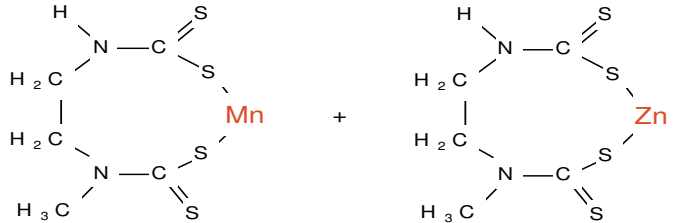
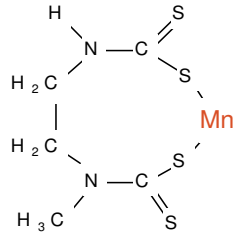
Nomenclatura comum e IUPAC	Fórmula de estrutura
<p><b>mancopper</b></p> <p>mistura de etilenobis(ditiocarbamato) de manganês com etilenobis(ditiocarbamato) de cobre e etilenobis(ditiocarbamato) de outros metais (13,7% de manganês e 4% de cobre)</p>	 <p>The image shows three chemical structures of ethylenediamine dithiocarbamate ligands coordinated to different metal ions. Each ligand consists of two nitrogen atoms connected by an ethylene bridge (-CH2-CH2-), with a methyl group (-CH3) attached to one of the nitrogens. Each nitrogen is also bonded to a sulfur atom, which is double-bonded to a carbon atom. The carbon atom is also bonded to another sulfur atom, which is coordinated to a metal ion. The metal ions are Manganese (Mn), Copper (Cu), and an unspecified metal (M). The structures are shown as Mn, Cu, and M, each with its respective ligand.</p>
<p><b>mancozebe</b></p> <p>mistura de etilenobis(ditiocarbamato) de manganês com etilenobis(ditiocarbamato) de zinco (polimérico)</p>	 <p>The image shows two chemical structures of ethylenediamine dithiocarbamate ligands coordinated to different metal ions. Each ligand consists of two nitrogen atoms connected by an ethylene bridge (-CH2-CH2-), with a methyl group (-CH3) attached to one of the nitrogens. Each nitrogen is also bonded to a sulfur atom, which is double-bonded to a carbon atom. The carbon atom is also bonded to another sulfur atom, which is coordinated to a metal ion. The metal ions are Manganese (Mn) and Zinc (Zn). The structures are shown as Mn and Zn, each with its respective ligand.</p>
<p><b>Manebe</b></p> <p>Etilenobis(ditiocarbamato) de manganês (polimérico)</p>	 <p>The image shows one chemical structure of an ethylenediamine dithiocarbamate ligand coordinated to a Manganese (Mn) ion. The ligand consists of two nitrogen atoms connected by an ethylene bridge (-CH2-CH2-), with a methyl group (-CH3) attached to one of the nitrogens. Each nitrogen is also bonded to a sulfur atom, which is double-bonded to a carbon atom. The carbon atom is also bonded to another sulfur atom, which is coordinated to the Mn ion.</p>

Tabela 1: Nomes e fórmulas dos alquilenobis(ditiocarbamatos)<sup>[7]</sup> (continuação).

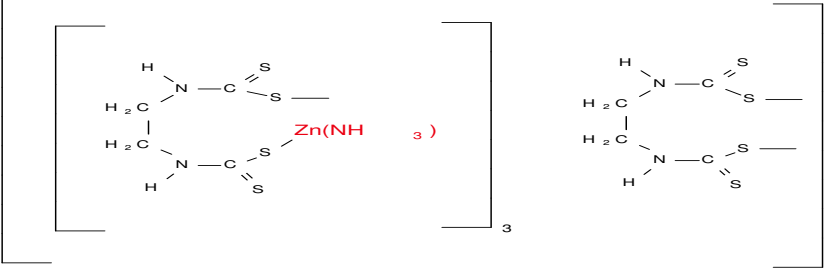
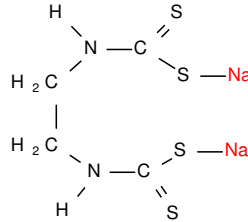
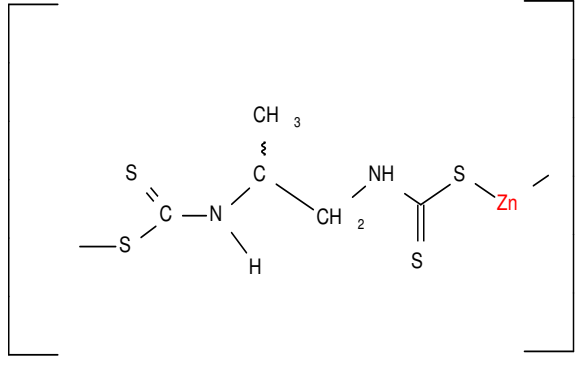
Nomenclatura comum e IUPAC	Fórmula de estrutura
<p><b>metirame</b></p> <p>amoniato de etilenobis(ditiocarbamato) zinco – poli</p> <p>[etilenobis(ditiocarbamato)]</p>	
<p><b>nabame</b></p> <p>Etilenobis(ditiocarbamato) dissódico</p>	
<p><b>propinebe</b></p> <p>Propilenobis(ditiocarbamato)de zinco (polimérico)</p>	

Tabela 1: Nomes e fórmulas dos alquilenobis(ditiocarbamatos)<sup>[7]</sup> (continuação).

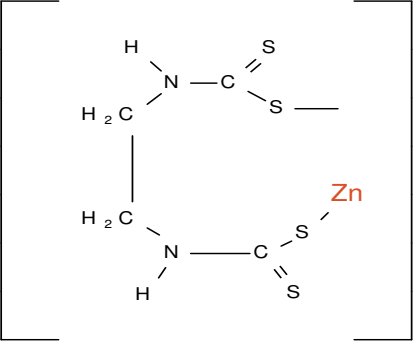
Nomenclatura comum e IUPAC	Fórmula de estrutura
<p style="text-align: center;"><b>zinebe</b></p> <p>Etilenobis(ditiocarbamato) de zinco (polimérico)</p>	

Tabela 2: Nomes e fórmulas dos dialquilditiocarbamatos<sup>[7]</sup>.

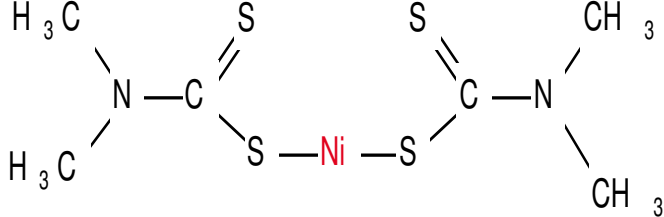
Nomenclatura comum e IUPAC	Fórmula de estrutura
<p style="text-align: center;">Dimetilditiocarbamato de níquel</p>	

Tabela 2: Nomes e fórmulas dos dialquilditiocarbamatos<sup>[7]</sup> (continuação).

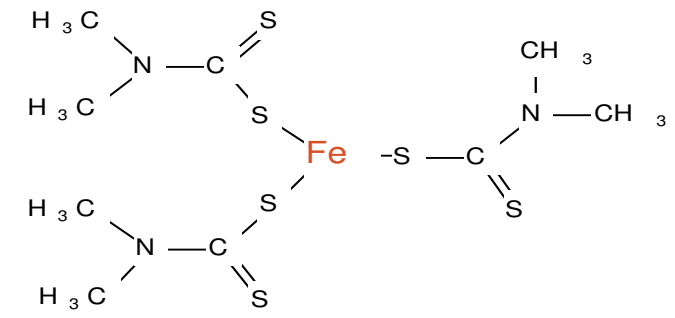
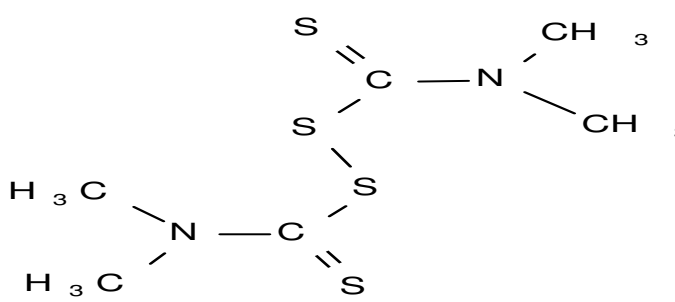
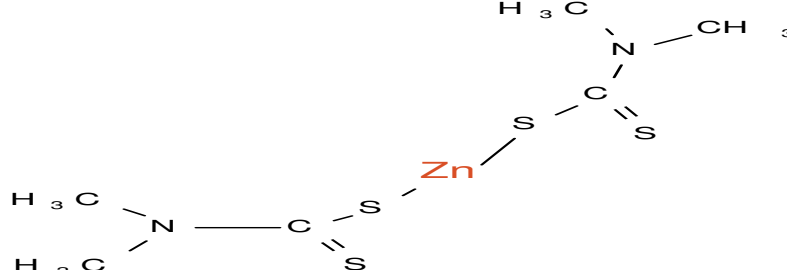
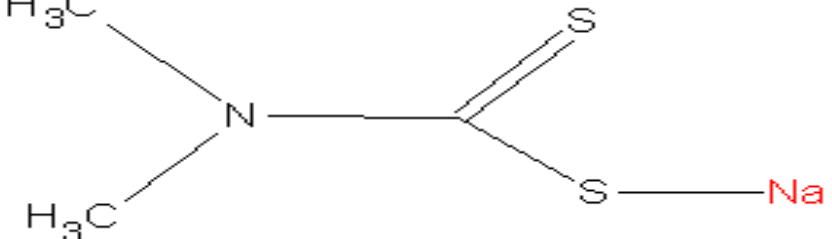
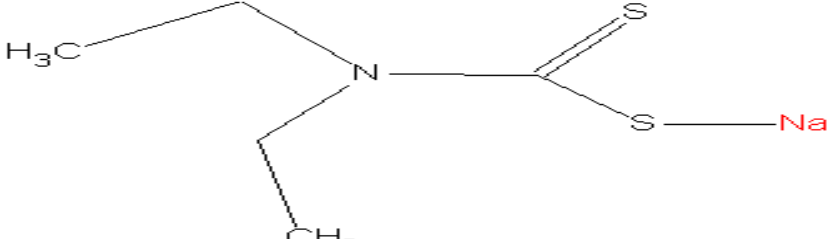
Nomenclatura comum e IUPAC	Fórmula de estrutura
<p style="text-align: center;"><b>ferbame</b></p> <p style="text-align: center;">Dimetilditiocarbamato de ferro (III)</p>	
<p style="text-align: center;"><b>tírame</b></p> <p style="text-align: center;">Dissulfureto de tetrametiltiurame</p>	
<p style="text-align: center;"><b>zirame</b></p> <p style="text-align: center;">Dimetiloditiocarbamato de zinco</p>	

Tabela 2: Nomes e fórmulas dos dialquilditiocarbamatos<sup>[7]</sup> (continuação).

Nomenclatura comum e IUPAC	Fórmula de estrutura
<p style="text-align: center;"><b>dibame</b> dimetilditiocarbamato de sódio</p>	
<p style="text-align: center;"><b>NaDDC</b> dietilditiocarbamato de sódio</p>	

## 1.2. Características físico-química

Apresentam-se na tabela 3, dados sobre os aspectos físico-químicos mais relevantes dos ditiocarbamatos, designadamente, massa molar, aspecto, ponto de fusão, pressão de vapor, constante de partição octanol-água e solubilidade em água.

Tabela 3: Características físico-químicas mais relevantes dos ditiocarbamatos<sup>[7]</sup>.

Ditiocarbamato	dimetilcarbamoeditioato de níquel	ferbame	mancozebe	manebe	metirame	nabame	propinebe	tirame	zinebe	zirame
Característica										
Massa molar (g/mol)	299,1	416,5	541,0	265,3	1088,7	256,3	289,8	240,4	275,8	305,8
Aspecto	Pó verde amorfo	Pó preto	Pó amarelo acinzentado	Cristais amarelos	Pó amarelo	Cristais incolores	Pó branco	Cristais incolores	Pó amarelo pálido	Pó incolor
Ponto de fusão	Decompõe-se a 250°C	Decompõe-se a 180°C	Decompõe-se a 192-204°C	Decompõe-se a 192-204°C	Decompõe-se a 156°C	Decompõe-se	Decompõe-se a 150°C	155-156°C	Decompõe-se a 157°C	246 °C
Pressão de vapor (mPa)	-----	Negligenciável	Negligenciável	Negligenciável	< 0,01	Negligenciável	< 1	2,3	< 0,01	<0,001
Log (K <sub>ow</sub> ) (20°C)	-----	-1,6	-----	-----	0,3	-----	-0,26	1,73	≤1,3	1,23
Solubilidade em água – (mg/L)	insolúvel	130	6,2	insolúvel	insolúvel	200 g/L	10	18	10	1,58 - 18,3

### 1.3. Toxicidade

Apresentam-se na tabela 4, dados toxicológicos relevantes sobre as substâncias activas pertencentes ao grupo dos pesticidas ditiocarbamatos, designadamente, doses letais (50%), níveis sem efeitos observáveis (NOEL), ingestão diária aceitável (ADI) e classe de toxicidade.

Tabela 4: Parâmetros toxicológicos mais relevantes dos ditiocarbamatos<sup>[7]</sup>.

Ditiocarbamato Característica	dimetilcarbamoato de níquel	ferbame	mancozebe	manebe	metirame	nabame	propinebe	tirame	zinebe	zirame
LD <sub>50</sub> (mg/kg) Cutâneo	> 5.000	> 4.000 (coelho)	> 10.000	> 5.000	> 2.000	-----	> 5.000	2.000 (coelho)	6.000	> 2.000 (coelho)
LD <sub>50</sub> (mg/kg) Oral	> 36.000	> 4.000	> 5.000	> 5.000	> 10.000	395	> 5.000	2.600	5.200	320
LC <sub>50</sub> (mg/L) em peixes	360	0,4	5,14	3,8	5,7	550	0,7	4,42	2 a 8	0,07
NOEL* (mg/kg de dieta)	200	250	-----	250	3,1	1.000	50	1,5	10.000	5
ADI (mg/kg peso corporal)	-----	0,02	0,03	0,03	0,03	-----	0,007	0,01	0,03	0,02
Classe de toxicidade (WHO)**	-----	III	III	III	III	II	III	III	III	III

Quando não for referido, os parâmetros respeitam aos ratos.

\*NOEL – no observable effects limit; \*\* II – moderadamente tóxico; III – ligeiramente tóxico.

#### 1.4. Destino no meio ambiente

Apresentam-se na tabela 5, informação sobre as formas de degradação, tempos de meia-vida (DT<sub>50</sub>) e destino no meio ambiente dos ditiocarbamatos.

Tabela 5: Parâmetros ambientais mais relevantes dos ditiocarbamatos<sup>[7,8]</sup>.

Ditiocarbamato / Destino em	dimetilcarbamo- ditiato de níquel	Ferbame	mancozebe	manebe	metirame	nabame	Propinebe	tirame	zinebe	zirame
Animais	-----	Não acumula nos tecidos	-----	Metabolizado a amina, thiram e tiourea	-----	-----	Excretado em 48 h na urina, fezes e respiração	Metabolizado a COS e CS <sub>2</sub>	-----	Eliminado na sua maioria em 1-2 dias
Plantas	-----	Metabolizado a sal dimetilaminico do ácido dimetilditio-carbâmico	Metabolizado a ETU	Metabolizado a ETU	-----	Metabolizado a ETU	Resíduos e metabolitos permanecem na superfície	Metabolizado a sal dimetilaminico do ácido dimetilditio-carbâmico	Metabolizado a ETU	Metabolizado a sal dimetilaminico do ácido dimetilditio-carbâmico
Solo	-----	-----	DT <sub>50</sub> de 6-15 dias	DT <sub>50</sub> de 25 dias	Degradado a ETU	-----	Degradação rápida, sem mobilidade no solo	DT <sub>50</sub> de 12H	-----	DT <sub>50</sub> de 42H Não sofre lixiviação
água	rapidamente hidrolizado, oxidado, fotolisado ou metabolizado.									
ar										

ETU - Etilenotiourea

## 2. Métodos de análise de ditiocarbamatos

Existem diversas metodologias, para a determinação analítica de ditiocarbamatos em produtos vegetais, métodos selectivos para pesquisa individual das substâncias activas pertencentes ao grupo e metodologias não selectivas que quantificam a totalidade dos ditiocarbamatos presentes na amostra, sem identificar a substância activa.

Descrevem-se de forma resumida, os métodos encontrados na bibliografia, e apresenta-se para cada um, o limite mínimo da gama de trabalho para fins comparativos.

Abordam-se também, os fundamentos teóricos e aspectos instrumentais da técnica analítica referente ao método estudado nesta dissertação, a espectrofotometria de absorção molecular.

### 2.1. Métodos espectrofotométricos

#### 2.1.1. Princípios teóricos de espectroscopia

A espectroscopia de absorção molecular é uma das ferramentas disponíveis, mais úteis e amplamente usada para a análise quantitativa. As principais razões para este facto residem no seguinte<sup>[9]</sup>:

- ampla aplicação em sistemas orgânicos e inorgânicos;
- limites mínimos de aplicação entre  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> (podendo chegar a  $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup> em certos casos);
- boa selectividade;
- boa precisão;
- facilidade e conveniência de aquisição de dados.

### 2.1.1.1. Absorção molecular

A espectroscopia molecular baseia-se no facto das moléculas e iões orgânicos bem como iões inorgânicos absorverem energia sob a forma de radiação electromagnética. Esta absorção de energia deve-se à excitação electrónica das espécies referidas.

Os electrões que contribuem para a absorção das moléculas orgânicas são os que participam directamente nas ligações moleculares e também, os pares de electrões não ligantes normalmente associados a átomos de oxigénio, enxofre e azoto.

As transições electrónicas dão-se entre orbitais moleculares  $\sigma$ ,  $\pi$  e  $n$  (não-ligantes). Encontram-se descritas na figura 1 e tabela 6 as transições possíveis e respectivas energias associadas.

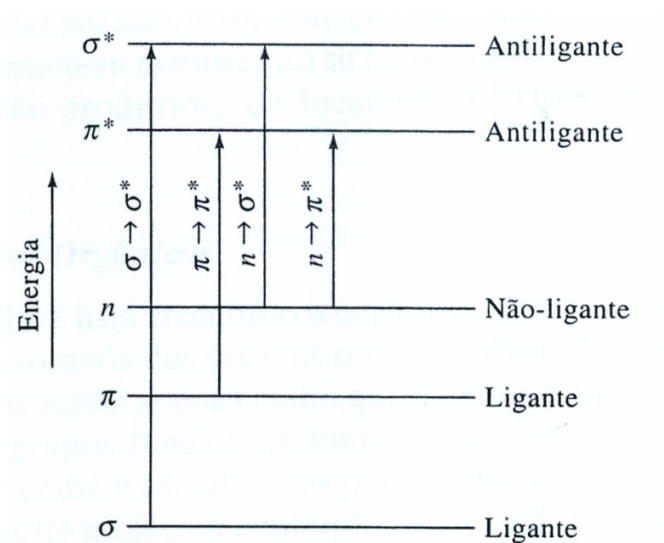


Figura 1: Diagrama de energia de orbitais moleculares  $\sigma$ ,  $\pi$  e  $n$ .

Tabela 6: Energias associadas às transições electrónicas entre orbitais moleculares.

<b>Transições entre orbitais</b>	<b>Energia</b> ( $\lambda$ comprimento de onda em nm)
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	< 185 nm
$n \rightarrow \sigma^*$	150 a 250 nm
$n \rightarrow \pi^*$	200 a 700 nm
$\pi \rightarrow \pi^*$	200 a 700 nm

\*antiligante

### 2.1.1.2. Absorção em metais de transição

Muitos iões de metais de transição absorvem na região do ultravioleta ou visível. A absorção de energia resulta de transições electrónicas entre orbitais atómicas 4f e 5f para a série dos lantanídeos e actinídeos e 3d e 4d para a primeira e segunda série de metais de transição.

Estas transições electrónicas derivam do desdobramento energético que ocorre nas orbitais d e f devido à presença de espécies ligantes em torno do ião atómico.

Nas figuras 2 e 3 mostram-se representações do conjunto de orbitais d e dos desdobramentos que ocorrem nas suas energias.

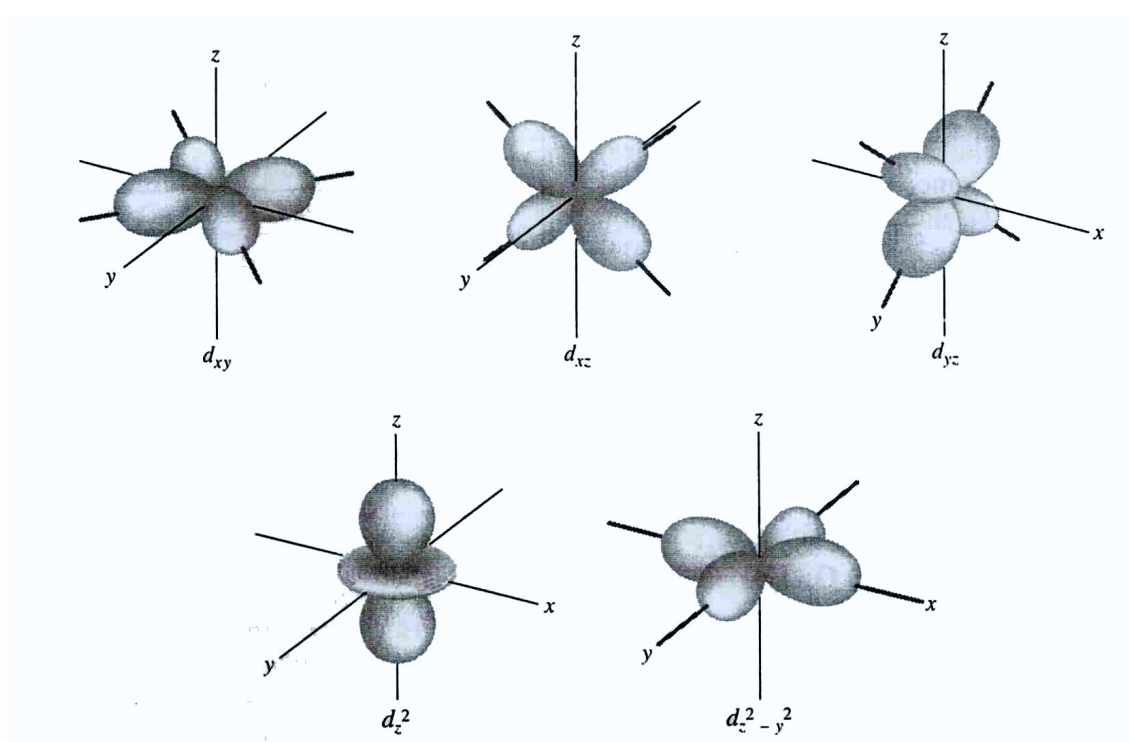


Figura 2: Representação de orbitais atômicas d, em termos de distribuição de densidade de probabilidade electrónica.

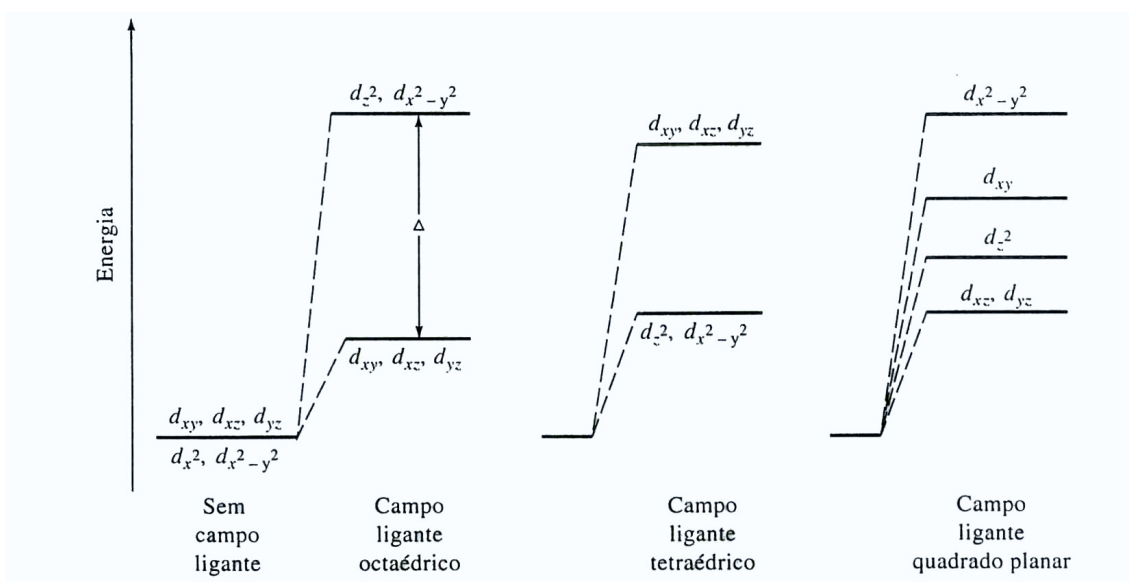


Figura 3: Desdobramento energético das orbitais d em função do ambiente ligante.

### 2.1.1.3. Absorção por transferência de carga

Este tipo de absorção deriva de uma transferência de electrões entre componentes de um ião complexo, um componente aceitador de electrões e outro doador, que dá origem a uma espécie de processo interno de oxidação/redução.

Estas espécies químicas caracterizam-se por terem absortividades molares muito intensas. São exemplos de complexos de transferência de carga;  $\text{FeSCN}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{fenantrolina})_3^{2+}$ , Amido- $\text{I}_5^-$ , etc...

### 2.1.1.4. Lei de Lambert-Beer

Considerando um feixe de radiação electromagnética atravessando um meio onde se encontre uma substância absorvente, a lei de Lambert-Beer relaciona a absorção de energia por parte dessa substância com a sua quantidade do seguinte modo:

$$A = \varepsilon b C$$

em que A representa a absorvência,  $\varepsilon$  a absortividade molar, b o percurso óptico e C a concentração da substância.

A absorvência representa o logaritmo da relação entre a intensidade do feixe de radiação incidente ( $I_0$ ) e a intensidade da radiação transmitida ( $I_t$ ) após absorção pela amostra, conforme se pode visualizar na seguinte equação.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right)$$

O percurso óptico (b) corresponde à distância linear percorrida pela radiação incidente ao passar pela amostra. Usualmente corresponde a 1 cm.

Relativamente ao coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ), observam-se empiricamente valores que variam de zero até à ordem de grandeza de  $10^5$ . Este coeficiente depende da área transversal da molécula ( $A_T$ ) e da probabilidade de ocorrência da transição electrónica (P) conforme a seguinte equação.

$$\epsilon = 8,7 \times 10^{19} P A_T$$

Os valores de P variam usualmente entre 0,1 e 1 e  $A_T$  é da ordem de grandeza de  $10^{-15} \text{ m}^2$ .

### 2.1.2. Princípios instrumentais

Os espectrofotómetros de absorção na região do ultravioleta e visível são de um modo geral constituídos pelos seguintes componentes<sup>[10]</sup>:

- uma fonte de radiação electromagnética; lâmpada de deutério para a região do ultravioleta e de tungsténio para a região do visível;
- um componente difractor, geralmente uma grade de difracção no sentido de difractar a radiação nos seus diferentes comprimentos de onda;
- um conjunto de componentes ópticos para encaminhar a radiação;
- um compartimento para colocar a amostra, usualmente uma câmara com acesso ao exterior onde se encontra um suporte para células de vidro ou quartzo, com 1 cm de percurso óptico;
- detector que permite quantificar a intensidade da radiação, geralmente um tubo fotomultiplicador.

Apresenta-se na figura 4 um esquema com os diversos componentes de um espectrofotómetro de duplo feixe.

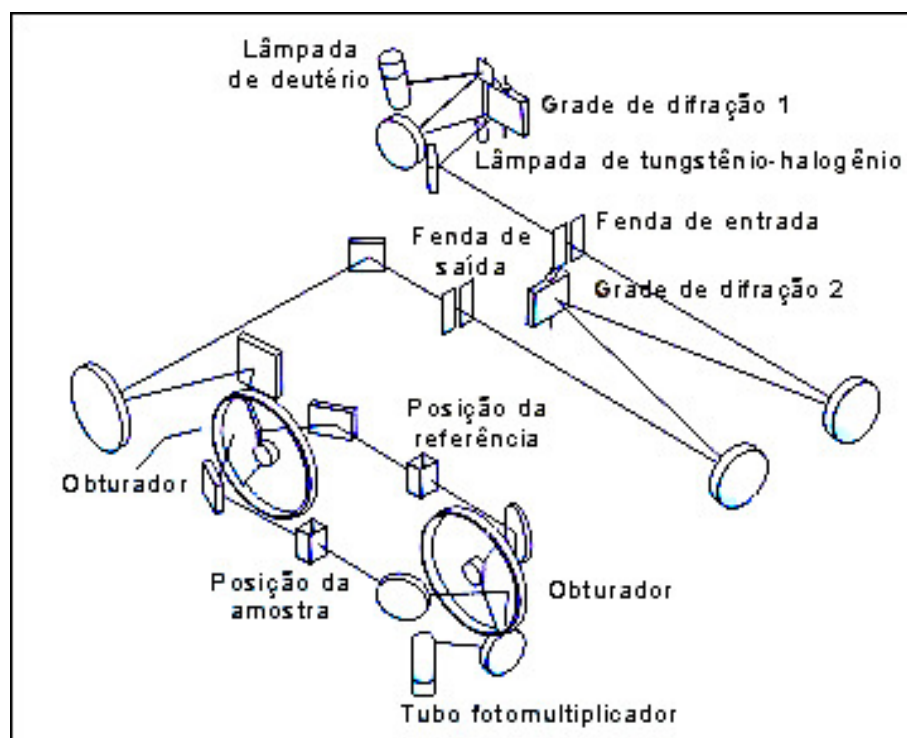


Figura 4: Representação dos componentes principais de um espectrofotómetro de duplo feixe.

Um espectrofotómetro de duplo feixe apresenta dois componentes adicionais, dois obturadores electromecânicos. Um deles transforma a passagem contínua de radiação em passagem pulsada e outro permite que alternadamente a radiação passe pela amostra e pela referência. Este dispositivo permite a subtração em contínuo do sinal da referência ao sinal da amostra.

### 2.1.3. Métodos selectivos

Apresentam-se na tabela 7 os métodos espectrofotométricos para pesquisa selectiva de ditiocarbamatos. Permitem quantificar individualmente as substâncias activas deste grupo.

Tabela 7 : Métodos espectrofotométricos, aspectos operacionais.

<b>Método</b>	<b>ditiocarbamatos determináveis</b>	<b>comprimento de onda (nm)</b>	<b>início da gama de trabalho (µg de CS<sub>2</sub>/25 mL)</b>
Formação do complexo dimetilditiocarbamato de cobre, solubilizado em água por adição de um surfactante – brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) <sup>[11]</sup>	tirame	430	7,0
Reacção com clorimida 4-clorimida-2,6-dicloroquinona e 4-clorimida-2,6-dibromoquinona para formar um complexo vermelho quantificado a 495 nm <sup>[12]</sup>	manebe	495	28
	zinebe		20
Complexação com 4- (2-piridilazo) resorcinol <sup>[13]</sup>	ferbame	530	6,8
Reacção do ferbame com 4,7-difenil-1,10-fenantrolina para formar o complexo [Ferro(III) (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) <sub>3</sub> ] <sup>3+</sup> , de cor vermelha <sup>[14]</sup>	ferbame	532	4,1
Formação do complexo Ferro(III)-1,10-fenantrolina, absorção em naftaleno microcristalino na presença de tetrafenilborato <sup>[15]</sup>	ferbame	515	30
Reacção com hidroxiamidina e 4-(2-piridilazo)naftol <sup>[16]</sup>	zirame	420	63

Tabela 7 : Métodos espectrofotométricos, aspectos operacionais (continuação).

<b>Método</b>	<b>ditiocarbamatos determináveis</b>	<b>comprimento de onda (nm)</b>	<b>início da gama de trabalho (µg de CS<sub>2</sub>/25 mL)</b>
Reacção com cloreto de cobre (I) <sup>[17,18]</sup>	ferbame	385	13
	zirame		12
	tirame	420	12
Reacção com acetato de cobre(II) <sup>[19]</sup>	zinebe	370	51
Reacção com molibdénio e extracção	Tirame <sup>[20]</sup>	420	79
	ferbame <sup>[21]</sup>	420	137
	Zirame <sup>[22]</sup>	420	336
	Nabame <sup>[23]</sup>	670	371
	Zinebe <sup>[24]</sup>	670	20
	manebe <sup>[25]</sup>	670	28
Reacção com crómio(III) e extracção do complexo com naftaleno fundido ou metilisobutilcetona <sup>[26,27,28]</sup>	tirame	420	79
	ferbame		137
	zirame		33
	NaDDC		14
	dibame		8,7

Tabela 7 : Métodos espectrofotométricos, aspectos operacionais (continuação).

<b>Método</b>	<b>ditiocarbamatos determináveis</b>	<b>comprimento de onda (nm)</b>	<b>início da gama de trabalho (µg de CS<sub>2</sub>/25 mL)</b>
Reacção com seleneto de sódio <sup>[29,30]</sup>	tirame	430	8,2
	ferbame		13
	zirame		10
	NaDDC		14
	dibame		14
Reacção com cobre e paládio, e adsorção dos complexos formados em naftaleno microcristalino <sup>[31,32]</sup>	tirame	430 (cobre)/395 (paládio)	10/11
	zirame		8,7/11
Reacção com difenilcarbazona <sup>[33]</sup>	ferbame	520	4,8
	zinebe		1,2
	zirame		1,2
Extracção com 1-(2-piridilazo)-naftol (PAN) <sup>[34,35]</sup>	manebe	550	5,3
	zinebe		5,1
	zirame		2,4
Reacção com 1,10-fenantrolina <sup>[36]</sup>	ferbame	490	11

Tabela 7 : Métodos espectrofotométricos, aspectos operacionais (continuação).

<b>Método</b>	<b>ditiocarbamatos determináveis</b>	<b>comprimento de onda (nm)</b>	<b>início da gama de trabalho (µg de CS<sub>2</sub>/25 mL)</b>
Reacção com 4,4',4"- metilidinatris(N,N-dimetilanilina) [37]	tirame	595	0,03
	zirame		0,02
	zinebe		0,41
Reacção com 2,2'- biperidil, com formação de um complexo. É registado o espectro de absorção entre 350 e 580 nm e a calibração efectuada por medição da altura de pico entre 472 e 534 nm, resultante do gráfico da 4ª derivada da absorvência <sup>[38]</sup>	ferbam	Estudo da 4ª derivada do espectro de absorção entre 350 e 580 nm	6,8

#### 2.1.4. Métodos não selectivos

Estes métodos determinam a quantidade total de ditiocarbamatos presentes por conversão destes a CS<sub>2</sub>, e respectiva quantificação.

Os procedimentos analíticos respeitantes aos métodos referidos neste ponto encontram-se descritos em normas europeias. Estes documentos são referências idóneas, estabelecidas por consenso e que reflectem as metodologias técnicas mais adequadas para a realização de tarefas técnicas de carácter repetitivo, ou seja para a realização de análises de rotina e para a regulação e autodisciplina dos agentes activos no âmbito da análise de resíduos de pesticidas.

Ao nível europeu, são emitidas pelo CEN – Comité Europeu de Normalização, constituído por 29 membros nacionais, dos quais faz parte Portugal<sup>[39]</sup>.

##### **Norma EN 12396-1**

Refere-se ao método estudado neste trabalho<sup>[5]</sup>, baseia-se no tratamento da amostra em meio ácido (HCl/SnCl<sub>2</sub>), que provoca a hidrólise dos ditiocarbamatos com respectiva formação de CS<sub>2</sub>. O CS<sub>2</sub> é separado e purificado por destilação e recolhido numa solução etanólica de dietanolamina e Cu<sup>2+</sup> de modo a formar um complexo corado com um máximo de absorção a 435 nm. O limite de quantificação é de 0,25 mg/kg de CS<sub>2</sub> na amostra, correspondente a 50 µg de CS<sub>2</sub>/25 mL de solução de extracto. A gama de trabalho está definida entre 50 e 250 µg de CS<sub>2</sub>/25 mL.

### **Norma EN 12396-3**

Este método<sup>[6]</sup> é semelhante ao descrito anteriormente, alterando a forma de recolha do CS<sub>2</sub>. Este é recolhido numa solução metanólica de hidróxido de potássio dando origem com a presença de CS<sub>2</sub> a xantogenato de potássio quantificado a 302 nm. O limite de quantificação é de 0,01 mg/kg de CS<sub>2</sub> na amostra, correspondente a 5 µg de CS<sub>2</sub>/25 mL de solução de extracto. A gama de trabalho está definida entre 5 e 100 µg de CS<sub>2</sub>/25 mL.

## **2.2. Métodos cromatográficos**

### **2.2.1. Métodos selectivos**

#### **Nabame e NaDDC (dietilditiocarbamato de sódio)**

Método desenvolvido por electroforese capilar<sup>[40]</sup>. A separação depende do valor de pH e da natureza do tampão utilizado. Os limites de detecção são, respectivamente,  $1,56 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  e  $2,48 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ .

### **2.2.2. Métodos não selectivos**

#### **Norma EN 12396-2**

A amostra sofre o mesmo processo de hidrólise acima referido, num recipiente hermético à saída do CS<sub>2</sub>, e que permita a recolha de uma porção da fracção gasosa do recipiente. A fracção gasosa recolhida é injectada num cromatógrafo gasoso com detector ECD ou FPD de modo a quantificar o CS<sub>2</sub> existente. Neste método, as soluções de calibração são sujeitas ao procedimento de análise. O limite de quantificação é de 0,01 mg/kg de CS<sub>2</sub> na amostra, correspondente a 1 µg de CS<sub>2</sub>/25 mL de solução de extracto. A gama de trabalho está definida entre 1 e 100 µg de CS<sub>2</sub>/25 mL<sup>[41]</sup>.

### **Derivados do etileno bisditiocarbamato (EBDC)**

A quantificação do CS<sub>2</sub> processa-se do mesmo modo que o anterior. A extracção remove selectivamente os EBDC existentes na superfície dos vegetais, com EDTA (50 g/dm<sup>-3</sup>)<sup>[42]</sup>.

### **2.3. Métodos polarográficos**

O princípio instrumental das técnicas analíticas polarográficas está associado ao estudo e interpretação da relação corrente versus potencial, num processo de electrólise.

Para uma avaliação quantitativa, efectua-se um varrimento do potencial eléctrico da qual resulta uma variação de intensidade de corrente que depende da concentração das espécies que são oxidadas ou reduzidas.

#### **Tirame**

Este método<sup>[43]</sup> foi desenvolvido para a determinação de tirame por Polarografia de Corrente Contínua e de Pulso Diferencial. O tirame Possui uma onda de difusão catódica bem definida, com um potencial de meia-onda de -0,36 V relativamente ao eléctrodo saturado de calomelanos.

Foi objecto de avaliação numa gama de trabalho de 0,02 a 100 µg cm<sup>-3</sup> em misturas de etanol e água e foi estudada a sua aplicabilidade em folhas de vegetais, em estudos de degradação desta substância activa.

### **2.4. Fluorimetria de injeção de fluxo**

As técnicas fluorimétricas aproveitam o facto de certos sistemas químicos, elementos ou moléculas, emitirem sob a forma de radiação electromagnética, energia que lhes foi conferida por um processo de excitação por radiação electromagnética.

No caso da fluorimetria atómica, o espectro de emissão corresponde a riscas específicas dos elementos ao invés da fluorimetria molecular em que se obtêm espectros de varrimento que geralmente são simétricos (excitação versus emissão) devido aos estados vibracionais serem semelhantes entre o estado excitado e fundamental.

### **Nabame e metame**

Este método<sup>[44]</sup> baseia-se na oxidação dos ditiocarbamatos pelo elemento Tálíio(III) que é reduzido a Tálíio(I) que apresenta propriedades fluorescentes (excitação a 227 nm e emissão a 419 nm). Foram estudadas nesta metodologia, gamas de trabalho de 0,25 a 2,56  $\mu\text{g cm}^{-3}$  para o nabame e de 0,26 a 2,56  $\mu\text{g cm}^{-3}$  para o metame.

Em termos de vantagem, apresenta a possibilidade de processar até 80 amostras por hora e foi avaliada e a sua aplicabilidade em amostras de água, trigo, cevada e aveia.

## **2.5. Biosensores**

### **Manebe**

Para a determinação de manebe<sup>[45]</sup> em água, foi desenvolvido um sensor bioenzimático baseado na inibição da enzima aldeído dihidrogenase.

O funcionamento do sensor está ligado à formação do complexo hexacianoferrato (II) num processo enzimático em que actua o enzima referido. Como os ditiocarbamatos inibem o funcionamento deste enzima, foi possível, correlacionar a presença de hexacianoferrato com a concentração de manebe.

A vantagem desta técnica prende-se com o baixo limite de detecção; 1,48  $\text{mg dm}^{-3}$ .

## **3. Validação interna do método de ensaio**

Um dos objectivos desta dissertação, relacionou-se com a validação interna da metodologia de análise definida na norma EN 12396-1.

A validação interna de um método de ensaio corresponde à demonstração, através de meios e critérios objectivos e amplamente aceites, de que a forma como essa metodologia foi implementada, conduz à obtenção de resultados credíveis, em função dos objectivos pretendidos.

Neste capítulo, abordam-se os aspectos teóricos considerados para esta avaliação<sup>[5,46,47]</sup>.

### 3.1. Resumo do método de ensaio

As amostras vegetais são cortadas em pequenas porções e digeridas, em ácido clorídrico e cloreto de estanho (II) libertando o sulfureto de carbono dos ditiocarbamatos presentes na amostra. O sulfureto de carbono é separado por destilação e recolhido numa solução de acetato de cobre(II) com excesso de dietanolamina, formando-se 2 complexos,  $[\text{Cu}(\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_2)]^+$  e  $[\text{Cu}(\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_2)_2]$ , com relação molar  $\text{Cu}^{2+}:\text{CS}_2$  de 1:1 e 1:2. A quantificação é efectuada por medição da absorvência da solução resultante a 435 nm e comparação com padrões apropriados.

### 3.2. Especificidade

Este aspecto da validação, dá-nos indicação da capacidade do método em discriminar o analito, de outras substâncias existentes na matriz analisada, através da medição de uma característica específica.

Relativamente ao método em estudo, existe, nalgumas matrizes vegetais e noutros materiais, a possibilidade de outras moléculas que não os ditiocarbamatos, terem a capacidade de libertar  $\text{CS}_2$  nas condições de digestão referidas<sup>[48]</sup>. Estudos realizados em vegetais, apontam para teores não superiores a 0,10 mg/kg.

Apresentam-se nesta dissertação os resultados obtidos na análise de algumas matrizes vegetais no sentido de verificar a existência de CS<sub>2</sub> fitogénico.

Um outro interferente identificado neste método<sup>[49,50]</sup>, o H<sub>2</sub>S, é libertado em paralelo com o CS<sub>2</sub> no processo de hidrólise dos ditiocarbamatos. O documento normativo de suporte<sup>[5]</sup> define a possibilidade de usar peneiros químicos de acetato de zinco – Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, acetato de chumbo – Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> e de hidróxido de sódio - NaOH.

Para avaliar a especificidade deste método, foram realizados ensaios de recuperação com diferentes substâncias activas pertencentes ao grupo dos ditiocarbamatos, em diversas matrizes vegetais.

### **3.3. Selectividade**

A selectividade dá-nos indicação sobre a capacidade do método em distinguir o analito numa mistura de substâncias para as quais tenha capacidade de detecção, sem interferências destas.

Relativamente aos métodos existentes para a pesquisa de ditiocarbamatos, existem os que determinam selectivamente as substâncias activas pertencentes a este grupo de pesticidas. Outros, onde se integra a metodologia em estudo, determinam o conjunto das substâncias activas, pela quantificação do CS<sub>2</sub> libertado, não sendo selectivo.

Embora existam métodos selectivos, não se justifica a sua utilização em programas de monitorização, pelos seguintes motivos:

- Necessidade de aplicação de vários métodos;
- Os LMR's estabelecidos, com excepção do tirame, serem expressos em mg/kg de CS<sub>2</sub>;
- Custos envolvidos, ao nível de equipamentos e reagentes.

### 3.4. Quantificação

#### 3.4.1. Calibração

Em análise química instrumental, entende-se por calibração, a definição de uma relação entre a concentração ou massa do analito e a resposta instrumental, de forma a poder quantificar a concentração ou massa de uma amostra desconhecida.

É importante, neste tipo de relação, assegurar a rastreabilidade à quantidade do analito na preparação dos padrões de calibração, pois a aplicabilidade do método de regressão linear dos mínimos quadrados, pressupõe um erro aleatório associado à abcissa (concentração ou massa) muito menor que o erro associado às ordenadas (resposta instrumental).

Assim, deverão ter-se em atenção os seguintes aspectos:

- utilizar reagentes de pureza conhecida e adequada;
- manter as condições adequadas à sua estabilidade durante a sua utilização;
- assegurar o bom funcionamento e calibração das balanças;
- assegurar a adequação e calibração do material volumétrico utilizado;
- manter a temperatura ambiental estável, próxima da temperatura de calibração do material volumétrico (20 °C);

por outro lado, é necessário controlar a resposta do equipamento relativamente à quantidade de analito, através de:

- manutenção adequada do equipamento;
- ensaios de recuperação\*;
- controlo de qualidade interno;

- controlo de qualidade externo, designadamente ensaios de comparação interlaboratorial e materiais de referência certificados\*;

\*possível neste método de ensaio por a calibração e fortificação da amostra serem feitas de forma independente.

### 3.4.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método em que se usa uma função de calibração linear, representa o intervalo de concentrações em que a resposta instrumental varia linearmente em função da concentração, ou massa do analito, e que permite quantificá-lo com um coeficiente de variação inferior a 10 %.

A técnica instrumental associada a este método de ensaio é a espectrofotometria de absorção molecular, na zona da radiação visível do espectro electromagnético. A medição da absorvência é efectuada a 435 nm, sendo também medida a 382 nm na alteração ao método introduzida nesta dissertação. Estes comprimentos de onda correspondem respectivamente ao máximo de absorção do complexo  $\text{Cu}^{2+}:\text{CS}_2$  (1:2) e  $\text{Cu}^{2+}:\text{CS}_2$  (1:1), respectivamente.

Sendo assim, considerando a lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon c l$$

verifica-se teoricamente uma relação linear entre a absorvência (A) e a concentração (c), sendo  $\epsilon$  e l, respectivamente a absorvidade molar e o percurso óptico.

Considerando esta relação, a calibração analítica deste método passa pelo ajuste de uma função polinomial de grau 1 – linear. A ferramenta matemática geralmente utilizada para a determinação dos coeficientes desta função é o método de regressão dos mínimos quadrados.

#### **3.4.2.1. Homogeneidade de variâncias**

A aplicabilidade do método dos mínimos quadrados, para além do aspecto referido em 3.4.1 e de que a resposta instrumental ou variabilidade do sinal ( $\sigma_y$ ) possa ser considerada Gaussiana, considera que  $\sigma_y$  é constante ao longo da gama em estudo. Admitindo<sup>[46]</sup> que entre dois pontos de calibração, a variância de qualquer ponto intermédio se situará entre os valores desses dois pontos, testam-se as variâncias dos pontos extremos de calibração.

#### **3.4.2.2. Linearidade**

A linearidade pode ser entendida como o grau de ajuste dos pontos experimentais à relação linear estabelecida entre a concentração e o sinal instrumental.

Foram utilizados 3 procedimentos para avaliar este parâmetro:

- Coeficiente de correlação;
- Avaliação visual da representação gráfica dos dados;
- Teste estatístico de comparação entre o ajuste linear e não-linear.

### 3.4.2.3. Limiares analíticos

Por limiares analíticos, entendem-se os limites da gama de trabalho, designadamente limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de determinação analítica (LDA) e limite máximo da gama de trabalho. O LDA define-se como o limiar de quantificação de rotina.

Relativamente ao LD e LQ, serão estimados através do tratamento estatístico dos mínimos quadrados. O LQ pode também ser testado pela variância da resposta instrumental a uma solução padrão de teor idêntico ao valor estimado, sendo que o coeficiente de variação associado deverá ser inferior a 10 % (valor associado ao cálculo do LQ pelo método dos mínimos quadrados).

O LDA, representa um valor prático, para aplicação em rotina, a partir do qual se emitem resultados analíticos e que neste trabalho, corresponde ao valor definido pela legislação aplicável.

Relativamente ao limite máximo da gama de trabalho, já se encontra estudado<sup>[5]</sup> e relaciona-se com o desvio à linearidade associado à lei de Lambert-Beer devido ao aumento da concentração do complexo em solução.

### 3.4.2.4. Sensibilidade

A sensibilidade define-se como a derivada de 1ª ordem da função de calibração, ou seja a variação de sinal por incremento infinitesimal de concentração. Neste caso, corresponde ao declive da recta obtida pelos mínimos quadrados.

Este parâmetro será controlado através de carta de controlo, integrado no controlo de qualidade interno do método. Para além deste parâmetro, será também controlado,

em relação ao ajuste linear da calibração, a abcissa na origem. Este último parâmetro está definido no normativo referente a este método.

### **3.4.3. Precisão**

Este conceito está associado à dispersão de resultados obtidos na aplicação do método de ensaio, na mesma amostra ou amostras semelhantes, em condições bem definidas.

Um passo particularmente relevante no método de ensaio em estudo e que afecta este factor, reside na forma como se efectua a preparação da toma para análise.

A degradação das substâncias activas pertencentes a este grupo de pesticidas, em contacto com as enzimas e nutrientes das matrizes vegetais<sup>[5,6,49,50,51]</sup>, não permite o procedimento de homogeneização das amostras.

Como estas substâncias têm uma acção de superfície e não é possível garantir uma distribuição homogénea da sua aplicação sobre os vegetais, este factor poderá resultar num aumento da variabilidade dos resultados obtidos. Este aspecto afecta assim a representatividade da toma para análise em relação à amostra de laboratório. É extremamente importante quando se trata de vegetais de forma irregular como por exemplo a alface.

As estimativas da precisão do método poderão ou não considerar este factor de variabilidade conforme expresso junto dos resultados apresentados.

### 3.4.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade estima a dispersão dos resultados obtida em condições tão idênticas quanto possível, designadamente no que respeita ao laboratório, operador, equipamento usado, reagentes e em curtos intervalos de tempo.

Neste estudo, a repetibilidade será estimada com base em:

- ensaios interlaboratoriais<sup>[4]</sup>;
- replicados em amostras reais.

Para estimar a repetibilidade com base nos resultados de ensaios interlaboratoriais, foi usada a seguinte expressão:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1)S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)}$$

$S_{ri}^2$  – variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

$S_{wi}^2$  – variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

$(n_{wi} - 1)$  – graus de liberdade da série de análises;

$p$  – número de laboratórios participantes.

### 3.4.3.2. Reprodutibilidade

Enquanto a repetibilidade estima a dispersão dos resultados em condições idênticas, a reprodutibilidade estima a dispersão associada ao método, em condições máximas de variabilidade ou seja, diferentes laboratórios, operadores, equipamentos, reagentes, data de ensaio e outros factores de variação.

Neste estudo, a repetibilidade será estimada com base nos resultados obtidos num ensaio interlaboratorial<sup>[4]</sup>.

#### **3.4.3.3. Precisão intermédia**

A precisão intermédia é um parâmetro que estima a dispersão dos resultados e que se situa entre a repetibilidade e a reprodutibilidade ou seja entre as condições mínimas e máximas de variabilidade. Deverão ser expressos com esta estimativa, os factores de variabilidade associados.

Este parâmetro é importante no que diz respeito à actividade prática do laboratório, pois alguns factores de variabilidade não podem facilmente ser testados internamente. Assim, este parâmetro é o que melhor reflecte a reprodutibilidade interna do laboratório.

Neste trabalho, será estudada a precisão intermédia com base nos ensaios de recuperação, em que os parâmetros que variam são as substâncias activas, momento de realização do ensaio, matriz vegetal e nível de fortificação.

#### **3.4.3.4. Relação funcional entre precisão e concentração**

A precisão, em termos de repetibilidade e reprodutibilidade, pode depender do nível de concentração em que foi estimada. É importante verificar se existe algum tipo de relação funcional entre estes dois parâmetros e caso se verifique, estimá-la de forma a conhecer a eventual correlação entre estes dois parâmetros.

O estudo desta relação será efectuado com base nos resultados obtidos nos ensaios de recuperação efectuados.

#### **3.4.4. Exactidão**

Por exactidão, entende-se o desvio entre o valor obtido pela aplicação do método de ensaio e o valor aceite como verdadeiro. Como a qualquer valor analítico, está associado um parâmetro de precisão, a avaliação da exactidão terá que ter em conta a dispersão associada aos valores considerados.

##### **3.4.4.1. Ensaio de recuperação**

Os ensaios de recuperação, no âmbito da pesquisa de resíduos de pesticidas em vegetais, consistem na fortificação de uma matriz vegetal com a substância activa em estudo, com posterior aplicação do método de ensaio para quantificação do teor adicionado. Esta técnica permite avaliar a exactidão do método em termos relativos pois depende do grau de exactidão da fortificação.

Este método de ensaio, em particular, apresenta uma característica especial que possibilita que os ensaios de recuperação sejam uma ferramenta mais eficaz na avaliação da exactidão.

O facto de as amostras serem fortificadas com padrões das substâncias activas do grupo ditiocarbamatos e da calibração química ser efectuada com CS<sub>2</sub>, possibilita uma avaliação independente entre o que se adicionou e o que foi recuperado. Assim, a detecção de anomalias na aplicação do método de ensaio torna-se mais eficaz, pois permite avaliar as perdas, interferências e deficiente aplicação do método, em relação a dois referenciais independentes.

Nesta dissertação, no âmbito da validação interna do método, foram efectuados ensaios de recuperação em diversas matrizes vegetais, para diferentes níveis de fortificação (quantidade de pesticida adicionado à matriz) e para algumas substâncias activas do grupo dos ditiocarbamatos.

#### **3.4.4.2. Materiais de referência certificados**

Os materiais de referência são materiais o mais possível idênticos às matrizes analisadas no laboratório e ao qual está associado um valor e respectiva incerteza para uma ou mais características mensuráveis. Estes materiais podem ser certificados por entidades reconhecidas para tal e devem ser acompanhadas de um certificado emitido por essa entidade.

Apresentam-se neste trabalho, os resultados obtidos na análise de materiais de referência cujo valor foi atribuído com base num ensaio interlaboratorial de aptidão.

#### **3.4.4.3. Ensaio interlaboratoriais**

Na validação interna do método, foi possível participar num ensaio interlaboratorial de aptidão. Este ensaio é utilizado para avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, em termos da exactidão por comparação com outros laboratórios.

O parâmetro  $Z$  é normalmente usado para definir a adequação dos resultados obtidos por cada laboratório, calcula-se pela seguinte expressão:

$$Z = \frac{(x - \mu)}{\delta}$$

em que

$x$  é o valor obtido pelo laboratório participante

$\mu$  a estimativa do valor verdadeiro (média dos resultados)

$\delta$  a estimativa do desvio padrão associado ao valor verdadeiro

## 4. Controlo de qualidade interno

A definição de procedimentos de controlo de qualidade interno permite obter ferramentas que possibilitam garantir a qualidade dos resultados obtidos nos ensaios de rotina realizados no laboratório<sup>[52]</sup>.

Por um lado, a validação da metodologia permite estimar os parâmetros característicos do método bem como avaliar o comportamento de equipamentos, reagentes, soluções e procedimentos utilizados. Por outro lado, os procedimentos de controlo de qualidade interno permitem detectar atempadamente comportamentos anómalos na execução dos ensaios em rotina, em relação ao comportamento obtido na fase de validação.

Abordam-se nos subpontos seguintes as metodologias usadas na implementação deste método de ensaio.

### 4.1. Brancos

Em muitos métodos analíticos, a concretização periódica de ensaios em materiais designados por brancos permite controlar eventuais ocorrências de falsos positivos provenientes de contaminações ou interferências. Estes materiais devem ser tão semelhantes quanto possível com as matrizes em estudo, com a condicionante de não apresentarem níveis detectáveis de analito ou caso não seja possível, o valor deve ser mínimo de forma a servir de referência para as amostras analisadas.

Neste método em concreto, estudos publicados indicam a possibilidade de, em algumas matrizes vegetais, ocorrer CS<sub>2</sub> fitogénico que nas condições de análise podem conduzir a falsos positivos [5,48].

É relevante por isso, efectuar a avaliação da ocorrência de falsos positivos na aplicação deste método de ensaio.

#### **4.2. Replicados**

No sentido de controlar a repetibilidade, é possível definir, com base numa estimativa deste parâmetro, valores limite para o desvio verificado entre análise replicadas.

A elaboração de cartas de controlo com base nestes limites possibilita o acompanhamento em rotina da repetibilidade do método.

#### **4.3. Materiais de referência internos**

Materiais de referência internos são materiais para análise, com os valores suficientemente conhecidos para características mensuráveis e que permitem avaliar a exactidão do método em rotina.

#### **4.4. Calibração química**

A calibração química com base numa curva de calibração de primeira ordem permite, com base no conhecimento dos valores de referência para os parâmetros da recta, nomeadamente, o declive, ordenada na origem e abcissa na origem, definir cartas de controlo para verificar em rotina, desvios ao comportamento normal verificado na validação do método.

## 5. Introdução de novos aspectos

### 5.1. Calibração química

O procedimento descrito na norma<sup>[5]</sup>, considera uma gama de trabalho entre os 50 e 250 µg de CS<sub>2</sub>. Com base numa toma para análise de 200 g, no limite mínimo da gama de trabalho, estabelece-se um Limite de Determinação Analítica de 0,25 mg/kg.

Como a legislação sobre teores máximos de resíduos de pesticidas estabelece em muitos casos, um valor de 0,05 mg/kg, não é possível, com a metodologia definida, atingir este valor, o que representa uma desvantagem perante outros métodos.

Considerando as vantagens deste método de ensaio, relativamente a outros, julgou-se valiosa a possibilidade de levar a gama de trabalho até aos 10 µg de CS<sub>2</sub>, correspondentes a 0,05 mg/kg na amostra, de modo adequar-se aos fins pretendidos.

Foi assim estudada a possibilidade de levar a cabo este aumento da gama de trabalho, sem prejuízo da referência explícita na norma da não linearidade abaixo dos 50 µg de CS<sub>2</sub>.

### 5.2. Estabilidade térmica do complexo de quantificação

O documento normativo<sup>[5]</sup> que estabelece esta metodologia de ensaio define o procedimento de destilação e de preparação da curva de calibração sem qualquer referência à estabilidade dos complexos formados ao longo do tempo. Define-se para a preparação dos padrões de calibração, bem como para a recolha do CS<sub>2</sub> no reagente de côr, um período de 60 minutos antes da realização da leitura da absorvência. Ou seja, apenas é considerado o factor tempo para a comparabilidade das respostas.

Verificou-se no entanto, na prática laboratorial, que pontualmente as leituras das absorvências dos padrões de calibração não correspondiam aos valores esperados,

obrigando à preparação de novas soluções, partindo do princípio que as soluções de CS<sub>2</sub> já não teriam a concentração inicialmente atribuída.

Com o objectivo de verificar as causas de tais observações, foi estudada nesta dissertação a estabilidade do equilíbrio de complexação em função da temperatura.

### **5.3. Utilização de luvas de protecção individual**

A norma que descreve a metodologia de ensaio<sup>[5]</sup> refere possíveis contaminações decorrentes do contacto com materiais de plástico e borracha.

No sentido de tornar mais prática a manipulação das matrizes e reagentes em jogo na aplicação do método de ensaio, salvaguardando a possível contaminação das amostras e a segurança dos operadores, foi estudada a interferência de diversos tipos de luvas de protecção individual cujos os resultados serão apresentados nesta dissertação.

## II. Materiais e métodos

### 1. Reagentes e soluções

Para a implementação da metodologia em estudo, foram usados os reagentes e soluções que seguidamente se descrevem.

- **Padrão ferbame;** material de referência, 84,5%, Dr. Ehrenstorfer – Augsburg - Alemanha;
- **Padrão mancozebe;** material de referência, 74,5%, Dr. Ehrenstorfer – Augsburg - Alemanha;
- **Padrão tirame;** material de referência, 99,0%, Dr. Ehrenstorfer – Augsburg - Alemanha;
- **Padrão zinebe;** material de referência, 74,5%, Dr. Ehrenstorfer – Augsburg - Alemanha;
- **Acetato de cobre mono-hidratado;** p.a., pelo menos 99,0%, MERCK – Darmstad - Alemanha;
- **Ácido clorídrico;** p.a., pelo menos 37,0%, MERCK – Darmstad - Alemanha;
- **Cloreto de estanho di-hidratado;** p.a., 98,0 – 103,0%, MERCK – Darmstad - Alemanha;
- **Dietanolamina;** p.a., pelo menos 99,5%, MERCK – Darmstad - Alemanha;
- **Etanol;** p.a., pelo menos 99,8%, MERCK – Darmstad - Alemanha;
- **Hidróxido de sódio;** p.a., pelo menos 99%, MERCK – Darmstad - Alemanha;

- **Sulfureto de carbono (CS<sub>2</sub>);** para espectroscopia, pelo menos 99,9%, MERCK – Darmstad - Alemanha;
- **Soluções para a calibração química;** para quantificar os teores de ditiocarbamatos presentes nas amostras, é efectuada uma calibração química com padrões resultantes da adição de CS<sub>2</sub>, ao reagente de côr.

Os padrões foram preparados do seguinte modo:

- ⇒ preparação de uma solução concentrada de CS<sub>2</sub> em etanol (1.1.3) – 25 mg/mL (esta solução é preparada por pesagem de 1 mL de CS<sub>2</sub> (1.1.1) devido ao CS<sub>2</sub> ser um reagente líquido e por ser muito volátil);
- ⇒ preparação de uma solução diluída de CS<sub>2</sub> – 50 µg/mL (quantidades preparadas em função do uso) por diluição 1:500 da solução concentrada;
- ⇒ em balões volumétricos, adicionar o volume adequado da solução diluída de CS<sub>2</sub> a 15 mL do reagente de côr e perfazer com etanol (1.1.3).
- ⇒ As soluções de CS<sub>2</sub> são armazenadas em recipientes hermeticamente fechados à temperatura de -30 °C.

## 2. Materiais volumétricos em vidro

Os materiais de vidro utilizados no método em estudo foram os seguintes:

- **Balões volumétricos (classe A);** 25,00±0,04 mL; 50,0±0,1 mL; 100,0±0,1 mL; 200,0±0,2 mL; 500,0±0,3 mL; 1000,0±0,4 mL; 2000± 1 mL;

- **Pipetas volumétricos (classe A);** 1,00±0,01 mL; 2,00±0,02 mL; 3,00±0,02 mL; 4,00±0,02 mL; 5,00±0,02 mL;
- **Pipetas graduadas (classe A);** 0,500±0,005 mL; 1,00±0,01 mL;
- **Provetas;** 10 mL; 25 mL; 50 mL;

### 3. Equipamentos

Descrevem-se, seguidamente os equipamentos usados neste trabalho:

- **Aparelho extractor** - Manuel Castro Peixoto, Lda – Lisboa - Portugal;  
equipamento em vidro para hidrólise dos ditiocarbamatos, extracção e purificação do CS<sub>2</sub> libertado;
- **Balanças;** Mettler PE3000, alcance de 3000 g e menor divisão de 0,1 g;  
balança Mettler AE160, alcance de 162 g e menor divisão de 0,1 mg; Mettler AG135, alcance de 31 g e menor divisão de 0,01 mg (Mettler - Columbus – USA);
- **Bombas de vácuo;** Heidolph (Nürnberg – Alemanha), modelo ROTAVAC,  
com uma capacidade nominal de sucção de 0,6 m<sup>3</sup>/h;
- **Câmaras de refrigeração;** RADIBER (Barcelona – Espanha), modelo GS-105, -30°C;
- **Espectrofotómetro;** HITACHI (Berkshire, UK), modelo U-2800;

- **Fluxímetros;** AALBORG (New York, USA), modelo 112-02, com uma capacidade de leitura a cerca de 300 mL/minuto;
- **Hote para pesagens;** HOLTEN (Waltham, USA), modelo Weighmaster 0,9;
- **Mantas de aquecimento;** aquecimento BUNSEN (Madrid – Espanha), com uma potência de 450 W;
- **Placa de aquecimento;** aquecimento BUNSEN (Madrid – Espanha), PCR-A;

## 4. Resumo do método de ensaio

### 4.1. Preparação da toma para análise

O documento normativo<sup>[5]</sup> que descreve o método refere que os vegetais devem ser cortados em fracções com as dimensões máximas que permitem inseridos nas tubuladuras do balão reactor. A aplicação prática deste procedimento é descrita na tabela 8.

Tabela 8: Modo de preparação da toma para análise.

<b>Vegetais</b>	<b>Preparação da toma para análise</b>
alcachofra, alface, ananás, batatas, beterraba, bróculo, cebola, côco, cogumelo, couve-flor, couve-galega, couve de repolho, figo, inhame, laranja, lima, limão, maçã, maracujá, marmelo, melão, papaia, pêra, pimento, pomelo, quivi, qumquats, romã, tangerina, tomate e toranja.	Cortar aleatoriamente secções longitudinais de todos os elementos individuais da amostra de laboratório, em número e largura adequados para se obter a massa de toma analítica pretendida e de forma a passar pelas tubuladuras do balão reactor.

Tabela 8: Modo de preparação da toma para análise (continuação).

<b>Vegetais</b>	<b>Preparação da toma para análise</b>
alho francês, banana, beringela, cenoura, curgete, espargo, pepino.	Cortar aleatoriamente secções transversais de todos os elementos individuais da amostra de laboratório, em número e largura adequados para se obter a massa de toma analítica pretendida e de forma a passar pelas tubuladuras do balão reactor.
abóbora e melancia	Cortar partes de secções longitudinais de todos os elementos individuais da amostra de laboratório, em posições diferentes, em número adequado para se obter a massa de toma analítica pretendida e de forma a passar pelas tubuladuras do balão reactor.
Abacate, ameixa, damasco, manga e pêsego.	Cortar secções longitudinais de todos os elementos individuais da amostra de laboratório, em número e largura adequados para se obter a massa de toma analítica pretendida e de forma a passar pelas tubuladuras do balão reactor. Antes de preparar a toma para análise, deverão ser medidas as massas das fracções de polpa e caroço para corrigir a concentração final na amostra.
Airela, alho, amêndoa, amora, amora framboesa, amora preta, avelã, azeitona, castanha, castanha do brasil, castanha de cajú, cereja, cogumelo pequeno, couve de bruxelas, ervilha sem casca, feijão sem casca, groselha, groselha espinhosa, morango, uva, framboesa, mirtilo, noz, noz de macadâmia, noz pecan, pastinaca, pepininho, pinhão, pistácio, lentilha, líchia, rabanete, rábano, salsifi, sementes, tâmara e tupinambo.	Introduzir os elementos individuais inteiros, retirados aleatoriamente da amostra de laboratório de forma a se obter a massa de toma analítica pretendida.
arroz, aveia, centeio, cevada, milho, trigo e triticale.	Introduzir a amostra de laboratório directamente no balão reactor, de forma a obter a massa da toma analítica pretendida.
acelga, agrião, espinafre e nabiça.	Introduzir folhas inteiras e caules, retirados aleatoriamente da amostra de laboratório de forma a obter-se a massa de toma analítica pretendida

## 4.2. Montagem do aparelho extractor

No método em estudo, os passos de hidrólise ácida dos ditiocarbamatos, extracção, purificação e recolha do  $\text{CS}_2$  libertado são realizados em simultâneo num aparelho em vidro designado por aparelho extractor.

Este equipamento, conforme se pode visualizar na figura 5, é composto por várias peças em vidro e está estruturado do seguinte modo:



Figura 5: Aparelho em vidro para extracção, purificação e recolha do  $\text{CS}_2$  produzido na hidrólise ácida dos ditiocarbamatos presentes na amostra.

- Balão de fundo redondo – figura 6, de 1 L de capacidade, com três tubuladuras onde ocorre a reacção de hidrólise ácida dos ditiocarbamatos. A mistura de ácido clorídrico com cloreto de estanho, previamente aquecida, é vertida por um funil de carga com torneira, a entrada de ar dá-

se pelo tubo da tubuladura oposta e na tubuladura central, é ajustado um condensador de Liebig;



Figura 6: Balão reactor.

- A mistura é colocada em refluxo de modo a separar o  $\text{CS}_2$  libertado pelos ditiocarbamatos e encaminhá-lo, devido ao vácuo aplicado na extremidade do aparelho, até aos recipientes onde se encontra o reagente de cor – figura 7;
- O  $\text{CS}_2$  chega ao reagente de cor, formando os complexos corados que serão quantificados por espectrofotometria de absorção molecular.



Figura 7: Recipientes com dispersores onde se encontra o reagente de cor.

- Para remover possíveis interferentes, foi introduzido no fluxo de ar que conduz o  $\text{CS}_2$  até ao reagente de cor, um peneiro químico de  $\text{NaOH}$  – figura 8, que serve para remover substâncias interferentes, de entre as quais o  $\text{H}_2\text{S}$ .



Figura 8: Peneiro químico, onde se encontra a solução de hidróxido de sódio.

### 4.3. Quantificação

Para efectuar a quantificação do CS<sub>2</sub> libertado na análise das amostras, foi estabelecido o seguinte procedimento. Com base na preparação de 10 rectas de calibração com 5 soluções padrão, totalizando 50 pares massa/absorvência, obteve-se para cada gama de trabalho (ponto 5.1 da introdução), uma função de calibração que é utilizada para estabelecer os valores analíticos das amostras. A validade destas funções é verificada com base no controlo do declive e da abcissa na origem.

### 4.4. Aspectos práticos

O fluxo gasoso necessário para canalizar o CS<sub>2</sub> gasoso para o colector com o reagente de cor, foi efectivado pela ligação de uma bomba de vácuo no extremo do aparelho extractor de forma a criar uma corrente de ar através deste.

Para controlar o fluxo de ar através do aparelho, usou-se um fluxímetro, ligado entre a bomba de vácuo e o aparelho extractor de forma a manter um fluxo de sucção de ar de cerca de 300 mL/minuto, conforme indicado na norma de ensaio. Este equipamento não foi calibrado por apenas ser referido como um valor aproximado e servir sobretudo para controlar as condições de repetibilidade de aplicação do método.

A matriz vegetal deve ser aquecida rapidamente após a colocação dos reagentes no balão reactor de modo a evitar a decomposição e consequente perda de analito<sup>[5,6,51]</sup>. Para esse efeito, foram usadas, mantas de aquecimento com uma potência de 450 W<sup>[5,6]</sup> e uma capacidade de 1 L de modo a acomodar o balão reactor.

Para que a mistura reactiva atinja mais rapidamente a temperatura de ebulição, usou-se uma placa de aquecimento de modo a aquecer previamente a solução de digestão antes de a colocar no balão reactor<sup>[5,6]</sup>.

As balanças foram calibradas nas gamas de trabalho usadas. Para a pesagem da toma para análise, foi usada a balança Mettler PE3000, para a pesagem dos reagentes, balança Mettler AE160, e para a pesagem dos padrões de referência de ditiocarbamatos e do CS<sub>2</sub>, a balança Mettler AG135.

As soluções de padrões de referência de ditiocarbamatos e de CS<sub>2</sub> foram armazenadas em câmaras congeladoras a cerca de -30 °C no sentido de garantir a temperatura de -20 °C aconselhada para o armazenamento de amostras que não são analisadas de imediato e assim evitar a alteração destas soluções.

Para salvaguardar a segurança do operador na pesagem de substâncias nocivas, designadamente os padrões de ditiocarbamatos e o CS<sub>2</sub>, foi usada uma hote que possibilita a utilização da balança AG135 no seu interior.

#### **4.5. Diagrama de aplicação**

Apresenta-se na figura 9, um fluxograma com a sequência dos procedimentos para a realização do método de ensaio.

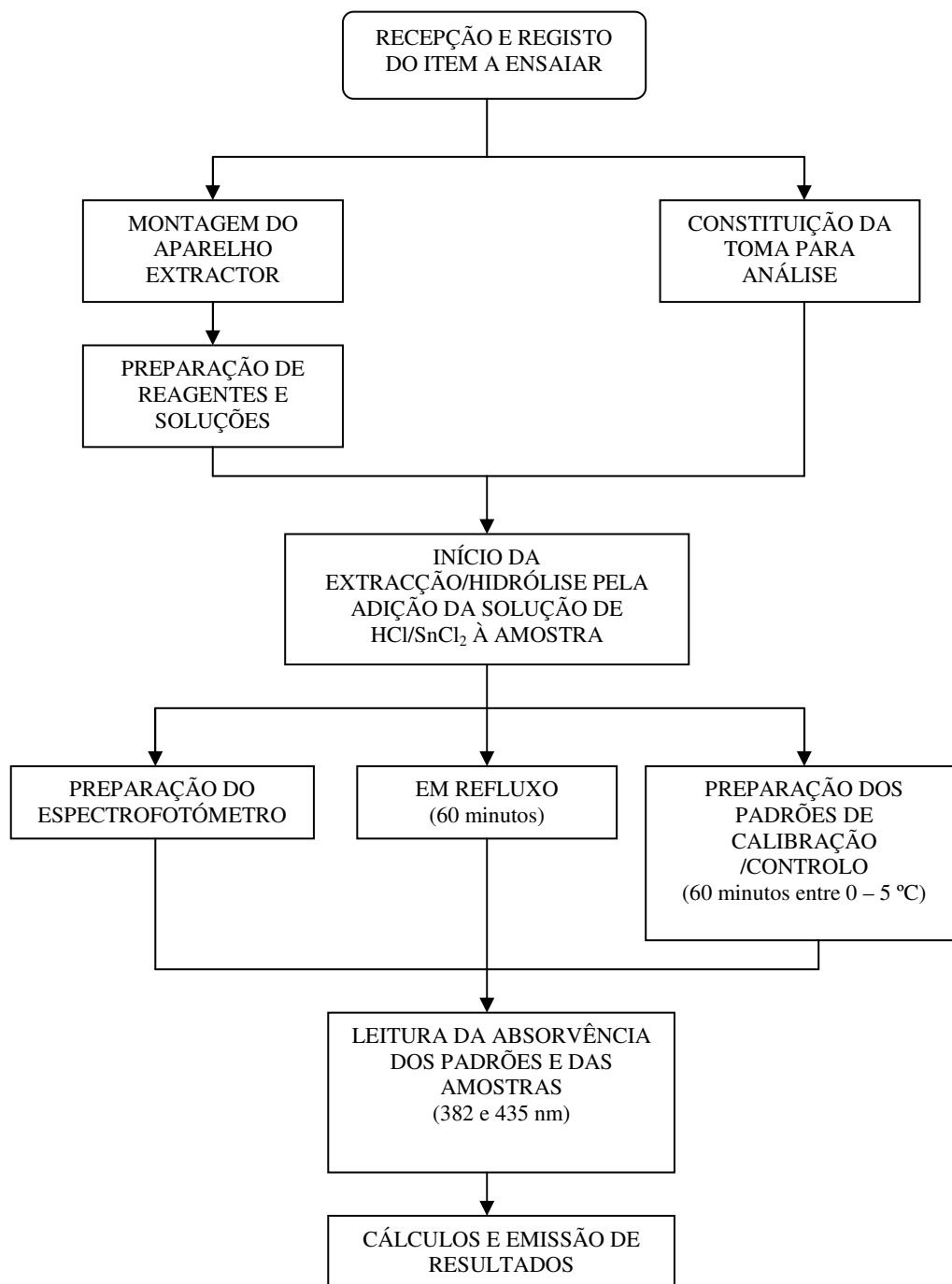


Figura 9: Fluxograma de aplicação da metodologia em estudo nesta dissertação.

## **5. Controlo de qualidade interno**

Apresentam-se neste ponto os procedimentos definidos para a concretização do controlo de qualidade interno desta metodologia.

### **5.1. Brancos**

No caso concreto da análise de pesticidas em vegetais, o analito é estranho às matrizes analisadas e a maior parte das amostras analisadas não apresentam resíduos de ditiocarbamatos detectáveis pelo que é possível controlar de forma quase contínua a ocorrência de falso positivos.

Este controlo de falso positivos é complementado com base em ensaios de recuperação realizados periodicamente, que para além da avaliação da exactidão, permitem controlar a ocorrência de falso negativos.

### **5.2. Replicados**

Foi estabelecido na rotina laboratorial, a realização de triplicados, sempre que:

- os valores obtidos ultrapassem os LMR's estabelecidos;
- em 5% das amostras com teores quantificáveis de resíduos.

Este procedimento visa estabelecer uma estimativa do desvio padrão desta população para cada matriz vegetal, no sentido de elaborar cartas de controlo para acompanhar este parâmetro.

### **5.3. Materiais de referência internos**

Os materiais remanescentes dos ensaios interlaboratoriais são utilizados como materiais de referência internos. Trimestralmente, são analisados para avaliar o desempenho do método, em termos da sua exactidão.

Para evitar a degradação dos ditiocarbamatos presentes, são armazenados a uma temperatura que ronda os  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **5.4. Calibração química**

Para controlar a qualidade e estabilidade da calibração química utilizada para efectuar a quantificação do  $\text{CS}_2$  libertado na digestão dos ditiocarbamatos, foram estudados o declive e a abcissa na origem da curva de calibração, para as duas gamas de trabalho estabelecidas.

Com efeito, o controlo da resposta do equipamento de medição, espectrofotómetro UV/Vis, permite detectar problemas de funcionamento deste aparelho, incorrecções na preparação do reagente de cor ou problemas na preparação dos padrões.

Para efectivar este controlo, foi estabelecido como procedimento técnico, em paralelo com a realização de ensaios, a preparação dos padrões de calibração, de valor nominal 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$  para a gama baixa e 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$  para a gama alta. Com base na resposta a estes padrões, foram elaboradas cartas de controlo de shewart de indivíduos para os parâmetros referidos.

Podemos assumir uma distribuição normal para estes parâmetros dado derivarem de variáveis que seguem este tipo de distribuição. Apresentam-se nesta dissertação, para cada parâmetro, os valores de referência e respectivas ferramentas de controlo.

## 6. Estabilidade dos complexos em função da temperatura

Conforme se demonstrará no capítulo III, a estabilidade dos complexos corados formados pela reacção do  $\text{CS}_2$  com o reagente de cor depende da temperatura.

Para minimizar as diferenças de temperatura entre os padrões de calibração e as soluções resultantes na metodologia de análise, os tubos contendo o reagente de cor foram refrigerados envolvendo-os em gelo. Para esse efeito, a montagem do aparelho de vidro foi ajustada conforme figura 10.



Figura 10: Os recipientes que contêm o reagente de cor foram colocados em copos de vidro onde será introduzido gelo durante o ensaio.

### **III. Apresentação e discussão de resultados**

Os resultados apresentados nesta dissertação dizem respeito, por um lado, à validação da metodologia descrita na norma EN 12396-1, desenvolvida em rotina no Laboratório da Direcção Regional de Agricultura do Algarve (ponto 1) e por outro lado, ao estudo de aspectos práticos relacionados com a implementação do método de ensaio, desenvolvidos no âmbito desta dissertação (pontos 2, 3 e 4).

#### **1. Validação interna do método**

##### **1.1. Especificidade**

Relativamente a interferentes eventualmente presentes nas matrizes vegetais, apresentam-se na tabela 9, a taxa de resultados abaixo do Limite de Detecção. Demonstra-se assim que para as matrizes referidas, não há evidência de existir qualquer tipo de interferência positiva, designadamente pela eventual ocorrência de CS<sub>2</sub> fitogénico.

Em paralelo com os resultados apresentados, a realização periódica de ensaios de recuperação consubstancia a validade destes resultados por permitirem controlar a eventual existência de falsos negativos.

Tabela 9: Percentagem de amostras em que não foi detectada a presença de ditiocarbamatos. Análises realizadas em 1999, 2000, 2004 e 2005

<b>Matriz vegetal</b>	<b>nº de amostras analisadas</b>	<b>Percentagem de amostras com resultado “&lt; Limite de Detecção”</b>
<b>alface</b>	90	59
<b>alho francês</b>	3	100
<b>arroz</b>	20	85
<b>batata</b>	3	100
<b>cenoura</b>	4	75
<b>couve flor</b>	15	80
<b>couve repolho</b>	21	90
<b>ervilha</b>	15	100
<b>espinafre</b>	17	94
<b>Feijão verde</b>	9	67
<b>laranja</b>	5	100
<b>maçã</b>	13	77
<b>melão</b>	15	53
<b>morango</b>	17	94
<b>pepino</b>	17	35
<b>pêra</b>	6	17
<b>pimento</b>	15	93
<b>tomate</b>	8	100
<b>trigo</b>	15	100
<b>Uva</b>	3	100

## 1.2. Calibração e gama de trabalho

Relativamente ao estudo da gama de trabalho, os resultados obtidos para a calibração entre 10 e 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$  encontram-se no ponto 2, por se enquadrarem no estudo desenvolvido no âmbito exclusivo desta dissertação.

No que respeita à calibração entre os 50 e 250  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ , apresentam-se os resultados obtidos no âmbito da validação da metodologia, conforme descrita no normativo EN 12396-1. Por ser uma metodologia normalizada, não foi verificada internamente a linearidade da gama de trabalho. Determinaram-se apenas os parâmetros característicos da recta de calibração com o objectivo de definir os procedimentos de controlo de qualidade da calibração.

Resumem-se na tabela 10 os resultados obtidos. Os valores apresentados referem-se às absorvências medidas a 435 nm.

Relativamente aos coeficientes de correlação, verifica-se que são todos superiores a 0,995<sup>[47]</sup>, valor de referência aceite. Podemos verificar também, que os valores obtidos para a abcissa na origem ( $X_{Y0}$ ) são próximos de 20  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ , valor de referência indicado na norma 12396-1<sup>[5]</sup>, como sendo um parâmetro que permite avaliar se a calibração química é adequada.

Tabela 10: Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos para a calibração na gama de trabalho definida na norma EN 12396-1.

Data	Coordenada	Padrão 50	Padrão 100	Padrão 150	Padrão 200	Padrão 250	m	b	r	X <sub>Y0</sub> (µg de CS <sub>2</sub> )
07/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	51,12	102,25	153,37	204,50	255,62	2,97x10 <sup>-3</sup>	-5,05x10 <sup>-2</sup>	0,9997	17,0
	Y (Absorvência)	0,108	0,248	0,397	0,559	0,711	± 0,12x10 <sup>-3</sup>	± 2,0x10 <sup>-2</sup>		
07/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	51,12	102,24	153,36	204,48	255,60	3,06x10 <sup>-3</sup>	-5,94x10 <sup>-2</sup>	0,9990	19,4
	Y (Absorvência)	0,107	0,251	0,395	0,559	0,734	± 0,22x10 <sup>-3</sup>	± 3,8x10 <sup>-2</sup>		
07/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	51,35	102,70	154,04	205,39	256,74	3,05x10 <sup>-3</sup>	-5,81x10 <sup>-2</sup>	0,9995	19,0
	Y (Absorvência)	0,107	0,251	0,403	0,566	0,733	± 0,15x10 <sup>-3</sup>	± 2,6x10 <sup>-2</sup>		
09/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	50,62	101,23	151,85	202,46	253,08	2,95x10 <sup>-3</sup>	-4,95x10 <sup>-2</sup>	0,9995	16,8
	Y (Absorvência)	0,105	0,245	0,389	0,558	0,695	± 0,16x10 <sup>-3</sup>	± 2,6x10 <sup>-2</sup>		
12/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	51,02	102,05	153,07	204,10	255,12	3,05x10 <sup>-3</sup>	-5,54x10 <sup>-2</sup>	0,9994	18,1
	Y (Absorvência)	0,109	0,250	0,408	0,560	0,733	± 0,17x10 <sup>-3</sup>	± 2,8x10 <sup>-2</sup>		
12/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	50,41	100,82	151,24	201,65	252,06	2,76x10 <sup>-3</sup>	-5,13x10 <sup>-2</sup>	0,9998	18,6
	Y (Absorvência)	0,092	0,219	0,366	0,508	0,642	± 0,10x10 <sup>-3</sup>	± 1,6x10 <sup>-2</sup>		

Tabela 10: Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos para a calibração na gama de trabalho definida na norma EN 12396-1 (continuação).

Data	Coordenada	Padrão 50	Padrão 100	Padrão 150	Padrão 200	Padrão 250	m	b	r	X <sub>Y0</sub>
13/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	50,68	101,35	152,03	202,70	253,38	3,02x10 <sup>-3</sup> ± 0,21x10 <sup>-3</sup>	-5,75x10 <sup>-2</sup> ± 3,5x10 <sup>-2</sup>	0,9991	19,1
	Y (Absorvência)	0,102	0,250	0,391	0,543	0,720				
13/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	49,80	99,60	149,40	199,20	249,00	3,03x10 <sup>-3</sup> ± 0,28x10 <sup>-3</sup>	-5,62x10 <sup>-2</sup> ± 4,5x10 <sup>-2</sup>	0,9984	18,6
	Y (Absorvência)	0,107	0,243	0,378	0,541	0,712				
13/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	49,14	98,28	147,42	196,56	245,70	3,03x10 <sup>-3</sup> ± 0,22x10 <sup>-3</sup>	-6,35x10 <sup>-2</sup> ± 3,7x10 <sup>-2</sup>	0,9989	21,0
	Y (Absorvência)	0,096	0,230	0,366	0,533	0,688				
13/07/2004	X (µg de CS <sub>2</sub> )	50,58	101,17	151,75	202,34	252,92	2,98x10 <sup>-3</sup> ± 0,34x10 <sup>-3</sup>	-4,75x10 <sup>-2</sup> ± 5,7x10 <sup>-2</sup>	0,9975	15,9
	Y (Absorvência)	0,117	0,254	0,377	0,559	0,719				

m – declive; b – ordenada na origem; r – coeficiente de correlação; X<sub>Y0</sub> – abcissa na origem

### 1.3. Precisão

Pelo facto das substâncias activas pertencentes ao grupo dos ditiocarbamatos terem acção na superfície do vegetal e de não ser tecnicamente adequado proceder-se à homogeneização da amostra para constituir a toma para análise, é importante proceder à estimativa dos parâmetros de dispersão associados à determinação destas substâncias. Apresentam-se nos pontos subsequentes os resultados obtidos.

#### 1.3.1. Repetibilidade

##### 1.3.1.1. Ensaio interlaboratorial

Com base na participação no ensaio interlaboratorial TESTQUAL 10, organizado pela empresa TESTQUAL, realizado com a substância activa mancozebe, na matriz alface, foi estimado o desvio padrão da repetibilidade intra-laboratório.

Dos 22 laboratórios participantes, foram seleccionados 13, por terem aplicado uma metodologia de ensaio idêntica – quantificação espectrofotométrica do CS<sub>2</sub> libertado. A estimativa não é afectada pela não homogeneização da amostra pois o material objecto do ensaio foi homogeneizado pela entidade organizadora. O valor do desvio padrão da repetibilidade estimado encontra-se expresso na tabela 11:

Tabela 11: Estimativa do desvio padrão da repetibilidade com base em resultados do ensaio interlaboratorial TESTQUAL 10 para o método em estudo.

Substância activa	Matriz vegetal	Nível de fortificação (µg de CS <sub>2</sub> )	Desvio padrão (µg de CS <sub>2</sub> )	Coefficiente de variação (%)
mancozebe	alface	240	17,1	7,1

Com base nos resultados dos laboratórios (9 laboratórios) que efectuaram a determinação por técnicas cromatográficas, foi também estimada a repetibilidade no sentido de possibilitar a comparação com a técnica espectrofotométrica, conforme se pode visualizar na tabela 12.

Tabela 12: Estimativa do desvio padrão da repetibilidade para a técnica cromatográfica.

<b>Substância activa</b>	<b>Matriz vegetal</b>	<b>Nível de fortificação (µg de CS<sub>2</sub>)</b>	<b>Desvio padrão (µg de CS<sub>2</sub>)</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
mancozebe	alface	240	14,2	5,9

Para comparação destes dois valores, efectuou-se um teste às variâncias para verificar a sua homogeneidade. O resultado indica que as variâncias não são significativamente diferentes, conforme se observa na tabela 13.

Tabela 13: Comparação das variâncias de repetibilidade obtidas para as técnicas utilizadas no ensaio interlaboratorial TESTQUAL10 – espectrofotometria e cromatografia.

<b>Técnica analítica</b>	<b>Espectrofotometria</b>	<b>Cromatografia</b>
<b>Variância</b>	292,41	201,64
<b>PG calculado</b>	0,69	
<b>PG tabelado (F;0,05;13;9)</b>	3,05	
<b>Resultado</b>	Verifica-se a homogeneidade de variâncias	

PG – Valor estatístico associado à distribuição de Fischer.

Os coeficientes de variação de repetibilidade obtidos encontram-se ambos abaixo do valor guia para esta determinação, 10 %<sup>[53]</sup>.

### 1.3.1.2. Réplicas em amostras reais

Efectuar replicados em amostras reais (amostras em que as substâncias activas estiveram naturalmente em contacto com o vegetal, de forma a criar as interacções reais entre a matriz e a substância activa) representa a forma que mais se aproxima da realidade para estimar a repetibilidade. Esta estimativa engloba todos os factores de dispersão inerentes; a distribuição do pesticida sobre o vegetal, a constituição da toma para análise e o processo de análise em si.

Foram realizados 4 ensaios em triplicado. Apresentam-se os resultados na tabela 14.

Tabela 14: Estimativa da repetibilidade em amostras reais.

Matriz vegetal	Massa da toma para análise (g)	Massa de CS <sub>2</sub> (µg)	X <sub>1</sub> *	X <sub>2</sub> *	X <sub>3</sub> *	$\bar{X}$ *	Desvio padrão*	Coefficiente de variação
couve de repolho	150	67,5	0,94	0,13	0,28	0,45	0,43	96 %
maçã	200	80	0,38	0,42	0,41	0,40	0,02	5,2 %
alface	80	173,6	2,08	2,06	2,36	2,17	0,17	7,7 %
espinafre	50 – 100	22,0 – 44,0	0,36	0,50	0,45	0,44	0,07	16 %

\* Resultados em mg/kg de CS<sub>2</sub>. Xi corresponde ao replicado i e  $\bar{X}$  corresponde ao valor médio

Embora com dados insuficientes para poder obter uma estimativa deste parâmetro, pode-se verificar que a não homogeneização da amostra pode levar à obtenção de resultados demasiadamente díspares. A situação ocorrida com a couve repolho poderá ser uma situação pontual e anómala mas permite verificar a importância da não homogeneização da amostra. Com excepção desta situação, os restantes valores encontram-se dentro dos limites guia<sup>[53]</sup>, respectivamente 18, 14 e 18%.

### 1.3.2. Reprodutibilidade

Para estimar a reprodutibilidade, usaram-se os dados do ensaio interlaboratorial TESTQUAL 10.

Dos 13 laboratórios seleccionados no ponto 1.3.1.1, apenas foram seleccionados 12 por se ter excluído um deles pela aplicação de testes de aberrantes<sup>[54]</sup> aos resultados, conforme se pode visualizar na tabela 15.

Tabela 15: Resultados da aplicação dos testes de valores aberrantes.

Teste	Nº de laboratórios	Resultado	Nº de laboratórios	Resultado
DIXON	13	não há aberrantes	-----	-----
QUARTÍS	13	1 aberrante	12	não há aberrantes
Valor Z (definido no ensaio interlaboratorial)	13	1 valor de $Z > 3$	12	Todos os valores de $Z < 3$

Com base nos resultados dos 12 laboratórios, estimou-se a reprodutibilidade, apresentando-se o valor na tabela 16:

Tabela 16: Estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade com base em resultados do ensaio interlaboratorial TESTQUAL 10.

Substância activa	Matriz vegetal	Nível de fortificação ( $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$ )	Desvio padrão ( $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$ )	Coefficiente de variação (%)
mancozebe	alface	240	81,0	33,7

Este resultado reflecte a reprodutibilidade na aplicação de técnicas espectrofotométricas.

### 1.3.3. Precisão intermédia

Com base nos ensaios de recuperação realizados, considerando as diversas substâncias activas, o momento da realização dos ensaios, a matriz vegetal e o nível de fortificação, obtiveram-se os resultados de variabilidade expressos na tabela 17. Estes serão utilizados para estimar a precisão intermédia do método de ensaio. Os ensaios referidos foram realizados em quintuplicado <sup>[53]</sup>, apresentando-se o desvio padrão obtido.

No procedimento usado para efectuar os ensaios de recuperação, não se coloca a questão da não homogeneização da amostra pois a substância activa de fortificação é adicionada à amostra por meio de material volumétrico (pipeta). Assim, a estimativa de dispersão obtida apenas inclui o processo de digestão e quantificação.

Tabela 17 : Desvio padrão obtido nos ensaios de recuperação realizados para estimar a precisão intermédia do método de ensaio.

<b>Substância activa</b>	<b>Matriz vegetal</b>	<b>Nível de fortificação (µg de CS<sub>2</sub>)</b>	<b>Média de recuperação (µg de CS<sub>2</sub>)</b>	<b>Desvio padrão (µg de CS<sub>2</sub>)</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
zinebe	alface	99	101,4	2,4	2,4
zinebe	couve-flor	99	108,5	4,2	3,9
mancozebe	trigo em grão	120	82,4	2,4	2,9
mancozebe	morango	156	102,4	6,4	6,2
mancozebe	couve de repolho	88	97,4	8,3	8,6
tirame	feijão verde	101	81,6	3,7	4,6

Aos resultados expressos, foi aplicado um teste de Cochran<sup>[54]</sup> para verificar a homogeneidade das variâncias, obtendo-se os seguintes resultados – tabela 18:

Tabela 18: Aplicação do teste de Cochran na estimativa da precisão intermédia.

Valor calculado	Valor referência para 6 dados e 5 réplicas com 5% de significância	Valor referência para 6 dados e 5 réplicas com 1% de significância
0,454	0,480	0,564

Pelos resultados apresentados, aceita-se, para um grau de significância de 5%, a hipótese estatística em que se admite que as variâncias não são diferentes.

Tendo-se verificado a homogeneidade das variâncias, calculou-se a média das variâncias destes 6 ensaios para estimar a precisão intermédia, através da expressão que se segue:

$$DP_{PI} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (DP_i)^2}{n}}$$

Onde  $DP_{PI}$  representa a estimativa do desvio padrão da precisão intermédia,  $DP_i$  os desvios padrão obtidos individualmente (foram usados os coeficientes de variação) e  $n$  o número de dados.

Obteve-se um valor de Coeficiente de Variação da precisão intermédia de 5,2%. Como seria de esperar, este valor é menor do que os valores obtidos para os parâmetros de variabilidade já estimados e encontra-se abaixo do valor máximo de referência, 10 %

[53].

### 1.3.4. Relação funcional entre precisão e concentração

Para verificar a possível relação funcional entre o desvio padrão de repetibilidade e a massa de CS<sub>2</sub> quantificada nas análises, foram utilizados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação realizados na validação interna do método.

Foram estudadas as duas relações mais frequentes, linear e logarítmica<sup>[47]</sup>, resultando nos gráficos apresentados nas figuras 11 e 12:

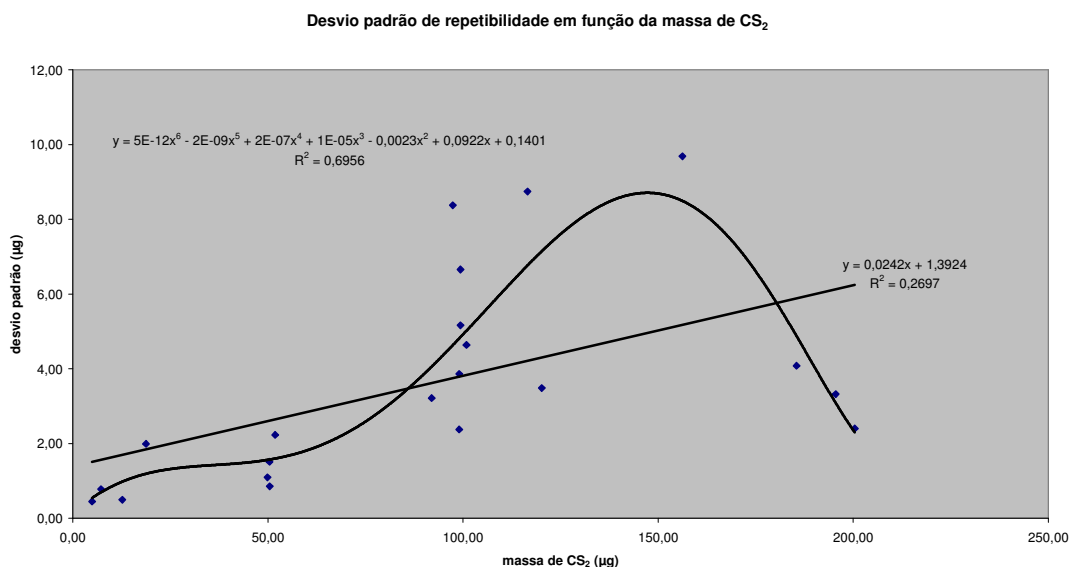


Figura 11: Representação gráfica entre o desvio padrão da repetibilidade e a massa de CS<sub>2</sub>.

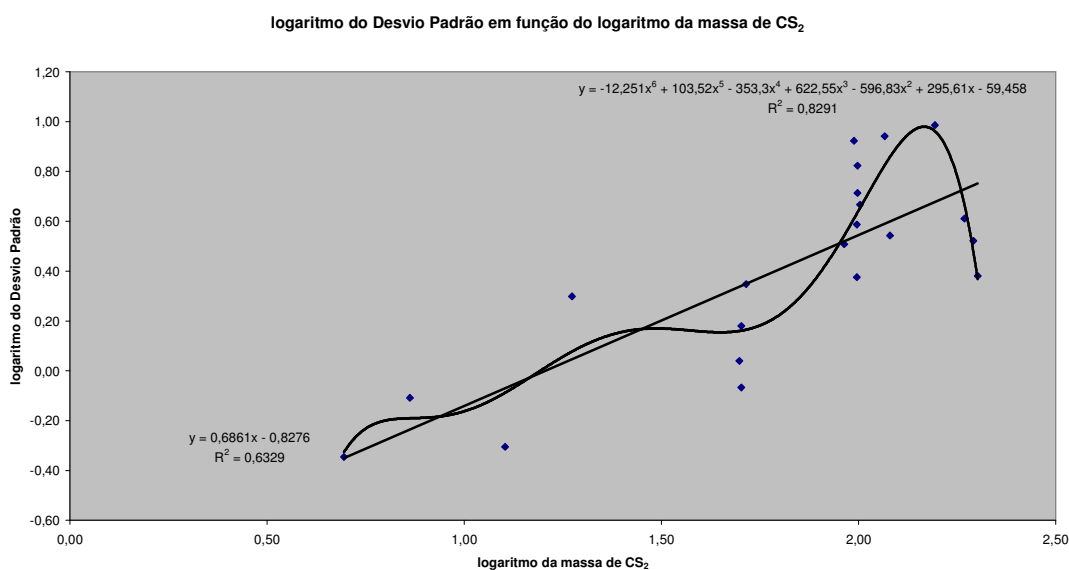


Figura 12: Representação gráfica entre o logaritmo do desvio padrão da repetibilidade e o logaritmo da massa de CS<sub>2</sub>.

Verifica-se, pela avaliação dos gráficos e pelos coeficientes de correlação obtidos para a função linear e polinomial (grau 6) que nenhuma delas descreve convenientemente a relação entre a massa de CS<sub>2</sub> e o desvio padrão associado à sua determinação.

## 1.4. Exactidão

### 1.4.1. Ensaio de recuperação

Foram realizados ensaios de recuperação em diversas matrizes vegetais, utilizando algumas substâncias activas do grupo do ditio-carbamatos para efectuar a fortificação, com diversos níveis de fortificação no sentido de abranger o mais possível a gama de trabalho. Apresentam-se os resultados obtidos na tabela 19.

Tabela 19: Ensaio de recuperação efectuados para avaliação da exactidão do método.

Data	Substância activa	Matriz	Nível de fortificação (µg de CS <sub>2</sub> )	Nº de replicados	Média (%)	Desvio padrão (%)
13/11/1995	tirame	feijão verde	50	3	80,6	2,4
14/11/1995	tirame	feijão verde	101	5	81,6	3,7
20/11/1995	tirame	tangerina	99	3	88,3	4,6
21/11/1995	tirame	tangerina	50	3	100,2	1,8
11/12/1995	tirame	alface	99	3	87,1	5,9
13/05/1996	tirame	morango	196	3	97,2	1,6
26/08/1996	tirame	uva	380	3	93,4	1,0
09/10/1996	tirame	pepino	52	3	88,0	3,7
15/01/1997	tirame	feijão verde	13	3	109,1	4,3
09/04/1997	tirame	espinafre	5	3	90,4	8,2
18/08/1997	tirame	uva	186	3	89,8	2,0
31/03/1998	tirame	alface	50	3	89,8	2,0
16/12/1998	tirame	quivi	92	3	92,6	3,2
02/06/1999	tirame	pimento	200	3	87,5	1,1
01/07/1999	zinebe	alface	99	5	101,4	2,4
09/09/1999	zinebe	couve-flor	99	5	108,5	4,2
07/12/1999	mancozebe	trigo em grão	120	5	82,4	2,4

Tabela 19: Ensaios de recuperação efectuados para avaliação da exactidão do método (continuação).

Data	Substância activa	Matriz	Nível de fortificação ( $\mu\text{g de CS}_2$ )	Nº de replicados	Média (%)	Desvio padrão (%)
19/04/2000	mancozebe	morango	156	5	102,4	6,4
20/06/2000	mancozebe	ervilha	19	3	108,5	11,5
21/06/2000	mancozebe	couve repolho	88	5	97,4	8,3
23/11/2000	zinebe	arroz	8	3	105,4	11,3
04/01/2001	zinebe	pepino	117	3	87,3	6,5
23/07/2004	zinebe	limão	202	3	118,9	0,4
26/07/2004	mancozebe	limão	135	3	94,2	1,8
17/09/2004	mancozebe	tomate	81	3	123,4	1,5

Considerando os critérios definidos na bibliografia<sup>[53]</sup>, os valores apresentados são adequados com excepção de dois, 118,9% e 123,4%, que se encontram fora do intervalo definido para este nível de fortificação (70-110%).

#### 1.4.2. Materiais de referência

Foi definido como material de referência interno, o material remanescente da participação no ensaio interlaboratorial de aptidão, definindo-se como critério de aceitação o intervalo de valores atribuídos nesse ensaio, com base em 16 dados analíticos. A substância activa de fortificação foi o mancozebe, produto comercial Afrosan MZ-8.

Apresentam-se os resultados obtidos na tabela 20:

Tabela 20: Resultados da avaliação da exactidão com base em materiais de referência internos. Os valores apresentados encontram-se em mg/kg de CS<sub>2</sub>.

Data	Valor atribuído	Desvio Padrão da população	Intervalo de aceitação	Valor obtido
11/11/2004	1,55 ± 0,18	0,31	[0,93 – 2,17]	1,61
15/09/2005				2,06

A incerteza associada ao valor atribuído resulta do desvio padrão da média (n=16) expandido para um intervalo de confiança de 95%, coeficiente de expansão de 2.

Verifica-se que os ensaios efectuados se encontram dentro do intervalo de aceitação definido.

#### 1.4.3. Ensaios interlaboratoriais

No âmbito da validação interna deste método, o Laboratório da DRAALG participou em 2 ensaios interlaboratoriais de aptidão, dos quais se obtiveram os resultados expressos na tabela 21. Verifica-se que os resultados se encontram dentro do critério de aceitação correspondente a resultados satisfatórios.

Tabela 21: Resultados da avaliação da exactidão com base na participação em ensaios interlaboratoriais de aptidão organizados pela empresa TESTQUAL. Os valores apresentados encontram-se em mg/kg de CS<sub>2</sub>.

Data	Valores obtidos		Média	$\mu$	DP <sub>E</sub> (%)	Resultado (valor Z)	Critério de aceitação
14/01/2005	3,85	3,68	3,76	2,95	25	1,1	Z  < 2
18/01/2006	1,82		1,82	1,90	25	- 0,2	

$\mu$  e DP<sub>E</sub> - valor verdadeiro e desvio padrão estimados pela entidade coordenadora

## **1.5. Controlo de qualidade interno**

### **1.5.1. Brancos**

No ponto 1.1. deste capítulo (página 56), apresentaram-se as percentagens de amostras com teores de CS<sub>2</sub> abaixo do limite de detecção, para diversas matrizes.

No que respeita a essas matrizes, pode afirmar-se que não há evidências da ocorrência de falsos positivos.

### **1.5.2. Replicados**

Os resultados dos replicados encontram-se no ponto 1.3.1.2. deste capítulo. Deverão ser obtidos mais dados para se poder elaborar as cartas de controlo referentes às estimativas de repetibilidade obtidas.

### **1.5.3. Materiais de referência**

Conforme se pode verificar no ponto 1.4.2. deste capítulo, os resultados obtidos nos ensaios realizados em materiais de referência internos encontram-se dentro dos limites de aceitação definidos.

À medida que sejam obtidos mais resultados, poderão ser construídas cartas de aceitação para este procedimento de controlo de qualidade interno.

### **1.5.4. Calibração química**

#### **1.5.4.1. Declive**

Para controlar este parâmetro, foi definida uma carta de controlo para cada gama de trabalho, de 10 a 50 µg de CS<sub>2</sub> (com base na média aritmética da resposta a 382 e 435 nm) e de 50 a 250 µg de CS<sub>2</sub> (com base na resposta a 435 nm conforme estabelecido no normativo em estudo<sup>[5]</sup>).

Apresentam-se na tabela 22 os valores considerados para a estimativa dos limites das cartas de controlo.

Tabela 22: Estimativa dos valores de referência para o estabelecimento dos limites da carta de controlo do declive das curvas de calibração.

<b>Dados</b>	<b>Gama de trabalho</b>	<b>10 a 50 µg de CS<sub>2</sub></b> <b>(x 10<sup>-3</sup>)</b>	<b>50 a 250 µg de CS<sub>2</sub></b> <b>(x 10<sup>-3</sup>)</b>
<b>1</b>		1,82	2,97
<b>2</b>		1,66	3,06
<b>3</b>		1,71	3,05
<b>4</b>		1,53	2,95
<b>5</b>		1,82	3,05
<b>6</b>		1,59	2,76
<b>7</b>		1,68	3,02
<b>8</b>		1,87	3,03
<b>9</b>		1,8	3,03
<b>10</b>		1,78	2,98
	<b>Média</b>	1,73	2,99
	<b>Desvio padrão</b>	0,11	0,09

e seguidamente, nas figuras 13 e 14, as respectivas cartas de controlo. Nestas cartas, utilizam-se as seguintes designações:

- LC – Limite Central;
- LAS e LAI – Limites de Aviso Superior e Inferior;
- LCS e LCI – Limites de Controlo Superior e Inferior.

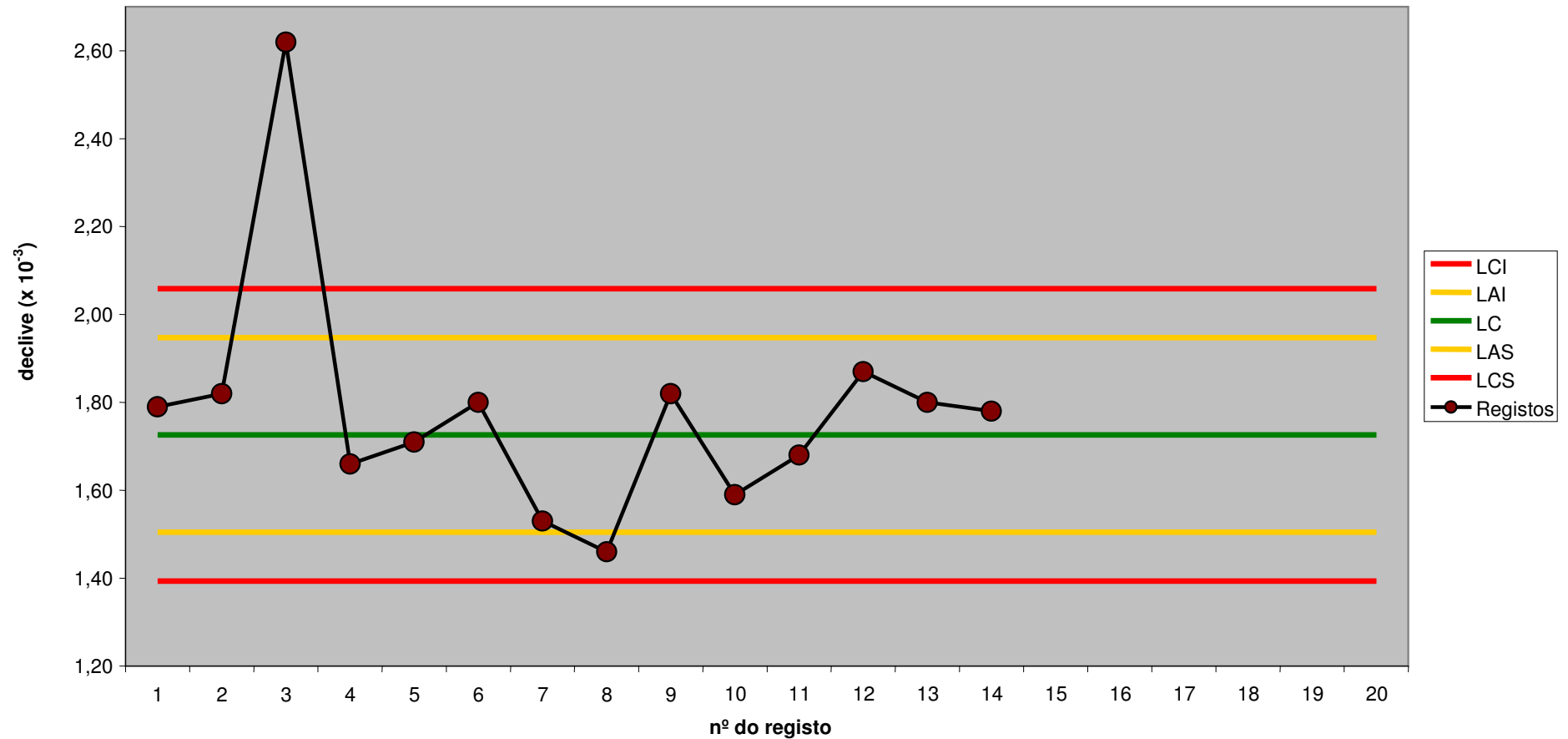


Figura 13: Carta de Controle do declive na gama 10 a 50 µg de CS<sub>2</sub>

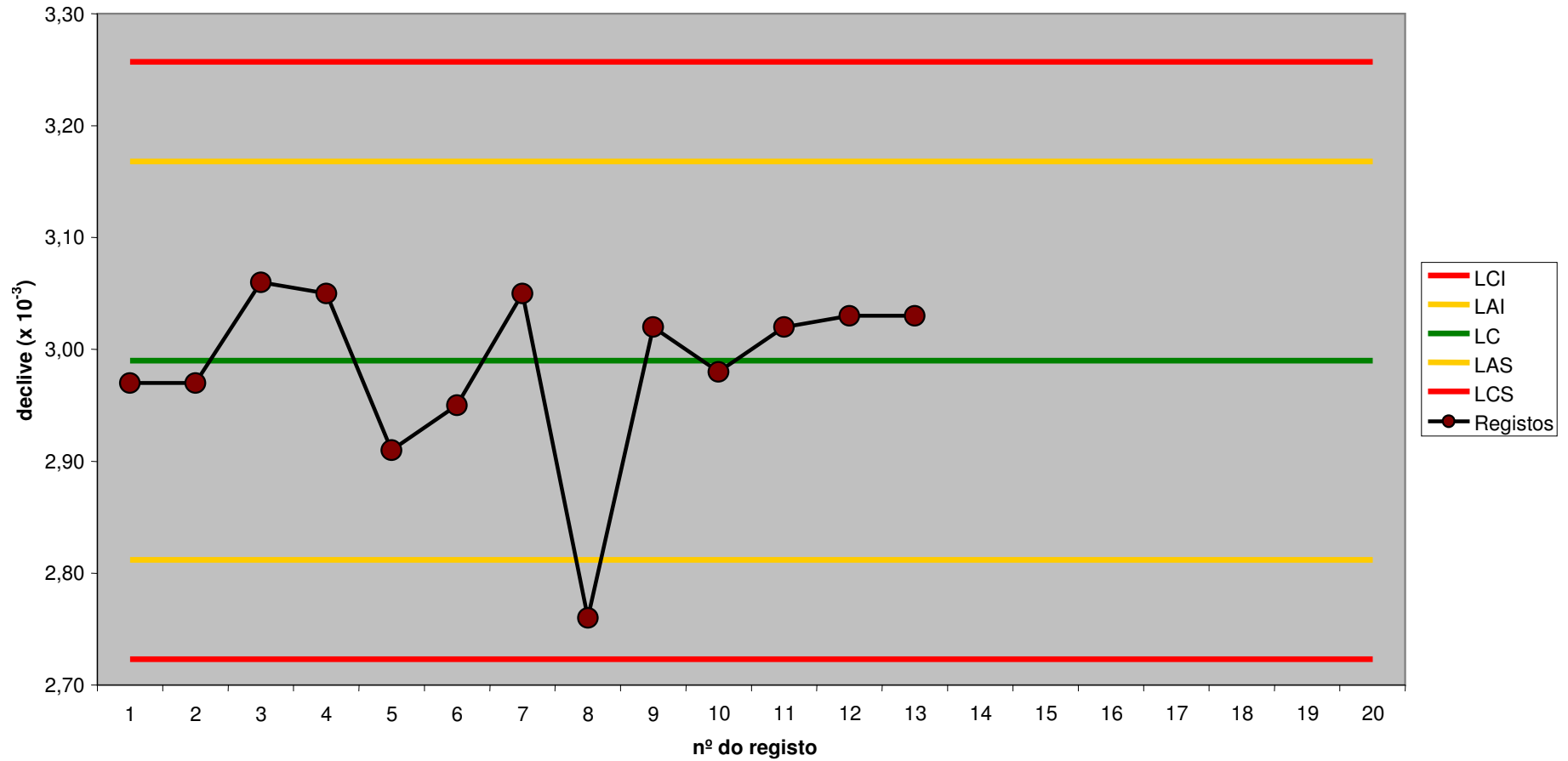


Figura 14: Carta de Controlo do declive na gama 50 a 250 µg de CS<sub>2</sub>

**1.5.4.2. Abcissa na origem**

Para este parâmetro, procedeu-se de modo idêntico ao estudo do declive, apresentam-se a tabela 23 com os valores usados e gráficos resultantes.

Tabela 23: Estimativa dos valores de referência para o estabelecimento dos limites da carta de controlo da abcissa na origem das curvas de calibração.

<b>Gama de trabalho Dados</b>	<b>10 a 50 µg de CS<sub>2</sub></b>	<b>50 a 250 µg de CS<sub>2</sub></b>
<b>1</b>	-0,38	17,0
<b>2</b>	0,9	19,4
<b>3</b>	1,17	19,0
<b>4</b>	-1,69	16,8
<b>5</b>	1,92	18,1
<b>6</b>	0,82	18,6
<b>7</b>	1,67	19,1
<b>8</b>	1,5	18,6
<b>9</b>	-1,5	21,0
<b>10</b>	0,56	15,9
<b>média</b>	0,50	18,4
<b>Desvio padrão</b>	1,3	1,5

Nas figuras 15 e 16, representam-se as cartas de controlo correspondentes, utilizando a mesma simbologia anteriormente referida.

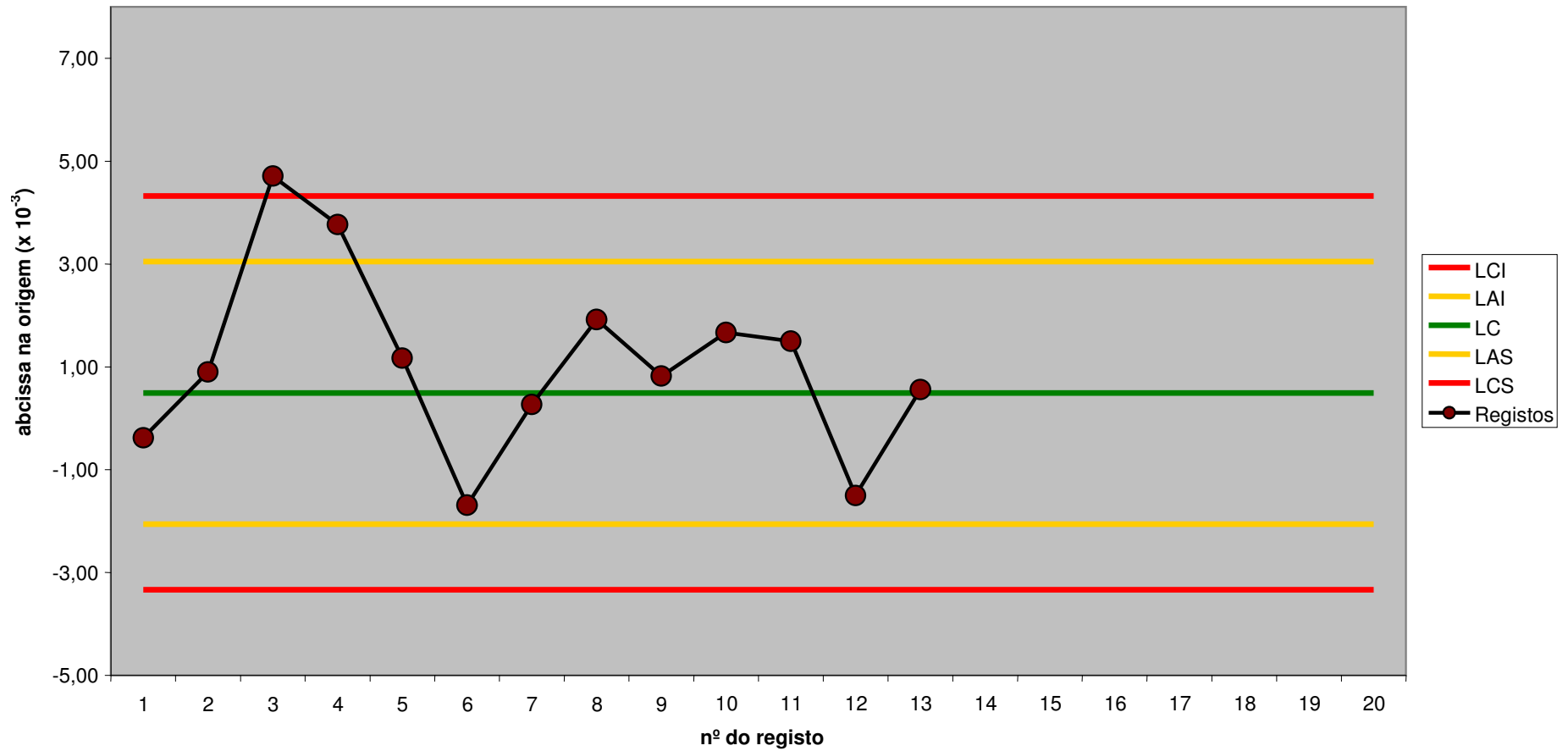


Figura 15: Carta de Controle da abcissa na origem na gama 10 a 50 µg de CS<sub>2</sub>

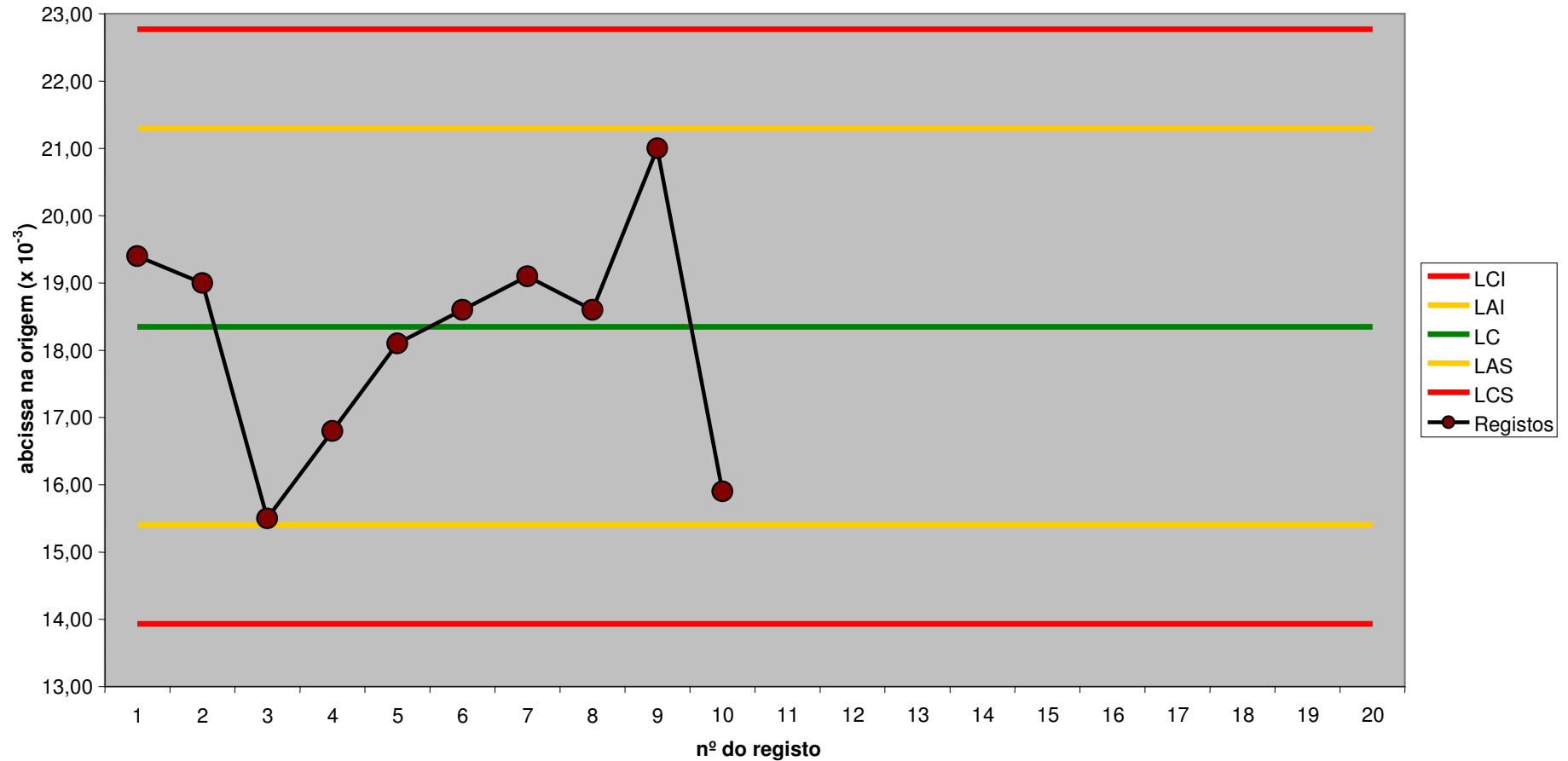


Figura 16: Carta de Controlo da abcissa na origem na gama 50 a 250  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$

## 1.6. Estimativa da incerteza

A implementação da metodologia em estudo na Unidade de Resíduos em Produtos Alimentares da Direcção Regional de Agricultura do Algarve visa a realização de análises que se integram no controlo oficial de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal, programa nacional de controlo da segurança alimentar.

Assim sendo, os resultados obtidos são confrontados com os LMR's estabelecidos pelo que é muito importante ter uma estimativa da incerteza associada aos mesmos para aumentar a confiança na decisão a tomar num enquadramento de fiscalização.

Apresenta-se neste ponto a metodologia usada para estimar a incerteza associada aos resultados emitidos<sup>[56]</sup>. Este valor é usado para garantir, com a confiança adequada, a decisão sobre o enquadramento legal das amostras analisadas.

### 1.6.1. Identificação das fontes de incerteza

Em primeiro lugar, a incerteza dos resultados é influenciada pela constituição da amostra de laboratório. Todavia, como a amostragem não é da responsabilidade do laboratório, não é possível estudar esta componente de variabilidade. As equipas que colhem as amostras seguem o disposto no normativo específico para a colheita de vegetais para pesquisa de resíduos de pesticidas<sup>[57]</sup>, pelo que se pressupõe que a amostra de laboratório é representativa do lote comercial.

Em relação ao método de ensaio, identificaram-se os seguintes factores de influência:

- pesagem da toma analítica (exactidão e precisão da balança);
- repetibilidade dos resultados obtidos para a quantificação da massa de CS<sub>2</sub>, em amostras reais (inclui constituição da toma analítica, processo analítico e calibração química);

Descreve-se no seguinte diagrama a influência de cada factor na variabilidade do resultado final.

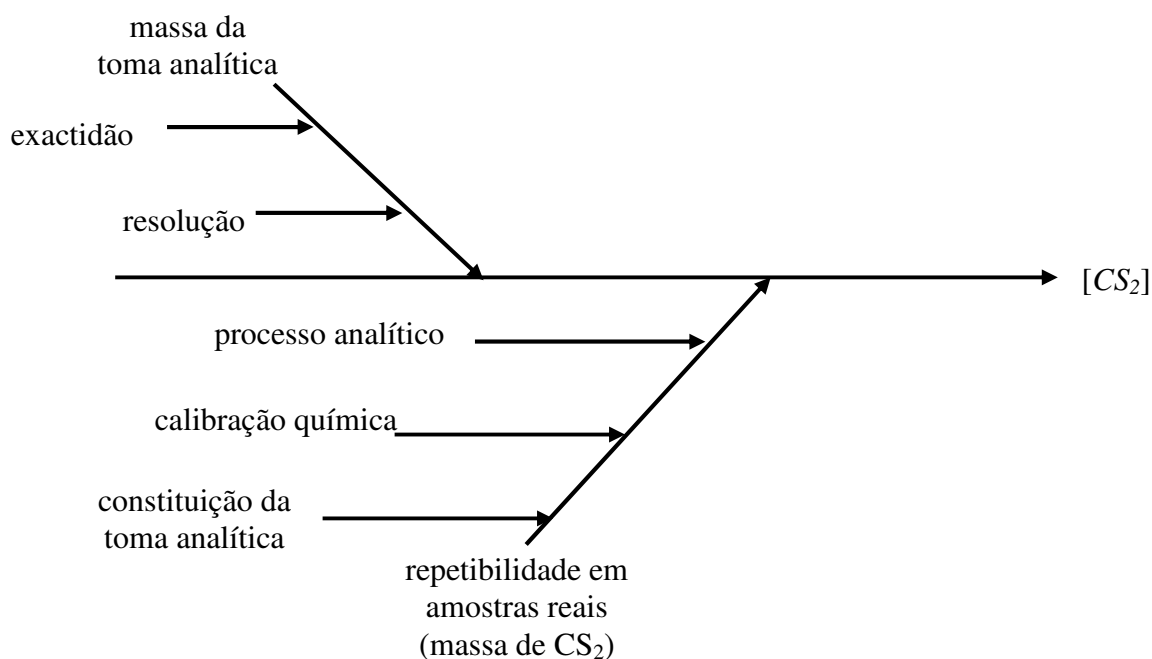


Figura 17: Diagrama de causa/efeito reflectindo a influência de cada factor de variabilidade no resultado final.

### 1.6.2. Modelo de estimativa da incerteza

Neste passo define-se a relação entre o resultado obtido e as grandezas de influência, tendo por base a fórmula de cálculo da concentração de CS<sub>2</sub> em mg/kg:

$$[CS_2] = \frac{m_{CS_2}}{m_{Toma}} \cdot 10^{-6}$$

### 1.6.3. Associação e quantificação

A cada grandeza de influência, corresponde uma fonte de incerteza padrão associada, que é quantificada por uma das seguintes formas:

- Avaliação Tipo A: quando obtida por um processo estatístico;
- Avaliação Tipo B: quando obtida por outro processo;

As grandezas presentemente identificadas serão avaliadas do seguinte modo:

- A incerteza da pesagem da toma para análise está associada ao valor expresso para a divisão da balança e ao erro máximo admissível - EMA definido para a mesma, considerando distribuições rectangulares;
- A incerteza da repetibilidade dos resultados foi estabelecida tendo por base valores bibliográficos <sup>[53]</sup>, pois não existem ainda dados suficientes para estimar internamente a repetibilidade em amostras reais. Assumiu-se assim uma incerteza relativa de 22%, considerando uma distribuição rectangular;

No caso de se efectuarem replicados e de o resultado final ser a média destes, o cálculo da componente de variabilidade da repetibilidade é alterado em função do número de réplicas.

Resumem-se na tabela 24 as associações e quantificações referidas:

Tabela 24: Resumo do processo de quantificação dos componentes individuais da incerteza. Determinação única e em triplicado.

Fonte de incerteza	Processo de avaliação	Tipo de avaliação e distribuição	Coefficiente de sensibilidade	Componente quadrático	Nº de graus de liberdade
Pesagem da toma analítica	Menor divisão da balança d=0,1g	B, Rectangular	1	$\left(\left(\frac{0,1}{\sqrt{12}}\right)/200g\right)^2$ 0,00000021	$\infty$
Pesagem da toma analítica	EMA* = $\pm 0,3g$	B, Rectangular	1	$\left(\left(\frac{0,3}{\sqrt{3}}\right)/200g\right)^2$ 0,00000075	$\infty$
Repetibilidade (toma única)	Bibliografia/Ensaio de repetibilidade em amostras reais	B, Rectangular	1	$(0,22)^2$ 0,0484	50
Repetibilidade (triplicado)	Bibliografia/Ensaio de repetibilidade em amostras reais	B, Rectangular	1	$(0,22/\sqrt{3})^2$ 0,01613	50

\*Erro Máximo Admissível

Verifica-se que as componentes derivadas das pesagens são desprezáveis face à componente de repetibilidade.

#### 1.6.4. Incerteza combinada

As componentes individuais de incerteza são combinadas através da seguinte fórmula, para calcular a incerteza combinada -  $u_{[CS_2]}$ :

$$\frac{u_{[CS_2]}}{[CS_2]} = \sqrt{\left(\frac{u_{m_{toma}}}{m_{toma}}\right)^2_{\text{precisão / divisão}} + \left(\frac{u_{m_{Toma}}}{m_{Toma}}\right)^2_{\text{EMA}} + \left(\frac{u_{\text{repetibilidade}}}{[CS_2]}\right)^2}$$

onde os termos incluídos na raiz quadrada correspondem respectivamente às incertezas relativas associadas às seguintes grandezas:

- pesagem da toma analítica (precisão/divisão e exactidão da balança);
- repetibilidade.

#### 1.6.5. Graus de liberdade efectivos e coeficiente de expansão

Para determinar o coeficiente de expansão a utilizar, temos em primeiro lugar que calcular o nº de graus de liberdade efectivos ( $v_{\text{efectivo}}$ ), aplicando a fórmula de Welch-Satterthwaite:

$$v_{\text{efectivo}} = \frac{(u_{\text{combinada}(y)})^4}{\sum \frac{\left(\frac{\delta y}{\delta x_i} u(x_i)\right)^4}{v_i}}$$

Referem-se na tabela 25, o valor obtido para o nº de graus de liberdade efectivos e respectivo coeficiente de expansão associado à distribuição de student com 5% de significância.

Tabela 25: Graus de liberdade efectivos calculados pela equação de Welch-Satterwaite.

Graus de liberdade efectivos	Factor de expansão (95 % de confiança)
50	2,01

### 1.6.6. Cálculo da incerteza expandida

Com base na incerteza combinada e considerando o coeficiente de expansão calculado, foram obtidas as seguintes estimativas de incerteza relativa - tabela 26.

Tabela 26: Estimativa final da incerteza relativa expandida a 95% de confiança.

Tipo de determinação	Estimativa da incerteza relativa (%)
determinação única	44
triplicado	26

## 2. Aumento da gama de trabalho

Apresentam-se neste ponto, os resultados obtidos na avaliação da gama de trabalho entre 10 e 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ .

### 2.1. Estudo da relação funcional entre 10 e 250 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$

Foi inicialmente estudada a relação funcional entre a massa de  $\text{CS}_2$  e a absorvência, entre 10 e 250  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$  para detectar eventuais diferenças de comportamento (figura 18). As absorvências foram medidas a 435 nm.

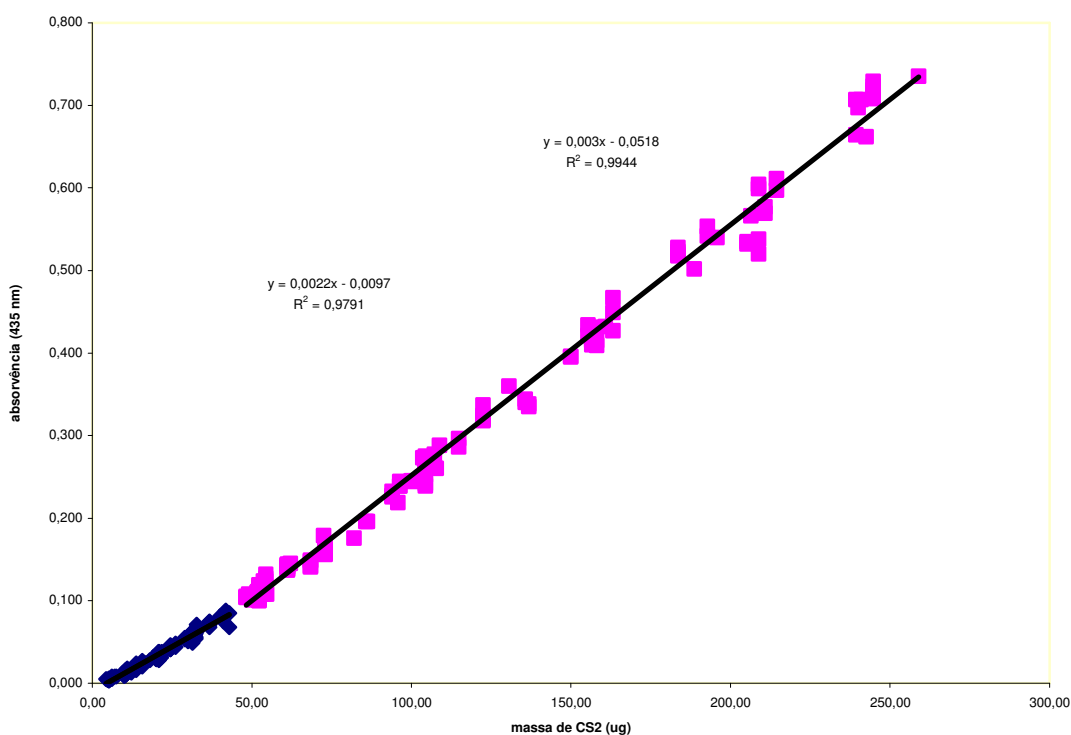


Figura 18: Representação gráfica da absorvência em função da massa de CS<sub>2</sub>, entre 10 e 250 µg de CS<sub>2</sub>

Foram utilizados para a elaboração deste gráfico, os dados obtidos ao longo de um ano, pela preparação de padrões de calibração. Verifica-se visualmente e através das equações expressas que perto dos 50 µg de CS<sub>2</sub>, existe uma inflexão da função de calibração.

Para estudar estatisticamente esta diferença, foram tratados os dados de 2 rectas com 5 pontos de calibração, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de CS<sub>2</sub> e 50, 100, 150, 200 e 250 µg de CS<sub>2</sub>.

Verificou-se em primeiro lugar a homogeneidade das variâncias dos declives das duas rectas ( $S_m^2$ ) e comparando os declives, verificou-se serem estatisticamente diferentes, conforme se pode visualizar na tabela 27.

Tabela 27: Comparação estatística dos declives das duas gamas de trabalho

Recta (10 a 50 µg de CS <sub>2</sub> )		Recta (50 a 250 µg de CS <sub>2</sub> )		Parâmetro	Recta (10 a 50 µg de CS <sub>2</sub> )	Recta (50 a 250 µg de CS <sub>2</sub> )
X <sub>i</sub> (µg de CS <sub>2</sub> )	Y <sub>i</sub> (Abs)	X <sub>i</sub> (µg de CS <sub>2</sub> )	Y <sub>i</sub> (Abs)		S <sub>m</sub>	2,97 x 10 <sup>-5</sup>
10,3	0,009	51,0	0,109	S <sub>m</sub> <sup>2</sup>	8,82 x 10 <sup>-10</sup>	3,55 x 10 <sup>-9</sup>
20,6	0,030	102,0	0,250	$\frac{S_{m(10-50)}^2}{S_{m(50-250)}^2}$	4,04	
30,9	0,051	153,1	0,408	<b>F tabelado (0,05;3;3)</b>	9,28	
41,2	0,074	204,1	0,560	<b>m</b>	(2,14±0,03) x10 <sup>-3</sup>	(3,05±0,06) x10 <sup>-3</sup>
51,5	0,097	255,1	0,733			

Apresentam-se graficamente (figuras 19 e 20) as duas rectas consideradas:

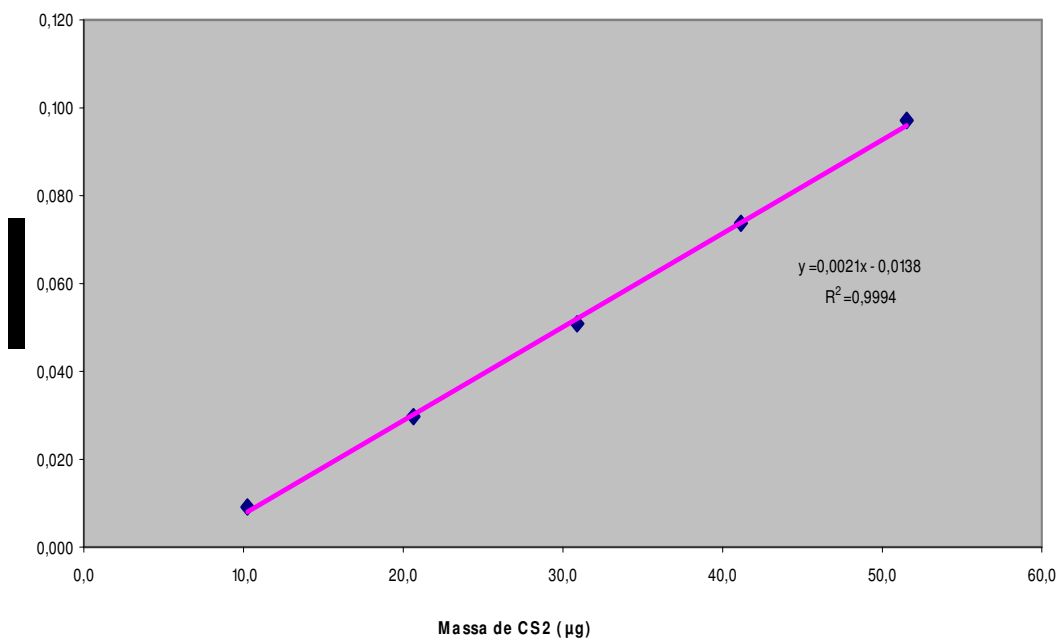


Figura 19: Recta de calibração para a gama 10 a 50 µg de CS<sub>2</sub>

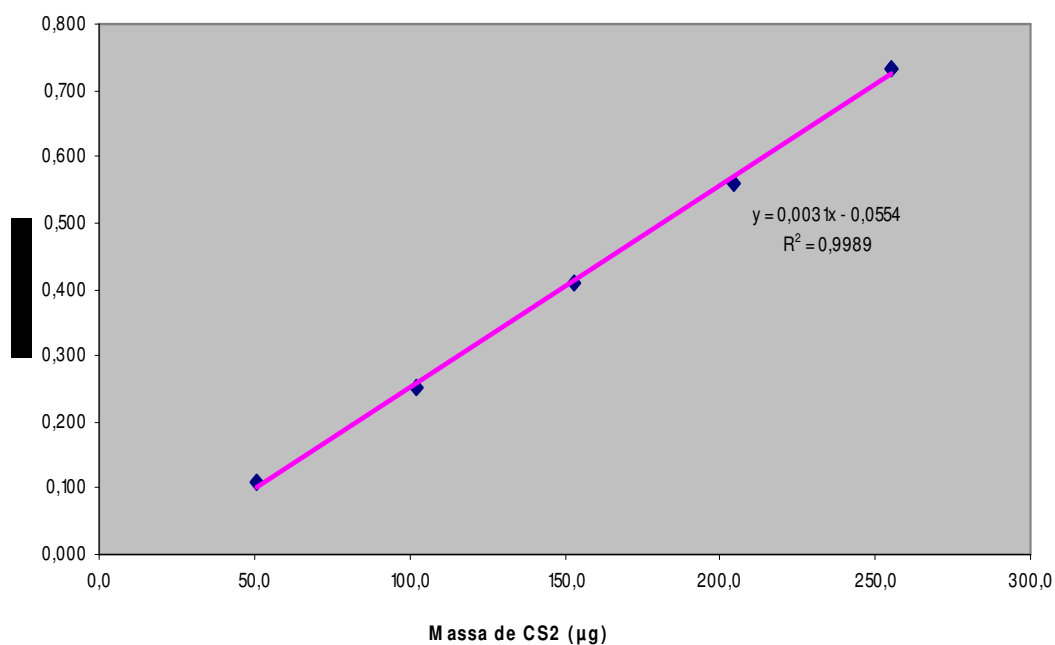


Figura 20: Recta de calibração para a gama 50 a 250 µg de CS<sub>2</sub>

## 2.2. Estudo da inflexão da função de calibração

Como já foi referido, a reacção do CS<sub>2</sub> com o reagente de côm forma 2 complexos, em equilíbrio químico, em conformidade com a representação que se segue (figura 21):

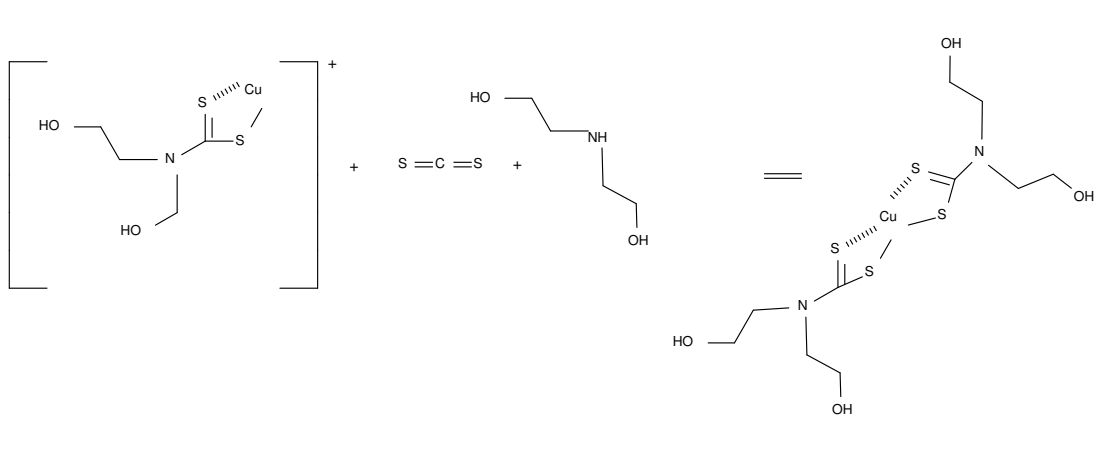


Figura 21: Equilíbrio entre os complexos de razão molar Cu<sup>2+</sup>/CS<sub>2</sub>, 1:1 e 1:2

Com base em estudos já desenvolvidos<sup>[49]</sup>, verifica-se que o equilíbrio entre estes 2 complexos depende da relação molar  $\text{Cu}^{2+}/\text{CS}_2$ . Nas tabelas 28 e 29, apresentam-se os valores destas relações, para diferentes padrões, comparativamente com os valores apresentados na bibliografia.

Tabela 28: Relação  $\text{Cu}^{2+}/\text{CS}_2$  calculada

<b>Padrão</b>	<b>Relação <math>\text{Cu}^{2+}/\text{CS}_2</math></b>
10 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	27,46
20 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	13,73
30 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	9,15
40 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	6,86
50 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	5,49
100 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	2,75
150 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	1,83
200 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	1,37
250 $\mu\text{g}$ de $\text{CS}_2$	1,10

Tabela 29: Valores descritos na bibliografia e efeitos no equilíbrio<sup>[49]</sup>

<b>Relação <math>\text{Cu}^{2+}/\text{CS}_2</math></b>	<b>Efeitos no equilíbrio</b>
0,5	deslocado no sentido do complexo 1,2
8,7	zona de transição
43,7	deslocado no sentido do complexo 1,1

Verifica-se que na gama de calibração 10 a 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ , o equilíbrio deixa de estar favorável ao complexo 1:2, não se podendo assim desprezar a contribuição do complexo 1:1, relativamente à concentração total de  $\text{CS}_2$ .

Ao contrário do complexo 1:2 que tem um máximo de absorvência a 435 nm (comprimento de onda ao qual se efectuaram as medições e definido na norma<sup>[5]</sup>), o complexo 1:1 tem esse máximo a 380 nm<sup>[49]</sup>, justificando assim que, nesta gama de concentrações, a absorvência a 435 nm passe a ter um comportamento funcional diferente, relativamente à concentração total de CS<sub>2</sub>. Esta afirmação pode comprovar-se também pela visualização dos espectros de absorvência dos padrões em causa (figura 22, 23 e 24).

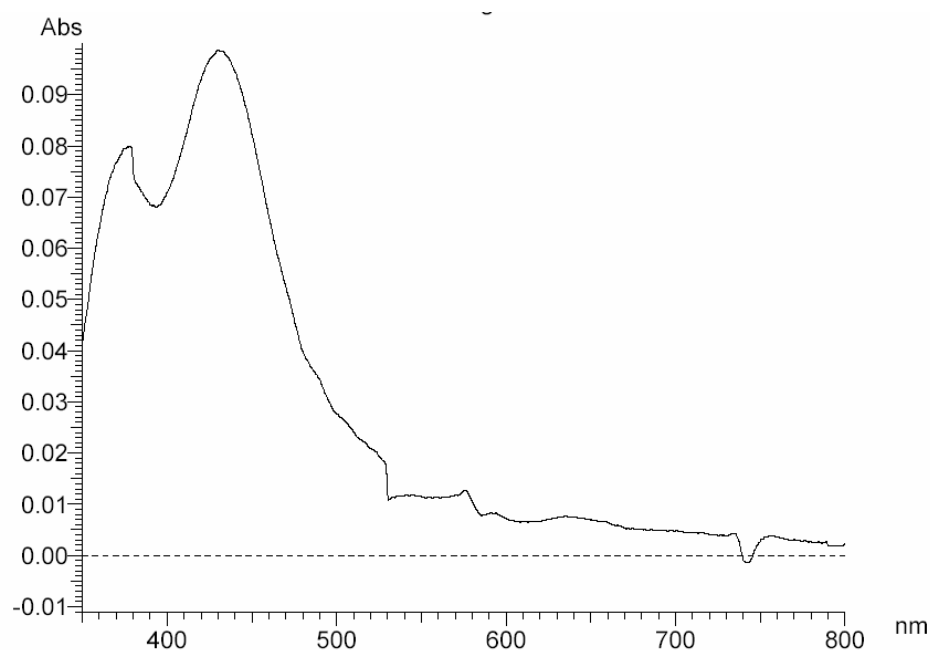


Figura 22: Espectro de absorção do padrão 50 µg de CS<sub>2</sub>.

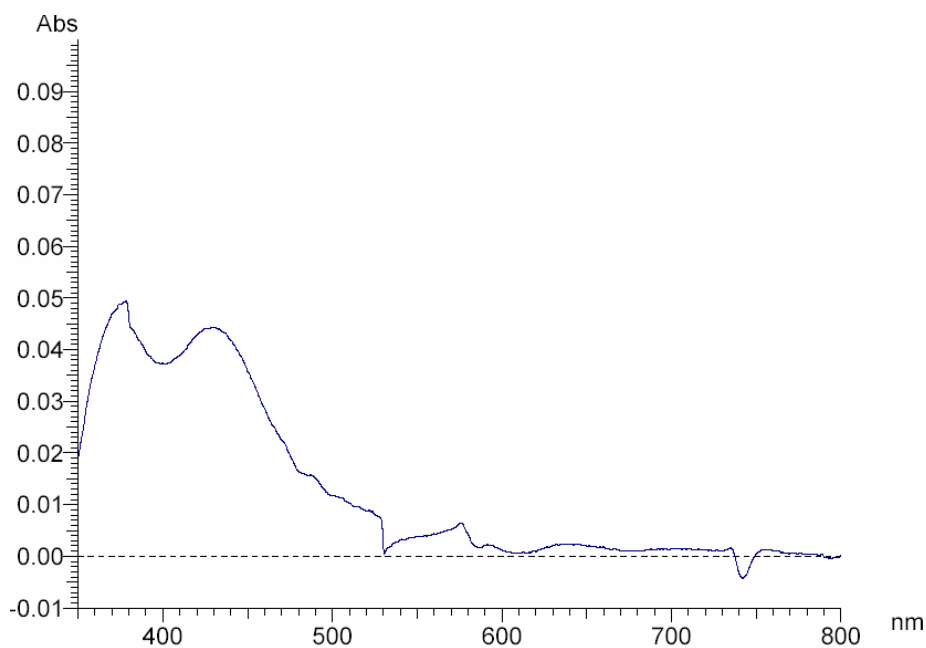


Figura 23: Espectro de absorção do padrão 30 µg de CS<sub>2</sub>.

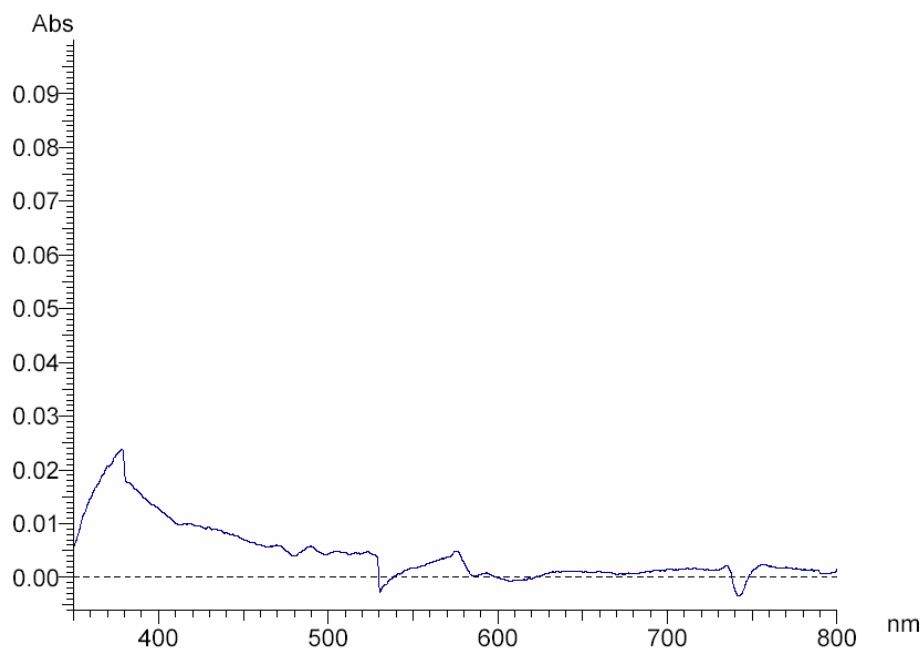


Figura 24: Espectro de absorção do padrão 10 µg de CS<sub>2</sub>.

### **2.3. Desenvolvimento da metodologia de calibração**

Com o objectivo de definir a melhor metodologia de calibração na gama de 10 a 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ , foram estudadas diferentes formas de medição do sinal, em função dos comprimentos de onda, no sentido de verificar a que apresentava melhores condições de validação da função de calibração.

Uma outra forma de resolver o problema do equilíbrio dos complexos, seria a preparação de reagente de côm com diferentes concentrações de  $\text{Cu}^{2+}$ , uma ajustada à gama alta e outra à gama baixa. No entanto, em termos de análise de rotina, é mais prático ter apenas uma solução, evitando a repetição da análise e o respectivo consumo de reagentes e tempo.

#### **2.3.1. Escolha do comprimento de onda**

Com base nos espectros de absorção registados para os padrões entre 10 e 50  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ , foi seleccionado o comprimento de onda que melhor serviria para efectuar a medição da absorvência do complexo 1:1. Verifica-se que esse complexo apresenta um máximo de absorvidade molar perto dos 380 nm.

No entanto, devido a um problema instrumental (que origina um aumento brusco e anormal de absorvência nesse comprimento de onda, facilmente perceptível na figura 25), seleccionou-se, para quantificar a presença deste complexo, um comprimento de onda (382 nm) cuja medição de absorvência ocorresse antes desta questão técnica, considerando uma diferença superior à abertura de fenda do feixe de radiação incidente (1,5 nm).

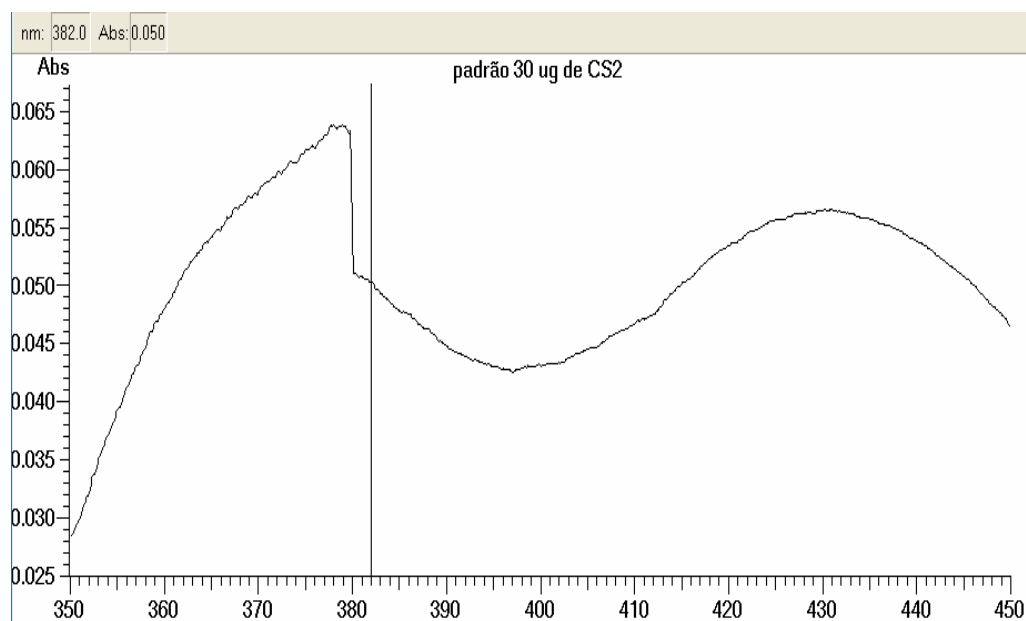


Figura 25: Ampliação do espectro de absorção do padrão 30 µg de CS<sub>2</sub>.

### 2.3.2. Comparação entre 382 e 435 nm

Para avaliar, o tipo de resposta instrumental, função do comprimento de onda, que melhor se adapta para a quantificação nesta gama de trabalho, comparou-se a resposta dos 5 padrões de calibração seleccionados, aos dois comprimentos de onda referidos. Por observação visual da representação gráfica das rectas (figura 26), optou-se por estudar também a resposta instrumental, em termos da média aritmética do sinal obtido a 382 e 435 nm.

O gráfico obtido com base na média aritmética das absorvências sugere visualmente, um melhor ajuste prático à equação de Lambert-Beer por a direcção do declive da função linear se aproximar mais da origem. Este factor sugere uma melhor compensação do equilíbrio entre os dois complexos nesta gama de trabalho e pressupõe também, um melhor ajuste do método de regressão dos mínimos quadrados aos dados de calibração.

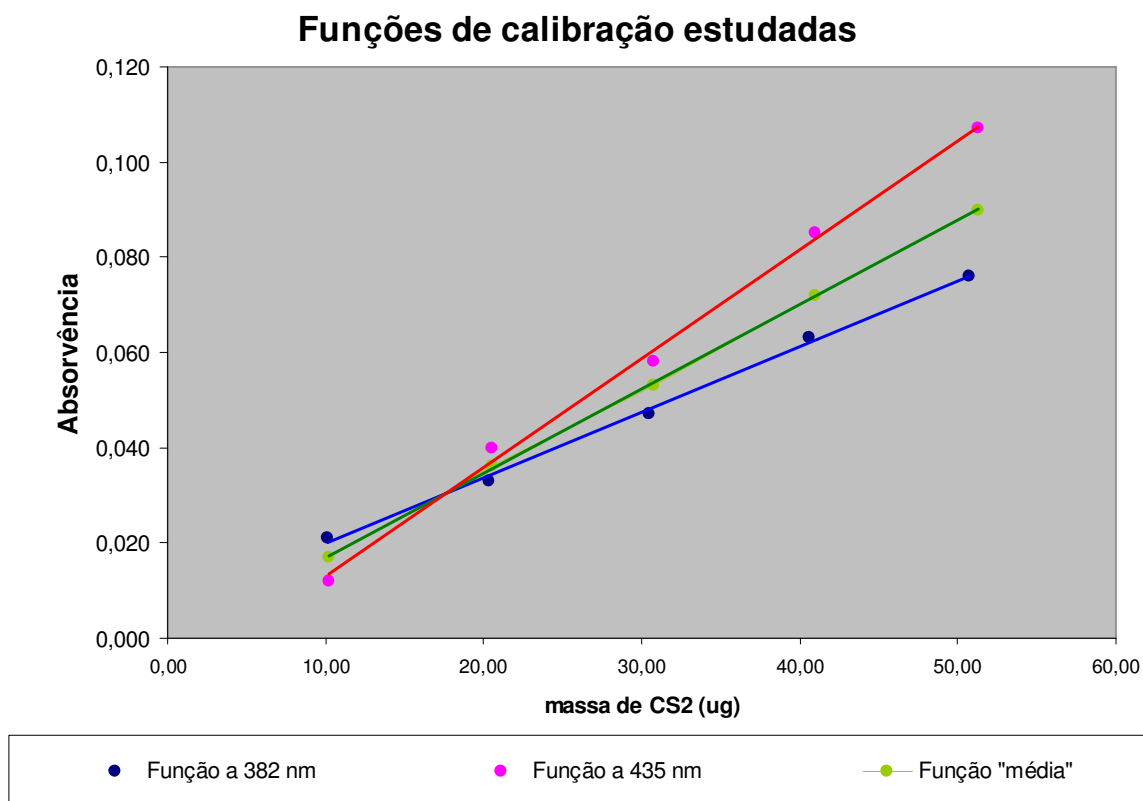


Figura 26: Representação gráfica da função de calibração a 382 nm, 435 nm e média aritmética da resposta a estes comprimentos de onda.

Teoricamente, e considerando a equação de Lambert-Beer,

$$A = \epsilon b C$$

Para que a média da resposta a 382 e 435 nm siga uma função linear, as absorvidades molares ( $\epsilon_{382}$  e  $\epsilon_{435}$ ) dos dois complexos deverão ser iguais.

$$\frac{A_{382} + A_{435}}{2} = b \left( \frac{\epsilon_{382} C_{382} + \epsilon_{435} C_{435}}{2} \right)$$

para resultar na seguinte expressão

$$\bar{A} = \frac{b\varepsilon}{2}(C_{total})$$

em que  $C_{total}$  representa a concentração de  $CS_2$  dos padrões.

Para verificar esta hipótese, com base na tabela 29 e 30, calculou-se a concentração de  $CS_2$  da zona de transição,  $31,6 \mu\text{g}$  de  $CS_2$  (teoricamente os complexos apresentam a mesma concentração) e estimaram-se os valores de  $\varepsilon_{382}$  e  $\varepsilon_{435}$  através das seguintes expressões (considerou-se a recta do dia 13/10/2005 para o cálculo de  $A_{382}$  de  $31,6\mu\text{g}$  e  $A_{435}$  de  $31,6\mu\text{g}$ ).

$$\varepsilon_{382} = \frac{A_{382 \text{ de } 31,6 \mu\text{g}}}{C b} = \frac{0,049}{15,8 \times 1} = 0,00310 \mu\text{g}^{-1} \cdot 25 \text{ mL cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{435} = \frac{A_{435 \text{ de } 31,6 \mu\text{g}}}{C b} = \frac{0,052}{15,8 \times 1} = 0,00328 \mu\text{g}^{-1} \cdot 25 \text{ mL cm}^{-1}$$

Estes valores representam uma estimativa grosseira mas sugerem que são próximos, o que condiz com a boa relação linear verificada com base na média das absorvências. Refere-se também que se as leituras pudessem ter sido obtidas a 380 nm, a absorvência seria ligeiramente superior e as absorvidades molares ainda mais próximas.

Para verificar o comportamento e aplicabilidade das funções de calibração, estudaram-se os aspectos descritos nos próximos subpontos.

### 2.3.2.1. Função de calibração e homogeneidade de variâncias

Foram preparadas ao longo do tempo, padrões de calibração (10, 20, 30, 40 e 50 µg de CS<sub>2</sub>\*) e determinados pelo método dos mínimos quadrados, a função de calibração linear e o respectivo coeficiente de correlação. Antes, porém, foi averiguada a existência de homogeneidade de variâncias ao longo desta gama de trabalho. Apresentam-se os resultados nas tabelas 30 e 31.

\*estes valores são nominais. O modo de preparação dos padrões não permite obter um valor constante na sua concentração.

Tabela 30: Homogeneidade de variância para a gama de trabalho seleccionada, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm) e a resposta média

Comprimento de onda	382 nm		435 nm		Média	
	Padrão 10 µg de CS <sub>2</sub> (Abs.)	Padrão 50 µg de CS <sub>2</sub> (Abs.)	Padrão 10 µg de CS <sub>2</sub> (Abs.)	Padrão 50 µg de CS <sub>2</sub> (Abs.)	Padrão 10 µg de CS <sub>2</sub> (Abs.)	Padrão 50 µg de CS <sub>2</sub> (Abs.)
1	0,014	0,061	0,010	0,100	0,018	0,093
2	0,014	0,062	0,012	0,098	0,019	0,093
3	0,012	0,063	0,014	0,101	0,016	0,093
4	0,012	0,062	0,010	0,099	0,018	0,091
5	0,012	0,063	0,014	0,097	0,016	0,093
6	0,011	0,061	0,010	0,099	0,015	0,090
7	0,013	0,062	0,009	0,096	0,019	0,092
8	0,012	0,061	0,014	0,098	0,018	0,091
9	0,012	0,063	0,013	0,098	0,018	0,093
10	0,012	0,062	0,014	0,099	0,022	0,085
<b>variância</b>	9,33x10 <sup>-07</sup>	6,67x10 <sup>-07</sup>	4,22x10 <sup>-06</sup>	2,06x10 <sup>-06</sup>	3,79x10 <sup>-06</sup>	5,38x10 <sup>-06</sup>

Tabela 30: Homogeneidade de variância para a gama de trabalho seleccionada, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm) e a resposta média (continuação)

<b>PG calculado</b>	0,71	0,49	1,42
<b>PG tabelado (F;0,05;9;9)</b>	3,18		
<b>resultado</b>	Verifica-se a homogeneidade de variâncias		

Verifica-se que qualquer resposta apresenta variâncias homogêneas nesta gama de trabalho.

Tabela 31: Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm e resposta média aos 2 comprimentos de onda referidos). m, b e r são respectivamente o declive, a ordenada na origem, a abcissa na origem e o coeficiente de correlação.

Data	Comprimento de onda (nm)	Padrão 10 Absorvência	Padrão 20 Absorvência	Padrão 30 Absorvência	Padrão 40 Absorvência	Padrão 50 Absorvência	m	b	r
06/09/2005	382	0,024	0,041	0,057	0,073	0,085	$1,53 \times 10^{-3}$ $\pm 0,15 \times 10^{-3}$	$9,8 \times 10^{-3}$ $\pm 4,9 \times 10^{-3}$	0,9982
	435	0,010	0,030	0,054	0,069	0,096	$2,09 \times 10^{-3}$ $\pm 0,25 \times 10^{-3}$	$-1,15 \times 10^{-2}$ $\pm 0,8 \times 10^{-2}$	0,9972
	Média da resposta	0,017	0,036	0,056	0,071	0,091	$1,82 \times 10^{-3}$ $\pm 0,12 \times 10^{-3}$	$-0,70 \times 10^{-3}$ $\pm 4,1 \times 10^{-3}$	0,9991
13/10/2005	382	0,021	0,036	0,049	0,061	0,074	$1,27 \times 10^{-3}$ $\pm 0,08 \times 10^{-3}$	$8,90 \times 10^{-3}$ $\pm 2,8 \times 10^{-3}$	0,9992
	435	0,010	0,029	0,048	0,071	0,095	$2,06 \times 10^{-3}$ $\pm 0,19 \times 10^{-3}$	$-1,30 \times 10^{-2}$ $\pm 0,6 \times 10^{-2}$	0,9984
	Média da resposta	0,016	0,033	0,049	0,066	0,085	$1,66 \times 10^{-3}$ $\pm 0,08 \times 10^{-3}$	$-1,5 \times 10^{-3}$ $\pm 2,8 \times 10^{-3}$	0,9995
20/10/2005	382	0,023	0,037	0,051	0,065	0,075	$1,28 \times 10^{-3}$ $\pm 0,12 \times 10^{-3}$	$10,60 \times 10^{-3}$ $\pm 4,3 \times 10^{-3}$	0,9982
	435	0,010	0,026	0,049	0,071	0,099	$2,16 \times 10^{-3}$ $\pm 0,32 \times 10^{-3}$	$-1,59 \times 10^{-2}$ $\pm 1,1 \times 10^{-2}$	0,9959
	Média da resposta	0,017	0,032	0,050	0,068	0,087	$1,71 \times 10^{-3}$ $\pm 0,11 \times 10^{-3}$	$-2,0 \times 10^{-3}$ $\pm 3,8 \times 10^{-3}$	0,9992

Tabela 31: Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm e resposta média aos 2 comprimentos de onda referidos). m, b e r são respectivamente o declive, a ordenada na origem, a abcissa na origem e o coeficiente de correlação (continuação).

Data	Comprimento de onda (nm)	Padrão 10 Absorvência	Padrão 20 Absorvência	Padrão 30 Absorvência	Padrão 40 Absorvência	Padrão 50 Absorvência	m	b	r
27/10/2005	382	0,021	0,036	0,050	0,064	0,072	$1,26 \times 10^{-3}$ $\pm 0,20 \times 10^{-3}$	$9,60 \times 10^{-3}$ $\pm 7,0 \times 10^{-3}$	0,9949
	435	0,014	0,031	0,050	0,071	0,088	$1,82 \times 10^{-3}$ $\pm 0,10 \times 10^{-3}$	$-0,56 \times 10^{-2}$ $\pm 0,4 \times 10^{-2}$	0,9994
	Média da resposta	0,018	0,034	0,050	0,068	0,080	$1,53 \times 10^{-3}$ $\pm 0,14 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$ $\pm 4,6 \times 10^{-3}$	0,9985
03/11/2005	382	0,020	0,039	0,052	0,067	0,077	$1,39 \times 10^{-3}$ $\pm 0,23 \times 10^{-3}$	$8,40 \times 10^{-3}$ $\pm 7,8 \times 10^{-3}$	0,9947
	435	0,010	0,030	0,049	0,077	0,103	$2,27 \times 10^{-3}$ $\pm 0,30 \times 10^{-3}$	$-1,61 \times 10^{-2}$ $\pm 1,0 \times 10^{-2}$	0,9965
	Média da resposta	0,015	0,035	0,051	0,072	0,090	$1,82 \times 10^{-3}$ $\pm 0,10 \times 10^{-3}$	$-3,5 \times 10^{-3}$ $\pm 3,5 \times 10^{-3}$	0,9994
10/11/2005	382	0,023	0,034	0,053	0,063	0,072	$1,24 \times 10^{-3}$ $\pm 0,27 \times 10^{-3}$	$10,9 \times 10^{-3}$ $\pm 9,1 \times 10^{-3}$	0,9911
	435	0,010	0,022	0,043	0,066	0,087	$1,93 \times 10^{-3}$ $\pm 0,32 \times 10^{-3}$	$-1,38 \times 10^{-2}$ $\pm 1,1 \times 10^{-2}$	0,9948
	Média da resposta	0,017	0,028	0,048	0,065	0,080	$1,59 \times 10^{-3}$ $\pm 0,20 \times 10^{-3}$	$-1,3 \times 10^{-3}$ $\pm 6,8 \times 10^{-3}$	0,9969

Tabela 31: Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm e resposta média aos 2 comprimentos de onda referidos). m, b e r são respectivamente o declive, a ordenada na origem, a abcissa na origem e o coeficiente de correlação (continuação).

Data	Comprimento de onda (nm)	Padrão 10 Absorvência	Padrão 20 Absorvência	Padrão 30 Absorvência	Padrão 40 Absorvência	Padrão 50 Absorvência	m	b	r
17/11/2005	382	0,020	0,037	0,050	0,061	0,075	$1,31 \times 10^{-3}$ $\pm 0,15 \times 10^{-3}$	$8,40 \times 10^{-3}$ $\pm 5,2 \times 10^{-3}$	0,9973
	435	0,009	0,026	0,046	0,067	0,095	$2,08 \times 10^{-3}$ $\pm 0,31 \times 10^{-3}$	$-1,53 \times 10^{-2}$ $\pm 1,1 \times 10^{-2}$	0,9956
	Média da resposta	0,015	0,032	0,048	0,064	0,085	$1,68 \times 10^{-3}$ $\pm 0,14 \times 10^{-3}$	$-2,8 \times 10^{-3}$ $\pm 4,9 \times 10^{-3}$	0,9986
24/11/2005	382	0,024	0,048	0,056	0,072	0,079	$1,31 \times 10^{-3}$ $\pm 0,43 \times 10^{-3}$	$15,6 \times 10^{-3}$ $\pm 14,8 \times 10^{-3}$	0,9792
	435	0,012	0,040	0,058	0,085	0,107	$2,29 \times 10^{-3}$ $\pm 0,21 \times 10^{-3}$	$-1,01 \times 10^{-2}$ $\pm 0,7 \times 10^{-2}$	0,9983
	Média da resposta	0,015	0,037	0,055	0,075	0,092	$1,87 \times 10^{-3}$ $\pm 0,13 \times 10^{-3}$	$-2,8 \times 10^{-3}$ $\pm 4,3 \times 10^{-3}$	0,9991
29/11/2005	382	0,019	0,040	0,053	0,067	0,078	$1,41 \times 10^{-3}$ $\pm 0,27 \times 10^{-3}$	$7,90 \times 10^{-3}$ $\pm 9,3 \times 10^{-3}$	0,9928
	435	0,010	0,033	0,056	0,083	0,105	$2,34 \times 10^{-3}$ $\pm 0,11 \times 10^{-3}$	$-1,46 \times 10^{-2}$ $\pm 0,4 \times 10^{-2}$	0,9995
	Média da resposta	0,018	0,044	0,057	0,079	0,093	$1,80 \times 10^{-3}$ $\pm 0,31 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-3}$ $\pm 10,7 \times 10^{-3}$	0,9942

Tabela 31: Funções de calibração e coeficientes de correlação obtidos, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm e resposta média aos 2 comprimentos de onda referidos). m, b e r são respectivamente o declive, a ordenada na origem, a abcissa na origem e o coeficiente de correlação (continuação).

Data	Comprimento de onda (nm)	Padrão 10 Absorvência	Padrão 20 Absorvência	Padrão 30 Absorvência	Padrão 40 Absorvência	Padrão 50 Absorvência	m	b	r
15/12/2005	382	0,023	0,042	0,055	0,068	0,080	$1,36 \times 10^{-3}$ $\pm 0,21 \times 10^{-3}$	$11,6 \times 10^{-3}$ $\pm 7,0 \times 10^{-3}$	0,9956
	435	0,010	0,030	0,051	0,076	0,100	$2,20 \times 10^{-3}$ $\pm 0,17 \times 10^{-3}$	$-1,44 \times 10^{-2}$ $\pm 0,6 \times 10^{-2}$	0,9989
	Média da resposta	0,017	0,036	0,053	0,072	0,090	$1,78 \times 10^{-3}$ $\pm 0,04 \times 10^{-3}$	$-1,0 \times 10^{-3}$ $\pm 1,5 \times 10^{-3}$	0,9999

m – declive; b – ordenada na origem; r – coeficiente de correlação.

Das 10 rectas estudadas, 8 apresentaram com a resposta média, melhores coeficientes de correlação. Relativamente ao valor absoluto do coeficiente de correlação, a 382 nm, verificaram-se 5 valores abaixo do critério de aceitação referenciado para este parâmetro;  $r \geq 0,995$ <sup>[47]</sup>. A 435 nm e com a média da resposta, apenas um valor de coeficiente de correlação ficou abaixo deste valor de referência.

### 2.3.2.2. Observação visual do ajuste linear aos pontos de calibração

A observação visual da função de calibração é uma ferramenta adicional para a verificação do seu ajuste aos pontos de calibração.

Apresentam-se nas figuras 27, 28 e 29, as representações gráficas das funções de calibração obtidas com base nos vários sinais de resposta considerados.

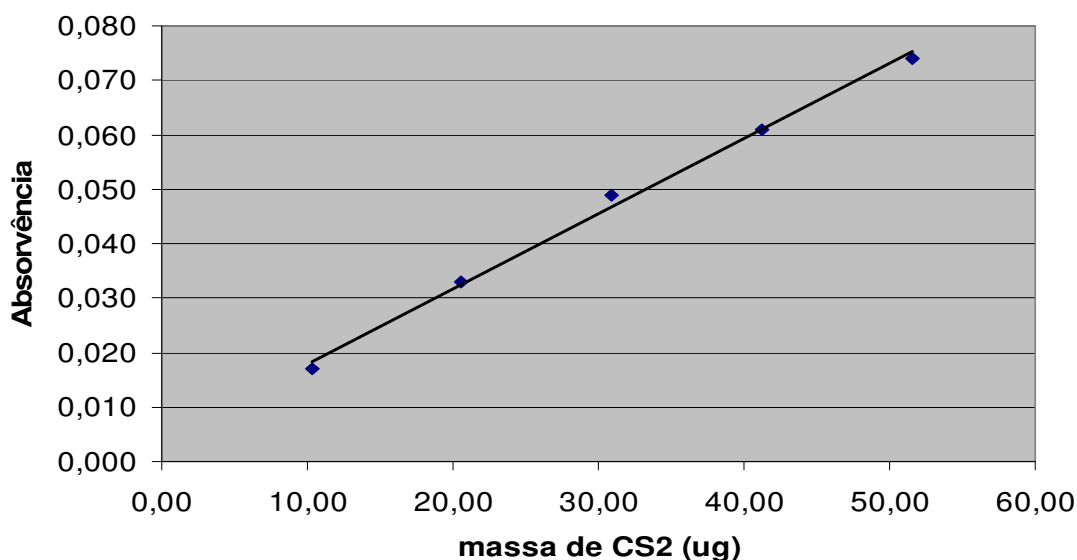


Figura 27: Representação gráfica da função de calibração a 382 nm.

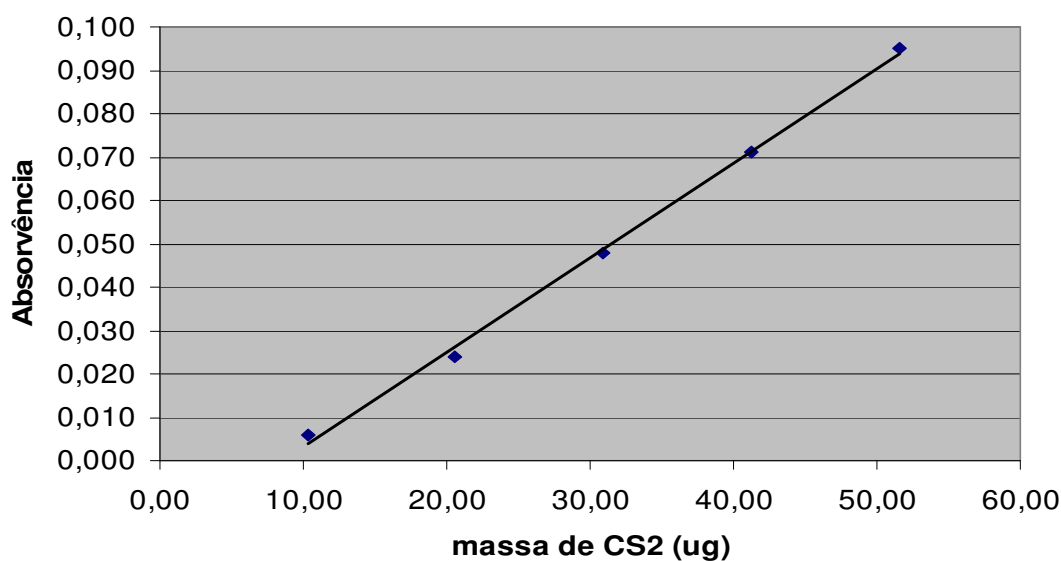


Figura 28: Representação gráfica da função de calibração a 435 nm.

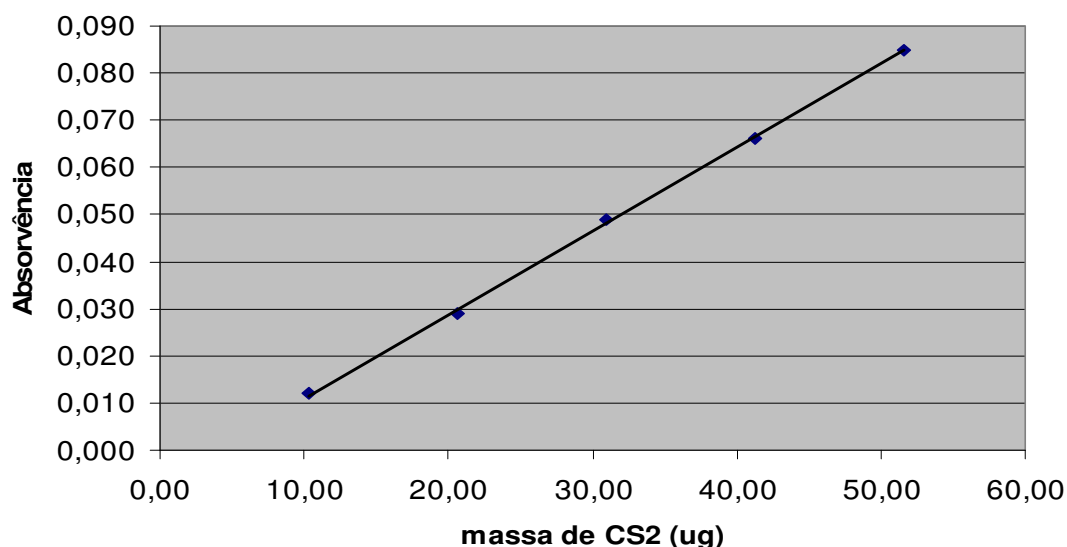


Figura 29: Representação gráfica da função de calibração com base na média das respostas.

Qualquer dos gráficos aparenta visualmente um bom ajuste linear dos pontos de calibração.

### 2.3.2.3. Comparação com o ajuste não linear

No sentido de averiguar se o ajuste linear é o que melhor se adapta aos pontos de calibração, determinaram-se os parâmetros do ajuste não-linear, de 2ª ordem e aplicou-se um teste estatístico <sup>[46]</sup> apropriado para comparar o ajuste linear com o não-linear. De uma forma simplificada, comparou-se a variância da diferença entre as variâncias lineares e não-lineares, com a variância não-linear. A hipótese estatística é a de que estas são homogêneas e caso o sejam, admite-se que o ajuste linear é o mais adequado. Apresentam-se os resultados na tabela 32.

Tabela 32 : Comparação estatística entre o ajuste linear e não-linear

Data	Comprimento de onda (nm)	Valor calculado (PG)	Valor tabelado F (1;2;95%)	Valor tabelado F (1;2;99%)	Decisão
06/09/2005	382	11,4	18,5	98,5	ajuste linear
	435	0,2			
	resposta média	0,2			
13/10/2005	382	3,9	18,5	98,5	ajuste linear
	435	35			ajuste não-linear
	resposta média	3,9			ajuste linear
20/10/2005	382	5	18,5	98,5	ajuste linear
	435	22,8			ajuste não-linear
	resposta média	14,5			ajuste linear
27/10/2005	382	8,8	18,5	98,5	ajuste linear
	435	9,8			
	resposta média	1,0			
03/11/2005	382	11,0	18,5	98,5	ajuste linear
	435	3,7			
	resposta média	0,1			
10/11/2005	382	1,4	18,5	98,5	ajuste linear
	435	4,7			
	resposta média	0,2			
17/11/2005	382	1,8	18,5	98,5	ajuste linear
	435	30,1			ajuste não-linear
	resposta média	2,4			ajuste linear
24/11/2005	382	10,5	18,5	98,5	ajuste linear
	435	0,1			
	resposta média	5,0			
29/11/2005	382	3,3	18,5	98,5	ajuste linear
	435	0,1			
	resposta média	1,3			
15/12/2005	382	8,8	18,5	98,5	ajuste linear
	435	15,7			
	resposta média	0,0			

Com excepção de alguns valores obtidos a 435 nm, o ajuste não-linear (quadrático) aos pontos de calibração não é significativamente melhor que o ajuste linear, pelo que este último é o mais adequado.

#### 2.3.2.4. Limites da gama de trabalho

O objectivo do estudo da calibração entre 10 e 50 µg de CS<sub>2</sub>, é o de baixar os limites inferiores da gama de trabalho para poderem adequar-se à legislação em vigor. Assim, com base na aplicação do método de regressão dos mínimos quadrados, estimaram-se os valores dos limites de determinação (LD) e de quantificação (LQ), aos dois comprimentos de onda seleccionados e com base no estudo do sinal médio da resposta instrumental. Os valores obtidos expressam-se na tabela 33.

Tabela 33: Limites de Detecção e Quantificação para as rectas estudadas, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm) e a média das respostas.

Data	Comprimento de onda (nm)	LD µg de CS <sub>2</sub>	LQ µg de CS <sub>2</sub>	LD* mg/kg	LQ* mg/kg
06/09/2005	382	3,28	10,94	0,02	0,05
	435	4,11	13,69	0,02	0,07
	resposta média	2,31	7,71	0,01	0,04
13/10/2005	382	2,24	7,46	0,01	0,04
	435	3,24	10,80	0,02	0,05
	resposta média	1,72	5,72	0,01	0,03
20/10/2005	382	3,42	11,41	0,02	0,06
	435	5,13	17,11	0,03	0,09
	resposta média	2,31	7,71	0,01	0,04
27/10/2005	382	5,70	18,99	0,03	0,09
	435	1,99	6,64	0,01	0,03
	resposta média	3,12	10,38	0,02	0,05

Tabela 33: Limites de Detecção e Quantificação para as rectas estudadas, considerando os comprimentos de onda definidos (382 e 435 nm) e a média da respostas. (continuação).

Data	Comprimento de onda (nm)	LD µg de CS <sub>2</sub>	LQ µg de CS <sub>2</sub>	LD* mg/kg	LQ* mg/kg
03/11/2005	382	5,81	19,38	0,03	0,10
	435	4,69	15,64	0,02	0,08
	resposta média	1,97	6,57	0,01	0,03
10/11/2005	382	7,54	25,15	0,04	0,13
	435	5,73	19,10	0,03	0,10
	resposta média	4,40	14,67	0,02	0,07
17/11/2005	382	4,11	13,69	0,02	0,07
	435	5,29	17,65	0,03	0,09
	resposta média	2,99	9,98	0,01	0,05
24/11/2005	382	6,79	22,62	0,03	0,11
	435	1,69	5,63	0,01	0,03
	resposta média	2,34	7,80	0,01	0,04
29/11/2005	382	11,65	38,82	0,06	0,19
	435	3,27	10,90	0,02	0,05
	resposta média	6,10	20,32	0,03	0,10
15/12/2005	382	5,26	17,54	0,03	0,09
	435	2,68	8,92	0,01	0,04
	resposta média	0,87	2,91	0,01	0,02

\*Os limites expressos em mg/kg consideram uma toma para análise de 200 g.

Com poucas excepções, a resposta média conduz a valores mais baixos do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Este facto deve-se sobretudo a um menor valor do desvio residual da curva de calibração.

Por outro lado, um dos pressupostos para o cálculo do LD e LQ pelo método dos mínimos quadrados, é o de que o valor da ordenada na origem ( $b$ ) corresponda ao sinal do branco ( $Y_b$  que nesta metodologia corresponde a 0,000 de absorvência)<sup>[58]</sup>.

Analisando a tabela 31, observa-se que para o ajuste linear com base na média das respostas a 382 e 435 nm, o intervalo de confiança para b inclui sempre o valor 0, o que só se verifica uma vez, a 382 nm e em nenhum caso para 435 nm.

Face a esta observação, podemos afirmar que, através do ajuste linear com base na média aritmética das absorvências, existe um melhor enquadramento do método dos mínimos quadrado e o cálculo dos limites de detecção e quantificação apresenta valores mais correctos.

Com base na média dos valores obtidos para as 10 rectas, estimaram-se os limites de detecção e quantificação, respectivamente, 2,8 e 9,4  $\mu\text{g}$  de  $\text{CS}_2$ .

## **2.4. Resultados obtidos usando a absorvência média**

Tendo sido confirmada a aplicabilidade da metodologia de calibração química utilizando a média das absorvências a 382 e 435 nm, foram efectuados ensaios de recuperação, ensaios em amostras reais e ensaio de um material de referência tendo em vista a comparação entre as três metodologias; resposta a 382 nm, 435 nm e resposta média.

### **2.4.1. Ensaios de recuperação**

Na tabela 34 apresentam-se os resultados obtidos em ensaios de recuperação efectuados em 3 amostras de espinafre diferentes, tendo-se usado para a fortificação a substância activa ferbame.

Tabela 34: Ensaio de recuperação - comparação entre metodologias de calibração.

<b>Amostra (código de entrada)</b>	<b>Data</b>	<b>Nível de fortificação (<math>\mu\text{g de CS}_2</math>)</b>	<b>Recuperação 382 nm (%)</b>	<b>Recuperação 435 nm (%)</b>	<b>Recuperação média aritmética (%)</b>
espinafre 0059051	10/11/2005	25,5	102	85	91
espinafre 0067051	15/12/2005	51,0	62	59	60
espinafre 0068051	15/12/2005	51,0	87	79	82
beldroega 0002061	08/05/2006	10,5	53	83	72
espinafre 0003061	18/05/2006	10,5	133	152	142

Teoricamente, para a mesma quantidade de  $\text{CS}_2$ , o equilíbrio entre os dois complexos deveria ser idêntico, levando a que as percentagens de recuperação fossem também semelhantes. Verifica-se no entanto que ao nível de fortificação de 10,5  $\mu\text{g de CS}_2$ , as percentagens de recuperação determinadas a 435 nm são superiores às obtidas a 382 nm e que o inverso ocorre a 25,5 e 51,0  $\mu\text{g de CS}_2$ . Este facto poderá ser explicado por uma alteração no equilíbrio entre os dois complexos devido a um efeito de matriz existente na solução resultante da análise e que não ocorre nas soluções dos padrões de calibração. Assim, as quantidades relativas dos dois complexos serão diferentes, alterando o valor quantificado pela respectiva função de calibração. Este efeito é também verificado no ponto seguinte, na análise de amostras reais.

Utilizando a média das absorvências a 382 e 435 nm, este efeito será em princípio suprimido pois são sempre considerados os dois complexos, em termos da concentração total de CS<sub>2</sub>, conforme descrito na página 92.

Todavia apenas com a análise de materiais de referência será possível verificar esta hipótese (ponto 2.4.3., página 108).

#### 2.4.2. Ensaios em amostras reais

No sentido de comparar os valores obtidos com as diferentes metodologias de calibração, apresentam na tabela 35 os resultados determinados em amostras reais.

Tabela 35: Ensaios em amostras reais - comparação entre metodologias de calibração.

Amostra (código de entrada)	Data	Resultado 382 nm		Resultado 435 nm		Resultado Média	
		(Abs/ µg de CS <sub>2</sub> /25mL)		(Abs/ µg de CS <sub>2</sub> /25mL)		(Abs/ µg de CS <sub>2</sub> /25mL)	
pêra - 0040051	20/10/2005	0,046	27,6	0,018	15,7	0,032	19,9
feijão verde - 0045051	20/10/2005	0,046	27,6	0,026	19,4	0,036	22,3
pêra - 0063051	17/11/2005	0,023	11,2	0,008	<5,3(LD)	0,016	11,2
alface - 0066051	29/11/2005	0,039	17,9	0,031	17,9	0,035	17,9
espinafre – 0069051 repetição 1	15/12/2005	0,062	36,9	0,067	36,9	0,064	36,6
espinafre – 0069051 repetição 2	15/12/2005	0,078	48,6	0,079	42,4	0,078	44,5
espinafre – 0069051 repetição 3	15/12/2005	0,044	23,7	0,037	23,3	0,040	23,1

LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação.

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação e em amostras reais apenas têm uma indicação relativa no que respeita à comparação entre as 3 metodologias de calibração.

Em termos absolutos, apenas através de acções no âmbito do controlo de qualidade externo (ensaios interlaboratoriais e análise de materiais de referência) ou por comparação com outro método de ensaio, poderemos concluir sobre qual das metodologias de calibração apresenta resultados mais exactos.

### 2.4.3. Materiais de referência

No sentido de verificar em termos absolutos, se a metodologia de ajuste através da absorvência média se adequa à quantificação da concentração de CS<sub>2</sub>, foi ensaiado um material de referência interno resultante do excedente de uma amostra proveniente do ensaio interlaboratorial realizado no dia 18/01/2006 (ponto 1.4.3. deste capítulo).

Tabela 36: Ensaio de material de referência interno- calibração com absorvência média.

<b>Material de referência</b>	<b>Data</b>	<b>Resultado (mg/kg) / Z</b>	<b>Valor referência (mg/kg)</b>
Ensaio interlaboratorial TESTQUAL 13 toma para análise de 20,0g	19/04/2006	1,86 Z = -0,1	1,90

O cálculo da concentração foi efectuado com a função de calibração obtida através dos 50 pontos estudados nesta dissertação. O resultado apresenta-se satisfatório, o que indica que a metodologia de calibração com base na média aritmética das absorvências a 382 e 435 nm é adequada à quantificação nesta gama de trabalho.

### 3. Estabilidade dos complexos em função da temperatura

No sentido de averiguar a estabilidade das soluções dos complexos de côm formados, efectuou-se o seguinte teste.

Prepararam-se padrões com a concentração nominal de 50 µg de CS<sub>2</sub> e foram colocados em diferentes ambientes durante 60 minutos (tempo de digestão da amostra):

- fechados em balões volumétricos a 0, 25 e 40 °C;
- no aparelho extractor a 0 e 25 °C.

Para verificar a estabilidade das leituras, foram efectuadas medidas da absorvência destes padrões no tempo inicial e posteriormente em intervalos de 10 minutos.

Para poder tratar estes dados através do método estatístico da Análise de Variâncias, foram efectuadas medições em quintuplicado. Apresentam-se os gráficos obtidos (figuras 30 e 31) com a média destes replicados a 435 e 382 nm.

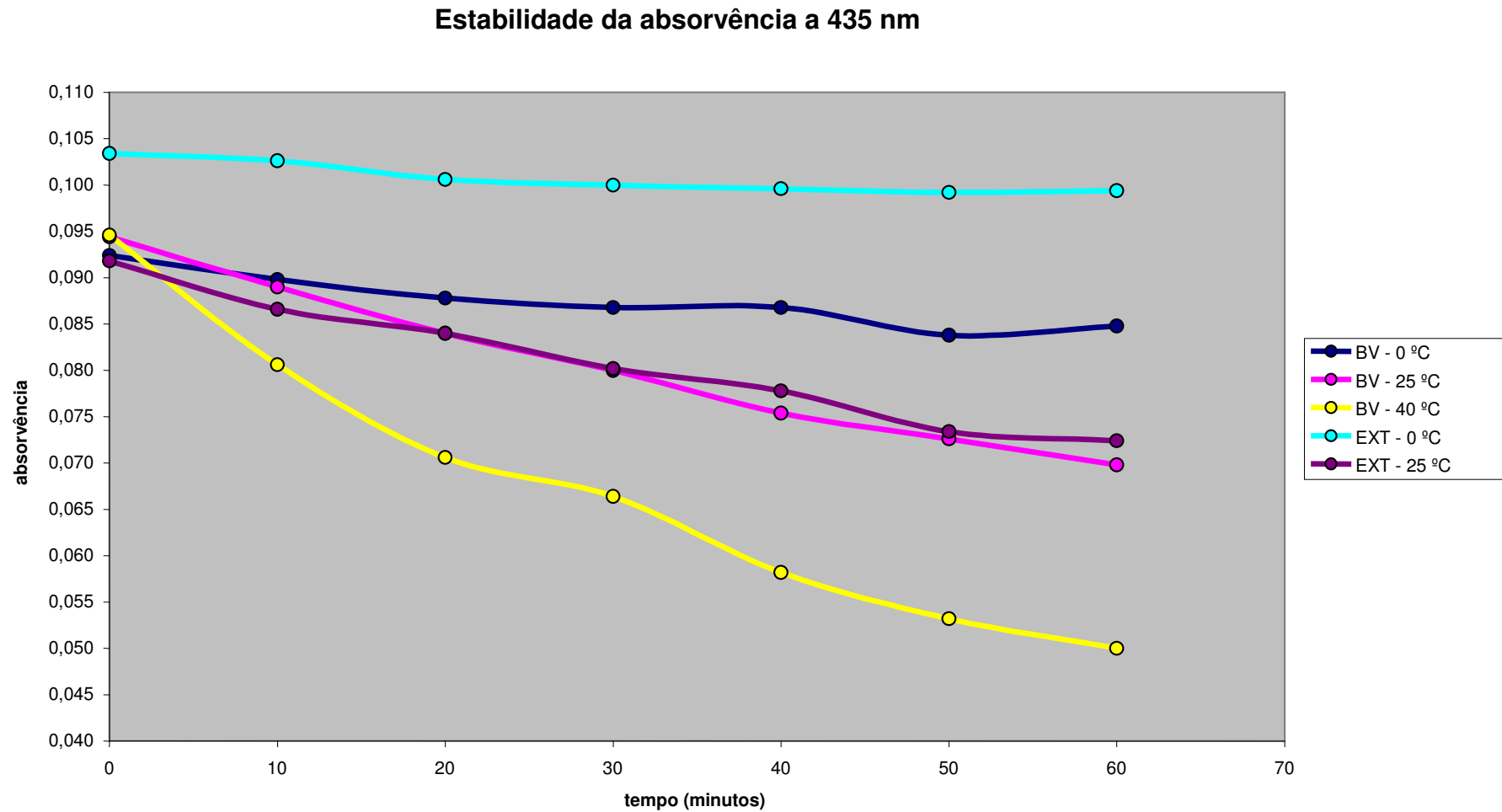


Figura 30: Variação da absorvência do padrão 50 µg de CS<sub>2</sub> a 435 nm, comparando os diferentes ambientes definidos. (BV – balão volumétrico; EXT – aparelho extractor).

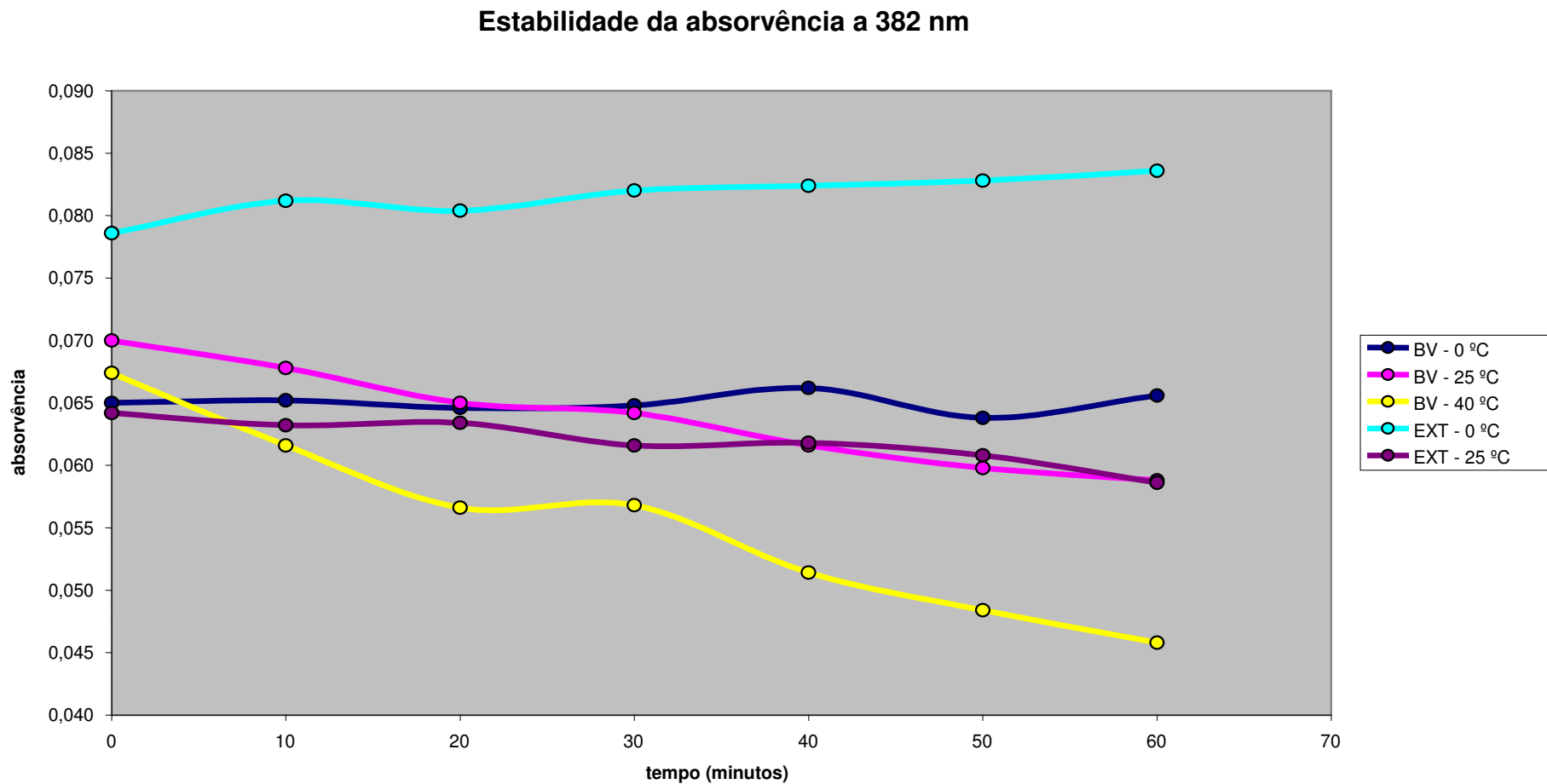


Figura 31: Variação da absorvência do padrão 50 µg de CS<sub>2</sub> a 382 nm, comparando os diferentes ambientes definidos. (BV – balão volumétrico; EXT – aparelho extractor).

Foi aplicado aos dados o tratamento estatístico de Análise de Variâncias, (ANOVA)<sup>[54]</sup> com um factor, no sentido de averiguar se as diferenças obtidas nos diferentes ambientes seleccionados são ou não significativas.

Em primeiro lugar, foi verificada a homogeneidade de variâncias intra-grupo (replicados das leituras), como se pode verificar na tabela 37.

Testaram-se para os 7 pontos de cada ambiente, a homogeneidade entre as variâncias das 5 leituras de cada ponto.

Tabela 37: Teste de Cochran<sup>[54]</sup> para verificar a homogeneidade de variâncias intra-leituras.

Comprimento de onda	Condições- teste	Valor calculado	Conclusão
382 nm	0 °C em balão	0,219	Homogéneas com 5 % de significância
435 nm	volumétrico	0,386	
382 nm	25 °C em balão	0,352	
435 nm	volumétrico	0,403	
382 nm	40 °C em balão	0,382	
435 nm	volumétrico	0,305	
382 nm	0 °C no aparelho extractor	0,197	
435 nm		0,318	
382 nm	25 °C no aparelho extractor	0,381	
435 nm		0,468	

Valor referência; (7 dados, 5 réplicas e 5% de significância) – 0,431; Valor referência; (7 dados, 5 réplicas e 1% de significância) – 0,508.

Tendo-se verificado a homogeneidade das variâncias, procedeu-se à análise das variâncias (ANOVA). Os resultados da comparação dos valores obtidos através da análise de variâncias intragrupo (replicados de leituras) e intergrupo (leituras ao longo do tempo) são apresentados na tabela 38.

Tabela 38: Resultados da análise de variância aplicada ao estudo da estabilidade dos complexos  $\text{Cu}^{2+}:\text{CS}_2$  ao longo do tempo (minutos) para diferentes ambientes.

Comprimento de onda	Condições-teste	Absorvência t=0	Absorvência t=10	Absorvência t=20	Absorvência t=30	Absorvência t=40	Absorvência t=50	Absorvência t=60	F calculado	DMS
382 nm	balão	0,065	0,065	0,065	0,065	0,066	0,064	0,066	1,78	0,002
435 nm	volumétrico a 0 °C	0,092	0,090	0,088	0,087	0,087	0,084	0,085	13,9	0,002
382 nm	balão	0,070	0,068	0,065	0,064	0,062	0,060	0,059	83,7	0,001
435 nm	volumétrico a 25 °C	0,094	0,089	0,084	0,080	0,075	0,073	0,070	154	0,002
382 nm	balão	0,067	0,062	0,057	0,057	0,051	0,048	0,046	588	0,001
435 nm	volumétrico a 40 °C	0,095	0,081	0,071	0,066	0,058	0,053	0,050	626	0,002
382 nm	aparelho extractor a	0,079	0,081	0,080	0,082	0,082	0,083	0,084	14,9	0,001
435 nm	0 °C	0,103	0,103	0,101	0,100	0,100	0,099	0,099	43,9	0,001
382 nm	aparelho extractor a	0,064	0,063	0,063	0,062	0,062	0,061	0,059	12,9	0,002
435 nm	25 °C	0,092	0,087	0,084	0,080	0,078	0,073	0,072	69,9	0,002

F crítico para 6 (7-1) e 28 (7x(5-1)) graus de liberdade e significância de 5% - 2,45; F crítico para 6 e 28 graus de liberdade e significância de 1% - 4,02

DMS – Diferença Mínima Significativa (diferença a partir do qual se pode considerar a média de um grupo significativamente diferente de outro grupo com 95% de confiança).

Pela avaliação dos gráficos e dos resultados da análise de variâncias, verifica-se que o ambiente térmico influi na estabilidade da absorvência dos padrões de calibração e no CS<sub>2</sub> recolhido das amostras.

Podemos também verificar que à temperatura de 0 °C, as leituras associadas aos padrões de calibração se mantêm mais estáveis durante o período de análise.

Como a quantificação é efectuada por comparação entre os padrões preparados em balões volumétricos e o extracto recolhido do aparelho extractor, qualquer alteração causada pela temperatura a que estas soluções se encontram, afectará a comparação entre elas.

Para acautelar esta questão, foi definido o procedimento descrito no ponto 6 do capítulo Materiais e métodos.

#### **4. Utilização de luvas de protecção individual**

No sentido de verificar a interferência sobre o método, pela utilização de luvas de protecção individual, foram ensaiados os seguintes tipos de luvas:

- proFood, Disposable Nitrile Gloves (nitrilo) - Ansell - Brussels - Belgium
- BLUE-COMFORT, Nitril, Latexfrei, Powder free (nitrilo) - Medline Products CO., LTD - Thailand
- HANDSAFE TM, Disposable natural Latex gloves, powdered with USP (látex) - Malaysia
- STAR –PREMIUM, Vinyl exam gloves (vinilo) - AQL 1.5 – EN 455-1/2

apresentam-se os resultados das análises na tabela 39.

Tabela 39: Resultados obtidos na aplicação do método de ensaio em estudo a diferentes tipos de luvas de protecção individual.

<b>Luvas</b>	<b>Data</b>	<b>Toma analítica</b>	<b>Absorvência</b>	<b>Resultados (mg/kg de CS<sub>2</sub>)</b>
<b>Profood</b>	02/06/2005	0,3 g	> 0,765	> 908 mg/kg
<b>Blue-comfort</b>	05/05/2005	0,3 g	0,094	163 mg/kg
<b>Handsafe tm</b>	05/05/2005	0,3 g	> 0,765	> 908 mg/kg
<b>Star – Premium*</b>	12/10/2005	0,3 g	0,000	não detectado

\* análise efectuada em triplicado.

Assim, foi possível confirmar que as luvas Star-Premium são passíveis de utilização no método de ensaio em estudo, para a manipulação de amostras e reagentes.

## IV. Conclusão

Ponderando os resultados obtidos na validação interna do método, pode concluir-se que a implementação prática do mesmo é adequada aos fins pretendidos.

Foi possível aferir externamente a qualidade dos resultados, verificando-se o bom desempenho alcançado nos ensaios interlaboratoriais e na análise de materiais de referência certificados.

O método objecto deste estudo, apresenta algumas vantagens que levaram a que seja um método normalizado ao nível europeu e que seja amplamente utilizado pelos laboratórios que desenvolvem o controlo oficial de resíduos de pesticidas em vegetais, para a pesquisa de resíduos de pesticidas ditiocarbamatos. Todavia, tem algumas limitações e foi o objectivo principal desta dissertação, contribuir para as minimizar.

Neste contexto, foi possível verificar que combinando o sinal instrumental (absorvências) das 2 espécies em jogo na formação dos complexos de CS<sub>2</sub>, se obtém uma resposta que se correlaciona linearmente com a concentração de CS<sub>2</sub> dos padrões, até um nível adequado à quantificação destes pesticidas pela legislação em vigor, ou seja, um limite de determinação de 0,05 mg/kg de CS<sub>2</sub>.

Relativamente à aplicação em amostras reais, da nova gama de trabalho estudada, foram obtidos resultados satisfatórios que indiciam a aplicabilidade desta nova metodologia de calibração.

Por outro lado, foi evidenciada a necessidade de manter as soluções de recolha do CS<sub>2</sub> e os padrões de calibração, à mesma temperatura e próxima de 0 °C, o que foi conseguido por imersão em gelo dos tubos associados ao aparelho digestor/extractor e colocando as soluções de calibração numa câmara frigorífica. Este procedimento assegura a estabilidade dos complexos corados e minimiza as diferenças de

comportamento entre os extractos das amostras e dos padrões de calibração aquando da sua comparação.

Relativamente aos operadores e no sentido de tornar mais prática a manipulação dos reagentes e amostras durante o procedimento de ensaio, foi evidenciado que as luvas Star – Premium, não contêm substâncias interferentes para esta metodologia analítica.

## **V. Considerações finais**

A metodologia de ensaio descrita na norma europeia EN 12396-1 afigura-se como um procedimento expedito, não demasiado dispendioso em termos de equipamentos e reagentes e que permite assegurar, com as modificações expressas nesta dissertação, as análises desenvolvidas no âmbito do controlo oficial destas substâncias em vegetais.

Relativamente aos novos procedimentos introduzidos por esta dissertação, deverão ser efectuados estudos mais exaustivos no que respeita à avaliação do método na nova gama de trabalho definida, designadamente:

- através do aprofundamento do estudo interno dos seus parâmetros característicos e aspectos práticos;
- por comparação com outros métodos, por exemplo o descrito na norma EN 12396-3;
- por avaliação com base em referências externas, designadamente, ensaios interlaboratoriais e materiais de referência.

Um aspecto de relevo e uma clara desvantagem deste método e análogos, advém de não ser possível homogeneizar a amostra de laboratório no sentido de obter tomas para análise que sejam representativas da amostra. Julga-se importante desenvolver um estudo alargado no sentido de verificar as condições experimentais que devem ser obedecidas e que permitam que as amostras sejam homogeneizadas. Este aspecto diminuiria a incerteza potencial dos ensaios, conduzindo ao aumento da confiança nos resultados.

Um outro aspecto que poderá merecer algum trabalho de investigação, prende-se com a possibilidade de criar uma derivação ao método que permitisse a extracção selectiva do tirame para posterior quantificação em separado, dado que este apresenta Limites Máximos de Resíduo específicos.

## VI. Bibliografia

[1] Malik, A.K.; Faubel, W.; “*Review, Methods of analysis of dithiocarbamate pesticides: a review*”; Pesticide Science 55, (1999) 965-970.

[2] Nebbia, C.; Fink-Gremmels, J.; “*Acute effects of low doses of zineb and ethylenethiourea on thyroid function in the male rat*”; Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, (1996) 847-852.

[3] Caldas, E.D.; Miranda, M.C.C.; Conceição, M.H.; Souza, L.C.K.R.; “*Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potencial risk for consumers*”; Food and Chemical Toxicology 42, (2004) 1877-1883.

[4] TestQual – Servicio de Ejercicios de Intercomparación de Residuos de Plaguicidas; “Ejercicio TestQual 10”, Universidad de Almería – Almería – Spain, (2005).

[5] European Committee for Standardization (CEN); European Standard EN 12396-1 “*Non-fatty foods – Determination of dithiocarbamate and thiuram disulfide residues – Part 1: Spectrometric method*”; (1998).

[6] European Committee for Standardization (CEN); European Standard EN 12396-3 “*Non-fatty foods – Determination of dithiocarbamate and thiuram disulfide residues – Part 3: UV spectrometric xanthogenate method*”; (2000).

[7] The Pesticide Manual: “*A World Compendium*”, 11th Edition, The British Crop Protection Council, Londres, 1997.

[8] WHO; ILO; UNEP; International Programme on Chemical Safety; “*Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and propylenethiourea: a general introduction*”, Geneva, (1988).

- [9] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A., “*Princípios de Análise Instrumental*”, 5ª Edição, Porto Alegre/São Paulo, Artmed – Bookman (2002), 300-321 pp.
- [10] Varian; “*Manual de operação do espectrofotômetro Cary 5G*” (1995)
- [11] Malik, A.K.; Kaul, K.N.; Lark, B.S.; Rao, A.L.J.; “*Simple and sensitive method for determination of tetramethylthiuram disulfide*”; *Pesticide Science* 53, (1998) 104-106.
- [12] Walash, M.I.; Belal, F.; Metwally, M.E.; Hefnawy, M.M. “*Spectrophotometric determination of Maneb, Zineb and their decomposition products in some vegetables and its application to kinetic studies after greenhouse treatment*” *Food Chemistry*, 47, (1993) 411-416
- [13] Kapoor, J.; Sharma, R.; Rao, A.L.J.; “*Spectrophotometric determination of ferbam using 4-(2-pyridylazo)resorcinol*”; *Indian Journal of Chemistry* 35, (1996) 1011-1013.
- [14] Malik, Ashok Kumar; Seidel, B.S.; Faubel, Werner; “*Spectrophotometric determination of ferbam (iron(III) dimethyldithiocarbamate) in a commercial sample and wheat grains using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline* ”; *Pesticide Science*, 55 (1999) 1000-1003.
- [15] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “*Spectrophotometric determination of iron(III) dimetilditiocarbamate*”; *Talanta* 44, (1997) 177-183.
- [16] Deb, M.K.; Chakravarty, S.; Mishra, R.K.; “*Spectrophotometric determination of zinc dimetilditiocarbamate (ziram) with hydroxyamidine and 4-(2-pyridylazo)resorcinol*”; *Journal of Indian Chemistry Society* 73, (1996) 551-552.

- [17] Rangaswamy, J. R; Poornima, P.; Majunder, S.K. “*Rapid colorimetric method for estimation of thiram residues on grains*”; JAOAC 53, (1970) 519-522.
- [18] Rangaswamy, J. R; Poornima, P.; Majunder, S.K. “*Rapid colorimetric method for estimation of ferbam and ziram residues on grains*”; JAOAC 53, (1970) 1043-1044.
- [19] Rangaswamy, J. R; Poornima, P.; Majunder, S.K. “*Colorimetric method for estimation of zineb*”; JAOAC 54, (1971) 1120-1121.
- [20] Rao, A.L.J.; Verma, N.; “*Spectrophotometric determination of zinctetramethylthiuramdisulfide (thiram) by extraction of its molybdenum complex*”; Journal of Indian Chemistry Society 67, (1990) 1006-1007.
- [21] Rao, A.L.J.; Verma, N.; “*Determination of ferbam (ferric dimethyldithiocarbamates) residues in apple by a spectrophotometric method*”; Journal of Indian Acad For Sci 24, (1985) 1-5.
- [22] Rao, A.L.J.; Verma, N.; “*Spectrophotometric method for the estimation of ziram (zinc dimethyldithiocarbamate) fungicide residues*”; Journal Inst Chemists (India) 60, (1988) 5-6.
- [23] Rao, A.L.J.; Verma, N.; “*Spectrophotometric determination of disodium ethylene-1,2-bisdithiocarbamate by extraction of its molybdenum complex into isobutyl methyl ketone*”; Journal of Indian Chemistry Society 65, (1988) 746-747.
- [24] Rao, A.L.J.; Verma, N.; “*Spectrophotometric determination of zinc bis(ethylenedithiocarbamate) (zineb)*”; Talanta 36, (1989) 1041-1043.
- [25] Rao, A.L.J.; Verma, N.; “*Determination of manganese N,N'-ethylenebis(dithiocarbamate) (maneb) by a spectrophotometric method and its applications*”; Rev Roum Chim 35, (1990) 625-630.

[26] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; Paul, Y.; Puri, B.K.; “Spectrophotometric determination of some dithiocarbamates after extraction of their chromium(III) complexes into molten naphthalene”; Internat J Environ Studies 38, (1991) 199-200.

[27] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “Spectrophotometric determination of thiram (tetramethylthiuram disulfide) with chromium acetate after extraction of its chromium complex into methyl isobutyl ketone”; Journal of Indian Chemistry Society 67, (1990) 615-616.

[28] Malik, A.K.; Paul, Y.; Rao, A.L.J.; “Spectrophotometric determination of dibam, thiram, ziram and ferbam in commercial samples”; Indian J Env Hlth 34, (1992) 39-44.

[29] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “Spectrophotometric determination of some dithiocarbamates”; Talanta 37, (1990) 1205-1207.

[30] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; Puri, B.K. “Spectrophotometric determination of ferbam using sodium selenite”; Internat J Environ Anal Chem 44, (1991) 159-166.

[31] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “Spectrophotometric determination of zinc dimethyldithiocarbamate after adsorption of copper and palladium complexes onto microcrystalline naphthalene”; J Chinese Chem Soc 39, (1992) 235-239.

[32] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “Spectrophotometric determination of tetramethylthiuram disulphide (thiram) by adsorption of its copper and palladium complexes onto microcrystalline naphthalene”; Indian J Chem 30(A), (1992) 986-988.

[33] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “Spectrophotometric determination of ziram, ferbam and zineb using diphenylcarbazone”; Talanta 38, (1991) 941-944.

- [34] Malik, A.K.; Kapoor, J. Rao, A.L.J.; “*Extraction and spectrophotometric determination of maneb with 1-(2-pyridylazo)-naphthol (PAN)*”; Talanta 40, (1993) 201-203.
- [35] Malik, A.K.; Kapoor, J. Rao, A.L.J.; “*Spectrophotometric determination of ziram and zineb with PAN*”; Indian J Chem 33(A), (1994) 83-85.
- [36] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “*Spectrophotometric determination of ferbam in formulations, grain and apples using 1,10-phenanthroline*”; Pestic Sci 35, (1992) 69-72.
- [37] Kesari, R.; Gupta, V.K.; “*A sensitive spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamate fungicide and its application in environmental samples*”; Talanta 45, (1998) 1097-1102.
- [38] Malik, A.K.; Rao, A.L.J.; “*Spectrophotometric determination of ferbam in formulations, grain and apples using 1,10-phenanthroline*”; Pestic Sci 35, (1992) 69-72.
- [39] <http://www.ipq.pt/custompage.aspx?modid=15>.
- [40] Malik, A.K.; Seidel, B.S; Faubel, W. “*Capillary electrophoretic determination of disodium ethylenebisdithiocarbamate (nabam) and sodium diethyldithiocarbamate*”; Internat J Environ Anal Chem (1999) (In press).
- [41] European Committee for Standardization (CEN); European Standard EN 12396-2 “*Non-fatty foods – Determination of dithiocarbamate and thiuram disulfide residues – Part 2: Gas chromatographic method*”; (1998).
- [42] Ahmad, N.; Guo, L.; Mandarakas, P.; Appleby, S. “*Headspace gas-liquid chromatographic determination of dithiocarbamate residues in fruits and vegetables with confirmation by conversion to ethylenethiourea*”; J AOAC Internat 79, (1996) 1417-1422.

- [43] Zjawiony, I.; “*Polarographic investigations and determination of thiuram*”; *Chemia Analityczna*, 41 (1996) 1043-1049.
- [44] Perezruiz, T.; Martinezlozano, C.; Tomas, V.; Casajus, R.; “*Flow-injection fluorimetric determination of nabam and metham*” *Talanta*, 43 (1996) 193-198.
- [45] Noguier, T.; Marty, J.L.; “*High sensitive bienzymic sensor for the detection of dithiocarbamate fungicides*”; *Anal Chim Acta* 347, (1997) 63-70.
- [46] International Standardization Organization (ISO); International Standard ISO 8466-1 “*Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*”; (1990)
- [47] Relacre – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; Guia RELACRE 13 “*Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*”; (2000).
- [48] Cairns, T.; Sherma, J.; “*Emerging Strategies for Pesticides Analysis*”; CRC Press Boca Raton (1992).
- [49] Cullen, E.Thomas; “*Spectrophotometric determination of dithiocarbamate residues on food crops*”; *Analytical Chemistry* 36, (1964) 221-224.
- [50] Keppel, George E.; “*Modification of the carbon disulfide evolution method for dithiocarbamate residues*”; *Journal of the AOAC* 52, (1969) 162-167.
- [51] Heise, S.; Weber, H.; Alder, L.; “*Reasons for the decomposition of the fungicide thiram during preparation of fruit and vegetable samples and consequences for residue analysis*”; *Fresenius J. Anal. Chem* 366, (2000) 851-856.
- [52] Relacre – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal; Guia RELACRE 3 “*Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*”; (1996).

[53] Documento SANCO/10476/2003 “Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis”; (2004);

[http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)

[54] Caulcutt, R.; Boddy, R.; “*Statistics for Analytical Chemists*”, London and New York, Chapman and Hall (1983).

[56] EURACHEM/CITAC Guide; “*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*”, 2ª Edição, S.L.R. Ellison (LGC, UK); M. Rosslein (EMPA, Switzerland); A. Williams (UK), (2000).

[57] Directiva 79/700/CEE da Comissão, de 24 de Julho, “*Métodos comunitários de colheita de amostras para o controlo oficial dos resíduos de pesticidas sobre e nas frutas e produtos hortícolas*”; (1979).

[58] Long, G.L., Winefordner J.D.; “*Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition*”; *Analytical Chemistry*, 55(7), (1983) 713A-724A.