

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS INGREDIENTES ATIVOS
EM AGROTÓXICOS ILEGAIS APREENDIDOS PELA POLÍCIA FEDERAL DO
BRASIL**

William Goelzer Fraga

Brasília
Instituto de Química – UnB
2012

William Goelzer Fraga

**IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS INGREDIENTES ATIVOS
EM AGROTÓXICOS ILEGAIS APREENDIDOS PELA POLÍCIA FEDERAL DO
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

Brasília
Instituto de Química – UnB
2012

Resumo

Os objetivos do estudo foram identificar os principais agrotóxicos envolvidos em apreensões da Polícia Federal no Brasil, por meio de uma compilação dos laudos periciais sobre produtos ilegais, sendo contrabandeados e/ou falsificados, elaborados pela Polícia Federal e realizar análises químicas quantitativas em amostras apreendidas contendo os ingredientes ativos tebuconazol, metsulfurom-metílico e glifosato. Os resultados da compilação indicaram os seguintes ingredientes ativos (IA) predominantes, em 2008 e 2009, respectivamente: metsulfurom-metílico (18% e 19%), imidacloprido (20% e 18%), fipronil (5% e 10%), tebuconazol (8% e 9%), clorimurom-etílico (12% e 9%) e glifosato (3% e 3%). O estudo revelou altos índices de importação ilegal para algumas formulações com IA que não estão entre os mais comercializados no país, devido, provavelmente, ao preço elevado do produto legalizado. Foi realizada também a identificação dos estados onde houve maior número de laudos no período em questão, provendo informações que podem auxiliar políticas públicas de controle da importação ilegal e falsificação de agrotóxicos no Brasil. Esses valores para 2008 e 2009, respectivamente, são: Rio Grande do Sul (17% e 51%), Paraná (31% e 24%), Mato Grosso (12% e 9%) e Mato Grosso do Sul (17% e 5%). Com relação às análises químicas, cenários distintos para o tebuconazol e o metsulfurom-metílico foram observados: agrotóxicos contrabandeados à base de tebuconazol (17 amostras, sendo 9 sólidas e 8 líquidas) chegam ao país com concentração variável, enquanto a maioria dos agrotóxicos à base de metsulfurom-metílico (18 amostras sólidas) apresentava rótulo com concentração de 600 g/kg do IA, sendo que os resultados analíticos indicaram menores concentrações do IA (média obtida de 337,0 g/kg). O estudo envolvendo o glifosato objetivou desenvolver um método simples para quantificar sua impureza toxicologicamente relevante, o n-nitrosoglifosato (NNG). O método desenvolvido em CLAE-UV/Vis para análise de NNG não necessita de etapa para derivatização do analito, observada nos métodos oficiais, e é capaz de determinar se uma amostra de glifosato contém NNG em concentração igual ou superior ao limite estipulado pela legislação (1 mg/kg). Em nenhuma das amostras de glifosato analisadas foi detectada concentração de NNG acima deste limite.

Palavras-chave: contrabando, agrotóxico, análise química, tebuconazol, metsulfurom-metílico, n-nitrosoglifosato.

Abstract

The aim of this study was to identify the main pesticides involved in seizures of the Federal Police in Brazil through a compilation of forensic reports on illegal products smuggled in the years of 2008 and 2009, and to analyze seized pesticide samples containing the active ingredients tebuconazol, metsulfuron-methyl and glyphosate. The following active ingredients (AI) prevailed in 2008 and 2009 results respectively: metsulfuron-methyl (18% and 19%), imidacloprid (20% and 18%), fipronil (5% and 10%), tebuconazole (8% and 9%), clorimurrom-ethyl (12% and 9%) and glyphosate (3% and 3%). The study revealed high rates of illegal importation of some AI formulations that are not among the most commercialized in the country, probably due to the high price of the legalized ones. It was also performed the identification of the states where there were more reports in the presented period, providing information that can help public policies of control of illegal importation and falsification of pesticides in Brazil. The values for 2008 and 2009 are, respectively: Rio Grande do Sul (17% and 51%), Paraná (31% and 24%), Mato Grosso (12% and 9%) and Mato Grosso do Sul (17% and 5%). The study cases have shown different scenarios: smuggled pesticides based on tebuconazole (17 samples, 9 solid and 8 liquid) arrive in the country with variable concentration, while most of metsulfuron-methyl pesticides (18 solid samples) arrive with their label indicating a concentration of 600 g/kg, although chemical results showed lower AI concentrations (average of 337.0 g/kg). The study involving glyphosate aimed to develop a simple method to quantify its toxicologically relevant impurity, the n-nitrosoglyphosate. The method developed for HPLC-UV/Vis analysis of NNG do not requires a derivatization step, observed in the official method for this quantification and proved to be simple and capable of determining whether a glyphosate sample has a concentration of n-nitrosoglyphosate equal or superior to the limit established by law (1 mg/kg). None of the GLY samples presented NNG concentration above law limits.

Keywords: seizure, chemical analysis, tebuconazole, metsulfuron-methyl, n-nitrosoglyphosate

Índice

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Equações	xi
1. Introdução	1
1.1. Evolução temporal do uso de agrotóxicos	2
1.2. Legislação brasileira	3
1.3. Objetivos do estudo	8
2. Compilação dos dados de agrotóxicos ilegais apreendidos pela Polícia Federal	9
2.1. Resultados da compilação	9
2.2. Perfil dos agrotóxicos apreendidos e analisados pela Polícia Federal	12
2.3. Classificação dos produtos apreendidos e comparação com mercado lícito.....	13
3. Revisão de literatura	19
3.1. Propriedades do tebuconazol	19
3.1.1. Métodos de determinação do tebuconazol	20
3.2. Propriedades do metsulfurom-metílico.....	21
3.2.1. Métodos de determinação do metsulfurom-metílico	21
3.3. Propriedades do glifosato	22
3.3.1. Métodos de determinação do glifosato	23
3.3.2. N-nitrosoglifosato e suas propriedades	26
3.3.3. Determinação do NNG em agrotóxicos à base de GLY	27
4. Parte Experimental	30
4.1. Determinação de tebuconazol	30
4.1.1. Materiais	30
4.1.2. Preparo das amostras	30

4.1.3.	Método analítico para determinação de tebuconazol	31
4.2.	Determinação de metsulfurom-metílico.....	32
4.2.1.	Materiais	32
4.2.2.	Preparo das amostras	32
4.2.3.	Método analítico para determinação de metsulfurom-metílico	32
4.3.	Determinação de n-nitrosoglifosato em matriz de glifosato.....	33
4.3.1.	Materiais	33
4.3.2.	Preparo das amostras	34
4.3.3.	Métodos analíticos para determinação de n-nitrosoglifosato em matriz de glifosato.....	35
4.3.3.1.	CI-DCE - Cromatografia de íons com detector de condutividade elétrica.....	35
4.3.3.2.	CLAE-UV/Vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do Ultravioleta/Visível.....	36
5.	Resultados e discussão.....	37
5.1.	Tebuconazol	37
5.1.1.	Desenvolvimento do método	37
5.1.2.	Amostras de tebuconazol	39
5.2.	Metsulfurom-metílico.....	41
5.2.1.	Desenvolvimento do método	41
5.2.2.	Amostras de metsulfurom-metílico	42
5.3.	N-nitrosoglifosato em matriz de glifosato	44
5.3.1.	Desenvolvimento e validação de método	44
5.3.1.1.	CI-DCE - Cromatografia de íons com detector de condutividade elétrica.....	44
5.3.1.2.	CLAE-UV/Vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do Ultravioleta/Visível.....	46
5.3.1.2.a.	Preparo da curva analítica	48

5.3.1.2.b. Validação do método proposto para CLAE-UV/Vis	50
5.3.2. Amostras de glifosato	54
6. Conclusões finais.....	56
7. Bibliografia.....	58

Lista de Figuras

- Figura 1.** Parte do modelo de rótulo de agrotóxico indicado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. As classificações toxicológica e do potencial de periculosidade ambiental têm que estar listadas.6
- Figura 2.** Estados brasileiros onde ocorreu maior número de apreensões de agrotóxicos nos anos de 2008 e 2009. 10
- Figura 3.** Representação dos dez estados brasileiros onde houve maior comercialização de agrotóxicos de forma legal em 2009 (adaptado). 12
- Figura 4.** Fórmula estrutural do tebuconazol. 19
- Figura 5.** Fórmula estrutural do metsulfurom-metílico. 21
- Figura 6.** Fórmula estrutural do glifosato. 22
- Figura 7.** Cromatograma de uma amostra de produto formulado com ingrediente ativo glifosato. (A) surfactante, (B) glifosato, (C) impureza X e (D) impureza Y, composta por dois isômeros (adaptado). 24
- Figura 8.** Cromatograma de solução padrão de glifosato (2 µg/mL) – (adaptado). .. 25
- Figura 9.** Derivatização do glifosato com TFAA e TFE. (Abreu, 2008 – adaptado). . 26
- Figura 10.** O reagente *p*-DAC (esquerda) e o produto cátion imínio (direita) do mecanismo proposto da reação de glifosato com *p*-DAC (adaptado). 26
- Figura 11.** Fórmula estrutural do n-nitrosoglifosato (NNG). 27
- Figura 12.** Espectro de RMN ¹H do NNG (adaptado). 29
- Figura 13.** Curva de calibração e cromatograma de uma amostra sólida real de tebuconazol (sinal em destaque) em CG-DIC. 38
- Figura 14.** Curva analítica de calibração do metsulfurom-metílico juntamente com um cromatograma de um padrão (sinal em destaque) de acordo com o método utilizado. 42
- Figura 15.** Cromatograma de íons com detector condutimétrico de uma solução contendo glifosato (Tr = 17,14 min) e n-nitrosoglifosato (Tr = 23,94 min), ambos na mesma concentração de 10 µg/mL. 44
- Figura 16.** Espectro de cromatografia de íons com detector condutimétrico de uma solução contendo 40.000 µg/mL de glifosato (Tr = 8,90 min) e 1,0 µg/mL de n-nitrosoglifosato (Tr = 24,00 min). Em destaque a ampliação do sinal de NNG... 45
- Figura 17.** (A) Cromatograma de solução contendo glifosato (Tr = 10,8 min) e n-nitrosoglifosato (Tr = 21,0 min), ambos com a mesma concentração de 10

µg/mL. Em detalhe: (B) espectro UV/Vis dos dois sinais de NNG; (C) espectros UV/Vis de GLY (vermelho) e NNG (azul).....47

Figura 18. Cromatogramas de uma amostra questionada: (A) amostra questionada sem fortificação com NNG; (B) amostra questionada fortificada com 0,15 µg/mL de NNG. Em ambos os cromatogramas as setas destacam o sinal de NNG.47

Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas das soluções de calibração de NNG (entre 0,10 e 4,00 µg/mL), em solução contendo aproximadamente 10.000 µg/mL de glifosato.49

Figura 20. Curva de calibração externa de NNG, em solução contendo aproximadamente 10.000 µg/mL de GLY.....50

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação de adjuvantes e modificadores de utilidades em agrotóxicos.	5
Tabela 2. Número de produtos analisados quimicamente reportados em laudos periciais, por unidade federativa, nos anos de 2008 e 2009.....	11
Tabela 3. (a) Classificação agrônômica dos produtos encaminhados à Polícia Federal e (b) classificação agrônômica dos produtos comercializados legalmente em 2009 (adaptado).....	14
Tabela 4. Ingredientes ativos mais comercializados legalmente em 2009 (adaptado).	15
Tabela 5. Principais ingredientes ativos analisados pela Polícia Federal em 2008 e 2009.....	16
Tabela 6. Preços em 2010 das principais marcas de agrotóxicos por ingrediente ativo.	17
Tabela 7. Características relevantes do ponto de vista químico e toxicológico dos principais agrotóxicos apreendidos pela Polícia Federal em 2008 e 2009.	18
Tabela 8. Resultados de seis análises da mesma solução de tebuconazol (30 µg/mL) para avaliação da precisão do método. O algarismo subscrito não é significativo.	37
Tabela 9. Amostras analisadas em triplicata de tebuconazol: informações contidas nos rótulos e concentração do IA determinada.....	40
Tabela 10. Resultados de seis análises da mesma solução de metsulfurom-metílico (9,4 µg/mL) para avaliação da precisão do método. O algarismo subscrito não é significativo.	41
Tabela 11. Amostras analisadas em triplicata de metsulfurom-metílico: informações contidas nos rótulos e concentração do IA determinada.	43
Tabela 12. Teste de precisão para o n-nitrosoglifosato.	51
Tabela 13. Teste de precisão intermediária para n-nitrosoglifosato.....	51
Tabela 14. Testes de recuperação de NNG em amostras reais fortificadas.....	52
Tabela 15. Concentração de NNG em solução e teor de NNG nas amostras questionadas.	55

Lista de Equações

Equação 1. Fórmula do cálculo do limite de detecção utilizando-se informações da curva analítica, segundo a norma ISO 11843-2.....	38
Equação 2. Cálculo do teor de NNG na amostra.....	48
Equação 3. Curva de calibração do NNG obtida por regressão linear.	49
Equação 4. Limite de detecção calculado por meio de quatro injeções do branco. .	52
Equação 5. Limite de detecção calculado por meio do desvio-padrão da solução de calibração mais diluída.	53
Equação 6. Limite de detecção calculado por meio da relação entre desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação.	53
Equação 7. Limite de detecção calculado por meio do valor médio do sinal/ruído do branco.....	53

Lista de Abreviações e Acrônimos

[X] = concentração de X	LOD = limite de detecção
μL = microlitro	LOQ = limite de quantificação
μg = micrograma	m/m = massa/massa
ACN = acetonitrila	mAU = mili unidade de absorvância
ALS = acetolactato sintase	mg = miligrama
CG = cromatografia gasosa	min = minuto
CI = cromatografia iônica	mL = mililitro
CIAP = cromatografia iônica de alta performance	mM = milimol
CL = cromatografia líquida	nm = nanômetro
CL ₅₀ = concentração letal média	NNG = n-nitrosoglifosato
CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência	°C = graus Celsius
Cn = teor de NNG na amostra questionada	PF = Polícia Federal
CV = coeficiente de variação	pH = $-\log [\text{H}^+]$
DAD = detector de arranjo de diodos	ppm = parte por milhão
DCE = detector de condutividade elétrica	PrF = Produto Formulado
DDT = diclorodifeniltricloroetano	PrT = Produto Técnico
DIC = detector de ionização em chama	RMN = ressonância magnética nuclear
DL ₅₀ = dose letal média	RTA = refletância total atenuada
EM = espectroscopia de massa	TFAA = anidrido trifluoroacético
FT-IV = infravermelho com transformada de Fourier	TFE = trifluoroetano
GABA = Ácido gama-aminobutírico	ton = toneladas
GLY = glifosato	Tr = tempo de retenção
IA = Ingrediente Ativo	UE = União Europeia
kg = quilograma	UV = ultravioleta
K _{oc} = coeficiente de partição octanol/água	Uv/Vis = Ultravioleta / Visível
L = litro	v/v = volume/volume
	VMP = valores máximos permitidos
	λ = comprimento de onda

1. Introdução

O Brasil tem sua agricultura altamente dependente de agrotóxicos. Em 2008, tornou-se o maior mercado desses produtos no mundo, totalizando um milhão de toneladas vendidas.¹ Nesse mesmo ano, o Brasil apresentou produção agrícola recorde, com crescimento na ordem de 9% em relação a 2007, superando a marca de 150 milhões de toneladas.²

Atualmente, o Brasil é o principal destino na rota de substâncias abolidas nos demais países. De acordo com a Anvisa, várias substâncias proibidas em países da União Europeia, China, Estados Unidos, entre outros, eram usadas nas plantações brasileiras em 2008.³ Trata-se de um mercado em que há um pequeno número de vendedores para uma multidão de compradores: em 2007, as empresas *Bayer, Syngenta, Basf, Monsanto, Dow e DuPont* – consideradas as seis maiores empresas responsáveis pela produção de substâncias tóxicas voltadas para a agricultura – somavam 86% da comercialização de agrotóxicos. De acordo com o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), essas mesmas empresas controlavam 85% do mercado brasileiro em 2006.⁴ No Brasil, os 366 ingredientes ativos registrados como agrotóxicos para uso agrícola fazem parte de mais de 200 grupos químicos distintos e geram 1.458 formulações de produtos comerciais pertencentes às seguintes classes: inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas, formicidas, reguladores e inibidores de crescimento. Os herbicidas são responsáveis pela maior fatia desse mercado (48%), seguidos pelos inseticidas (25%) e fungicidas (22%).⁵

Devido aos benefícios econômicos, o comércio de agrotóxicos no Brasil tem atraído não só empresas nacionais e internacionais como também contrabandistas. Os produtos contrabandeados não são registrados por órgãos competentes brasileiros, podendo apresentar composição diferente das especificações legais, elevando os riscos relacionados ao impacto ambiental e à intoxicação humana. Somente em 2008, foram registrados cerca de sete mil casos de intoxicação humana por agrotóxicos (taxa de óbito de 3,7%), respondendo por 7,8% do total de casos de intoxicação no país.^{6,7}

1.1. Evolução temporal do uso de agrotóxicos

Há 2000 anos os romanos utilizavam resíduos de compostos inorgânicos na manutenção de estradas (herbicidas). No fim do século XVIII e início do XIX, iniciou-se a produção em maior escala de agrotóxicos em razão de formulações consideradas, na época, eficazes e seguras, como “*Paris Green*” (1865) e do dinitrofenol (1930). Os anos de 1940 a 1950 foram chamados de “Era da química” no controle de pragas, com o inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), o herbicida 2,4D e o fungicida “*Captan*”, trazendo euforia e otimismo com relação aos agrotóxicos.⁸

Descobriu-se após alguns anos que os agrotóxicos utilizados nessa época eram perigosos ao ambiente, sendo alguns extremamente tóxicos a abelhas, peixes, pássaros e passíveis de bioacumular na cadeia alimentar.⁹

Nas décadas de 60 e 70 iniciou-se um debate sobre a utilização desses compostos químicos. Rachael Carson, autora do livro *Silent Spring* (1962), teve um papel importante no que diz respeito a documentar os problemas ambientais ocasionados pelo uso intenso de inseticidas e os efeitos colaterais dos herbicidas.⁸ Um exemplo marcante foi o inseticida DDT, o qual, após serem usados mais de 2,7 milhões de toneladas, teve seu uso restrito ou banido em vários países em 1973 por apresentar malefícios ao ambiente e à saúde humana, como bioacumulação e toxicidade aos seres vivos.⁸

Desde então muitos órgãos governamentais, pesquisadores e empresas de vários países estudam os impactos ambientais e específicos de cada agrotóxico. O intuito é minimizar os malefícios relacionados ao uso indevido dessas substâncias, as quais, caso aplicadas corretamente, trazem vantagens, como maiores produções em lavouras e melhor controle de vetores de doenças.⁹

Segundo Solomon, “*É provável que as razões pelas quais as discussões sobre praguicidas continuem sejam devidas ao fato de que os benefícios do seu uso apropriado podem ser tão incomensuráveis quanto os perigos e prejuízos à saúde advindos de seu uso inadequado.*”⁸

1.2. Legislação brasileira

A Lei nº 7.802 de 1989,¹⁰ também conhecida como “Lei dos Agrotóxicos”, versa, em seu artigo 3º: “os agrotóxicos, seus componentes e afins deverão ser registrados de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de saúde, do meio ambiente e da agricultura”.

Segundo o Decreto nº 4.074¹¹ de 2002, compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) avaliar a eficiência agrônômica e fiscalizar o uso dos produtos agrícolas; ao Ministério da Saúde (MS) e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) cabe acompanhar a saúde ocupacional do trabalhador e a exposição humana ao agrotóxico por meio da avaliação toxicológica de produtos e do monitoramento dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos; de forma complementar, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) e seu órgão executivo, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (Ibama), são os responsáveis pela avaliação de possíveis impactos e efeitos dos agrotóxicos sobre o ambiente e pela definição do potencial de periculosidade ambiental dos produtos.

Ainda conforme o Decreto nº 4.074, “o registro de agrotóxicos é ato privativo do órgão federal competente, destinado a atribuir o direito de produzir, comercializar, exportar, importar e utilizar agrotóxicos, seus componentes e afins, sem prejuízo das condições de autorização de uso”. Para os agrotóxicos utilizados na agricultura, por exemplo, o registro é competência do MAPA, após anuência da Anvisa/MS e do Ibama/MMA.

O produto registrado pode ser um produto técnico (PrT) ou um produto formulado (PrF). O PrT constitui produto obtido diretamente de matérias-primas por processo químico, físico ou biológico, cuja composição apresente teor definido do ingrediente ativo (IA) e impurezas, podendo conter estabilizantes e produtos relacionados, tais como isômeros.¹² Os PrT são comumente destinados à obtenção de PrF ou de pré-misturas, sendo que somente os formulados são comercializados para uso na agricultura. Conseqüentemente, apenas os PrF entram, efetivamente, em contato com o ambiente. Informações como dados físico-químicos, dose de campo, modo de aplicação e toxicidade dos produtos comercializados são utilizadas em inúmeras avaliações de exposição a organismos não-alvo e de risco ambiental.

Os PrT, ao contrário, ficam confinados às instalações industriais, constituindo-se insumos dos processos de fabricação.¹³

Para que um novo produto, seja ele técnico ou formulado, possa ser registrado e comercializado no Brasil, é necessário o cumprimento de várias etapas de avaliação. A toxicidade destes produtos é avaliada tanto pela Anvisa quanto pelo Ibama, cada órgão atuando dentro de seu escopo de trabalho a partir de parâmetros como DL₅₀ e/ou CL₅₀, ou seja, a dose e/ou concentração, respectivamente, requerida do produto ou do IA para levar a óbito 50% de uma população de organismos teste.¹⁴

A avaliação do potencial de periculosidade ambiental de um produto, conduzida pelo Ibama, baseia-se em propriedades físico-químicas (como disposição para sofrer fotólise ou hidrólise), na toxicidade para vários organismos teste, no grau de acumulação em tecidos vivos, na persistência no ambiente e no deslocamento entre os compartimentos ambientais (solo, ar e água). Ainda são estudados os potenciais de causar mutação, câncer, teratogênese e efeitos na reprodução de aves e mamíferos.¹⁵ A avaliação final do Ibama, resultado da somatória ponderada de 19 parâmetros com diferentes pesos, enquadra o produto em 4 (quatro) classes quanto à periculosidade ambiental: Classe I – Produto Altamente Perigoso; Classe II – Produto Muito Perigoso; Classe III – Produto Perigoso; Classe IV – Produto Pouco Perigoso.¹⁶

A avaliação toxicológica realizada pela Anvisa, além de considerar a toxicidade aguda, baseia-se em alguns indicadores também avaliados pelo Ibama (mutagenicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade), além de parâmetros como danos na córnea e lesões na pele de animais testes.²⁰ O produto é enquadrado em quatro classes toxicológicas definidas pelo dado mais agravante, ou seja, o parâmetro com o enquadramento na classe de maior toxicidade. São elas: Classe I - Produto Extremamente Tóxico; Classe II - Produto Altamente Tóxico; Classe III - Produto Medianamente Tóxico; Classe IV - Produto Pouco Tóxico.¹⁷

Na avaliação desses parâmetros ecotoxicológicos, além dos ingredientes ativos, os demais componentes presentes em cada formulação, tais como adjuvantes e modificadores, são conjuntamente considerados, e a classificação toxicológica final é consequência também da identidade e da quantidade deles. A

tabela a seguir apresenta resumidamente uma classificação dos componentes mais utilizados.

Tabela 1. Classificação de adjuvantes e modificadores de utilidades em agrotóxicos.

Adjuvantes	
Classe	Objetivo
Surfactantes	Melhorar a molhabilidade, o espalhamento, a dispersão e a emulsificação da calda.
Agentes molháveis	Melhorar a miscibilidade entre formulações de pós molháveis ou pós fluidizáveis e água.
Espalhantes	Melhorar a uniformidade da cobertura da pulverização sobre a praga-alvo ou da área tratada.
Agentes condicionantes de água	Sequestrar cátions da água que, de outro modo, poderiam reagir com o agrotóxico e inativá-lo.
Concentrados oleosos	Romper o material graxo das cutículas das folhas das plantas ou de insetos e permitir maior contato do agrotóxico com o alvo.
Espalhantes adesivos	Aumentar a resistência à água da chuva ou de irrigação.
Modificadores de utilidades	
Classe	Objetivo
Agentes de tamponamento	Alterar o pH da solução de aplicação e, deste modo, melhorar a solubilidade dos agrotóxicos.
Agentes de compatibilidade	Melhorar a combinação de dois ou mais agrotóxicos ou agrotóxicos com fertilizantes.
Espessante de calda	Reduzir a deriva da aplicação através do aumento da viscosidade da calda e do tamanho da gota.

Os adjuvantes normalmente são misturados com a calda de agrotóxicos na proporção de 1% a 3% do volume total da calda (v/v). Mas existem adjuvantes recentes com concentrações muito mais baixas (0,25 a 1%).⁸

O registro de um agrotóxico também está condicionado ao cumprimento dos valores máximos permitidos (VMP) para impurezas provenientes do processo de produção de IA, conforme previsto na Instrução Normativa Conjunta nº 2 de 2008.¹⁸ Com base nesta instrução, o Ibama, a Anvisa e o MAPA disciplinaram o controle de impurezas relevantes em agrotóxicos sob a ótica toxicológica e ambiental. O controle dos VMP deve ser permanentemente atestado frente aos três órgãos registrantes enquanto durar o registro do produto.

Todo PrF registrado no Brasil apresenta um rótulo e uma bula que passaram por aprovação dos órgãos competentes e que trazem listadas frases de advertências pertinentes, juntamente com a classificação toxicológica do Ibama e da Anvisa (**Figura 1**). Além disso, nas bulas também são incluídas informações de interesse agrícola, como culturas, doses e métodos de aplicação.¹⁵ Estas informações buscam disseminar, em termos simples e acessíveis, as melhores práticas e os maiores riscos relacionados ao uso de agrotóxicos para o público em geral e, especialmente, para os agricultores.

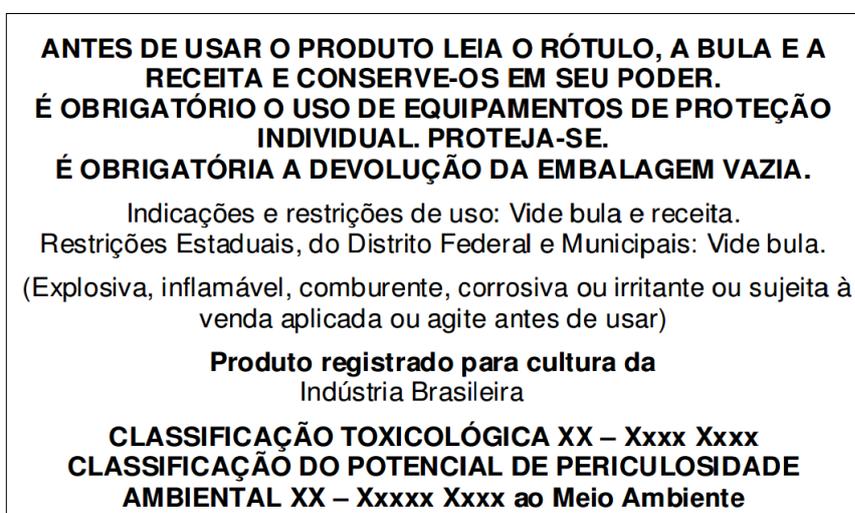


Figura 1. Parte do modelo de rótulo de agrotóxico indicado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. As classificações toxicológica e do potencial de periculosidade ambiental têm que estar listadas.¹⁹

A Lei dos Agrotóxicos e seu decreto regulamentador foram considerados, à época da publicação, um avanço sob o ponto de vista da preservação da saúde pública e do ambiente. Esta iniciativa de classificação de agrotóxicos permitiu distingui-los entre níveis de maior e menor periculosidade e toxicidade e, conseqüentemente, desestimular o uso de substâncias das classes I e II. Além disso, a legislação também restringiu o registro de novas substâncias de maior toxicidade em comparação àquelas já registradas para o mesmo fim.²⁰ Passados mais de vinte anos da promulgação da Lei 7.802 de 1989, discute-se agora a necessidade de serem inseridas ferramentas legais que garantam também os processos de avaliação de risco mais abrangentes e atuais no tocante aos efeitos dos produtos sobre a saúde humana e ao ambiente.²¹

No Brasil, a utilização de agrotóxicos ilegais é tipificada como crime¹⁰ e a conduta constitui crime ambiental.²² Já a importação do produto ilegal e/ou sem registro pode ser tipificada como contrabando²³ e envolver também sonegação fiscal.²⁴ O contrabando e a falsificação, sendo ações condenadas por lei, por definição possuem vícios, como a não padronização da composição dos produtos e a não observância dos limites de concentração preconizados pelos órgãos competentes. A baixa confiabilidade sobre a composição química apresentada nos rótulos e bulas torna-se um enorme problema, podendo-se esperar conteúdos completamente distintos, tanto com relação aos IA quanto com relação aos demais componentes. Essas duas características afetam diretamente a eficácia do agrotóxico, além de produzirem efeitos desconhecidos sobre o agricultor, sobre a cultura e/ou sobre o ambiente.

No Brasil, a aquisição legal de agrotóxicos por parte dos agricultores é condicionada à obtenção de receituário agrônomico emitido por engenheiro agrônomo ou florestal, nas respectivas áreas de competência^{10,25} ou, desde que sob supervisão destes, por técnicos agrícolas.²⁶ A emissão de um receituário agrônomico deve ser resultado de uma visita ao campo, visando identificar as características da área e, conseqüentemente, as melhores práticas de aplicação do agrotóxico selecionado.²⁷

Os agrotóxicos ilegais são adquiridos sem receituário agrônomico e, portanto, sem qualquer garantia de que exista alguma orientação quanto ao seu uso, o que contribui para o aumento dos riscos de intoxicação humana e contaminação ambiental.

Os agrotóxicos são responsáveis não só por intoxicação humana, mas também por enorme impacto ambiental. Pesquisas revelam que muitos agricultores aplicam doses acima das recomendadas pelo fabricante, imaginando que, com isso, evitam riscos associados à perda da produção. Existem também outros procedimentos inadequados, tais como a colheita antes da data prescrita ou a utilização de um agrotóxico não recomendado à cultura em questão.²⁵ A depender de sua toxicidade e do tempo que permanece disponível no ambiente (persistência), os agrotóxicos podem interferir em processos básicos de ecossistemas, tais como a respiração do solo, a ciclagem de nutrientes, o ciclo de vida de peixes ou aves, entre outros processos.¹³

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi iniciado em 2001 pela Anvisa com o objetivo de avaliar, continuamente, os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. Em 2009, o PARA monitorou 20 alimentos[†]. A escolha baseou-se em dados de consumo obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na disponibilidade destes alimentos em supermercados de diferentes Unidades da Federação e no uso intensivo de agrotóxicos sobre as respectivas culturas. Foram investigados até 234 IA diferentes, dependendo da cultura. Das 3.130 amostras analisadas pelo PARA, 907 (29%) foram consideradas insatisfatórias. O pimentão, uva e pepino foram os líderes da lista, com 80%, 56% e 55% de produtos com alguma irregularidade, respectivamente. Além disso, foram encontradas 32 amostras (4% do total) contendo IA que fazem parte de substâncias banidas ou que nunca tiveram registro no Brasil.²⁸

1.3. Objetivos do estudo

Diante de toda problemática inerente ao uso de agrotóxicos no Brasil, o estudo teve como objetivos:

- i. Compilar os dados de agrotóxicos ilegais apreendidos pela Polícia Federal e, com os resultados:
 - Identificar os estados da federação mais afetados pela prática criminosa;
 - Identificar os principais agrotóxicos ilegais no Brasil;
 - Selecionar as amostras de agrotóxicos a serem analisadas.
- ii. Determinar tebuconazol, metsulfurom-metílico e n-nitrosoglifosato em amostras de agrotóxicos ilegais e comparar os resultados com a legislação vigente.

[†] Alimentos monitorados em 2009: abacaxi, alface, arroz, banana, batata, cebola, cenoura, feijão, laranja, maçã, mamão, manga, morango, pimentão, repolho, tomate, uva, couve, beterraba e pepino.

2. Compilação dos dados de agrotóxicos ilegais apreendidos pela Polícia Federal

Como polícia judiciária da União e com atribuições de polícia de fronteiras, diversas operações da Polícia Federal envolvem ações contra organizações criminosas que fazem da importação de agrotóxicos ilegais uma atividade altamente rentável, baseando suas atividades no contrabando e sonegação de impostos e que trazem, pela disponibilização de tais produtos no mercado nacional, riscos concretos à saúde humana e ao ambiente.

A identificação dos principais agrotóxicos ilegais foi baseada em registros do Sistema de Gestão da Criminalística da Polícia Federal do Brasil, por meio da compilação dos laudos químicos periciais elaborados pela própria PF datados de janeiro de 2008 a dezembro de 2009 e que tratavam de agrotóxicos apreendidos em situações supostamente ilegais, tais como aquelas que envolviam indícios de contrabando e/ou de falsificação. Esses laudos apresentam a descrição e análise química qualitativa do produto apreendido.

Com base na compilação foram determinados quais eram os IA mais citados nos laudos periciais e o número de laudos emitidos pelas unidades de criminalística da PF em cada unidade federativa. As informações foram comparadas com dados disponibilizados pelo Ibama¹³ das substâncias comercializadas legalmente no mesmo período, possibilitando a realização de uma avaliação crítica da situação que envolve o uso de agrotóxicos ilegais no Brasil e aventar algumas das possíveis razões que podem estar impulsionando esse comércio ilegal.

Os resultados dessa compilação foram usados como base para a seleção das amostras de agrotóxicos a serem analisadas neste estudo.

2.1. Resultados da compilação

Enquanto em 2008 foram redigidos 126 laudos pela criminalística da Polícia Federal envolvendo agrotóxicos, no ano de 2009 o total foi 150, representando um incremento de 19% em um ano. Em 2008, foram analisados quimicamente, em média, 2,6 agrotóxicos por laudo (total de 327) e, em 2009, 2,2 por laudo (total de 332 agrotóxicos). Esses resultados foram apresentados na **Figura 2**, onde os estados com maior número de produtos ilegais analisados foram destacados.

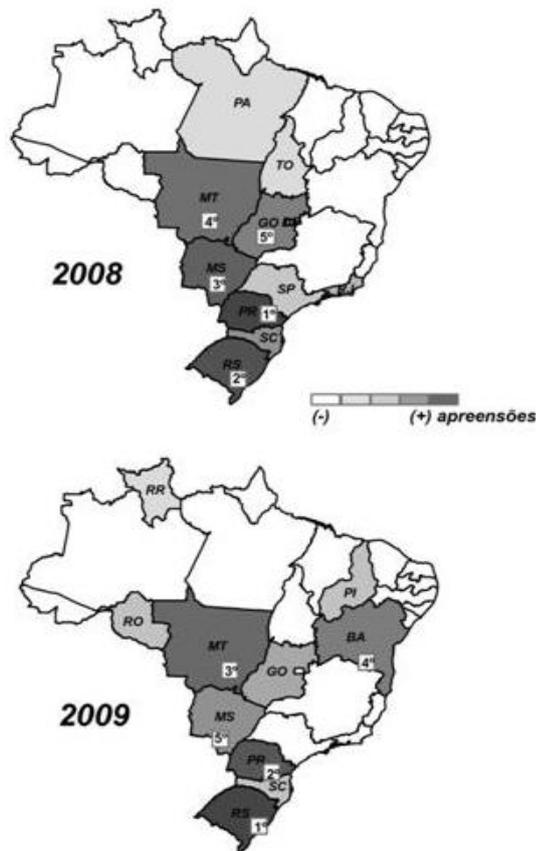


Figura 2. Estados brasileiros onde ocorreu maior número de apreensões de agrotóxicos nos anos de 2008 e 2009.

Na **Tabela 2** são apresentados a quantidade de agrotóxicos analisados por unidade federativa nos laudos de 2008 e 2009. Somente os estados do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS) demandaram mais de 70% dos laudos gerados, o que é coerente com as rotas de entrada de agrotóxicos contrabandeados mais conhecidas e divulgadas no país,^{29,30,31} e.g. “A *fronteira com o Paraguai é área de risco de confronto com traficantes de drogas e armas, além de incidência de crimes ambientais.(...) Os agrotóxicos também são um problema na fronteira tríplice Brasil-Argentina-Paraguai.*”³⁰

Tabela 2. Número de produtos analisados quimicamente reportados em laudos periciais, por unidade federativa, nos anos de 2008 e 2009.

Unidades Federativas	Número de produtos analisados			Participação no total, em %		
	2008	2009	Total	2008	2009	Total
RS	57	168	225	17,4	50,6	34,1
PR	101	79	180	30,9	23,8	27,3
MS	55	16	71	16,8	4,8	10,8
MT	41	29	70	12,5	8,7	10,6
GO	27	4	31	8,3	1,2	4,7
BA	0	25	25	0	7,5	3,8
SC	21	3	24	6,4	0,9	3,6
DF	16	0	16	4,9	0	2,4
RJ	5	0	5	1,5	0	0,8
PI	0	3	3	0	0,9	0,5
RO	0	3	3	0	0,9	0,5
RR	0	2	2	0	0,6	0,3
SP	2	0	2	0,6	0	0,3
PA	1	0	1	0,3	0	0,2
TO	1	0	1	0,3	0	0,2
Total geral	327	332	659	-	-	-

Os resultados da compilação mostram que, dependendo da solicitação do delegado ou do juiz nos contextos do inquérito policial ou ação criminal, o laudo pode, ou não, incluir a efetiva análise química dos agrotóxicos apreendidos e relatar resultados quali-quantitativos. A opção da autoridade policial ou judicial leva em conta quais artigos da legislação penal estão sendo utilizados para embasar o processo e de qual forma. Por exemplo, a venda de agrotóxicos com rótulo em língua estrangeira é proibida, tal situação pode ser considerada suficiente e a análise química não ser demandada.

Na **Figura 3** são destacados os 10 estados brasileiros com maior volume de comércio legal, considerando-se a massa por IA no ano de 2009, segundo dados do Ibama.¹³ A comparação com os IA ilegais apreendidos pela PF em 2009 (**Figura 2** 2009) indica uma coincidência razoável entre os estados mais envolvidos em apreensões de produtos ilícitos e aqueles que mais demandam agrotóxicos em atividades legais.



Figura 3. Representação dos dez estados brasileiros onde houve maior comercialização de agrotóxicos de forma legal em 2009 (adaptado).¹³

2.2. Perfil dos agrotóxicos apreendidos e analisados pela Polícia Federal

Análises químicas qualitativas foram efetivamente executadas por peritos federais em 73% de todos os laudos estudados (2008 e 2009). As principais técnicas qualitativas aplicadas na produção dos laudos foram: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta-visível (UV/Vis) e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IV) com uso de acessório de refletância total atenuada (RTA).

Algumas informações podem ser destacadas com relação aos laudos que continham resultados qualitativos, apesar de os métodos utilizados não serem multirresiduais:

- Em 10,6% das amostras a embalagem do produto não apresentava rótulo, porém foi identificada a existência de IA.
- Em 6,5% dos resultados o IA identificado diferia daquele descrito no rótulo.
- Em 1,2% dos resultados, além do IA descrito no rótulo, foram identificados um ou mais IA não descritos.
- Em 1,5% dos resultados nenhum IA foi identificado.

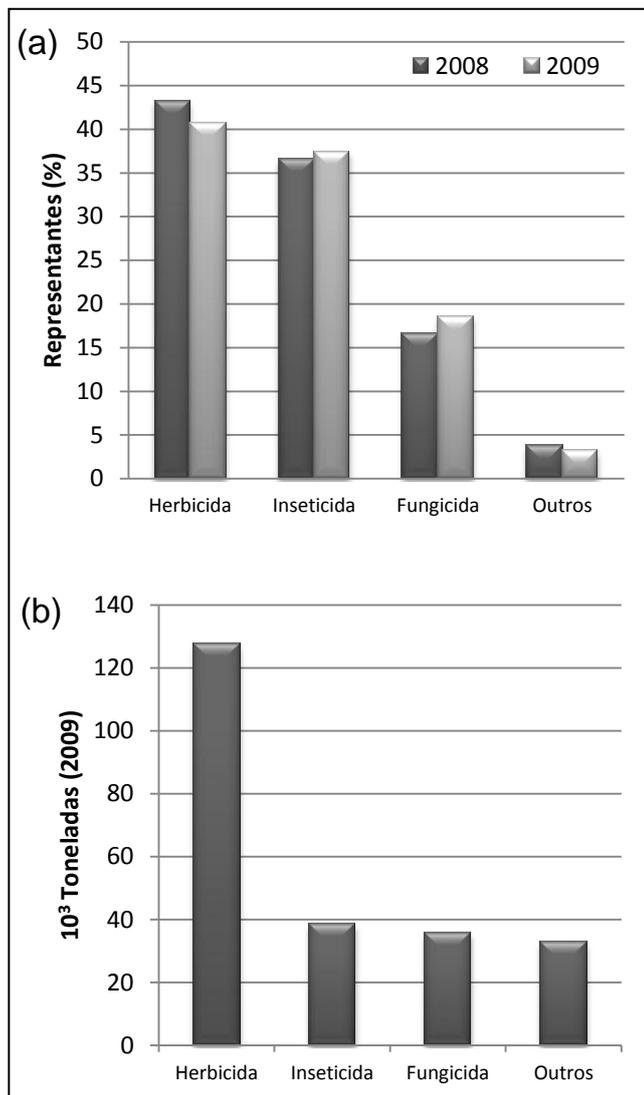
- Em 2,9% dos resultados foram identificados IA em embalagens cujos rótulos não mencionavam a presença de nenhum agrotóxico como, por exemplo, em embalagens de produtos de limpeza.

Como a quantificação dos IA não é solicitada rotineiramente para a perícia nos procedimentos da Polícia Federal, não é possível avançar na discussão sobre concentração de IA e de impurezas toxicologicamente relevantes nos produtos analisados pertencentes a essa base de dados.

2.3. Classificação dos produtos apreendidos e comparação com mercado lícito.

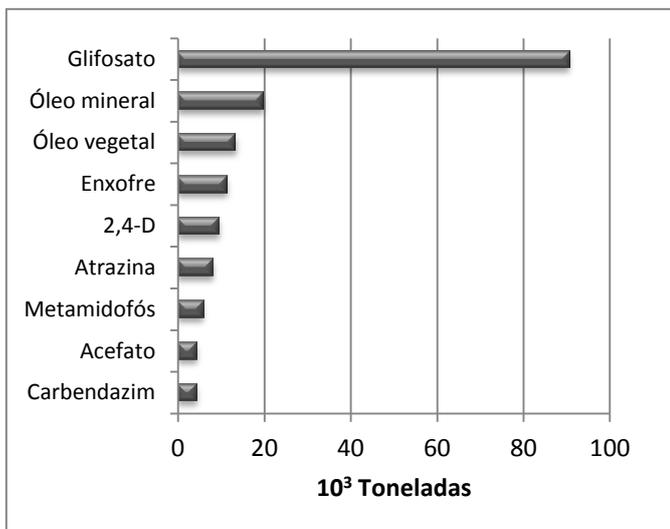
Com relação à classificação agrônômica dos agrotóxicos apreendidos em procedimentos da Polícia Federal, as formulações “herbicidas” prevaleceram, representando 43% e 41% do total de produtos examinados pela perícia nos anos 2008 e 2009, respectivamente (**Tabela 3**).

Tabela 3. (a) Classificação agrônômica dos produtos encaminhados à Polícia Federal e (b) classificação agrônômica dos produtos comercializados legalmente em 2009 (adaptado).¹³



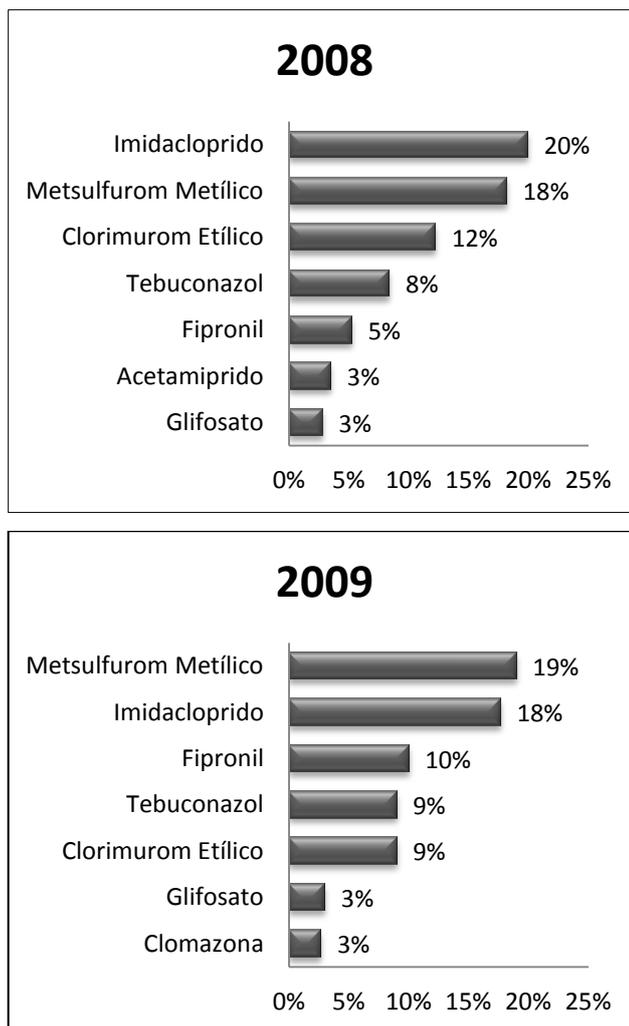
Os dados de comercialização legal também apresentam os herbicidas com o maior número de vendas, sendo que, do total comercializado (cerca de 120.000 ton), 75% (cerca de 90.000 ton) são referentes à venda de glifosato (**Tabela 4**).

Tabela 4. Ingredientes ativos mais comercializados legalmente em 2009 (adaptado).¹³



Com relação à classe dos IA apreendidos pela Polícia Federal, o estudo revelou que o inseticida imidacloprido e os herbicidas metsulfurom-metílico e clorimurrom-etílico foram os agrotóxicos mais frequentemente apreendidos entre 2008 e 2009 (**Tabela 5**). De forma comparativa, no gráfico da **Tabela 3b** são apresentados dados relativos às classes dos IA legalmente registrados e comercializados no Brasil no ano de 2009.¹³

Tabela 5. Principais ingredientes ativos analisados pela Polícia Federal em 2008 e 2009.



Nos gráficos da **Tabela 5**, são apresentados os dados relativos à identidade dos principais agrotóxicos apreendidos pela Polícia Federal em 2008 e 2009. Ao comparar esses resultados com os dados apresentados na **Tabela 4**, é possível perceber que os IA mais contrabandeados não estão presentes entre os mais comercializados legalmente[‡]. Pode-se explicar essa aparente disparidade pelo alto preço de mercado (**Tabela 6**) dos produtos à base dos IA mais apreendidos no Brasil nos procedimentos da Polícia Federal, o que poderia estar servindo de incentivo à demanda de produtos oriundos de contrabando e outras ações ilegais.

[‡] Com a exceção do glifosato, que ocupou o modesto sexto lugar em 2009 dentre os produtos apreendidos pela Polícia Federal, apesar de ser o agrotóxico mais consumido legalmente no país.

Tabela 6. Preços em 2010 das principais marcas de agrotóxicos por ingrediente ativo.³²

Produto Brasileiro (IA/Concentração)	Preço por kg ou L
Gaucho FS (Imidacloprido / 600 g/L)	R\$ 429,38
Roundup Original (Glifosato / 360 g/L)	R\$ 13,08
Ally (Metsulfurom-metílico / 600 g/L)	R\$ 1.464,00
Classic (Clorimuró Etilico / 250 g/kg)	R\$ 140,57
Folicur 200 CE (Tebuconazol / 200 g/L)	R\$ 64,83
Regent 800 WG (Fipronil / 800 g/kg)	R\$ 663,17
Mospilan (Acetamiprido / 200 g/kg)	R\$ 271,40
Gamit (Clomazone / 500 g/L)	R\$ 39,51

Apesar de nem todos os ingredientes ativos identificados na compilação serem analisados quimicamente nesse estudo, a **Tabela 7** apresenta um resumo das características toxicológicas dos IA mais contrabandeados.

Considerando os padrões analíticos, as condições e os equipamentos nos laboratórios da Polícia Federal e da Universidade de Brasília, a revisão de literatura e as análises quantitativas em agrotóxicos contrabandeados foram efetuadas somente com relação às amostras dos ingredientes ativos tebuconazol, metsulfurom-metílico e glifosato.

Imidacloprido (Inseticida)	Inseticida sistêmico do grupo das neonicotinóides, com ação de contato e ingestão que atua como uma neurotoxina, ligando-se ao receptor nicotínico da acetilcolina ³³ . Aplicado em sementes, folhas, solo, tronco de citrus e no controle de cupins. O potencial de bioacumulação e toxicidade para peixes e aves é baixo. No entanto, é altamente tóxico para abelhas. ^{34,35}	
Metsulfurom Metílico (Herbicida)	Herbicida do grupo sulfoniluréia que interfere na síntese de aminoácidos (leucina, isoleucina e valina), através da inibição da enzima ALS (Acetolactato sintase). Aplicado em pós-emergência de plantas infestantes em variadas culturas e em pré-emergência na cultura de cana-de-açúcar. Considerado pouco tóxico para organismos aquáticos, aves e mamíferos, moderadamente tóxico para abelhas e não bioacumulável em peixes. ^{36,37}	
Clorimurom Etílico (Herbicida)	Herbicida do grupo sulfoniluréia que interfere na síntese de aminoácidos (leucina, isoleucina e valina), através da inibição da enzima ALS (Acetolactato sintase). Aplicado em pós-emergência de plantas infestantes na cultura de soja. Praticamente não tóxico para aves e pouco tóxico para peixes e invertebrados. Possui potencial para bioacumulação em peixes e potencial de lixiviação em alguns solos. ^{38,39}	
Tebuconazol (Fungicida)	Fungicida sistêmico do grupo triazol que atua como inibidor da desmetilação na via metabólica do ergosterol para a biossíntese do esterol. ⁸ Utilizado em aplicação foliar e em sementes de trigo. Considerado muito tóxico para organismos aquáticos, tais como peixes, algas e microcrustáceos. ⁴⁰	
Fipronil (Inseticida)	Inseticida do grupo pirazol que atua no sistema nervoso central bloqueando o canal de cloreto regulado pelo GABA (Ácido gama-aminobutírico). Utilizado em aplicações no solo, foliar, em sementes e no controle de formigas e cupins. Altamente tóxico para abelhas e várias espécies aquáticas e bioacumulável para algumas dessas. ^{41,42}	
Glifosato (Herbicida)	Herbicida não seletivo, sistêmico e pós-emergente do grupo glicina substituída. Inibe a enzima EPSPS (5-enolpiruvil shiquimato ácido-3-fosfase sintase), responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina e triptofano). Pouco tóxico para aves e praticamente não tóxico para peixes, organismos aquáticos invertebrados e abelhas. ^{43,44}	

Tabela 7. Características relevantes do ponto de vista químico e toxicológico dos principais agrotóxicos apreendidos pela Polícia Federal em 2008 e 2009.

3. Revisão de literatura

Foram consultados artigos científicos que apresentaram métodos de análise de amostras contendo, separadamente, os analitos: tebuconazol, metsulfurometílico e n-nitrosoglifosato.

3.1. Propriedades do tebuconazol

O tebuconazol (**Figura 4**) é um sólido cristalino com odor levemente aromático. Sua solubilidade em água é de 36 mg/L a 20°C, com valores mais altos de solubilidade em solventes orgânicos polares, como acetona e diclorometano (> 200 g/L). Possui alto potencial de bioacumulação devido ao elevado valor de $\log K_{oc} = 3,70$. A molécula é persistente em solo ($t_{1/2} > 100$ dias) e em água por ser estável à hidrólise, fotólise e degradação microbiana. No entanto apresenta baixo potencial de mobilidade em solos.⁴⁵

Legalmente, o tebuconazol está no mercado brasileiro em um número grande de formulações (37 produtos - dado do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Agrofit), sendo a maioria comercializada na forma de concentrado emulsionável com 200 a 250 g/L de IA.⁴⁶

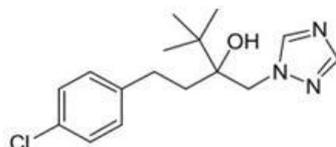


Figura 4. Fórmula estrutural do tebuconazol.

Na compilação de dados sobre agrotóxicos contrabandeados, tanto em 2008, quanto em 2009, o tebuconazol ocupou o 4º lugar como agrotóxico mais apreendido pela Polícia Federal (**Tabela 5**).

O Agrofit define as modalidades de emprego desse IA: “*aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, álamo, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, beterraba, cacau, café, cebola, cenoura, cevada, citros, cravo, crisântemo, feijão, figo, gladiolo, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêssego, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo e uva. Aplicação em sementes de trigo.*”⁴⁶

Na **Tabela 7**, apresentada na página 18, são descritas algumas características relevantes do ponto de vista químico e toxicológico dos principais agrotóxicos identificados neste trabalho, inclusive do tebuconazol.

3.1.1. Métodos de determinação do tebuconazol

A análise quantitativa de produtos técnicos e formulados não é facilmente encontrada em publicações científicas, sendo mais amplamente publicados métodos para quantificação de agrotóxicos, seus metabólitos e suas impurezas em diversas matrizes, tais como alimentos, solos e águas superficiais. Não foram encontrados métodos oficiais para determinação desse analito em produtos formulados.

Pareja *et al.* apresentaram um *review* sobre os métodos mais utilizados ao se determinar, na mesma análise, resíduos de vários agrotóxicos em arroz, dentre eles o tebuconazol. Como exemplos de equipamentos abordados neste trabalho, podem ser citados a cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa (CG-EM), a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta/visível (CLAE-UV/Vis) e equipamentos mais sofisticados, como a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa *in tandem* (CLAE-EM/EM).⁴⁷ A CG-EM utilizou-se de coluna DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e injetor *splitless* a 220 °C. Já a CLAE-UV/Vis utilizou-se de derivatização pós-coluna com dois comprimentos de onda sendo monitorados: 350 nm e 450 nm. Fase móvel por gradiente: água e acetonitrila, com fluxo de 0,75 mL/min e coluna Zorbax XDB C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna Zorbax XDB-C18 (12,5 x 4,6 mm x 5 µm).

Dessa publicação percebeu-se que é possível analisar o tebuconazol por cromatografia gasosa e líquida, com colunas cromatográficas, detectores e condições comumente utilizadas em laboratórios analíticos.

Farajzadeh *et al.* utilizaram a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC) como uma alternativa à análise do tebuconazol. Foi utilizado um cromatógrafo CG-15A Shimadzu com detector DIC a 250 °C. A separação foi realizada na coluna capilar PT-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás de arraste (na vazão de 30 cm/s) e a seguinte programação de temperatura: 100 °C (por 2 min), taxa de 15 °C/min até 250 °C permanecendo por 5 min. A injeção foi do tipo *split* com temperatura do injetor a 250 °C.⁴⁸

O método de Farajzadeh mostrou a possibilidade de ser usada a ionização em chama como detector na cromatografia gasosa para análise de tebuconazol, não sendo encontrados interferentes. Como se trata de um detector menos dispendioso que a espectrometria de massa e com sensibilidade adequada com relação ao analito (o LOD do método apresentado foi de 0,14 µg/L), o DIC pode ser visto como uma alternativa interessante para a determinação de tebuconazol.

3.2. Propriedades do metsulfurom-metílico

O metsulfurom-metílico (**Figura 5**) possui solubilidade em água de 2,8 g/L a 25 °C e é tido como pouco bioacumulável devido ao baixo valor de $\log K_{oc} = -1,74$.⁴⁹

Na compilação de dados sobre agrotóxicos contrabandeados, o metsulfurom-metílico ocupou o 2º lugar em 2008 e o 1º lugar em 2009 como agrotóxico mais apreendido pela Polícia Federal (**Tabela 5**).

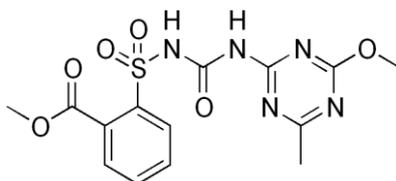


Figura 5. Fórmula estrutural do metsulfurom-metílico.

O Agrofit define as modalidades de emprego desse IA: “*aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de arroz, aveia, aveia preta, cevada, pastagens, trigo e triticales. Aplicação em pré-emergência das plantas infestantes na cultura de cana-de-açúcar.*”⁴⁶

Na **Tabela 7**, apresentada na página 18, são descritas algumas características relevantes do ponto de vista químico e toxicológico dos principais agrotóxicos identificados neste trabalho, inclusive do metsulfurom-metílico.

3.2.1. Métodos de determinação do metsulfurom-metílico

Assim como visto para o tebuconazol, a análise quantitativa de produtos técnicos e formulados não é facilmente encontrada em publicações científicas, sendo mais amplamente publicados métodos para quantificação de agrotóxicos,

seus metabólitos e suas impurezas em diversas matrizes, tais como alimentos, solos e águas superficiais. Não foram encontrados métodos oficiais para determinação desse analito em produtos formulados.

Apesar de vários métodos analíticos surgirem nos últimos anos, o mais utilizado para análise de sulfoniluréias é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV/Vis ou por espectrometria de massa.⁵⁰

Paul *et al.* publicaram sobre um método em CLAE-UV/Vis para determinação de resíduos de metsulfurom-metílico em solos. Com equipamento Hewlett Packard (series 1100) equipado com detector de arranjo de diodos, coluna Lichrospher RP-18 (250 × 4 mm x 5 µm), fase móvel 40:60 (v/v) de acetonitrila e água acidificada (0,01% ácido *o*-fosfórico), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda monitorado de 230 nm.⁵¹

A cromatografia gasosa não é utilizada para análise de sulfoniluréias por apresentarem instabilidade térmica e baixa volatilidade, porém Singh e Paul desenvolveram um método que utiliza a pré-derivatização do analito para contornar essa limitação.⁵² A derivatização em análises quantitativas é uma etapa a mais, que demanda a utilização de reagentes, de equipamentos especiais que promovem a reação *online* e maior tempo de preparação de amostra, o que são fontes de erro.

3.3. Propriedades do glifosato

O glifosato é uma substância hidrofílica (**Figura 6**) que contém vários graus de dissociação dependendo do pH (**Gráfico 1**). Sua temperatura de decomposição é de 199 °C e seu coeficiente de partição octanol/água é muito baixo, indicando baixo potencial para bioacumulação.

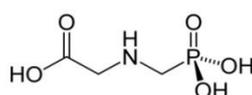


Figura 6. Fórmula estrutural do glifosato.

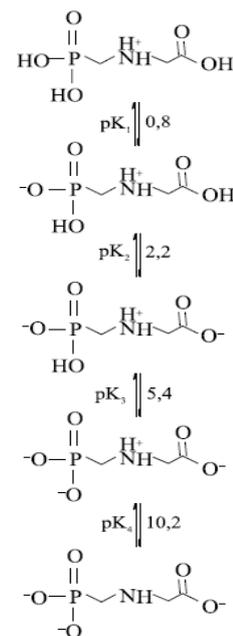
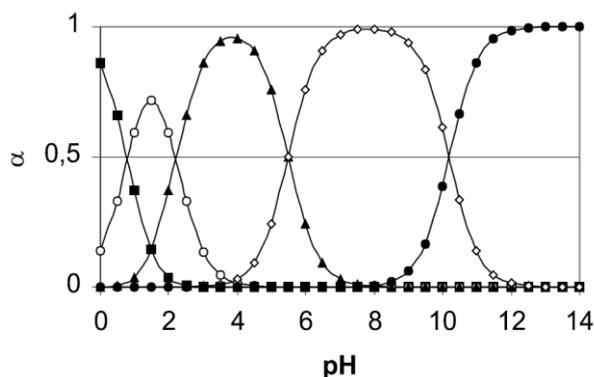


Gráfico 1. Grau de dissociação do glifosato (esquerda) construído a partir dos valores de K_a (direita). O eixo das ordenadas representa a proporção de cada estado de protonação α . (α_0 , espécie com uma protonação; α_1 , com uma dissociação; α_2 , com duas dissociações; α_3 , com três dissociações; α_4 , totalmente dissociada) – (adaptado).⁵³

O glifosato, [N-(fosfometil)-glicina], ingrediente ativo (IA) mais utilizado no Brasil, é classificado como herbicida não seletivo, sistêmico e pós-emergente.^{13,46} O seu grande uso deve-se à sua elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas, sendo pouco tóxico aos que o manipulam, além de não haver evidência de ser carcinogênico para humanos.^{53,54,55}

3.3.1. Métodos de determinação do glifosato

Entre as publicações recentes sobre o assunto, Kim *et al.* afirmam que o método mais utilizado atualmente para a separação cromatográfica do glifosato é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).⁵⁶ A detecção do analito é muito discutida na literatura, visto que essa molécula absorve radiação eletromagnética em comprimentos de onda próximos a 200 nm, dificultando o uso direto de detectores ultravioleta ou colorimétricos. Nessa faixa de comprimento de onda ocorre absorção dos gases que compõem o ar atmosférico, tornando o cromatograma ilegível se não utilizado um sistema de vácuo. A alternativa ao problema é a derivatização, tendo

como objetivo acoplar ao analito grupos cromóforos capazes de serem detectados em comprimentos de onda maiores que 215 nm.

Em determinações de glifosato por cromatografia líquida, o pH da fase móvel é importante, pois adequa o grau de dissociação do analito, possibilitando controle da carga total do íon glifosato. Essa quantidade de cargas é responsável pela maior ou menor afinidade do glifosato em forma aniônica com a coluna de troca iônica, influenciando vários parâmetros da cromatografia em si, como o tempo de retenção do analito, resolução e simetria do sinal.

O método oficial de análise de glifosato em produtos formulados da *Association of Official Agricultural Chemists International* (AOAC - 1990) utiliza as seguintes condições para cromatografia líquida: coluna de troca iônica, detector ultravioleta (195 nm), fase móvel isocrática (KH₂PO₄ e metanol em solução aquosa, ajustando o pH em 2,1 com ácido fosfórico) e fluxo de 2,3 mL/min, sem derivatização.^{57,58} Na **Figura 7** é apresentado um cromatograma obtido pelos pesquisadores com estes parâmetros, evidenciando a alta seletividade do método para o glifosato.

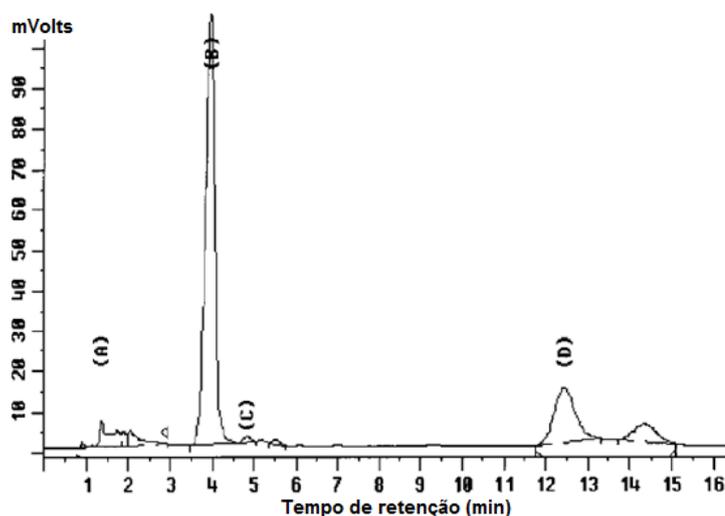


Figura 7. Cromatograma de uma amostra de produto formulado com ingrediente ativo glifosato. (A) surfactante, (B) glifosato, (C) impureza X e (D) impureza Y, composta por dois isômeros (adaptado).⁵⁸

Gavlick *et al.* (2008) sugeriram algumas alterações no método da AOAC para a determinação de glifosato: o detector entre 195 e 205 nm, com coluna iônica, fluxo de 2 mL/min, isocrático (12% metanol e 88% de 6 mM tampão fosfato, pH 2,0).

Alterações que, segundo os autores, aumentam a resolução e sensibilidade do método.⁵⁹

Yan Zhu *et al.* (1999) publicaram sobre determinação de resíduos de glifosato (GLY) em água por cromatografia iônica com detector de condutividade com supressão de íons sem derivatização. Foi utilizada coluna iônica Dionex (AS4SC), fase móvel isocrática (9 mM de Na₂CO₃ e 4 mM de NaOH) e fluxo de 1,5 mL/min, injeção de 50 µL. O método tem como vantagens a sensibilidade (limite de detecção foi de 0,042 µg/mL) e a simples preparação da amostra, que se baseia em filtragem, extração com diclorometano e concentração por meio da rotaevaporação. Na **Figura 8** é apresentado um cromatograma obtido nas condições mencionadas de uma solução padrão com baixa concentração de glifosato.⁶⁰

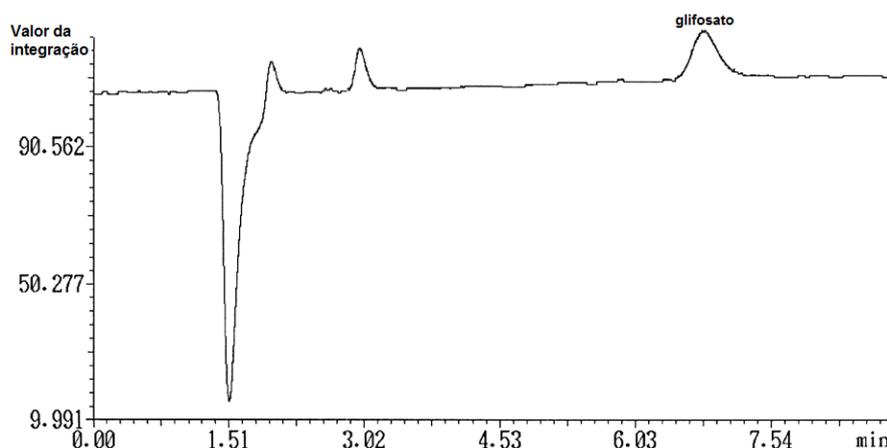


Figura 8. Cromatograma de solução padrão de glifosato (2 µg/mL) – (adaptado).⁶⁰

Já Chunyan Hao *et al.* (2011) desenvolveram um método de determinação de resíduos de glifosato em água que utiliza a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *in tandem* (CL-EM/EM) com coluna cromatográfica de fase reversa com fraca troca iônica, não sendo necessárias pré-concentração e derivatização do analito, fase móvel por gradiente com (A) 1:1 de metanol e água e (B) 300 mM de acetato de amônia em 1:1 de metanol e água - fluxo de 0,4 mL/min.⁶¹ Apesar do excelente limite de detecção (1,2 µg/L), o equipamento utilizado não é muito comum em laboratórios analíticos por ter um custo alto.

Apesar de o GLY não poder ser determinado por cromatografia gasosa devido a sua temperatura de decomposição, Adley Abreu *et al.* (2008) desenvolveram um

método de determinação de glifosato em grãos de soja utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) precedida por uma etapa de derivatização, a qual foi feita com a adição de anidrido trifluoroacético (TFAA) e trifluoroetanol (TFE), sob aquecimento a 100 °C por 1 hora (**Figura 9**). O limite de detecção obtido foi de 60 µg/L.⁶²

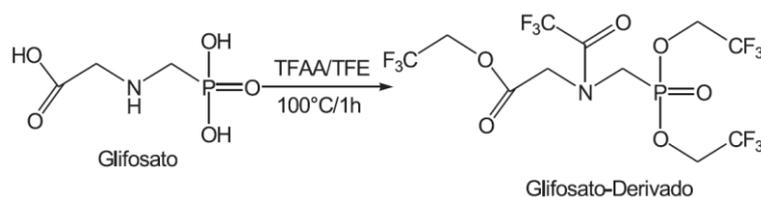


Figura 9. Derivatização do glifosato com TFAA e TFE. (Abreu, 2008 – adaptado).

Aline Silva *et al.* (2011) desenvolveram um método de determinação de glifosato em produtos formulados e em água por espectroscopia de refletância difusa. A derivatização foi efetuada com *p*-DAC, transformando o analito em um sal (**Figura 10**), para que a interação do analito com a onda eletromagnética incidida se desse em comprimento de onda maior que 220 nm, a fim de não haver interferência com o ar atmosférico. O limite de detecção foi de 7,23 µg/mL em comprimento de onda 495 nm.⁶³

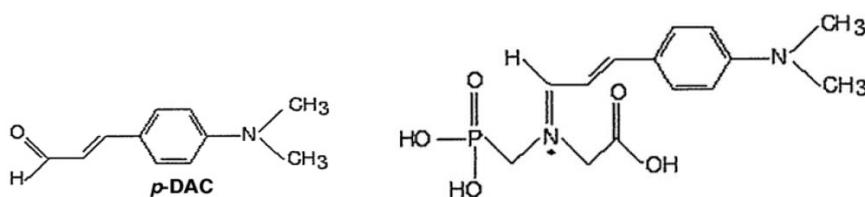


Figura 10. O reagente *p*-DAC (esquerda) e o produto cátion imínio (direita) do mecanismo proposto da reação de glifosato com *p*-DAC (adaptado).⁶³

3.3.2. N-nitrosoglifosato e suas propriedades

Existem valores máximos definidos em lei brasileira para os subprodutos toxicologicamente relevantes da síntese do ingrediente ativo para que o agrotóxico possa ser comercializado. O artigo primeiro da Instrução Normativa Conjunta número 2 de 20 de junho de 2008 define impureza relevante:¹⁸

“Art. 1º Estabelecer as impurezas toxicológica e ambientalmente relevantes a serem pesquisadas nos estudos de cinco bateladas dos produtos técnicos a base dos ingredientes ativos relacionados no Anexo I desta Instrução Normativa.

Parágrafo único. Considera-se impureza relevante:

1 - qualquer impureza identificada em bancos de dados toxicológicos que exibam efeitos teratogênicos, carcinogênicos, mutagênicos ou de alterações hormonais e danos ao aparelho reprodutor; ou

2 - qualquer impureza estruturalmente similar às substâncias ou grupos químicos listados no Anexo II, ou

3 - qualquer impureza que atue como um ingrediente ativo.”

A impureza toxicologicamente relevante da síntese do glifosato é o n-nitrosoglifosato (NNG), o qual tem limite de 0,001 g/kg (1 ppm) na lei.⁶⁴ O NNG faz parte do grupo das nitrosaminas, as quais são conhecidas por apresentarem propriedades carcinogênicas.^{65,66,67}

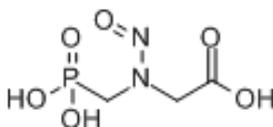


Figura 11. Fórmula estrutural do n-nitrosoglifosato (NNG).

3.3.3. Determinação do NNG em agrotóxicos à base de GLY

Sua determinação, em geral, é efetuada pelas mesmas técnicas utilizadas para o glifosato, pois suas estruturas (**Figura 6** e **Figura 11**) e propriedades químicas são semelhantes. Um exemplo é o método da FAO, órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), que utiliza CLAE com coluna iônica, fase móvel constituída de fosfato de amônio, metanol e controle do pH em 2,1 com ácido fosfórico, derivatização pós-coluna e detecção UV em 550 nm.⁶⁸

A presença do grupo nitroso, em comparação com o GLY, facilita a determinação por detectores que utilizam radiação eletromagnética sem necessidade de atmosfera especial, pois o NNG absorve radiação em aproximadamente 244 nm, enquanto o GLY absorve radiação abaixo de 215 nm.

Esse dado é fundamental para o desenvolvimento de um método que seja capaz de quantificar o NNG em amostras contendo grandes concentrações de GLY, visto que, nas colunas cromatográficas mais utilizadas, o glifosato possui tempo de retenção menor que sua impureza em cromatografia iônica.

O que torna a determinação do NNG um desafio é o fato de, em amostras de produto formulado e técnico, a concentração do glifosato ser muito superior ao do NNG, tendo como principal empecilho a co-eluição dos dois compostos. Apesar de possuírem tempos de retenção diferentes, o glifosato, em grandes concentrações, continua a eluir por vários minutos, influenciando o sinal do NNG. O pH da fase móvel é um importante parâmetro a ser controlado, pois a carga total do íon GLY e do íon NNG variam (**Gráfico 1**). Como a fase estacionária de uma coluna iônica possui sítios de íons com carga contrária ao do analito, a carga total dos íons a serem analisados influencia fortemente o tempo de retenção. Como o NNG possui o grupo nitroso e o GLY não, a interação do NNG com colunas com sítios catiônicos é maior, tendo o tempo de retenção maior que o do GLY.

Pastore *et al.* (1990), por meio de diferentes técnicas de análise (CIAP-UV/Vis, CI-DCE e RMN), reportaram sobre as características físico-químicas do NNG, inclusive sobre a presença de dois confôrmers. Na **Figura 12** estão representados os sinais que indicam dois ambientes eletrônicos para os hidrogênios da molécula em questão obtidos por RMN ^1H .⁶⁹ De acordo com *Pastore et al.*, a proporção entre as duas formas isoméricas, no equilíbrio, é aproximadamente de 60:40.

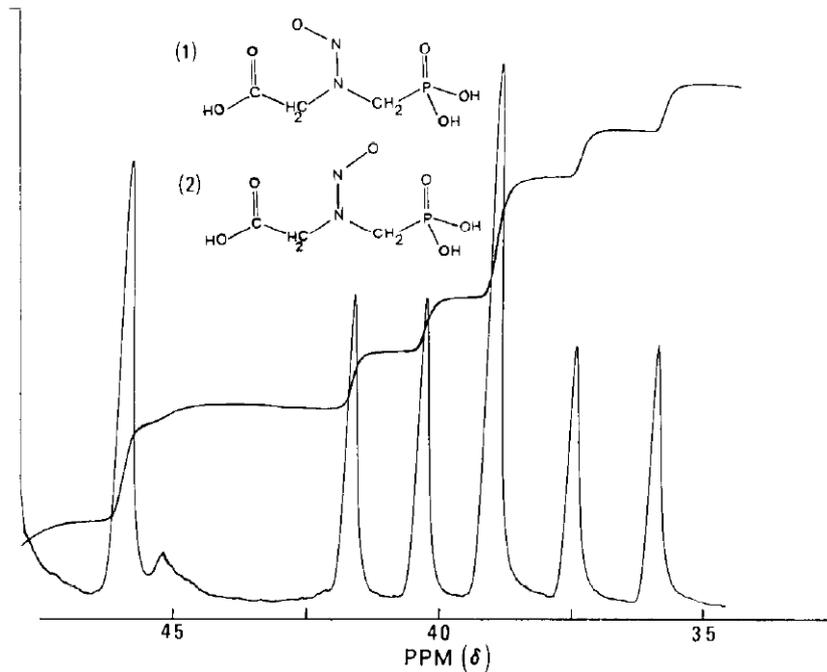


Figura 12. Espectro de RMN ¹H do NNG (adaptado).⁶⁹

Como visto, a maioria dos métodos atuais utiliza a derivatização para a análise do GLY e do NNG, ou seja, além de se utilizar reagentes, equipamentos especiais que promovem a reação *online* e mais tempo de corrida ou de preparação de amostra, é adicionada mais uma etapa passível de erros na análise. Portanto, com o objetivo de desenvolver um método simples e capaz de quantificar NNG em produtos técnicos e formulados de glifosato vários testes foram realizados visando a obtenção do método sem a utilização de equipamentos especiais e tampouco derivatização, mas que atingisse limites de detecção baixos o suficiente para comparação com a legislação vigente.

4. Parte Experimental

Amostras representativas de produtos apreendidos pela Polícia Federal foram analisadas de forma quantitativa, ampliando o escopo do presente trabalho por meio da busca de maior conhecimento quanto à efetiva concentração de ingredientes ativos dos produtos ilícitos selecionados e por meio da contribuição do presente estudo na implantação das metodologias em rotinas forenses.

4.1. Determinação de tebuconazol

4.1.1. Materiais

- Acetona 99,7% Merck;
- Balança analítica Mettler Toledo Excellence XS;
- Banho ultrassom Branson 1500;
- Filtro *Titan 2* (0,45 μm x 30 mm);
- Padrão de tebuconazol, Bayer; 97,31% - Mar/2009;
- Cromatógrafo Gasoso Agilent, modelo 6890N com injetor automático 7683B Series;
- Coluna capilar para cromatografia gasosa, tipo RXI-5Sil MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

4.1.2. Preparo das amostras

As amostras contendo o IA tebuconazol foram originadas das apreensões da PF, selecionadas a partir da compilação dos laudos de agrotóxicos emitidos em 2008 e 2009. Foram no total, para esse analito, 11 laudos periciais e 17 amostras, sendo 9 sólidas e 8 líquidas. A preparação das amostras variou de acordo com o estado físico:

- Amostras Sólidas: Foram pesados 25,0 mg da amostra, solubilizados em acetona, utilizando ultrassom por 10 minutos e completado o volume em um balão de 50 mL. Uma alíquota de 300 μL foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL e completado o volume. Ao transferir as soluções

preparadas para os *vials* de 2 mL, houve a filtragem em filtros *Titan 2* e diluição 1:1.

- Amostras Líquidas: Foram transferidos 50 µL da amostra para um balão de 10 mL, diluídos em acetona utilizando ultrassom por 10 minutos, para finalmente completar o volume do balão com acetona. Uma alíquota de 200 µL foi transferida para outro balão volumétrico de 10 mL e completado o volume. Ao transferir as soluções preparadas para os *vials* de 2 mL, houve a filtragem em filtros *Titan 2* e diluição 1:1.

4.1.3. Método analítico para determinação de tebuconazol

Na maioria dos artigos científicos encontrados na literatura, mesmo sendo para análise de traços de tebuconazol, a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama era a técnica selecionada para separação e análise desta substância. As condições do estudo sobre essa técnica foram otimizadas para que houvesse melhor separação, resolução, precisão e menor tempo de análise possível.

Utilizou-se a CG-DIC com a injeção de 1 µL de solução por divisão do fluxo (*split*), na razão 50:1 e com injetor a 200 °C. Na programação de temperatura do forno, utilizou-se a temperatura inicial de 70 °C, com incrementos de 20 °C/min até 250 °C (rampa 1); de 5 °C/min até 270 °C (rampa 2), permanecendo nesta temperatura por 5 min; e de 40 °C/min até 300 °C (rampa 3), permanecendo nesta temperatura por 3 min. O gás He foi usado como carreador, mantido em fluxo constante de 0,9 mL/min.

As soluções-padrão foram preparadas com concentrações: 2,0; 7,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 30,0 µg/mL para calibração externa por análises em triplicata, a partir da solubilização do material de referência em acetona por meio de agitação vigorosa e ultrassom por 15 minutos.

4.2. Determinação de metsulfurom-metílico

4.2.1. Materiais

- Acetonitrila (ACN) J.T.Baker grau HPLC/UV;
- Água ultra pura do sistema *Milli-Q*;
- Balança analítica Mettler Toledo Excellence XS;
- Banho ultrassom Branson 1500;
- Filtro *Titan 2* (0,45 µm x 30 mm);
- Padrão de metsulfurom-metílico, Dupon, 98,9% - Out/2011.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 com bomba quaternária, injetor automático e detector de arranjo de diodos 1100 series;
- Coluna para cromatografia líquida Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm x 5 µm);

4.2.2. Preparo das amostras

As amostras contendo o IA metsulfurom-metílico foram originadas das apreensões da PF, selecionadas a partir da compilação dos laudos de agrotóxicos emitidos em 2008 e 2009. Foram no total, para esse analito, 12 laudos periciais e 18 amostras, sendo todas sólidas. Os rótulos, em sua maioria, continham informação de concentração de 600 g/kg do IA, mas em 2 amostras não existia qualquer rótulo.

O preparo das amostras foi baseado na solubilização em solvente adequado de acordo com o procedimento a seguir: foram pesados 7,0 mg da amostra, solubilizados em 60% ACN e 40% H₂O, ultrassom por 10 minutos e completado o volume (com a mesma proporção de solventes) em um balão de 25 mL. Transferidos 892 µL dos 25 mL para um balão volumétrico de 10 mL e completado o volume (com a mesma proporção de solventes) e posterior filtragem em filtros *Titan 2*.

4.2.3. Método analítico para determinação de metsulfurom-metílico

A mesma situação ocorrida com a revisão de literatura do tebuconazol ocorreu para o metsulfurom-metílico: a maioria dos artigos científicos encontrados na literatura tratava de análise de traços de metsulfurom-metílico. A cromatografia

líquida de alta eficiência com detecção UV/Vis foi a técnica selecionada para separação e análise desta substância por ser largamente utilizada em laboratórios de análise química. As condições do estudo sobre essa técnica foram adaptadas para que houvesse melhor separação, resolução e menor tempo de análise possível.

Utilizou-se a CLAE-UV/Vis, sendo que a fase móvel consistiu de uma mistura com 40%:60% de acetonitrila:água acidificada (0,01% de ácido *o*-fosfórico) na forma isocrática, com fluxo de 1 mL/min e 10 µL de volume de injeção. O comprimento de onda selecionado no detector foi de 225 nm.

As soluções-padrão foram preparadas com concentrações 1,9; 9,4; 18,7; 28,1 e 37,5 µg/mL, para calibração externa por análises em triplicata, a partir da solubilização do material de referência na mistura ACN:H₂O na proporção de 60%:40%, por meio de agitação vigorosa e ultrassom por 15 minutos.

4.3. Determinação de n-nitrosoglifosato em matriz de glifosato

Esta etapa do projeto objetivou desenvolver um método que fosse capaz de quantificar NNG em matriz de glifosato atingindo o limite de quantificação suficiente para gerar dados de acordo com a legislação pertinente (Instrução Normativa nº 2 de 2008) e considerando as estruturas disponíveis no Instituto Nacional de Criminalística da Polícia Federal e da Universidade de Brasília. Para isso levou-se em consideração os dados reportados na literatura que visavam quantificar NNG sem necessitar da etapa de derivatização.

4.3.1. Materiais

- Acetonitrila (ACN) J.T.Baker grau HPLC/UV;
- Água ultra pura do sistema *Milli-Q*;
- Balança analítica Mettler Toledo Excellence XS;
- Banho ultrassom Branson 1500;
- Filtro *Titan 2* (0,45 µm x 30 mm);
- Ácido *o*-fosfórico - Vetec, 85%;
- NaOH - Synth, 99%;
- Na₂CO₃ - Grupo Química, 99%;

- Padrão de glifosato, Monsanto do Brasil Ltda., lote GLP-0810-19515-A, 99,8%;
- Padrão de n-nitrosoglifosato: “*glyphosate-N-nitroso mono sodium salt*”, Dr. Ehrenstorfer GmbH, lote 70307; 98,5%;
- Cromatógrafo Iônico *Metrohm 761 Compact IC* com supressor químico e detector de condutividade elétrica;
- Coluna *Metrosep A Supp 5* (150 x 4,0 mm x 5 µm);
- Coluna *Metrosep A Supp 7* (250 x 4,0 mm x 5 µm);
- Pré-coluna *Metrosep A Supp 4/5 Guard/4.0* (5 x 4,0 mm x 5 µm);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência *Agilent 1100*, com injetor automático e detector de arranjo de diodos *1100 Series*.

4.3.2. Preparo das amostras

As amostras, as quais eram produtos técnicos sólidos, foram preparadas por meio de extração de NNG, ou seja, a alíquota da amostra pesada não foi totalmente solubilizada. Porém houve o cuidado, por meio do teste de recuperação da extração que será mostrado na **Tabela 14**, de se obter uma uma porcentagem de extração de NNG aceitável. Esse procedimento impede que haja diluição excessiva do analito (no caso o NNG) e grandes concentrações de interferentes (como por exemplo o GLY) na solução, o que interferiria por saturar o detector e/ou por coeluir com o analito.

Pesou-se 2,000 g de amostra e inseriu-se 10 mL de solução alcalina - NaOH 0,1 mol/L, a fim de se obter o pH pretendido de acordo com a similaridade do GLY com o NNG e com as informações do **Gráfico 1**. A solução foi vigorosamente agitada com auxílio de bastão de vidro, posto em ultrassom por 15 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtros *Titan 2*. Testes de extração em soluções ácidas (H₂SO₄ 0,05 M) e neutras também foram efetuados, porém corridas cromatográficas preliminares de produtos desses dois modos de extração tiveram resultados visivelmente inferiores comparados à extração alcalina.

4.3.3. Métodos analíticos para determinação de n-nitrosoglifosato em matriz de glifosato

Os testes efetuados no decorrer do desenvolvimento do método para quantificação de NNG são apresentados abaixo. Primeiramente, se utilizou, item 4.3.3.1, a técnica de cromatografia de íons com detector de condutividade elétrica (CI-DCE), mas essa técnica não se mostrou sensível o suficiente. Em seguida, utilizou-se, item 4.3.3.2, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta/visível (CLAE-UV/Vis) por meio de arranjo de diodos (DAD). A forma de preparo das amostras foi a mesma para ambos os testes, já abordada anteriormente (item 4.3.2).

Em cada teste, os parâmetros e as condições das técnicas foram alterados de várias formas para atingir resolução e sensibilidade satisfatórias.

4.3.3.1. CI-DCE - Cromatografia de íons com detector de condutividade elétrica

Nesse teste, empregou-se a CI-DCE, mudando-se diversas condições experimentais, tais como:

- Troca da coluna cromatográfica *Metrosep A Supp 5 pela Supp 7*, a fim de aumentar a separação entre os sinais do GLY e NNG;
- Fluxo aumentado de 0,7 para 0,8 mL/min (respeitando o limite estabelecido pelas colunas);
- Volume de injeção de 20 a 40 µL, com o intuito de aumentar a proporção do sinal do NNG frente ao do GLY;
- Fase móvel preparada com Na₂CO₃ (entre 10 e 15 mM) e NaOH (entre 0 e 10 mM), nas seguintes proporções: 10:0; 10:10; 15:0 e 15:10 mM, respectivamente;
- Tempo de corrida de 30 a 60 min, a fim de evitar o não registro de algum componente que tenha maior afinidade pela coluna;
- Soluções contendo diversas concentrações de glifosato (10 a 40.000 µg/mL), n-nitrosoglifosato (0,1 a 10 µg/mL) e misturas dos dois analitos (10.000 µg/mL de GLY e de 0,1 a 10 µg/mL de NNG).

4.3.3.2. CLAE-UV/Vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do Ultravioleta/Visível

A coluna cromatográfica de troca iônica foi transportada da CI-DCE para a técnica de CLAE juntamente com as condições experimentais já parcialmente definidas a partir do teste com a técnica CI-DCE. O intuito era avaliar a sensibilidade do detector UV/Vis para esse analito.

Utilizou-se como fase móvel uma solução de Na_2SO_4 10 mM com NaOH 10 mM (pH aproximado de 10) na forma isocrática. O volume de injeção foi de 40 μL com fluxo de 0,8 mL/min (fluxo máximo permitido pela coluna), temperatura da coluna de 25 °C e temperatura da bandeja de *vials* de 10 °C. O detector escolhido foi o UV/Vis com DAD, pois esse seria capaz de, por meio da correta escolha do comprimento de onda (244 nm), proporcionar melhor sensibilidade para a análise. O tempo de corrida foi de 27 min (mais 5 min pós-corrida).

5. Resultados e discussão

5.1. Tebuconazol

5.1.1. Desenvolvimento do método

Avaliou-se a precisão (repetitividade) do método por meio de seis injeções de uma mesma solução de tebuconazol com 30 µg/mL (**Tabela 8**), calculando-se o coeficiente de variação (CV, %) das áreas dos picos e obtendo-se CV = 1,0%. A concentração dessa avaliação foi escolhida de acordo com a faixa de diluição esperada das amostras.

Tabela 8. Resultados de seis análises da mesma solução de tebuconazol (30 µg/mL) para avaliação da precisão do método. O algarismo subscrito não é significativo.

Análise	Concentração estimada a partir da curva (µg/mL)
1	29,3 ₆
2	29,5 ₀
3	29,3 ₄
4	29,3 ₇
5	29,1 ₆
6	29,9 ₈

O limite de detecção (LOD) foi de 1,32 µg/mL e quantificação (LOQ) de 3,95 µg/mL. O LOD e o LOQ foram calculados[‡] de acordo com a **Equação 1**, a qual estima o valor do LOD pela probabilidade a partir de informações da curva analítica. Para a melhor aplicação da **Equação 1**, o ponto mais diluído da curva de calibração deveria resultar em um sinal analítico muito pequeno a partir do equipamento (próximo do LOD). Neste estudo não houve a intenção de calcular os menores valores possíveis de LOD, pois a faixa de concentração das amostras era muito alta (produtos técnicos e formulados de agrotóxicos). Portanto, os valores calculados através desta equação são valores superestimados, mas considerados suficientes para o atual estudo.

[‡] Utilizando-se as informações da curva de calibração analítica, segundo a norma ISO 11843-2, é possível calcular o LOD e LOQ,⁷⁰ porém, como não foram feitas análises de soluções próximas do LOD, os valores calculados são maiores que o valor real.

$$LOD = a + 2t_{95,v} \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 1. Fórmula do cálculo do limite de detecção utilizando-se informações da curva analítica, segundo a norma ISO 11843-2.⁷⁰

Onde: $s_{y/x}$ é o desvio-padrão dos resíduos da curva analítica de coeficiente angular b ; n é o número de padrões utilizados na construção da curva; m o número de replicatas; \bar{y} é a média das medidas instrumentais para os padrões; \bar{x} é a média das concentrações dos padrões e x_i a concentração do padrão i ; $t_{95,v}$ é o valor tabelado da distribuição t-Student com v graus de liberdade.

A curva analítica obtida encontra-se na **Figura 13**, juntamente com um cromatograma de uma amostra real. Os componentes inertes constituintes das amostras não promoveram interferência nos cromatogramas na faixa de diluição utilizada.

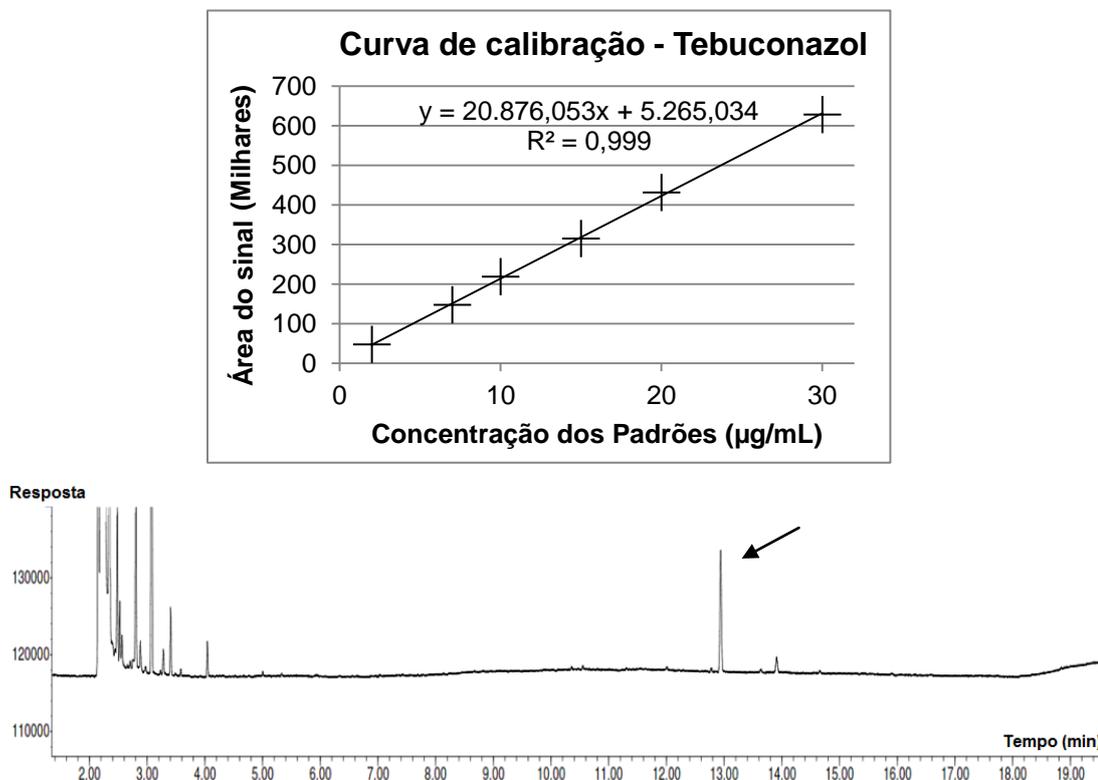


Figura 13. Curva de calibração e cromatograma de uma amostra sólida real de tebuconazol (sinal em destaque) em CG-DIC.

5.1.2. Amostras de tebuconazol

Legalmente, o tebuconazol está no mercado brasileiro em 37 produtos formulados de quinze diferentes empresas, com a concentrações do IA variáveis.⁴⁶

Os resultados obtidos nas análises químicas de amostras ilegais de tebuconazol (**Tabela 9**) evidenciam a presença de três classes principais de amostras:

- a. Amostras líquidas com concentrações nominais (nos rótulos) equivalentes às formulações vendidas no mercado nacional. Em alguns casos foram observadas divergências entre a concentração informada no rótulo e a obtida em laboratório (ex: amostras 1 e 4), mas somente uma análise mais aprofundada com utilização de réplicas e cálculos estatísticos (como por exemplo o Teste T de Student) poderia afirmar com mais segurança a magnitude das diferenças.
- b. Amostras líquidas bastante diluídas (amostras 7 e 8) e que podem representar resíduos de alguma manipulação ou de reaproveitamento de embalagens;
- c. Amostras sólidas com concentrações do IA, tanto nominais (nos rótulos) quanto evidenciadas nos resultados analíticos, acima de qualquer produto formulado registrado no Brasil, tratando-se provavelmente de produtos técnicos.

Tabela 9. Amostras analisadas em triplicata de tebuconazol: informações contidas nos rótulos e concentração do IA determinada.

Líquido			Sólido		
Nº	Rótulo (g/L)	Concentração Analítica (g/L) e desvio (n = 3)	Nº	Rótulo (g/kg)	Concentração Analítica (g/kg) e desvio (n = 3)
1	200	216,6 ± 4,6	9	800	887,4 ± 11,6
2	200	204,7 ± 0,8	10	800	884,8 ± 11,4
3	200	192,9 ± 3,0	11	800	879,7 ± 6,7
4	250	204,8 ± 4,3	12	nd	870,8 ± 11,3
5	nd	214,0 ± 3,2	13	800	870,5 ± 3,4
6	nd	118,7 ± 2,7	14	800	846,2 ± 14,7
7	nd	5,6 ± 0,0	15	800	824,3 ± 19,4
8	nd	2,5 ± 0,0	16	nd	806,1 ± 11,3
			17	800	766,6 ± 5,8

nd: não disponível. *apesar de abaixo do LOQ calculado a partir da curva de calibração, estima-se concentração da ordem de 2,4 µg/mL (amostra 8) por haver sinal analítico.

Os resultados obtidos, principalmente das amostras enquadradas no caso (c) descrito acima, revelam divergências preocupantes entre as concentrações de tebuconazol nos agrotóxicos contrabandeados e nos produtos formulados disponíveis no mercado nacional. Nesta situação, duas hipóteses podem ser formuladas: o agricultor compra de forma ilegal o tebuconazol sólido e o formula no campo (diluindo-o para obtenção de concentrações próximas das recomendadas para PrF lícitos) e/ou o agricultor aplica o tebuconazol ilegal seguindo sistemática similar à que costuma realizar na aplicação do produto nacional. Em ambas as hipóteses, as incertezas inerentes à natureza ilícita do produto levam a crer que dificilmente a quantidade de IA que chega às plantações será aquela recomendada.

5.2. Metsulfurom-metílico

5.2.1. Desenvolvimento do método

Avaliou-se a precisão (repetitividade) do sistema por meio de seis injeções de uma mesma solução de metsulfurom-metílico com 9,4 µg/mL (**Tabela 10**), calculando-se o coeficiente de variação (CV, %) das áreas dos picos e obtendo-se CV = 0,3%.

Tabela 10. Resultados de seis análises da mesma solução de metsulfurom-metílico (9,4 µg/mL) para avaliação da precisão do método. O algarismo subscrito não é significativo.

Análise	Concentração estimada a partir da curva (µg/mL)
1	9,1 ₁
2	9,0 ₉
3	9,0 ₅
4	9,1 ₃
5	9,1 ₁
6	9,1 ₄

O limite de detecção (LOD) foi de 4,94 µg/mL e quantificação (LOQ) de 14,83 µg/mL. O LOD e o LOQ foram calculados[§] da mesma maneira que foi calculado para o tebuconazol (**Equação 1**). Lembrando que os valores calculados de LOD e LOQ para o metsulfurom-metílico também estão superestimados, assim como visto para a determinação de tebuconazol, por não ter havido necessidade de se trabalhar numa faixa de concentração tão baixa, uma vez que as amostras são produtos técnicos e/ou formulados de agrotóxicos com altas concentrações.

A curva analítica encontra-se na **Figura 14**, juntamente com um cromatograma de uma solução de calibração utilizada. Os componentes inertes constituintes das amostras não promoveram interferência nos cromatogramas na faixa de diluição utilizada.

[§] Utilizando-se as informações da curva de calibração analítica, segundo a norma ISO 11843-2, é possível calcular o LOD e LOQ,⁷⁰ porém, como não foram feitas análises de soluções próximas do LOD, os valores calculados são maiores que o valor real.

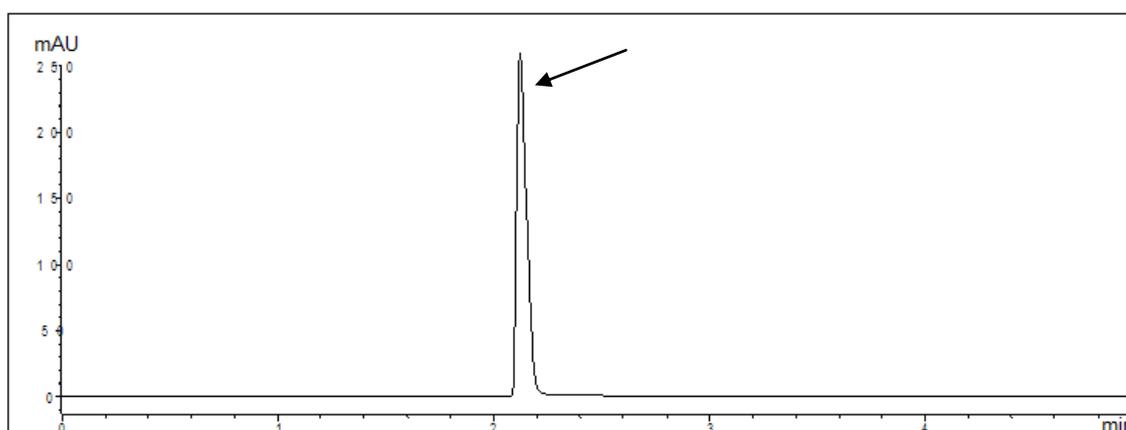
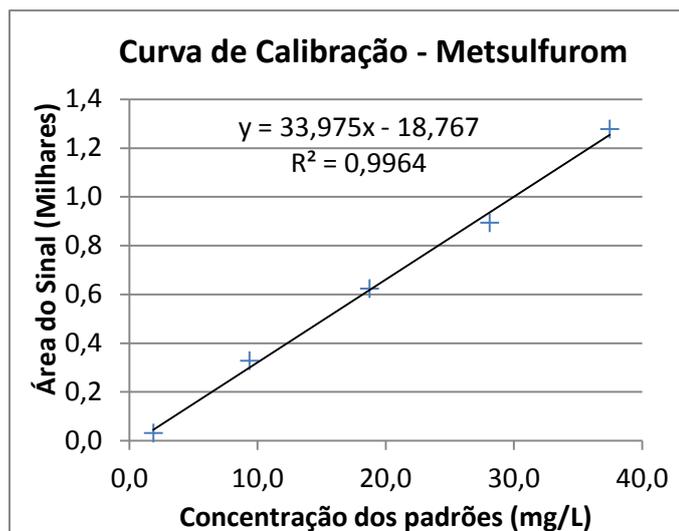


Figura 14. Curva analítica de calibração do metsulfurom-metílico juntamente com um cromatograma de um padrão (sinal em destaque) de acordo com o método utilizado.

5.2.2. Amostras de metsulfurom-metílico

Legalmente, o metsulfurom-metílico está no mercado brasileiro em apenas 6 produtos formulados (*Accurate, Ally, Metsuram, Nufuron, Wolf e Zartan*) de diferentes empresas, sendo que todos com a concentração do IA de 600 g/kg.⁴⁶

Os resultados das análises químicas (**Tabela 11**) indicam a presença de IA em concentrações reiteradamente menores do que as indicadas nos rótulos (média obtida de 337,0 g/kg e desvio padrão de 46,1 g/kg).

Tabela 11. Amostras analisadas em triplicata de metsulfurom-metílico: informações contidas nos rótulos e concentração do IA determinada.

Nº	Rótulo (g/kg)	Concentração Analítica (g/kg) e desvio (n = 3)
1	600	429,0 ± 1,0
2	600	408,8 ± 2,9
3	nd	404,8 ± 1,3
4	600	380,5 ± 0,7
5	600	379,7 ± 3,1
6	600	351,3 ± 3,1
7	600	338,9 ± 2,5
8	600	337,6 ± 0,5
9	600	334,4 ± 3,0
10	600	325,5 ± 2,6
11	600	312,3 ± 2,0
12	nd	307,3 ± 0,5
13	600	302,6 ± 0,7
14	600	301,9 ± 2,0
15	600	295,3 ± 2,8
16	600	293,2 ± 1,6
17	600	285,8 ± 3,6
18	600	277,0 ± 2,7

nd: não disponível

Nessa situação, o uso de metsulfurom-metílico contrabandeado poderia:

- a. Levar a prejuízos financeiros caso os agricultores utilizem as mesmas doses prescritas para o produto nacional, pois a perda de eficiência acarretada pelo uso de produto diluído exigiria um maior número de aplicações do agrotóxico;
- b. Impactar sobre o ambiente ou a produção da lavoura pelo uso de agrotóxico em concentrações diferentes das estudadas no procedimento de registro.

5.3. N-nitrosoglifosato em matriz de glifosato

5.3.1. Desenvolvimento e validação de método

5.3.1.1. CI-DCE - Cromatografia de íons com detector de condutividade elétrica

Inicialmente, avaliou-se o desempenho analítico da cromatografia de íons com detector condutimétrico, variando-se os parâmetros a fim de aperfeiçoar as condições experimentais visando a máxima resolução entre os sinais de GLY e NNG. Os resultados otimizados e representativos das análises efetuadas nesse equipamento são apresentados na **Figura 15**, onde é observada a boa resolução dos sinais de uma solução de NNG e GLY ambos na mesma concentração de 10 µg/mL.

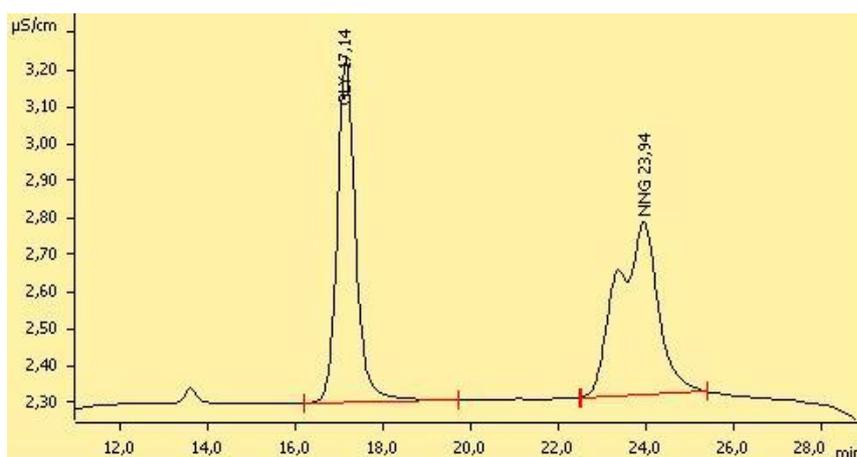


Figura 15. Cromatograma de íons com detector condutimétrico de uma solução contendo glifosato (Tr = 17,14 min) e n-nitrosoglifosato (Tr = 23,94 min), ambos na mesma concentração de 10 µg/mL.

Os testes de seletividade, os quais consistem na injeção de todos os solventes e soluções dos reagentes empregados no método, demonstraram não haver picos interferentes no tempo de retenção do NNG. Esta técnica permite a separação e detecção das substâncias de interesse com boa resolução, inclusive em uma solução preparada nas concentrações de 40.000 µg/mL de GLY e 1,0 µg/mL de NNG (**Figura 16**).

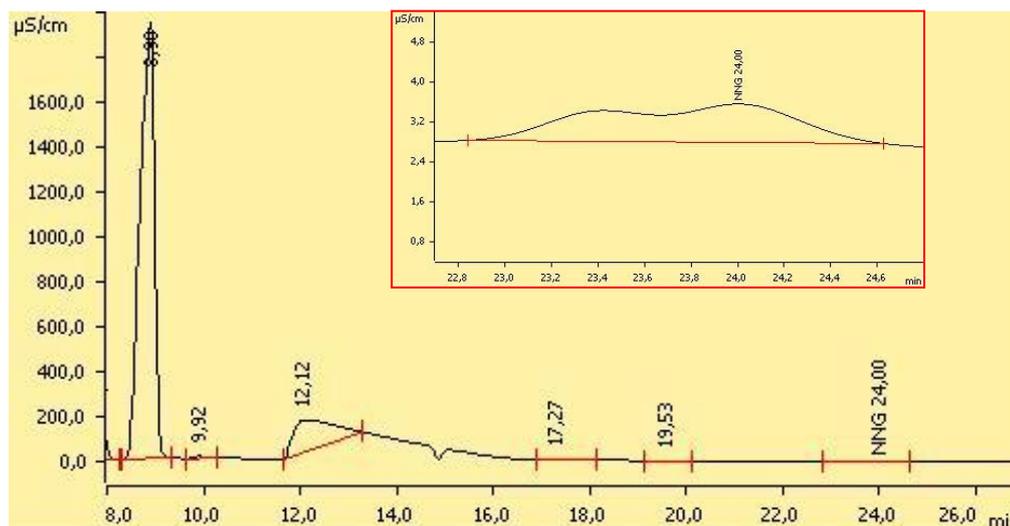


Figura 16. Espectro de cromatografia de íons com detector condutimétrico de uma solução contendo 40.000 µg/mL de glifosato (Tr = 8,90 min) e 1,0 µg/mL de n-nitrosoglifosato (Tr = 24,00 min). Em destaque a ampliação do sinal de NNG.

Como já discutido (**Figura 12**), o NNG apresenta duas conformações espaciais possíveis. Pode-se perceber nos cromatogramas acima a coeluição (aproximadamente em 24 minutos) de seus dois confôrmeros, os quais estão em equilíbrio em solução. O pH da fase móvel é importante para a constatação de um sinal para cada confôrmero no cromatograma.

Finalmente, esse método (primeiro teste) mostrou-se linear no intervalo de concentração de NNG entre 1,0 e 10,0 µg/mL, possuindo coeficiente de correlação 0,99981. Porém, apresentou o limite de detecção acima do mínimo necessário para avaliar teores de NNG em GLY, o qual a legislação brasileira limita em 0,001 g/kg. Ou seja, apesar da separação dos componentes das soluções-teste ser satisfatória, havia a necessidade de se empregar um detector mais sensível no que diz respeito ao analito em questão.

5.3.1.2. CLAE-UV/Vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do Ultravioleta/Visível

Os cromatogramas e espectros obtidos estão apresentados na **Figura 17** e na **Figura 18**, respectivamente. O comprimento de onda utilizado para a detecção ($\lambda = 244 \text{ nm}$) é seletivo ao NNG, razão pela qual o método desenvolvido permite a detecção e quantificação de NNG em amostras que contém alta concentração de glifosato, ou seja, produtos técnicos e produtos formulados. Na **Figura 18** é possível observar o sinal do GLY que termina de eluir em aproximadamente 16 min, apesar de ser praticamente invisível ao detector no comprimento de onda selecionado, demonstrando sua grande concentração na solução.

Cabe ressaltar que, tanto nos padrões quanto nas amostras, o formato dos sinais que se encontram entre os minutos 22 e 25 nas análises por CI-DCE (Teste 1 - **Figura 16**) mantiveram-se inalterados. Quando analisados por UV/Vis em CLAE, descreveram o mesmo formato e apresentaram um único espectro gerado pelo detector de arranjo de diodos (Teste 2 - **Figura 17**), o que reafirma a existência dos confômeros, assim como já anunciado por Pastore *et al.*⁶⁹

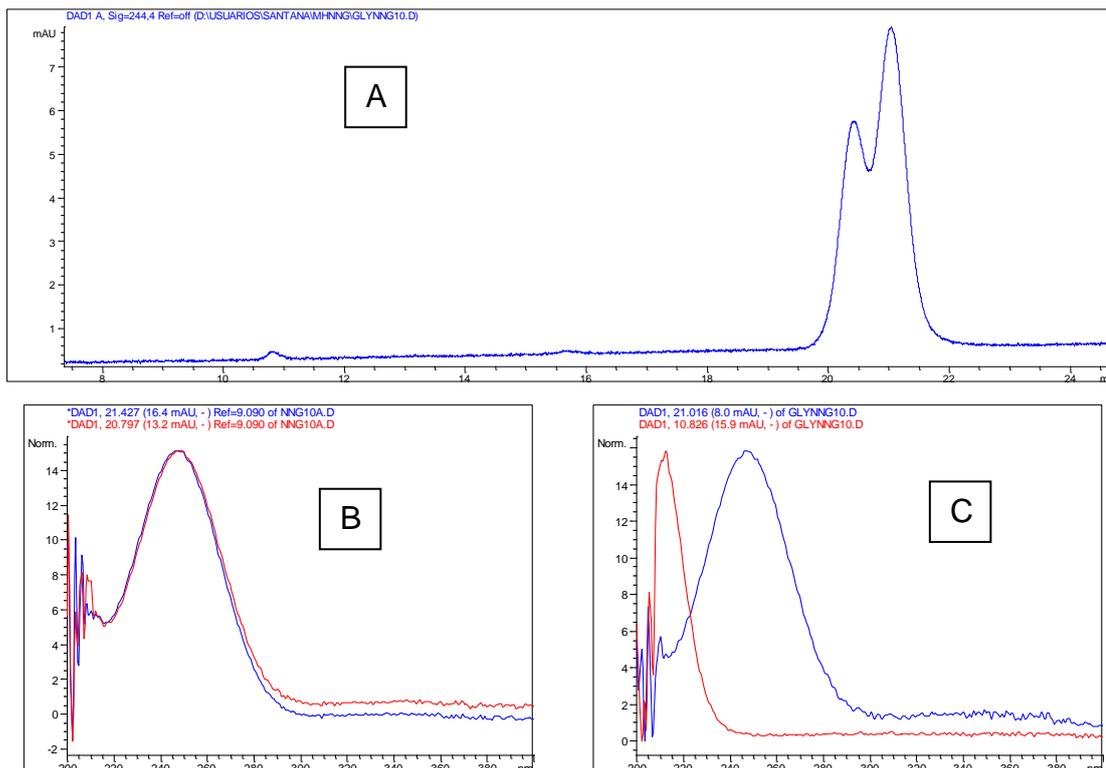


Figura 17. (A) Cromatograma de solução contendo glifosato ($Tr = 10,8$ min) e nitrosoglifosato ($Tr = 21,0$ min), ambos com a mesma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Em detalhe: (B) espectro UV/Vis dos dois sinais de NNG; (C) espectros UV/Vis de GLY (vermelho) e NNG (azul).

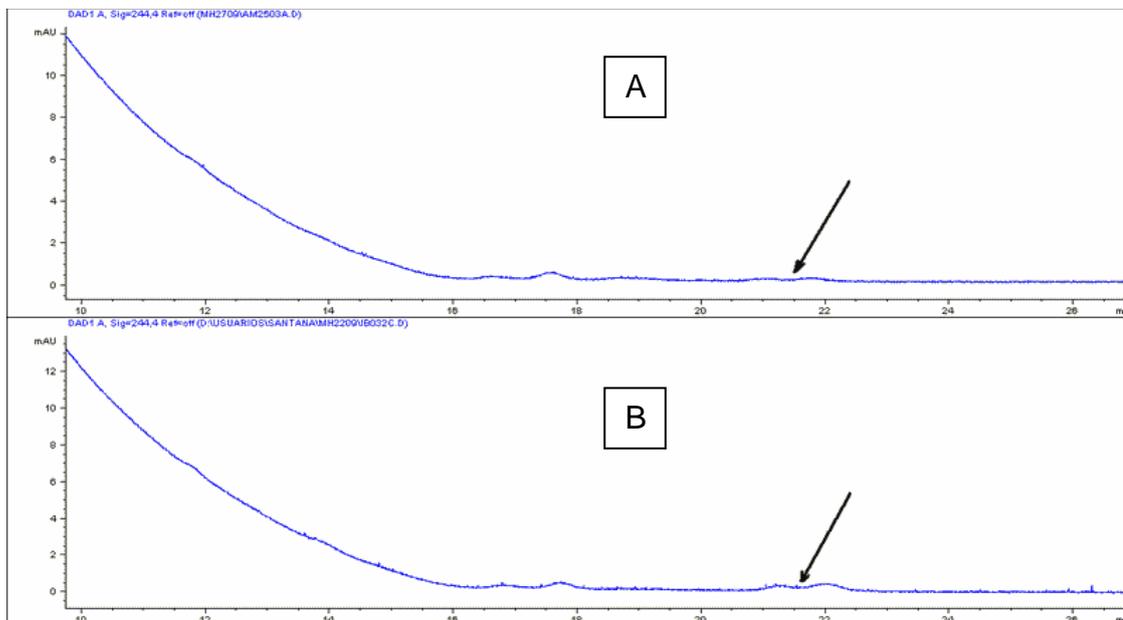


Figura 18. Cromatogramas de uma amostra questionada: (A) amostra questionada sem fortificação com NNG; (B) amostra questionada fortificada com $0,15 \mu\text{g/mL}$ de NNG. Em ambos os cromatogramas as setas destacam o sinal de NNG.

Em produtos técnicos legalmente registrados no país, deveriam ser encontrados somente o ingrediente ativo e as impurezas derivadas dos processos químicos para sua produção. Logo, a fórmula utilizada para o cálculo da concentração de NNG (**Equação 2**) leva em consideração o peso da amostra e não somente a concentração de glifosato, a fim de termos uma aproximação adequada para comparação com o conceito de “produto técnico“. Em outras palavras: como foram pesados 2,000 g de amostra, a concentração de NNG na solução determinada pelo método diz respeito a esses 2,000 g.

$$C_N = \frac{[NNG]}{[GLY]} * 10^6$$

Equação 2. Cálculo do teor de NNG na amostra.

Em que C_N é o teor de NNG na amostra em mg/kg; [NNG] é a concentração determinada de n-nitrosoglifosato em solução ($\mu\text{g/mL}$) e [GLY] é a concentração nominal de glifosato em solução ($\mu\text{g/mL}$).

5.3.1.2.a. Preparo da curva analítica

Outra constatação que influencia a análise é o fato de que altas concentrações de glifosato em solução alteram tanto o tempo de retenção do próprio glifosato quanto do n-nitrosoglifosato.^{60,69} Amostras comerciais de produtos técnicos e formulados de GLY apresentam esse ingrediente ativo em concentrações centenas de milhares de vezes superior à concentração de NNG. Portanto, optou-se por trabalhar com solução-padrão de NNG com adição de GLY visando obter maior confiabilidade analítica, simulando a matriz de GLY em amostras comerciais.⁷¹

A solução estoque de NNG foi preparada pela solubilização de 5,08 mg do padrão analítico (98,5%) em água *MilliQ* até o volume final de 10 mL, tendo como resultado uma concentração de 500,38 $\mu\text{g/mL}$.

As soluções-padrão de NNG, portanto, foram preparadas pela dissolução do padrão de glifosato em NaOH 0,1 mol/L (pH alcalino, assim como no preparo das amostras), resultando em uma solução com concentração de aproximadamente 10.000 $\mu\text{g/mL}$ (concentração de GLY escolhida de acordo com sua solubilidade em água). A curva analítica foi realizada utilizando-se essa solução, foram preparados

os níveis de NNG usados na calibração externa ($\mu\text{g/mL}$): 0,10; 0,25; 0,75; 2,00 e 4,00; os quais foram injetados em duplicata (**Figura 19** e **Figura 20**) e resultaram em uma função de calibração linear com coeficiente de correlação de 0,99998.

A função de calibração obtida por regressão linear foi:

$$A = 0,40483 + 75,40505 * [\text{NNG}] \quad r = 0,99983$$

Equação 3. Curva de calibração do NNG obtida por regressão linear.

Em que A é a área do sinal de NNG e r é o coeficiente de correlação obtido.

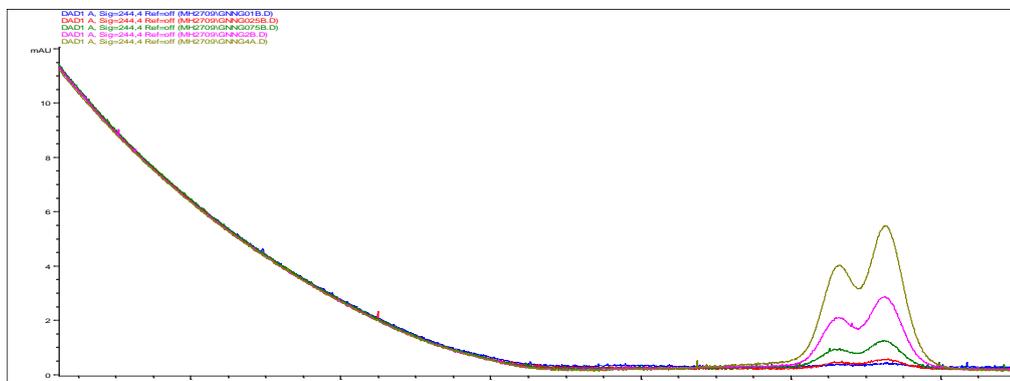


Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas das soluções de calibração de NNG (entre 0,10 e 4,00 $\mu\text{g/mL}$), em solução contendo aproximadamente 10.000 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato.

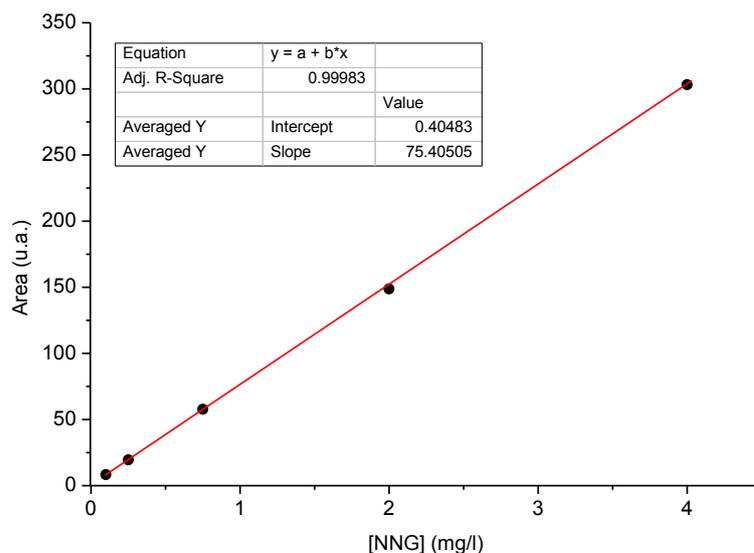


Figura 20. Curva de calibração externa de NNG, em solução contendo aproximadamente 10.000 µg/mL de GLY.

A validação do método proposto de acordo com as condições do **Teste 2** foi efetuada a partir dos seguintes parâmetros: seletividade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

5.3.1.2.b. Validação do método proposto para CLAE-UV/Vis

a) Seletividade

Foram realizadas injeções dos solventes usados nos testes: H₂O, NaOH 0,1 mol/L, H₂SO₄ 0,05 mol/L e padrões de glifosato entre 10 e 40.000 µg/mL. Em todos os testes não houve picos interferentes no tempo de retenção de NNG. Não foram feitos testes de seletividade com outras moléculas similares ao analito, pois as amostras são produtos técnicos.

b) Precisão do método (repetitividade)

Avaliou-se a precisão do método por meio de nove injeções de uma mesma solução de NNG, calculando-se o desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação (CV, %). Para um analito com concentração em torno de 1,0 mg/kg, equivalente a 0,00001% (m/m), o CV deve estar abaixo de 15% de acordo com ABNT - Validação de métodos analíticos - NBR 14029:2005.⁷¹ O método apresentou excelente repetitividade, com CV = 0,9%.

Tabela 12. Teste de precisão para o n-nitrosoglifosato.

Injeção nº	Área do sinal (u.a.)	Área média (u.a.)	CV (%)
1	64,0		
2	64,3		
3	63,7		
4	63,6		
5	62,5	63,5	0,9
6	63,0		
7	63,7		
8	63,0		
9	63,9		

c) Precisão intermediária do método

A precisão intermediária foi investigada por meio de seis determinações de uma amostra real, realizadas por dois analistas diferentes. Assim, foram preparadas seis amostras reais e cada uma foi injetada e analisada uma vez. O coeficiente de variação entre as áreas dos picos deve estar abaixo de 15% caso a concentração do analito seja cerca de 0,0001% (m/m) de acordo com ABNT - Validação de métodos analíticos - NBR 14029:2005.⁷¹ Como visto na **Tabela 13**, o método mostrou-se preciso, com CV = 5,2%.

Tabela 13. Teste de precisão intermediária para n-nitrosoglifosato.

Analista	[GLY] nominal (µg/mL)	[NNG] determinada (µg/mL)	Teor de NNG na amostra (mg/kg)	Teor médio (mg/kg)	CV (%)
1	200.000	0,131	0,655	0,653	5,23
	200.060	0,143	0,715		
	200.026	0,126	0,630		
2	199.952	0,126	0,630	0,653	5,23
	200.152	1,125	0,625		
	200.090	0,133	0,665		

d) Recuperação

Foram preparadas duas amostras reais usadas nos testes de precisão intermediária. Em cada amostra foi adicionada uma concentração definida de NNG e cada amostra foi analisada em duplicata para determinar a concentração total de NNG. Desse total, a média da recuperação (%) de NNG deve, considerando que a concentração do analito esteja abaixo de 0,1% (m/m), estar entre os limites de 75% e 125%, de acordo com ABNT - Validação de métodos analíticos - NBR 14029:2005.⁷¹

Tabela 14. Testes de recuperação de NNG em amostras reais fortificadas.

[GLY] nominal (µg/mL)	Teor de NNG na amostra (mg/kg)	[NNG] na solução (µg/mL)	[NNG] adicionada (µg/mL)	[NNG] total obtida na curva (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	Média Global (%)
199,944	0,6532	0,131	0,2	0,2983	90,12	89,73	96,87
				0,2957	89,34		
199,924	0,6532	0,131	0,4	0,5238	98,64	104,01	
				0,5808	109,38		

e) Limite de detecção e limite de quantificação

Dentre as várias formas de se avaliar o limite de detecção (LOD), efetuaram-se quatro testes distintos, com os seguintes resultados:

1. Por meio do desvio-padrão de quatro injeções do branco (solução com [GLY] ≈ 10.000 µg/mL): LOD = 0,06 µg/mL;

$$LOD = 3,3 * \frac{s}{S}$$

Equação 4. Limite de detecção calculado por meio de quatro injeções do branco.

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão

ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.⁷²

2. Por meio do desvio-padrão da solução de calibração mais diluída (injetado sete vezes): LOD = 0,05 µg/mL;

$$LOD = 3 * S_{x_0}$$

Equação 5. Limite de detecção calculado por meio do desvio-padrão da solução de calibração mais diluída.

em que S_{x_0} é o desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.⁷³

3. Por meio do desvio-padrão da equação da curva de calibração: LOD = 0,02 µg/mL. Foi calculado por meio da relação entre desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma ICH de 1996:⁷⁴

$$LOD = \frac{DP}{Inc} * 3$$

Equação 6. Limite de detecção calculado por meio da relação entre desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação.

onde: LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação; DP = desvio padrão da reta de calibração; Inc = inclinação da curva de calibração

4. Por meio do valor médio do sinal/ruído do branco (solução com [GLY] ≈ 10.000 µg/mL): LOD = 0,15 µg/mL

$$LOD = \frac{3*[NNG]_D}{S/N}$$

Equação 7. Limite de detecção calculado por meio do valor médio do sinal/ruído do branco.

onde $[NNG]_D$ é a concentração do ponto mais diluído da curva. N = altura do ruído médio do branco. S = sinal do analito.⁷⁵

Conservadoramente, assumiu-se o maior valor obtido de LOD, ou seja, $LOD = 0,15 \mu\text{g/mL}$. O limite de quantificação, LOQ, foi calculado como $LOQ = 3 \cdot LOD$, de modo que $LOQ = 0,45 \mu\text{g/mL}$.

5.3.2. Amostras de glifosato

De acordo com a **Equação 2**, ao analisar uma solução de glifosato preparada como proposto, se nela fosse determinada uma concentração de NNG menor que $0,2 \mu\text{g/mL}$, poderia se afirmar que o produto está de acordo com a lei, pois o teor na amostra seria menor que $1,00 \text{ mg/kg}$.

Desse modo, foram determinadas (**Tabela 15**), seguindo o método proposto, as concentrações de n-nitrosoglifosato de 20 amostras em duplicata e, embora estejam abaixo do LOQ, os valores são apresentados apenas como uma estimativa.

Além disso, para avaliar a exatidão dos valores, o teor de NNG de 30% das amostras (6 amostras aleatórias analisadas em duplicata) foi obtido pelo método de adição padrão, o qual consistiu em adicionar concentrações conhecidas de NNG em alíquotas das amostras ilegais para que fosse feita uma curva analítica para cada amostra. As curvas foram extrapoladas até o eixo das abscissas (concentração), obtendo o valor em módulo da concentração. Este método requer maior quantidade da amostra e maior tempo de execução e foi utilizado somente para a comparação com os dados do método desenvolvido, o qual faz a calibração externa na matriz de glifosato.

O resultado dessa avaliação por meio de adição padrão é mostrado na última coluna da **Tabela 15**, o que corrobora os valores obtidos pelo método proposto, confirmando sua eficácia em determinar se o teor de NNG está ou não de acordo com o valor máximo permitido por lei.

Tabela 15. Concentração de NNG em solução e teor de NNG nas amostras questionadas.

Análise	[GLY] nominal (µg/mL)	[NNG] média (µg/mL) e desvio (n = 2)	Teor de NNG na amostra, C _N , (mg/kg)	Teor de NNG determinado por adição padrão (mg/kg)
1	199.967,0	0,068	0,34	0,14
2	200.020,0	0,050	0,25	---
3	200.079,0	0,120	0,58	0,64
4	199.953,0	0,064	0,32	0,42
5	200.090,0	0,060	0,30	---
6	199.959,0	0,100	0,49	0,62
7	200.093,0	0,070	0,35	---
8	199.985,0	0,077	0,38	---
9	200.007,0	0,110	0,53	---
10	200.087,0	0,130	0,65	---
11	199.989,0	0,072	0,36	---
12	200.042,0	0,077	0,38	---
13	200.085,0	0,060	0,30	---
14	199.960,0	0,055	0,28	0,26
15	200.000,0	0,060	0,30	---
16	200.001,0	0,058	0,29	---
17	199.998,0	0,070	0,35	---
18	200.041,0	0,060	0,30	---
19	200.024,0	0,057	0,29	---
20	200.076,0	0,100	0,50	0,70

Comparada com as técnicas citadas na literatura, a CLAE-UV/Vis é comumente encontrada nos laboratórios, visto que se trata de uma técnica de separação e detecção abrangente, justificando, assim, sua maior utilização na determinação de glifosato e suas impurezas.

O método de quantificação de NNG em amostras de glifosato desenvolvido neste trabalho permite determinar se uma amostra de glifosato contém um teor de n-nitrosoglifosato igual ou superior ao limite estipulado pela legislação de 0,001 g/kg, sem necessidade da etapa de derivatização, a qual faz parte do método oficial para quantificação de n-nitrosoglifosato.

6. Conclusões finais

Os dados obtidos através do levantamento dos laudos periciais da criminalística da Polícia Federal dos anos de 2008 e 2009 apontaram os ingredientes ativos imidacloprido, metsulfurom-metílico, clorimurom-etílico, tebuconazol, fipronil, acetamiprido, glifosato e clomazona como os principais contrabandeados no período. Esses produtos ilegais apresentam formulações que não passaram pela aprovação dos órgãos federais responsáveis pelo registro e controle e não possuem garantias quanto à eficiência e à composição, nem mesmo da concentração do IA. Além disso, apresentam rotineiramente rótulos e bulas incompletos e/ou em língua estrangeira, incrementando ainda mais o potencial perigo em suas utilizações, tanto quando se considera o risco para o ambiente, quanto para a saúde dos trabalhadores rurais.

Os resultados obtidos nas análises químicas de amostras ilegais de tebuconazol evidenciaram algumas amostras líquidas muito diluídas e amostras sólidas com concentrações desse IA acima de qualquer produto formulado registrado no Brasil. Já os resultados da análise das amostras contendo metsulfurom-metílico indicam a presença desse analito em concentrações reiteradamente menores do que as indicadas nos rótulos. As divergências entre as concentrações desses ingredientes ativos nos agrotóxicos ilegais e nos devidamente registrados são preocupantes.

O método de quantificação de n-nitrosoglifosato em amostras de glifosato, desenvolvido neste trabalho, permite determinar se uma amostra de GLY contém um teor de NNG igual ou superior ao limite estipulado pela legislação de 0,001 g/kg, sem necessidade da etapa de derivatização. Ou seja, o método permite maior praticidade e menor custo para essa determinação em comparação com os encontrados na literatura.

Os danos econômicos relativos à utilização de agrotóxicos ilegais podem ser desastrosos, visto que tais formulações são passíveis de apresentar eficiência agrônômica menor ou diversa da esperada para um produto legalizado e supostamente similar ao irregular, além de não gerarem o devido recolhimento de impostos.

Para o cidadão e consumidor brasileiro, a existência de alimentos produzidos em lavouras que utilizam produtos agrotóxicos obtidos por vias ilegais acaba

gerando uma série de riscos à saúde pública, tais como (1) as concentrações residuais dos IA utilizados podem estar acima do legislado; (2) impurezas toxicologicamente relevantes podem estar presentes; (3) adjuvantes e outros inertes não permitidos podem aparecer como resíduos.

Conhecer em detalhes o conteúdo de um agrotóxico contrabandeado e, especificamente, reconhecer o quanto este conteúdo difere de produtos legalizados e dos dados apresentados nos rótulos e bulas, é essencial para trazer à tona os riscos envolvidos no uso de produtos ilegais, amparando e orientando políticas públicas de repressão, saúde e educação.

7. Bibliografia

¹Valor Econômico; *Uso de defensivos bate recorde no país*, 2010. <http://www.valor.com.br/arquivo/822661/uso-de-defensivos-bate-recorde-no-pais> - Acessado em abril de 2012.

²IBGE; *Levantamento sistemático da produção agrícola pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil*, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Brasília, 2010.

³Anvisa; *Reavaliação de agrotóxicos: 10 anos de proteção a população*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2009. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/020409.htm> - Acessado em abril de 2012.

⁴Pelaez, V.; *Monitoramento do Mercado de Agrotóxicos - Observatório da indústria de agrotóxicos*. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária e UFPR - Universidade Federal do Paraná, 2010. <http://www.memorialapodi.com.br/biblioteca/agrotoxicos-nacional/docs/Apresentacao%20,%20Monitoramento%20do%20Mercado%20de%20Agrotoxicos%20,%20Victor%20Pelaez%20,%202011.03.2010.pdf> – Acessado em abril de 2012.

⁵Londres, F.; *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*, Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa (AS-PTA), p. 190; ISBN 978-85-87116-15-4, 2011.

⁶FIOCRUZ; *Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento*, Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, 2010.

⁷FIOCRUZ; *Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região*. Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, 2010.

⁸Solomon, K.R.; Stephenson, G.R.; Correa, C.L.; Zambrone, F.A.D.; *Praguicidas e o Meio Ambiente*, 1º ed., ILSI Brasil: São Paulo, 2010.

⁹Casida, J. E.; *The Greening of Pesticide–Environment Interactions: Some Personal Observations, Environmental Health Perspectives*, 120:487-493, 2012. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1104405> - Acessado em maio de 2012.

¹⁰Brasil. *Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989*: Brasília, 1989.

¹¹Brasil. *Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002*: Brasília, 2002.

¹²Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. M.; *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. Rima; Intertox: São Paulo, 2004.

¹³IBAMA; *Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009*, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Brasília, 2010.

-
- ¹⁴Pimentel, L. C. F.; Chaves, C. R.; Freire, L. A. A.; Afonso, J. C.; *O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado*, *Química Nova*, 29, 5, 2006.
- ¹⁵IBAMA; *Manual para Requerimento de Avaliação Ambiental: Agrotóxicos e afins*, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Brasília, 2009.
- ¹⁶IBAMA; *Portaria Normativa nº 84 de 15 de outubro de 1996*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Brasília, 1996.
- ¹⁷MS; *Portaria nº 03/MS/SNVS de 16 de janeiro de 1992*, Ministério da Saúde: Brasília, 1992.
- ¹⁸Brasil; *Instrução Normativa Conjunta nº 2 de 20 de junho de 2008*: Brasília, 2008.
- ¹⁹MAPA; *Manual de Procedimentos, Capítulo III – Modelo de Bula e Rótulo*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas, Coordenação-Geral de Agrotóxicos e afins - http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegeta/agrotoxicos/Modelo%20Bula%20e%20R%C3%B3tulo%20abril%20de%202011.pdf - Acessado em julho de 2012.
- ²⁰Garcia, E. G.; Bussacosi, M. A.; Fischerrii, F. M.; *Rev. Saúde Pública*, 39, 5, 2005.
- ²¹Portal Brasil; *Anvisa propõe novas exigências para registro de agrotóxicos*, 2011. <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/01/28/anvisa-propoe-novas-exigencias-para-registro-de-agrotoxicos> - Acessado em abril de 2012.
- ²²Brasil. *Lei nº. 9.605 de 12 de fevereiro de 1998*: Brasília, 1998.
- ²³Brasil. *Decreto-Lei nº. 2.848 de 07 de dezembro de 1940*: Rio de Janeiro, 1940.
- ²⁴Brasil. *Lei nº. 7.492 de 16 de julho de 1986*: Brasília, 1986.
- ²⁵CPQBA; *Agrotóxicos: Análises de Resíduos e Monitoramento*, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas: Campinas, 2006.
- ²⁶CONFEA; *Resolução nº344 de 27 de julho de 1990*, Conselho Federal de Engenharia, Arquitetura e Agronomia: Brasília, 1990.
- ²⁷EMBRAPA; *Sistemas de Produção*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Brasil, 2011.
- ²⁸Anvisa; *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) – Relatório de atividades de 2009*.
- ²⁹IBAMA; *Revista Ibama – Uma janela para a informação ambiental Ano II – nº 03*, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Brasília, 2008.

³⁰IBAMA; *Revista Ibama – Uma janela para a informação ambiental Ano II – n° 02*, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis: Brasília, 2007.

³¹SINDAG e ANDAV; *Informações e Roteiro de Procedimentos para Fiscalização de Agrotóxicos Ilegais*. Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola e Associação nacional dos distribuidores de insumos agrícolas e veterinários: São Paulo, 2006.

³²IEA; *Preços agrícolas do ano 2010 no mês de abril*, Instituto de Economia Agrícola: São Paulo, 2010.

³³Moino, A. Jr; Alves, S. B.; *Efeito de imidacloprid e fipronil sobre Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. e Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de Heterotermes tenuis (Hagen)*. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27, 4, 1998.

³⁴GPO; *Imidacloprid: Pesticide Tolerances for Emergency Exemptions*, Government Printing Office: United States of America, 2005.

³⁵EPA; *Pesticide News Story: EPA Issues Registration Review Final Work Plan for Imidacloprid*. United States Environmental Protection Agency: Washington, 2009.

³⁶EPA; *Pesticide Fact Sheet Number 71: Metsulfuron-methyl*. United States Environmental Protection Agency: Washington, 1986.

³⁷EXTOXNET; *Metsulfuron-methyl*, Extension Toxicology Network: United States of America, 1993.

³⁸OMAFRA CropIPM; *Herbicides: Chlorimuron-ethyl*. Ministry of Agriculture Food & Rural Affairs, Crop Integrated Pest Management: Ontario, 2009.

³⁹PMEP; *Chemical fact sheet for: Chlorimuron Ethyl*, Pesticide Management Education Program: Ithaca, 1986.

⁴⁰US/EPA; *Memorandum Tebuconazole*. United States Environmental Protection Agency: Washington, 2006.

⁴¹Manrique, W. G.; *Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guaru (Poecilia Reticulata) e dissipação no ambiente aquático*. Universidade Estadual Paulista (UNESP): São Paulo, 2009.

⁴²Cal/EPA; *Environmental Fate of Fipronil*. California Environmental Protection Agency: California, 2007.

⁴³PAN; *Glyphosate - Identification, toxicity, use, water pollution potential, ecological toxicity and regulatory information*. Pesticide Action Network Pesticide Database Chemicals: San Francisco, 2010.

-
- ⁴⁴Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikorski, J. A.; *Glyphosate's Molecular Mode of Action*. In *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society: Washington 1997.
- ⁴⁵PMRA; Regulatory Note REG2006-11, Pest Management Regulatory Agency: Canada, 2006.
- ⁴⁶Agrofit; Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons - Acessado em março de 2012.
- ⁴⁷Pareja, L; Fernandez-Alba, A.R.; Cesio, V.; Heinzen, H.; *Analytical methods for pesticide residues in Rice*. Trends in Analytical Chemistry, v. 30, No. 2, 2011.
- ⁴⁸Farajzadeh, M. A.; Bahram, M.; Jafary, F.; Bamorowat, M.; *Combination of Extraction by Silylated Vessel-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction as a High-Enrichment Factor Technique: Optimization and Application in Preconcentration of Some Triazole Pesticides from Aqueous Samples Followed by GC-FID Determination*. Chromatographia, v. 73, p. 393-401, 2011.
- ⁴⁹FAO; *Specifications and Evaluations for Plant Protection Products: Metsulfuron methyl*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/metsulfu.pdf> - Acessado em abril de 2012.
- ⁵⁰Lian, H.Z.; Zhang, W.B.; Jiang, Q.; Mias, J.; *Simultaneous determination of metsulfuron-methyl, chlorsulfuron and bensulfuron-methyl in various formulations of sulfonyleurea herbicide by HPLC-UV detection*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 19, p. 207–217, 1996.
- ⁵¹Paul, R.; Sharma, R.; Kulshrestha, G.; Singh, S. B.; *Analysis of metsulfuron-methyl residues in wheat field soil: a comparison of HPLC and bioassay techniques*. Pest Management Science, v.65(9), p. 963-968, 2009.
- ⁵²Singh, S. B.; Paul, R.; *Gas Chromatographic Method for Residue Analysis of Metsulfuron Methyl from Soil*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 86, p. 149–151, 2011.
- ⁵³Amarante, O. P. A. Jr.; Santos, T. C. R. *Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação*. Química Nova, v. 25, p. 589-593, 2002.
- ⁵⁴Chang, F.-C.; Simcik, M.; Capel, P.; *Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere*. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 30, p. 548–555, 2011.
- ⁵⁵WHO; *Glyphosate and AMPA in drinking-water*, World Health Organization, 2005. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/glyphosateampa290605.pdf - Acessado em agosto de 2011.

-
- ⁵⁶Kim, M.; Stripeikis, J.; Iñón, F.; Tudino M.; *A simplified approach to the determination of n-nitroso glyphosate in technical glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection*. *Talanta*, 1054–1058, 2007.
- ⁵⁷AOAC-Cipac; Method 284/tc/(m)/3, Cipac 1c, p.2132, AOAC 983.10, 1990 e AOAC-Cipac Method 284/sg/(m)/3, Cipac H, p. 182, AOAC Official Method 996.12, Association of Analytical Communities, 1997.
- ⁵⁸Morlier, L. W.; Tomkins, D. F.; *Liquid chromatographic determination of glyphosate in water-soluble granular formulations: collaborative study*. *Agricultural Materials*, 1996.
- ⁵⁹Gavlick, W. K.; Tomkins, D. F.; *An updated liquid chromatographic assay for the determination of glyphosate in technical material and formulations*. Association of Analytical Communities International, v. 91, n. 1, 2008.
- ⁶⁰Zhu, Y.; Zhanga, F.; Tongb, C.; Liub, W.; *Determination of glyphosate by ion chromatography*. *Journal of Chromatography A*, n. 850, p. 297–301, 1999.
- ⁶¹Hao, C.; Morse, D.; Morra, F.; Zhao, X.; Yang, P.; Nunn, B.; *Direct aqueous determination of glyphosate and related compounds by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode column*. *Journal of Chromatography A*, n. 1218, p. 5638–5643, 2011.
- ⁶²Abreu, A. B. G.; Matta, M. H. D. R.; Montagner, E.; *Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja*. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 5–9, 2008.
- ⁶³Silva, A.S; Fernandes, F.C.; Tognolli, J.O.; Pezza, L.; Pezza, H.R.; *A simple and green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy*. *Spectrochimica Acta*, v. a, n. 79, p. 1881-1885, 2011.
- ⁶⁴MAPA; Diário Oficial. nº 120 – de 25/06/08, p.4, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008. <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=4&data=25/06/2008> - Acessado em agosto de 2011.
- ⁶⁵Jakszyn, P.; González, C. A.; *Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence*. *World Journal of Gastroenterology*. 12(27): 4296-4300, 2006.
- ⁶⁶Lijinsky, W.; *N-Nitrosamines as Environmental Carcinogens*. Chapter 10, pp 165–173, Chemical Carcinogenesis Program, NCI Frederick Cancer Research Center, Frederick, 1979.
- ⁶⁷Bowman, M.C.; *Handbook of carcinogens and hazardous substances; chemical and trace analysis*. Marcel Dekker Inc, p. 750, 1982.

⁶⁸FAO; Specifications and evaluations for plant protection products: N-nitrosoglyphosate, Food And Agriculture Organization of the United Nations, 2011. http://www.fao.org/ag/aqp/agpp/pesticid/specs/docs/pdf/new/d+e/n_glypho.pdf - Acessado em setembro de 2011.

⁶⁹Pastore, P.; Lavagnini, I.; Boaretto, A.; Magno, F.; *Ion chromatographic determination of n-nitrosoglyphosate in a glyphosate matrix*. Analytica Chimica Acta, 29-34, 1990.

⁷⁰ISO 11843-2; *Capability of detection*; International Standards for Organization: Geneva, Switzerland; 2000.

⁷¹ABNT; *Validação de métodos analíticos* - NBR 14029:2005. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2^a ed, 2005.

⁷²Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C; *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

⁷³Reto, M.; Figueira, M. E.; Filipe, H. M.; Almeida, C. M. M.; *Teor de fluoretos em infusões de chá verde (Camellia sinensis)*. Química Nova, v.31, n.2, 2008.

⁷⁴ICH; *Topic Q2B - Validation of Analytical Procedures: Methodology, Proceedings of the Commission of the European Communities*. International Conference on Harmonisation, 1996.

⁷⁵Brito, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; *Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão*. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 129-146, 2003.