

VANESSA HELOISA FERREIRA DE FARIA

**GLIFOSATO: DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO EM
SOJA E MILHO E AVALIAÇÃO DE
PARÂMETROS LABORATORIAIS EM
TRABALHADORES EXPOSTOS A
AGROTÓXICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luci Maria Sant'Ana Dusse

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Leiliane Coelho André

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

F224g Faria, Vanessa Heloisa Ferreira de.
Glifosato: desenvolvimento de metodologia para determinação em soja e milho e avaliação de parâmetros laboratoriais em trabalhadores expostos a agrotóxicos / Vanessa Heloisa Ferreira de Faria. – 2013.
130 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse.
Co-orientadora: Profa. Dra. Leiliane Coelho André.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Glifosato – Teses. 2. Produtos químicos agrícolas – Teses. 3. Herbicidas – Teses. 4. Espectrometria de Massas – Teses. 5. Cromatografia líquida – Teses. 6. Trabalhadores rurais – Teses. 7. Toxicologia ambiental – Teses. 8. Toxicologia – Testes – Teses. I. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. II. Amorim, Leiliane Coelho André. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.9

ATA DA SESSÃO DE APRESENTAÇÃO DA **DUCENTÉSIMA QUADRAGÉSIMA SEGUNDA** DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze, realizou-se, a partir das 09h00 (nove horas), na sala 3003 do Bloco 2 da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão de defesa da dissertação da candidata ao título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, **Vanessa Heloísa Ferreira de Faria**, intitulada "**Glifosato: Desenvolvimento de metodologia para determinação em soja e milho e avaliação de parâmetros laboratoriais em trabalhadores expostos a agrotóxicos**". A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores doutores, Helvécio Costa Menezes da Fundação Educacional de Divinópolis (Instituição associada a UEMG), Ieda de Fátima Oliveira Silva, Leiliane Coelho André (coorientadora da discente) e Luci Maria Sant'Ana Dusse - orientadora da discente -, todas essas lotadas na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. A orientadora, presidente da comissão, abriu a sessão e passou a palavra à candidata que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores. Terminada a arguição, a Comissão Examinadora deliberou pela **APROVADA** da candidata. Nada mais havendo a constar, lavrou-se a presente ata, que segue assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Helvécio Costa Menezes
 Fundação Educacional de Divinópolis - Funedi/UEMG - campus Divinópolis


Profa. Dra. Ieda de Fátima Oliveira Silva
 Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG


Profa. Dra. Leiliane Coelho André (coorientadora)
 Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG


Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse (orientadora)
 Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

AGRADECIMENTOS

Acho que a gratidão deve ser expressa durante o trabalho, no decorrer do processo e não apenas com essas poucas palavras escritas aqui, mas queria deixar registrado o quanto sou grata a todas as pessoas que me aconselharam, motivaram, orientaram ou qualquer outra colaboração que de alguma forma resultou na apresentação dessa dissertação e de todo o trabalho antes dela.

Agradeço a Deus, sempre e em primeiro lugar, por tudo, pela força e saúde para lutar de vencer.

Agradeço à minha família: irmãos, sobrinhos, tios, primos... (como a família é grande), mas principalmente aos meus pais, irmãos e ao meu marido, amor e companheiro Michel, pelas lutas em conjunto, por estar sempre ao meu lado.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Resíduos de Pesticidas (LRP) da Funed, pelos auxílios técnicos, conselhos de vida e companheirismo, principalmente à minha amiga e chefia imediata Tânia, pelo grande incentivo.

Agradeço aos técnicos dos equipamentos que me ajudaram quando tudo estava dando errado, ao Cláudio Fiuza da Agilent® e ao Hélio Martins Jr. da AB Sciex®.

Agradeço ao diretor da APRAFAD Nilson Sérgio Pereira e ao engenheiro agrônomo Adenilson Martins pelo empenho e mobilização dos agricultores pelo auxílio nessa luta...

Agradeço à equipe dos laboratórios de hematologia e bioquímica da FAFAR/UFMG pelas análises realizadas e à Danyelle Rios pela grande ajuda da coleta de sangue em Divinópolis.

Às minhas orientadoras.

RESUMO

Desde 2008 o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor mundial de agrotóxicos. Considerando toda a gama de princípios ativos, o glifosato tem destaque nesse mercado, com 76% do total de vendas de herbicidas. Tendo em vista a importância deste produto no cenário mundial e nacional, e o risco de exposição ambiental e ocupacional, tornam-se necessárias medidas de proteção à saúde da população. Portanto, propôs-se o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de glifosato e AMPA em amostras de soja e milho empregando-se a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray*. A linearidade do método foi obtida na faixa de 0,005 a 0,05 ng/ μ L para glifosato e 0,10 a 1,0 ng/ μ L para AMPA. Comprovou-se o efeito de matriz para ambas. A recuperação apresentou uma faixa média de 86 a 107% e de 85 a 118% para o glifosato e AMPA, respectivamente. Os limites de quantificação em milho e soja para o glifosato foram de 1,0 e 2,0 mg/kg respectivamente. A incerteza expandida para o glifosato e AMPA em milho variou de 22 a 24% e 24 a 26% respectivamente. Em soja os valores de incerteza expandida para glifosato e AMPA foram respectivamente 27 a 31% e 59 a 93% sendo considerada insatisfatória no caso do AMPA, com base nos valores aceitos pelo SANCO, necessitando, dessa forma de mais testes. Para aplicar a metodologia validada foram analisadas 75 amostras de milho, não sendo detectados resíduos de glifosato ou AMPA nas mesmas. Associados ao desenvolvimento da metodologia analítica foram determinados parâmetros hematológicos e bioquímicos para avaliar o impacto à saúde de agricultores expostos ao glifosato e outros agrotóxicos, sabendo que a exposição na agricultura é múltipla. A população estudada consistiu de 49 trabalhadores expostos a agrotóxicos do município de Divinópolis com média de idade de 42 anos, sendo todos do sexo masculino. Mais de 61% dos trabalhadores utilizavam EPI completo e mais da metade (54%) informou que faz uso do glifosato. Apesar disso, os inseticidas (43%) foram a classe de agrotóxicos mais utilizada pelo grupo, seguida pelos herbicidas (31%) e fungicidas (26%). As alterações hematológicas foram discretas e consistiram em diminuição da hemoglobina (4%), plaquetopenia (4%), neutrofilia (8,2%) e eosinofilia (10,5%). Quanto aos parâmetros bioquímicos, 19,1% dos trabalhadores tiveram alteração de AST, 16,3% de ALT, 14,3% de GGT. Foi encontrado aumento da

creatinina sérica em 76,6% e 8,2% de ureia nos trabalhadores pesquisados. A biomonitorização de efeito para a avaliação da exposição ocupacional a agrotóxicos é complexa sendo limitado o estabelecimento donexo causal entre as alterações de parâmetros laboratoriais e a exposição ocupacional aos agrotóxicos. A avaliação periódica da função medular, hepática e renal deve ser incentivada para prevenir danos à saúde em decorrência da exposição a esses compostos.

Palavras-chave: glifosato, validação analítica, espectrometria de massas, cromatografia líquida, agrotóxicos, biomonitorização.

ABSTRACT

Since 2008 Brazil has assumed the position of the largest global consumer of agrochemicals market. Considering the full range of active ingredients, the glyphosate has highlighted that market, with 76% of total sales of herbicides. Considering the importance of this product on the world, and the risk of environmental or occupational exposure, measures to protect the health of the population are necessary. Therefore, we proposed the development and validation of analytical methodology glyphosate and AMPA determination in soybean and corn samples by liquid chromatography coupled electrospray ionization tandem mass spectrometry technique. The method linearity for glyphosate was 0.005 to 0.05 ng/ μ L and for AMPA 0.10 to 1.0 ng/ μ L. The matrix effect was proved for both. The recovery ranged from 86 to 107% and from 85 to 118% for glyphosate and AMPA, respectively. The limits of quantification in corn and soybeans for glyphosate were 1.0 and 2.0 mg/kg respectively. The expanded uncertainty for glyphosate and AMPA in maize ranged from 22 to 24% and 24 to 26% respectively. In soybean expanded uncertainty values for glyphosate and AMPA were 27-31% and 59-93% respectively. It was considered unsatisfactory for AMPA, based on the values accepted by SANCO further testing need be done. To apply the validated methodology, it were analyzed 75 corn samples, waste is not detected at the same glyphosate and AMPA. Hematological and biochemical parameters were analysed aimig to determine the impact on health of farmers exposed to glyphosate and other pesticides, since the agrochemicals exposure in agriculture is multiple. A total of 49 men workers exposed to pesticides in Divinópolis/Brazil with an average age of 42 years. Over 61% of the workers wore full health protect equipment and over half (54%) reported using glyphosate. Nevertheless, insecticides (43%) were the most widely used class of pesticides, followed by herbicide (31%) and fungicides (26%). Hematological abnormalities were mild and consisted in decreased hemoglobin (4%), thrombocytopenia (4%), neutrophilphilia (8.2%), and eosinophilia (10.5%). Regarding the biochemical parameters, 19.1% of workers had change of AST, ALT of 16.3%, 14.3% of GGT. Serum creatinine and urea were increased in 76.6% and 8.2% of the workers repectively. Biomonitoring occupational exposure to pesticides is complex and the causal link establishment between changes in laboratory parameters and occupational exposure to pesticides is limited. Periodic assessment of bone narrow,

liver and kidney function should be encouraged to prevent damage to health due to exposure to these compounds.

Keywords: glyphosate, analytical validation, mass spectrometry, liquid chromatography, pesticides, biomonitoring.

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química do glifosato e de seu principal metabólito (AMPA).....	29
2	Dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil em 2009 (em toneladas).....	30
3	Espacialização da comercialização do ingrediente ativo glifosato, por estado, em 2009.....	30
4	Vendas de Produtos Formulados por Classe de Uso (kg) – Brasil (2° semestre de 2010 e 1° semestre de 2011).....	31
5	Participação das Vendas de Produtos Formulados por Ingrediente Ativo (kg) – Brasil (2° semestre de 2010 e 1° semestre de 2011).....	32
6	Participação das Vendas de Herbicidas (Produto Formulado) por Ingrediente Ativo (kg) - Brasil (2° semestre de 2010 e 1° semestre de 2011).....	32
7	Fluxograma do processo de extração.....	52
8	Diagrama de um instrumento triploquadrupolo. Q1 e Q3 são espectrômetros de massas e o quadrupolo do meio (q2) é a célula de colisão.....	53
9	Constantes de ionização do glifosato e AMPA.....	56
10	Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão de glifosato e AMPA no ensaio de avaliação da linearidade com indicação dos respectivos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.....	65
11	Curva de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para Glifosato.....	66
12	Curva de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para AMPA.....	66
13	Cromatogramas mostrando branco de soja. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.....	68
14	Cromatogramas mostrando branco de milho. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.....	68
15	Cromatogramas de solução padrão de glifosato na concentração de 1,0 mg/kg e solução padrão de AMPA na concentração de 20,0 mg/kg em soja. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.....	69
16	Cromatogramas de solução padrão de glifosato na concentração de 0,50 mg/kg e solução padrão de AMPA na concentração de 10,0 mg/kg em milho. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.....	69
17	Supressão de sinal da soja e milho.....	70
18	Efeito de matriz para glifosato em soja e milho.....	70
19	Efeito de matriz para AMPA em soja e milho.....	71

20	Efeito de matriz relacionado ao fator de diluição da amostra- Glifosato em milho	72
21	Efeito de matriz relacionado ao fator de diluição da amostra- AMPA em milho	73
22	Peso de alguns componentes da incerteza associada à análise de glifosato em milho e soja respectivamente.	79
23	Peso de alguns componentes da incerteza associada à análise de AMPA em milho e soja respectivamente.	79
24	Escolaridade dos trabalhadores rurais de Divinópolis pesquisados	91
25	Informação sobre a última vez que o trabalhador entrou em contato com algum tipo de formulação de agrotóxicos.	94
26	Percentual dos agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais de Divinópolis segundo classe/modo de ação.	95
27	Classificação toxicológica dos agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais de Divinópolis	95
28	Representação gráfica da determinação da concentração de hemoglobina nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos	98
29	Representação gráfica da determinação do número de plaquetas nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	99
30	Representação gráfica da determinação da global de leucócitos nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	99
31	Representação gráfica da determinação da concentração de AST sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	102
32	Representação gráfica da determinação da concentração de ALT sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	102
33	Representação gráfica das transaminases hepáticas nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	103
34	Representação gráfica da determinação da concentração de GGT sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	103
35	Representação gráfica da determinação da concentração de creatinina sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos	104
36	Representação gráfica da determinação da concentração de ureia sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	106

LISTA DE TABELAS

1 Vendas brasileiras de defensivos agrícolas por classes.	23
2 Classificação Toxicológica dos Agrotóxicos, segundo o Ministério da Saúde	24
3 Casos, óbitos e letalidade de intoxicação humana, por agente, registrados no Brasil em 2010.	27
4 Casos de intoxicação por agrotóxicos em geral, segundo zona de ocorrência, registrados em 2009.....	27
5 Agrotóxicos a base de glifosato aptos para comercialização em Minas Gerais e as várias classificações toxicológicas.	36
6 Limites máximos de resíduos (LMR) e intervalo de segurança de glifosato de acordo com a cultura onde é aplicado.	41
7 Produção brasileira de milho ano safra 2012/2013, por Estado	46
8 Produção brasileira de soja ano safra 2012/2013, por Estado.....	47
9 Parâmetros da fonte de ionização JetStream® empregados nas análises.	54
10 Parâmetros otimizados para análise de glifosato e AMPA em amostras de soja e milho. ...	55
11 Faixa de operação analítica validada para glifosato e AMPA.....	65
12 Concentrações das recuperações, médias de recuperação, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial para matriz Milho.....	74
13 Concentrações das recuperações, médias de recuperação, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial para matriz Soja	74
14 Limites de detecção e quantificação de Glifosato e AMPA para Soja e Milho.	76
15 Valores de incertezas expandidas relativas de Glifosato e AMPA.....	78
16 Dados relacionados à aplicação e uso das misturas de agrotóxicos	93
17 Produtos formulados utilizados pelos trabalhadores rurais de Divinópolis	96
18 Venda de agrotóxicos por classe em 2011 no Brasil	97
19 Parâmetros hematológicos dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	98
20 Diferencial de leucócitos dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos	100
21 Avaliação dos parâmetros bioquímicos em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ALT	Alanina Aminotransferase
AMPA	Ácido Aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APRAFAD	Associação dos Produtores da Agricultura Familiar de Divinópolis
AST	Aspartato Aminotransferase
CL ₅₀	Concentração Letal inalatória suficiente para matar 50% de um lote de animais.
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DISAD	Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Saneantes Domissanitários
DL ₅₀	Dose Letal Suficiente para Matar 50% de um Lote de Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPRr	Desvio Padrão Relativo de Repetitividade
DPRR	Desvio Padrão Relativo de Reprodutibilidade Parcial
EC	<i>European Commission</i>
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EPI	Equipamento de proteção individual
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
EPSPS	5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintetase
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMOC-Cl	Cloroformato de 9-fluorenilmetoxícarbonil
FMOC-OH	Hidróxido de 9-fluorenilmetoxícarbonil
FPD	<i>Flame Photometric Detector</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GGT	Gama Glutamiltransferase
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
GM	Geneticamente Modificado
Hb	Hemoglobina
HFB	Heptafluorobutanol
Hm	Eritrócitos
Ht	Hematócrito
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IEA	Instituto de Economia Agrícola
IMA	Instituto Mineiro Agropecuário
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LACEN	Laboratório Central
LC/ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas em tandem com Ionização por Electrospray
LD	Limite de detecção
LMR	Limite máximo de resíduos
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
MERC	2-mercaptoetanol
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Ministério da Saúde
NE	Não estabelecido
OGM	Organismo geneticamente modificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA	orto-ftalaldeído
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PAA	Programa de Aquisição de Alimentos
PAN AP	<i>Pesticide Action Network Asia & the Pacific</i>
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PNAE	Programa Nacional de Alimentação Escolar
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POEA	Polietoxilenoamina
rpm	Rotações por minuto
RR	<i>Roundup Ready</i>
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação.
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SNVS	Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária

SISAGRO	Sistema de Alerta Rápido Agropecuário
SPE	Extração em Fase Sólida
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFAA	Ácido trifluoroacético anidro
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFB	Trifluoroetanol
TMOA	Trimetilorto-acetato
TR	Tempo de retenção
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
SUMÁRIO	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Agrotóxicos.....	22
2.1.1 Classificação dos agrotóxicos	23
2.1.2 Aspectos toxicológicos e epidemiológicos dos agrotóxicos.....	24
2.2 Glifosato	29
2.2.1 Classificação toxicológica do Glifosato.....	35
2.2.2 Glifosato em alimentos	40
2.2.3 Aspectos analíticos do glifosato	42
2.3 Milho	45
2.4 Soja	46
3 OBJETIVO GERAL	48
3.1. Objetivos específicos.....	48
4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM SOJA E MILHO (FUBÁ)	49
4.1 Materiais e Métodos	49
4.1.1 Amostragem	49
4.1.2 Reagentes e Padrões	50
4.2 Equipamentos	50
4.3 Procedimentos de Extração	51
4.4 Espectrometria de massas	53
4.5 Condições do sistema de cromatografia	54
4.6 Seleção da fase móvel	55
4.7 Parâmetros de Validação	57

4.7.1 Linearidade e Curva de calibração	58
4.7.2 Seletividade e Efeitos de matriz	59
4.7.3 Exatidão.....	60
4.7.4 Precisão	61
4.7.5 Limite de Quantificação e Limite de Detecção.....	62
4.7.6 Incerteza da medição	63
4.8 Resultados e Discussão	64
4.8.1 Seleção da fase móvel	64
4.8.2 Linearidade e Curva de calibração	65
4.8.3 Seletividade e Efeito de matriz.....	67
4.8.4 Exatidão.....	73
4.8.5 Precisão	74
4.8.6 Limite de Quantificação e Limite de Detecção.....	75
4.8.7 Incerteza da medição	77
4.9 Análise das Amostras de milho (fubá).....	79
5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE TRABALHADORES RUAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS.....	82
5.1 Avaliação da Exposição Ocupacional a Agrotóxicos.....	82
5.2 Parâmetros hematológicos, plaquetários e bioquímicos.....	84
5.2 Materiais e Métodos	86
5.3 Casuística.....	87
5.3.1 Critérios de inclusão	88
5.3.2 Critérios de exclusão	88
5.4 Análise Estatística.....	88
5.5 Amostra biológica.....	89
5.6 Características da população	89
5.7 Características da exposição	90
5.8 Metodologias para as determinações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	90
5.9 Resultados e Discussão	90
5.9.1 Características da população	90
5.9.2 Características da exposição	94
5.9.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos	97
6 CONCLUSÕES.....	107
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	108

8 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS.....	109
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
10 ANEXO	126
10.1 Anexo 1 – Aprovação pelo COEP/UFMG	126
10.2 Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	127
10.3 Anexo 3 – Ficha de coleta de dados	128

1 INTRODUÇÃO

A denominação “agrotóxicos” refere-se aos praguicidas normalmente utilizados na agricultura. O termo “agrotóxico” passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas, após grande mobilização da sociedade civil organizada. Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana. (BRASIL, 1997). Apesar de praguicidas ser uma denominação técnica referente ao combate de pragas, foi utilizado neste trabalho a denominação agrotóxicos, tendo em vista que o mesmo tornou-se mais amplo e conhecido por ter sido aceito no âmbito da saúde pública.

A utilização dos agrotóxicos na agricultura inicia-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores a controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960. Após um incentivo oficial para a disseminação da utilização de agrotóxicos pelos setores da agricultura brasileira na década seguinte, o país começa a perceber a necessidade de controlar os efeitos à saúde decorrente da utilização desses compostos (BRASIL. MS, 1997).

A crescente demanda de alimentos no mundo impulsiona o desenvolvimento de técnicas agrícolas, uso de agrotóxicos e a manipulação genética das plantas, permitindo um aumento considerável na produção mundial de alimentos. O Brasil apresenta um papel estratégico para a produção de alimentos, tanto para o mercado interno quanto externo. O surgimento de alimentos geneticamente resistentes ao uso de agrotóxicos sugere um risco ainda maior de exposição tanto dos trabalhadores quanto da população em geral que irá consumir tal alimento, em função do aumento da quantidade e frequência do uso destes produtos.

Com o processo de automação da produção agrícola nas décadas de 1960-1970 no Brasil na chamada “Revolução Verde”, os agrotóxicos ganharam uma posição de destaque (RIBAS E MATSUMURA, 2009). Seu uso proporcionou grande benefício para a produção de alimentos, principalmente por aumentar a produtividade por hectare. Entretanto, paralelo aos benefícios, surgiu o efeito potencial de resíduos de agrotóxicos no ambiente e nos alimentos, sendo a ingestão

de alimentos contendo agrotóxicos uma das principais rotas de exposição humana (PALMA, 2011).

Cumprir destacar o impacto da “Revolução Verde” principalmente para o trabalhador rural, que é a classe de maior risco por estar em contato direto com grandes quantidades de produtos tóxicos. Se para o consumidor o maior risco é a longo prazo, para o trabalhador rural o problema está associado ao risco de intoxicação. A falta de orientação adequada também acaba deixando os agricultores de pequenas propriedades ou de propriedades familiares em uma situação de maior risco de exposição (ANVISA, 2006).

O trabalhador rural pode contar com o Programa de Saúde do Trabalhador, vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS), que tem como um de seus objetivos a prevenção dos danos à saúde causados por agentes químicos presentes no ambiente de trabalho, neste caso, os agrotóxicos. Para isso, tornam-se necessárias a identificação e quantificação do risco por meio da avaliação ambiental e biológica da exposição. A detecção precoce de uma exposição perigosa pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde dos trabalhadores expostos a esses produtos (AMORIM, 2003).

As formulações dos agrotóxicos são misturas complexas que incluem, além do(s) ingrediente(s) ativo(s), vários outros componentes como solventes, agentes umidificantes, emulsificantes e aditivos. Além disso, é comum na agricultura que diferentes formulações sejam simultaneamente utilizadas com combinações variadas, aumentando a complexidade da exposição e dificultando a biomonitorização destes compostos para a avaliação da exposição. A utilização de exames comumente realizados nos laboratórios clínicos da rede pública pode ser uma forma de detectar o início de intoxicação desses trabalhadores expostos diretamente aos agrotóxicos. Esses compostos são metabolizados e excretados pelo fígado e rins, respectivamente, sendo que os médicos devem estar atentos ao tipo de trabalho do paciente e a qualquer alteração em exames de rotina.

Mundialmente, os herbicidas pertencem à classe de agrotóxicos mais utilizada e desde 2008 o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor mundial de agrotóxicos em geral. As vendas destes produtos somaram US\$ 7,125 bilhões, diante US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos em 2010, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola - SINDAG (IBAMA, 2010).

De acordo com o Instituto de Economia Agrícola (IEA), no Brasil, em 2011, os herbicidas movimentaram US\$ 2,74 bilhões, ou seja, 32,3% do faturamento total do setor, e responderam por 48,8% da quantidade total vendida em produto comercial. Nesse período, a soja foi a principal consumidora de agrotóxicos no país, sendo responsável por 43,5% do valor total das vendas. Em seguida, apareceu o algodão (12,5%), a cana-de-açúcar (11,6%), o milho (8,8%), o café (3,7%), os citros (3,1%), culturas de inverno (2,4%) e feijão (2,4%). Nos três primeiros meses de 2012, estima-se que as vendas de agrotóxicos tiveram um aumento de 27,2% em relação ao mesmo período de 2011, impulsionadas pelas culturas de cana-de-açúcar, algodão, milho e citros (IEA, 2012).

Observa-se uma grande concentração de uso de agrotóxicos nas regiões em que há o predomínio do agronegócio, destacando-se os estados da região Centro Oeste e Sul do Brasil. Considerando toda a gama de princípios ativos registrados no Brasil, o ingrediente ativo glifosato tem destaque no mercado de herbicidas, ultrapassando 90 mil toneladas comercializadas em 2009, o que representa 76% do total de herbicidas (IBAMA, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a toxicidade aguda do ingrediente ativo glifosato é considerada baixa, com uma DL_{50} oral do princípio ativo puro de 1950 a 5000 mg/kg de massa corporal para camundongos, ratos e cabras (FARZA, CUNHA e MALTY, 2009). No entanto, a DL_{50} é estabelecida a partir de estudos de toxicidade aguda, não indicando os riscos de doenças de evolução prolongada como, por exemplo, câncer, neuropatias, hepatopatias, problemas respiratórios crônicos e outros (FARIA, FASSA e FACCHINI, 2007).

Devido às suas propriedades físico-químicas como alta polaridade, baixo peso molecular e ausência de grupos cromóforos, o glifosato não pode ser analisado pelos métodos de multirresíduos. Assim, o monitoramento de resíduos de glifosato em alimentos demanda a realização de análises por métodos de molécula única, não sendo, por isso, priorizados pelos principais programas nacionais de controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos como o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Considerando-se a ampla utilização do glifosato em todo o mundo, devido às suas propriedades herbicidas de largo espectro, ainda classificado como pouco

tóxico para os animais em geral, justifica-se a necessidade de implementação de programas de monitorização ambiental e biológica (TEÓFILO, 2003).

Cumprе ressaltar que a biomonitorização de efeito para a avaliação da exposição ocupacional a agrotóxicos é complexa sendo limitado o estabelecimento do nexo causal entre as alterações de parâmetros laboratoriais e a exposição ocupacional a esses compostos.

A avaliação periódica da função medular, hepática e renal dos trabalhadores rurais deve ser incentivada para prevenir danos à saúde em decorrência da exposição aos agrotóxicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agrotóxicos

De acordo com a lei nº 7.802/89 agrotóxicos são “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 1989).

Desde 1998, três órgãos estão envolvidos no processo de comercialização de produtos agrotóxicos no Brasil, ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cabe verificar a pertinência e eficácia do agrotóxico, à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cabe avaliar os impactos do mesmo sobre a saúde humana e ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) compete analisar as implicações desse no meio ambiente, desse modo, cada um deles faz uma avaliação distinta. Pela legislação brasileira, o registro de agrotóxicos, depois de concedido, é definitivo, porém os órgãos reguladores podem reavaliá-lo sempre que houver indícios de que o seu uso oferece riscos (IBAMA, 2010).

Os dados do monitoramento nacional PARA / ANVISA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos), permitem concluir que o maior problema brasileiro, em relação aos níveis de agrotóxicos no alimento *in natura*, não está na forma de aplicação do produto em alimento, mas sim no uso indiscriminado e não recomendado para determinados alimentos, resultando, em sua grande maioria, em irregularidades (KUSSUMI, 2007; ANVISA, 2013a). A **Tabela 1** ilustra a importância do comércio de agrotóxicos no Brasil, tanto em quantidade comercializada quanto nos valores financeiros envolvidos, mostrando a venda destes produtos, denominados por defensivos agrícolas pelo SINDAG de 2007 a 2011.

Tabela 1 - Vendas brasileiras de defensivos agrícolas por classes.

CLASSES	PRODUTO COMERCIAL (t)					VALOR - US\$ 1.000				
	2.007	2.008	2.009	2.010	2.011	2.007	2.008	2.009	2.010	2.011
TOTAL:	599.834	673.892	725.577	787.790	826.683	5.371.965	7.125.140	6.625.610	7.303.918	8.487.944
HERBICIDAS	349.905	389.401	429.693	415.171	403.620	2.304.062	3.200.721	2.505.414	2.427.878	2.743.000
FUNGICIDAS	68.254	78.495	89.889	136.972	174.194	1.264.416	1.573.600	1.791.477	2.128.377	2.315.188
INSETICIDAS	116.609	138.754	137.908	160.593	170.932	1.537.390	2.027.771	1.987.800	2.364.868	2.944.726
ACARICIDAS	19.888	20.321	12.281	11.755	9.326	92.136	112.876	88.195	91.285	110.180
OUTRAS	45.178	46.921	55.806	63.299	68.611	173.961	210.172	252.724	291.510	374.850

Fonte: SINDAG, 2012.

2.1.1 Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de diversas maneiras, como em relação ao seu modo de ação no organismo alvo, em relação à sua estrutura química, em relação aos efeitos à saúde humana ou ao meio ambiente, ou pela avaliação da neurotoxicidade, carcinogenicidade, dentre outras (SAVOY, 2011).

Quanto ao modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou à natureza da praga combatida, os agrotóxicos são classificados como inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas e/ou raticidas, acaricidas, nematocidas, fumigantes, moluscicidas etc. (SAVOY, 2011).

A classificação dos agrotóxicos segundo o seu grau de toxicidade é estabelecida a partir dos valores de Dose Letal (DL₅₀) ou Concentração Letal (CL₅₀), sendo de responsabilidade do Ministério da Saúde (ANVISA). No Brasil, a portaria da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) nº 03 de 16 de janeiro de 1992 redefiniu os critérios de classificação toxicológica anteriormente vigentes definidos pelas Portarias da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Saneantes Domissanitários (DISAD) de 1980 e 1987. Mantiveram-se quatro classes toxicológicas definidas principalmente pela DL₅₀ dos produtos e também por outros dados relacionados a danos na córnea, lesões na pele e concentração letal inalatória para ratos (CL₅₀), prevalecendo a classificação pelo dado mais agravante. A Lei nº 7802/89, regulamentada pelo Decreto nº 4074/2002, dispõe que os rótulos desses produtos devem conter uma faixa colorida indicativa de sua classificação toxicológica (**Tabela 2**) (BRASIL. MS, 1992; BRASIL. MS, 2002; GARCIA,

BUSSACOS e FISCHER, 2009; SAVOY, 2011). Já a Consulta Pública da ANVISA nº 02, de 25 de janeiro de 2011 sugeriu a adoção dos critérios de classificação toxicológica do *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS) ou Sistema Global Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, um sistema internacional criado pela Organização das Nações Unidas que visa padronizar internacionalmente a classificação dos produtos químicos, entretanto esse sistema ainda não foi aceito (ANVISA, 2011).

Por outro lado, o IBAMA é o responsável pela classificação ecotoxicológica dos agrotóxicos (relacionado ao meio ambiente), regulamentado pela portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996, dentre outras portarias, que estabelece procedimentos obedecidos pelo Ministério do Meio Ambiente (IBAMA) para avaliação ecotoxicológica de agrotóxicos e afins (BRASIL. IBAMA, 1996). Nem sempre a avaliação e classificação do agrotóxico feita por essas duas agências reguladoras é similar.

Tabela 2 – Classificação Toxicológica dos Agrotóxicos, segundo o Ministério da Saúde

Classe	Toxicidade	Rótulo	CL ₅₀ (mg/L) Inalatória Gás/ 1h	DL ₅₀ (mg/kg) Oral		DL ₅₀ (mg/kg) Dérmica	
				Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
I	Extremamente Tóxico	Vermelho	≤ 0,2	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
II	Altamente Tóxico	Amarelo	0,2 a 2	5 a 50	20 a 200	10 a 100	40 a 400
III	Mediamente Tóxico	Azul	2 a 20	50 a 500	200 a 2000	100 a 1000	400 a 4000
IV	Pouco Tóxico	Verde	> 20	> 500	>2000	> 1000	> 4000

Fonte: BRASIL. MS, 1992.

2.1.2 Aspectos toxicológicos e epidemiológicos dos agrotóxicos

O termo toxicidade é a medida do potencial tóxico de uma substância, é a capacidade latente, inerente, que uma substância química possui. Admite-se que não existe substância química atóxica, mas também não existe substância química

que não possa ser utilizada com segurança limitando a dose e a exposição à mesma. Os principais fatores que influenciam a toxicidade de uma substância são a frequência de exposição, a duração da exposição e a via de administração. Para uma avaliação completa da toxicidade de uma substância é necessário conhecer que tipo de efeito ela produz, a dose para produzir tal efeito, as características da substância e as informações sobre a exposição do indivíduo (MICHEL, 2000).

O risco de determinado agrotóxico é dado por sua toxicidade intrínseca, modo e o tempo de exposição a ele. Se ocorrer alta exposição ao agrotóxico, mesmo que esse tenha baixa toxicidade, o risco é alto. Do mesmo modo, a exposição baixa a produto de alta toxicidade, o risco também é alto. O glifosato é um exemplo que se enquadra no segundo caso, sendo classificado como pouco tóxico (classe IV), mas amplamente utilizado no Brasil e no mundo (TRAPÉ, 2003). Sendo assim, devido ao seu alto risco, deveria levar a uma maior preocupação de seu uso.

A questão da toxicidade não se resume apenas em ser alta ou baixa, mas a outros problemas toxicológicos existentes. Sabe-se que a classificação dos agrotóxicos relativa à toxicidade refere-se principalmente a problemas agudos mas, em contrapartida, há poucos dados na literatura mundial para inferir sobre toxicidade crônica, sinergismo de agrotóxicos ou mesmo sobre os modos de ação no organismo do homem (TRAPÉ, 2003).

Os principais dados de registro de intoxicação por agrotóxicos no Brasil são obtidos através de dois sistemas: o SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas e o SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. O SINITOX tem como principal atribuição coordenar a coleta, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no país e está vinculado à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O SINAN, vinculado diretamente ao Ministério da Saúde, é alimentado, principalmente, pela notificação e investigação de casos de doenças e agravos que constam da lista nacional de doenças de notificação compulsória, sendo facultado aos estados e municípios incluírem nesse sistema outros problemas de saúde importantes em sua região.

Dados nacionais oficiais sobre intoxicações por agrotóxicos não retratam a realidade do país. Os sintomas agudos de tais intoxicações são apenas “a ponta do iceberg” de um problema muito mais amplo que fica escondido por trás da subnotificação dos casos e da quase ausência de informação sobre as doenças

crônicas causadas por exposição a agrotóxicos, já que não há registros oficiais sobre os efeitos crônicos causados pelo contato com os agrotóxicos. (BOCHNER, 2007, BOMBARDINI, 2011).

As agências internacionais de saúde como a Organização Mundial de Saúde (OMS) consideram que em países como o Brasil, no qual existem graves problemas de estrutura da saúde pública, ocorre um sub-registro de casos de intoxicações por agentes químicos em geral, inclusive agrotóxicos. Estima-se que os casos registrados de intoxicações representem somente 2% do total de casos que ocorrem anualmente. Embora no SINITOX em 2010 (**Tabela 3**), tenham sido registrados cerca de 10 mil casos, estima-se que ocorreram mais de 513 mil intoxicações por agrotóxicos no Brasil em 2010. Estes dados registrados referem-se apenas aos casos de intoxicações agudas que chegam ao conhecimento dos centros de controle de intoxicações, não incluindo, portanto, os casos relacionados aos efeitos adversos crônicos (TRAPÉ, 2001).

Os dados dos efeitos crônicos são obtidos normalmente através de estudos isolados. Tumores hematológicos e do sistema nervoso foram associados aos trabalhadores norte-americanos expostos a agrotóxicos (FLEMING et al., 2003). Na Alemanha, conseguiu-se levantar dados que forneceram evidências de leucemia infantil e uso de agrotóxicos, sendo este doméstico ou agrícola (MEINERT et al., 2000). Estudo canadense inferiu que o risco de linfoma não-Hodgkin aumenta com o aumento do número de princípios ativos utilizados e algumas combinações específicas de agrotóxicos (HOHENADEL et al., 2011). Na Itália, uma pesquisa entre pessoas que trabalham na agricultura, desde os aplicadores até os manipuladores dos alimentos *in natura*, indicou aumento do risco de cânceres hematopoéticos (COSTANTINI et al., 2001). Ainda na Europa, um estudo sueco associou o uso de glifosato ao aumento de linfomas não-Hodgkin (HARDELL, ERIKSSON e NORDSTRÖM, 2002).

Tabela 3 - Casos, óbitos e letalidade de intoxicação humana, por agente, registrados no Brasil em 2010.

Agente	Casos	Óbitos	Letalidade
	nº	nº	%
Medicamentos	24056	67	0,28
<i>Agrotóxicos/Usos Agrícola</i>	<i>4789</i>	<i>171</i>	<i>3,57</i>
<i>Agrotóxicos/Usos Doméstico</i>	<i>2094</i>	<i>7</i>	<i>0,33</i>
<i>Produtos Veterinários</i>	<i>810</i>	<i>2</i>	<i>0,25</i>
<i>Raticidas</i>	<i>2576</i>	<i>18</i>	<i>0,70</i>
Agrotóxicos no geral	10269	198	4,85
Domissanitários	10813	11	0,10
Cosméticos	1120	0	-
Produtos Químicos Industriais	5135	18	0,35
Metais	312	4	1,28
Drogas de Abuso	5289	47	0,89
Plantas	1132	5	0,44
Alimentos	946	0	0,00
Animais Peç./Serpentes	2476	7	0,28
Animais Peç./Aranhas	3261	0	-
Animais Peç./Escorpiões	9317	6	0,06
Outros Animais Peç./Venenosos	4649	6	0,13
Animais não Peçonhentos	3605	0	-
Desconhecido	2106	9	0,43
Outro	2214	10	0,45
Total	86700	388	0,45

Fonte: FIOCRUZ/SINITOX, 2010

Tabela 4- Casos de intoxicação por agrotóxicos em geral, segundo zona de ocorrência, registrados em 2009.

Agente \ Zona	Rural	Urbana	Ignorada	Total	
	nº	nº	nº	nº	%
NORTE	23	212	17	252	2,16
NORDESTE	189	1134	16	1339	11,50
SUDESTE	1790	3202	159	5151	44,25
Minas Gerais	680	695	31	1406	12,08
Espírito Santo	319	659	101	1079	9,27
Rio de Janeiro	182	19	4	205	1,76
São Paulo	609	1829	23	2461	21,14
SUL	606	1951	151	2708	23,26
Paraná	142	398	103	643	5,52
Santa Catarina	---	---	---	---	---
Rio Grande do Sul	464	1553	48	2065	17,74
CENTRO-OESTE	341	1796	54	2191	18,82
Mato Grosso do Sul	61	197	4	262	2,25
Mato Grosso	---	---	---	---	---
Goiás	163	705	44	912	7,83
Distrito Federal	117	894	6	1017	8,74
Total	2949	8295	397	11641	100,00
%	25,33	71,26	3,41	100,00	

Fonte: FIOCRUZ/SINITOX, 2009

--- Dados numéricos não disponíveis

A **Tabela 4** indica que a área urbana é responsável por mais de 71% das notificações. Certamente que este percentual resulta da maior conscientização da necessidade de notificação, bem como da facilidade de acesso aos centros de saúde para fazê-la, e não relacionado à quantidade de agrotóxico usada quando se compara as zonas urbana e rural.

Dados da ANVISA, provenientes do PARA, são alarmantes tanto para os consumidores, quanto para os agricultores e produtores. Um número elevado de diferentes agrotóxicos é encontrado em um mesmo alimento. Não há no Brasil uma legislação que limite o número de princípios ativos por alimento e os estudos de toxicologia levam em conta apenas um composto, não havendo estudos sobre o sinergismo entre os vários agrotóxicos.

Além disso, no país, o maior problema dos alimentos *in natura* não é a utilização de agrotóxicos em maior quantidade que a permitida (aquela acima do Limite Máximo Permitido – LMR), mas a utilização de agrotóxicos proibidos para determinada cultura, aqueles que já tiveram a monografia excluída ou nunca foram permitidos no Brasil e, apesar das proibições, tais princípios ativos ainda sim são utilizados e não estão incluídos na estimativa do risco quando se calcula a Ingestão Diária Aceitável (IDA). Deve-se preocupar também com a grande quantidade de agrotóxicos contrabandeados que não possuem nenhum tipo de controle por nenhuma das agências reguladoras.

Formulações de agrotóxicos são misturas complexas que contém além do ingrediente ativo, vários outros componentes como solventes e emulsionantes, dentre outros. Além disso, é comum o uso de diferentes formulações simultaneamente e em diversas combinações levando a ocorrência de exposições complexas tornando o biomonitoramento muito difícil. Os possíveis efeitos tóxicos da exposição a múltiplos compostos ainda são desconhecidos e as informações da toxicidade relacionada apenas aos ingredientes ativos isolados não são suficientes para avaliar o risco dos efeitos adversos dos agrotóxicos à saúde. Assim, a informação isolada relativa à toxicidade de um ingrediente ativo ou produto formulado não é suficiente para avaliar o risco de efeitos adversos relacionados à exposição a agrotóxicos (FALCK et al., 1999).

2.2 Glifosato

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina)) é um herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente, com rápida absorção foliar e translocação, tanto pelo xilema quanto pelo floema da planta tratada. (TEÓFILO, 2003). Apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e massa molecular de 169,01g/mol (**Figura 1**). Em condições ambientais, é sólido cristalino, branco e inodoro, muito solúvel em água (11,6 g/L a 25°C, pH 7), quase insolúvel em solventes orgânicos, funde-se a 185°C e degrada-se a 187°C. Suas formulações apresentam-se bastante estáveis em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C, sendo que sua meia vida no solo é de 47 dias (MARQUES, 2008; RODRIGUES, 2009; USDOE, 2000).

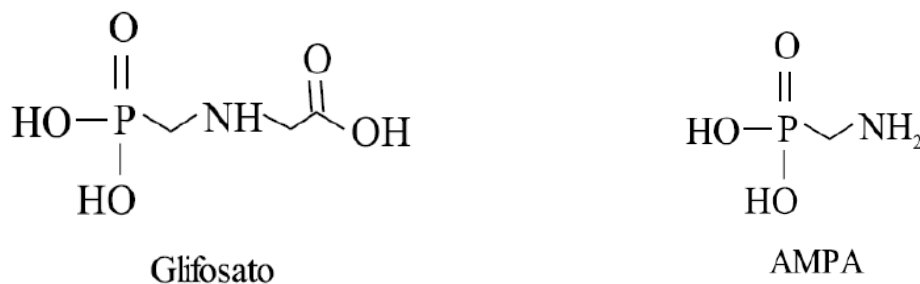


Figura 1 - Estrutura química do glifosato e de seu principal metabólito (AMPA).

A degradação do glifosato no solo é mais rápida que na água devido à quantidade elevada de microrganismos existentes no solo. Estes microrganismos usam este herbicida como fonte de energia e fósforo, por meio de duas rotas catabólicas, produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o principal metabólito, e sarcosina como metabólito intermediário (GALLI e MONTEZUMA, 2005; MARQUES, 2008).

O glifosato foi criado em 1950 pelo Dr. Henri Marin, um químico suíço da indústria química *Cilag*. Posteriormente, em 1970, o Dr. E. Franz da *Monsanto Company* sintetizou novamente a molécula e descobriu sua capacidade herbicida, dando-lhe o nome de Roundup® e lançou-a no mercado dos Estados Unidos em 1974 (AULING, 2009; FERRARO, 2009).

Nas formulações comerciais, ao princípio ativo é adicionado o surfactante polietoxilenoamina (POEA) para melhorar a eficácia do produto, o qual tem efeitos toxicológicos próprios evidenciados (MARQUES, 2008). O uso de aditivos nas suas

formulações (como tensoativos, emulsificantes, óleos minerais e vegetais) permite um transporte mais rápido do agrotóxico do solo para a planta, protegendo-o da evaporação e retardando o processo de lixiviação. No entanto, tais aditivos normalmente não têm estudos de toxicidade isolados, muito menos, estudos de sinergismo com o princípio ativo (TEÓFILO, 2003).

As **Figuras 2 e 3** mostram a distribuição da comercialização brasileira do glifosato em relação aos outros princípios ativos e sua comercialização por Estado do País.

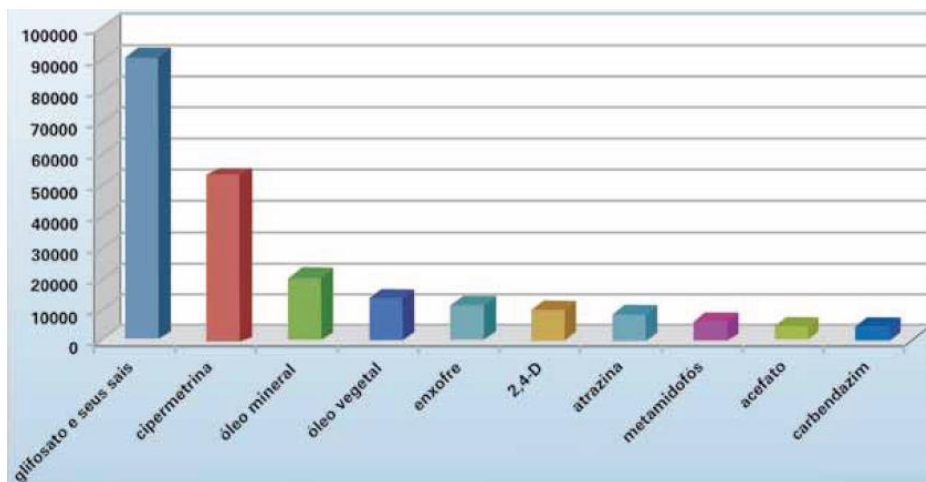


Figura 2 - Dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil em 2009 (em toneladas).
Fonte: IBAMA, 2010

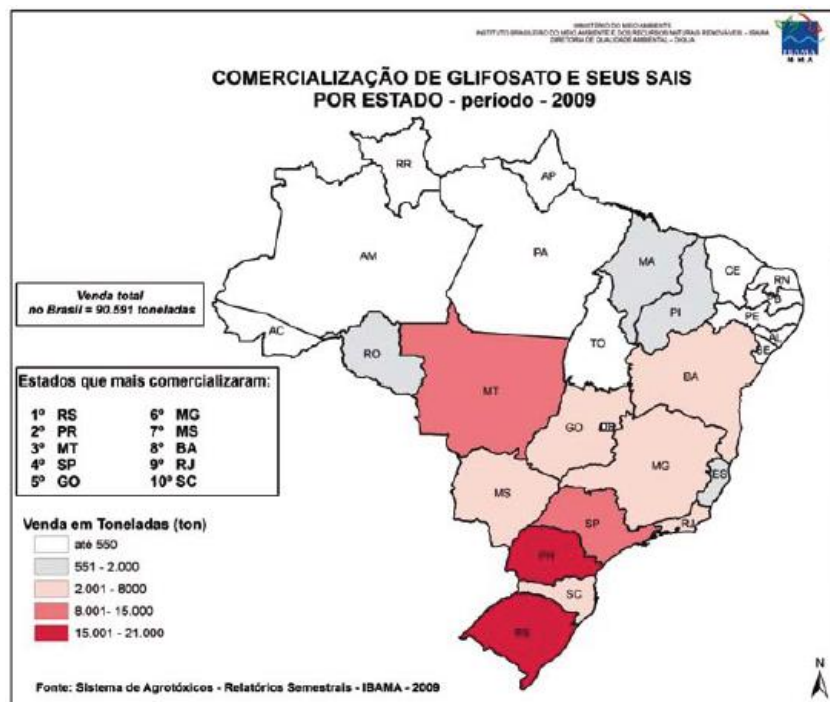


Figura 3 - Espacialização da comercialização do ingrediente ativo glifosato, por estado, em 2009. Fonte: IBAMA, 2010

De acordo com dados compilados do programa Sistema de Controle Semestral de Agrotóxico (SISAGRO) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) referente ao primeiro semestre de 2010, obtidos através de relatórios fornecidos por funcionário autorizado, relacionado a ingredientes ativos comercializados em Minas Gerais, os dez maiores municípios mineiros consumidores de glifosato (incluindo seus sais) correspondem a 54,6% de todo consumo em Minas Gerais, sendo que apenas o município de Unaí é responsável por 27% dessa parcela (IMA, 2012).

Dados da ANVISA (**Figuras 4, 5 e 6**) mostram a importância dos herbicidas no Brasil, em especial do glifosato, sendo este, no 2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011, o responsável por 29% de toda a venda de produtos formulados (kg) e por 50% quando se leva em consideração apenas os herbicidas.

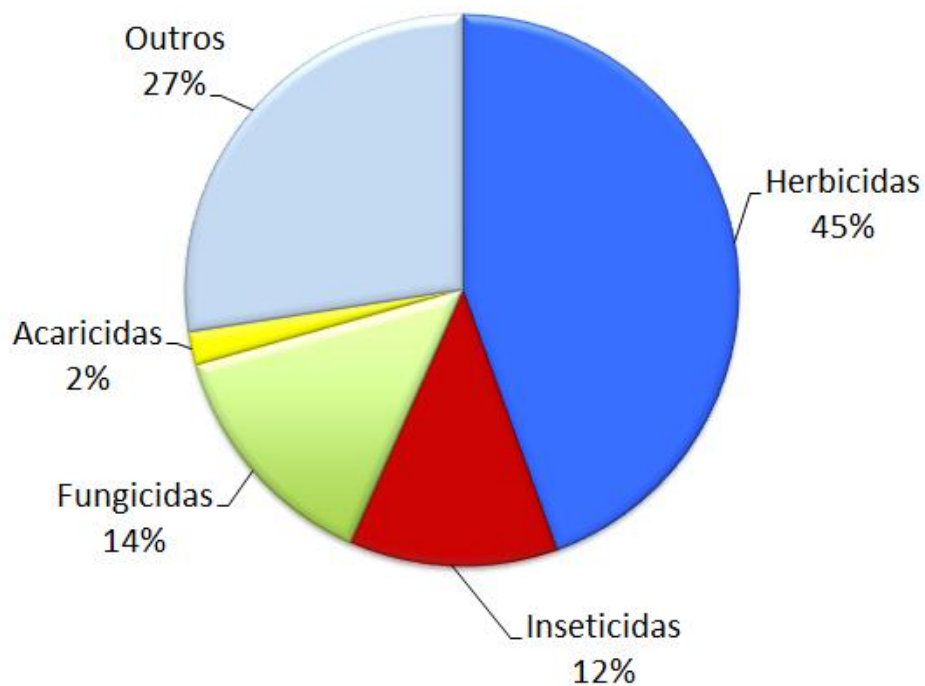


Figura 4 - Vendas de Produtos Formulados por Classe de Uso (kg) – Brasil (2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011). Fonte: ANVISA, 2012

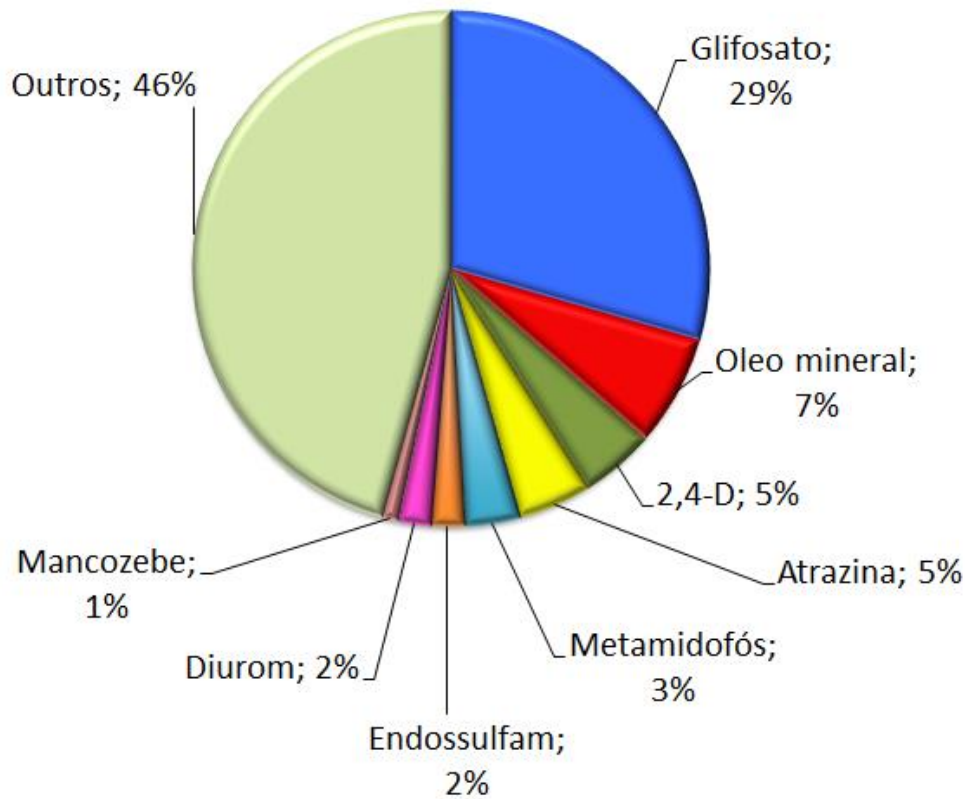


Figura 5 - Participação das Vendas de Produtos Formulados por Ingrediente Ativo (kg) – Brasil (2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011). Fonte: ANVISA, 2012

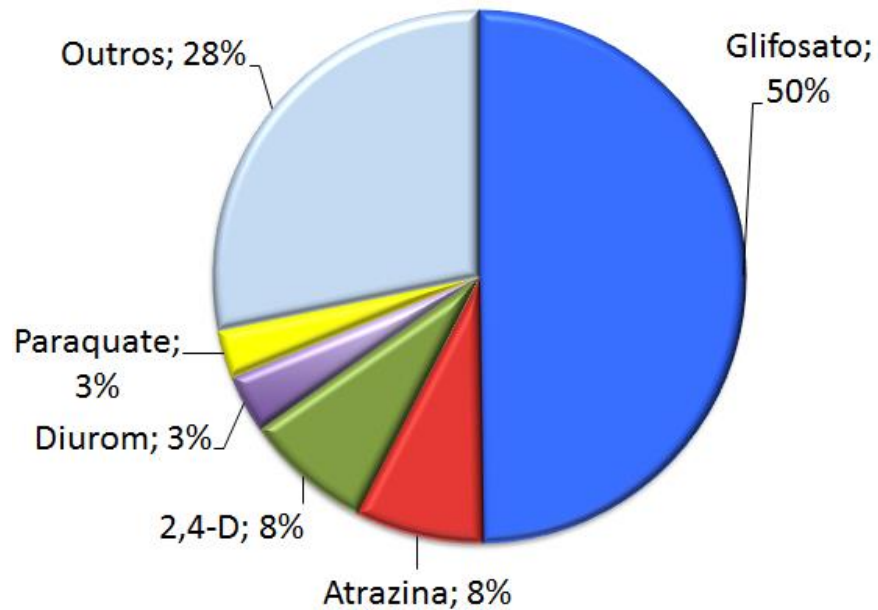


Figura 6 - Participação das Vendas de Herbicidas (Produto Formulado) por Ingrediente Ativo (kg) - Brasil (2º semestre de 2010 e 1º semestre de 2011). Fonte: ANVISA, 2012

O glifosato é tido como o mais específico e menos tóxico agrotóxico para o ecossistema sendo que plantas transgênicas tolerantes a esse composto têm sido desenvolvidas seguindo tal argumento (RICHARD et al., 2005).

Atualmente, mais de 80% da área cultivada no mundo é de plantas geneticamente modificadas (GM), sendo a maioria dessas resistentes a níveis elevados de glifosato. As principais culturas GM são a soja, milho, canola e algodão, cultivadas principalmente nos EUA, Canadá, Argentina, Brasil e Paraguai. De acordo com o documento da rede *Pesticide Action Network Asia & the Pacific* (PAN AP), em 2008, a soja transgênica, tolerante a glifosato, correspondia a 53% do total das culturas GM no mundo, seguida pelo milho (30%) e algodão (12%) (WATTS, 2009).

Em 2010, o Brasil manteve e fortaleceu sua posição como segundo maior produtor de GM no mundo, com cerca de 25,4 milhões de hectares, sendo responsável pela produção de 17% de todas as culturas GM no mundo. O primeiro maior produtor de GM são os Estados Unidos com 66,8 milhões de hectares (JAMES, 2010).

Além do aumento de consumo de transgênicos, quantidades maiores de glifosato vêm sendo usadas nas lavouras transgênicas resistentes ao mesmo, pois não há preocupação com a quantidade aplicada. Geralmente, este herbicida é pulverizado em cima da planta e não somente nas ervas daninhas que estão próximas ao solo, fazendo com que os grãos apresentem níveis maiores de resíduos (LONDRES, 2011). Observa-se uma grande concentração de uso de agrotóxicos nas regiões em que há o predomínio do agronegócio, destacando-se os municípios da região Sul e Centro Oeste no Brasil. A soja ocupa o primeiro lugar em vendas de agrotóxicos com 47,1% dos agrotóxicos vendidos no país sendo destinados a essa cultura, seguida pelo milho (11,4%) e a cana (8,2%) (BOMBARDINI, 2011).

Talvez pela dificuldade de análise de glifosato na maioria das matrizes, sua prevalência e efeitos não são bem estudados. No Brasil esse herbicida ainda não é contemplado pelo PARA, monitorização esta que vem sendo feita no país desde 2001 (ANVISA, 2013a). Mesmo com técnicas mais modernas como a cromatografia acoplada a espectrometria de massas, a maioria das metodologias analíticas para determinação do glifosato e AMPA requerem etapa de derivatização, uma vez que ambos não apresentam grupos cromóforos, não sendo por isso detectados por métodos usuais colorimétricos ou de fluorescência.

Fatores como estes dificultam ainda mais a análise deste composto que, somando-se às suas características físicas, não é contemplado por métodos de multirresíduos, comumente utilizado na rotina dos laboratórios que analisam resíduos de agrotóxicos. Nesse caso, grupos de moléculas com características tão peculiares necessitam dos chamados métodos de molécula única, aumentando o tempo de análise total e conseqüentemente, os custos. Alguns estudos vêm indicando que a análise do glifosato e AMPA, sem derivatização, é possível utilizando-se espectrômetro de massas com análises de massas sequencial (SRM) (MARTINS-JÚNIOR et al., 2009).

O AMPA, principal metabólito do glifosato, é mais persistente no solo (76 a 240 dias) do que o glifosato (2 a 197 dias) e existem evidências que esse pode alcançar lençóis freáticos profundos (FERRARO, 2009). Nesse sentido, a Portaria 2914 de 2011 do Ministério da Saúde que estabelece os parâmetros de potabilidade para água de consumo humano, incluiu a pesquisa de glifosato e AMPA no controle e vigilância de água potável. Apesar do glifosato não ser considerado de alto risco como outros agrotóxicos, a sua inclusão nesta portaria se justificou pela a amplitude de seu uso. O valor permissível para o glifosato e o AMPA estabelecidos como a soma dos dois é de 500 µg/L (BRASIL. MS, 2011).

No Brasil, segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT, encontram-se registradas quatro principais formas químicas de glifosato: glifosato, glifosato-sal de amônio, glifosato-sal de isopropilamina e glifosato-sal de potássio. Os produtos formulados registrados no país podem conter como ingrediente ativo apenas o glifosato, ou esse associado a outros herbicidas ou ainda, formulações contendo formas químicas distintas do glifosato entre si. Até dezembro de 2012, havia no país, 72 produtos formulados registrados a base de glifosato e seus sais (BRASIL. MAPA, 2013).

A maioria dos estudos sobre os efeitos do glifosato e seus derivados sobre a saúde e o meio ambiente são realizados pelos próprios fabricantes do produto, interessados em aprovar seu uso e impulsionar as vendas. Soma-se a isso, a dificuldade de realizar estudos independentes sobre o produto, uma vez que são poucos os laboratórios que possuem os recursos, equipamentos e técnicas necessárias a uma efetiva avaliação dos seus impactos. A carência de estudos e a dificuldade de detectar objetivamente os efeitos do glifosato sobre a saúde humana têm dificultado uma avaliação segura acerca do risco do seu uso. No entanto,

admite-se que este risco está diretamente relacionado ao aumento do seu uso, especialmente em culturas transgênicas resistentes (PACHECO e SHOTTS, 2005).

2.2.1 Classificação toxicológica do Glifosato

A toxicidade do glifosato foi associada inicialmente apenas aos vegetais, uma vez que esse age, nas plantas, por inibição competitiva da 5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), enzima responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) por via específica do reino vegetal (via metabólica do ácido chiquímico). Mais tarde, descobriu-se que, além de efeitos agudos de irritação, também pode intervir no funcionamento do complexo do citocromo P450 e da glutaciona-S-transferase, envolvidas no metabolismo de substâncias tóxicas pelo fígado, e de outras enzimas vitais para o organismo (FARZA, CUNHA e MALTY, 2009).

A portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992 do MS redefiniu as regras de classificação toxicológica, buscando adequar-se aos padrões internacionais. Dessa forma, o glifosato, que antes pertencia à classe toxicológica II, passou a pertencer à classe IV, podendo induzir à falsa impressão de que esse composto tornou-se menos tóxico (BRASIL. MS, 1992; FARIA, FASSA e FACCHINI, 2007).

A **Tabela 5** mostra a classificação de todas as formulações de agrotóxicos à base de glifosato aptos para comercialização no Estado de Minas Gerais, até dezembro de 2012.

Tabela 5 – Agrotóxicos a base de glifosato aptos para comercialização em Minas Gerais e as várias classificações toxicológicas.

Marca Comercial	Classificação Toxicológica	Empresa
CRUCIAL	I	NUFARM INDÚSTRIA
DIRECT	IV	MONSANTO
FERA	III	FMC
GLIATO	II	PRENTISS
GLIFOS	IV	CHEMINOVA
GLIFOS PLUS	III	CHEMINOVA
GLIFOSATO 480 AGRIPÉC	II	NUFARM INDÚSTRIA
GLIFOSATO 480 HELM	IV	HELM
GLIFOSATO 480 PIKAPAU	IV	Prod. Quím. São Vicente
GLIFOSATO AGRIPÉC 720 WG	III	NUFARM INDÚSTRIA
GLIFOSATO ATANOR	III	ATANOR
GLIFOSATO ATANOR 48	III	ATANOR
GLIFOSATO ATAR 48	III	ATAR DO BRASIL
GLIFOSATO FERSOL 480 NA	III	FERSOL
GLIFOSATO NORTOX	IV	NORTOX
GLIFOSATO NORTOX 480 SL	III	NORTOX
GLIFOSATO NORTOX NA	IV	NORTOX
GLIFOSATO NORTOX WG	IV	NORTOX
GLIFOSATO NUFARM	II	NUFARM INDÚSTRIA
GLIFOXIN	III	HELM
GLIOX	IV	NORTOX
GLIPHOGAN 480	III	MILENIA
GLISTER	II	SINON
GLI-UP 480 SL	III	CROP-CHEM
GLIZ 480 NA	IV	DOW
GLIZ 480 SL	III	DOW
GLIZ PLUS	II	DOW
GLIZMAX	II	DOW
GLYPHOTAL	III	CCAB AGRO
PILARSATO	III	PILARQUIM
POLARIS	IV	DU PONT
PRETORIAN	III	ATANOR
RADAR	III	MONSANTO
RADAR WG	III	MONSANTO
RODEO	IV	MONSANTO
RODEO N.A.	IV	MONSANTO
RONAT-A	III	ATANOR
ROUNDUP READY MILHO	II	MONSANTO
ROUNDUP NA	III	MONSANTO
ROUNDUP ORIGINAL	IV	MONSANTO
ROUNDUP READY	II	MONSANTO
ROUNDUP TRANSORB	II	MONSANTO
ROUNDUP TRANSORB R	II	MONSANTO
ROUNDUP ULTRA	II	MONSANTO
ROUNDUP WG	IV	MONSANTO
RUSTLER	III	MONSANTO
SCOUT	III	MONSANTO
SCOUT N.A.	IV	MONSANTO
SHADOW 480 SL	III	CONSAGRO
STINGER	III	MONSANTO
SUCESOBR	III	OURO FINO
SUMÔ	I	PILARQUIM
TOUCHDOWN	III	SYNGENTA
TROP	III	MILENIA
TROP N.A.	IV	MILENIA
TUPAN	III	CROP-CHEM
ZAPP QI 620	III	SYNGENTA

Fonte: IMA, 2013

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994), o glifosato não apresenta propriedades mutagênicas e carcinogênicas. A toxicidade aguda desse composto é considerada baixa, apresentando uma DL₅₀ oral na faixa de 1950 a 5000 mg/kg para camundongos, ratos e cabras (FARZA, CUNHA e MALTY, 2009). Os efeitos tóxicos de formulações de glifosato podem resultar da presença de surfactante e outros elementos aditivos. O surfactante POEA tem toxicidade estimada cerca de três vezes maior que o glifosato.

Estudos toxicocinéticos em animais mostram uma absorção aproximada de 30-40% no tubo digestivo e escassa absorção cutânea. Uma vez absorvido se distribui amplamente pelo organismo, com maiores concentrações nos ossos, mas também encontrado nos intestinos, cólon e rins. Quase não é metabolizado sendo que 97-99% é eliminado inalterado. Tem uma meia vida de aproximadamente dois dias e seu principal produto de biotransformação é o AMPA. (BURGER e FERNÁNDEZ, 2004; OGA, 2003).

No homem, a excreção desse composto ocorre pelas vias intestinal (62 a 70%) e renal (15 a 36%). O Glifosato é eliminado principalmente na sua forma inalterada e em pequena proporção na forma de seu metabólito AMPA, e não é evidenciada a formação de outros metabólitos mais tóxicos (ACQUAVELLA et al., 2004; BURGER e FERNÁNDEZ, 2004; ROMANO, ROMANO e OLIVEIRA, 2009). Chan e Mahler (1992) administraram glifosato marcado com C¹⁴ em ratos por via oral (dois grupos com concentrações 5,6 e 56 mg/kg) e analisaram amostras de tecido, urina, sangue e fezes após 72 horas. Verificaram que 20-30% foi eliminado na urina, 70-80% nas fezes e aproximadamente 1% permaneceu nos tecidos.

Chan e Mahler (1992), também realizaram estudos com ratos expostos ao glifosato por via oral, e verificaram que os ratos machos, que ingeriram doses mais elevadas, tiveram significativa diminuição na contagem de esperma e as fêmeas tiveram um aumento do cio. A ação do glifosato no funcionamento de glândulas endócrinas foi investigada por Yousef et al. (1995) em coelhos e encontraram declínio no volume de ejaculação e na concentração do esperma. Estes investigadores sugeriram que tais efeitos poderiam ser devido ao efeito citotóxico direto do glifosato na espermatogênese e/ou indiretamente, via sistema endócrino.

Apesar do mecanismo de ação do glifosato em mamíferos não ser ainda totalmente esclarecido esse composto pode atuar em alguns outros mecanismos enzimáticos. O produto formulado Roundup® inibiu a síntese de esteroides por

desregulação da expressão da proteína StAR em cultivo de células testiculares de camundongo da linhagem tumoral Leydig MA-10. No mesmo trabalho, outros testes foram realizados, mas tais efeitos não foram evidenciados quando apenas o glifosato (princípio ativo) foi utilizado (WALSH et al., 2000). Arbuckle, Lin e Mery (2001) associaram o glifosato ao aumento da incidência de abortos entre a 12^a e a 19^a semana de gravidez em mulheres de fazendeiros expostas a esse composto e outros agrotóxicos. Utilizando apenas células mononucleares de sangue periférico humano, Martínez, Reyes e Reyes (2007) evidenciaram que, tanto o glifosato grau técnico, quanto o produto formulado Roundup® foram citotóxicos, e esse efeito foi proporcional ao tempo de exposição e à concentração. O Roundup® apresentou maior citotoxicidade quando comparado ao glifosato grau técnico.

Estudos em células endoteliais de veia umbilical humana, células de rim embrionário e células placentárias JEG3 humanas mostraram que quatro formulações de Roundup®, diluídas 100.000 vezes, foram capazes de causar apoptose nessas células. Cumpre ressaltar que estas diluições continham níveis inferiores aos dos resíduos encontrados em alimentos cultivados com glifosato (BENACHOUR e SÉRALINI, 2008).

Paz-Y-Miño et al. (2007) utilizaram o teste cometa como parâmetro de avaliação do efeito genotóxico em indivíduos expostos ocupacionalmente ao glifosato. O teste cometa é um método simples para medir quebras na fita de DNA (ácido desoxirribonucleico) de células eucarióticas, sendo uma técnica padrão para avaliação de danos no DNA e, conseqüentemente, de genotoxicidade. Os resultados do teste mostraram maior incidência de lesão no DNA no grupo exposto quando comparado ao grupo controle não exposto ocupacionalmente. Estes investigadores sugeriram que a aplicação do glifosato na forma de spray resulta em uma exposição que causa o efeito genotóxico. Mañas et al (2009a, 2009b) comprovaram a ação genotóxica do glifosato e de seu metabólito AMPA pelo teste cometa e teste do micronúcleo em culturas de linfócitos Hep-2 expostos por 4 horas ao glifosato.

Gasnier et al. (2009) avaliaram os efeitos tóxicos de quatro formulações contendo glifosato, em células hepáticas humanas da linhagem HepG2. Foram testadas concentrações bem inferiores às utilizadas comumente na agricultura e efeitos tóxicos foram obtidos a partir de 5 ppm e ação como desruptor endócrino a partir de 0,5 ppm. Neste estudo foi demonstrado o primeiro estágio de lesão do

DNA, causado por níveis residuais de formulações a base de glifosato, em células humanas.

Benachour e Séralini (2008) confirmaram o efeito citotóxico do glifosato em células humanas de embriões, placenta e cordão umbilical, com doses muito abaixo das utilizadas em campos de soja. Foi observada a morte celular em poucas horas e, mesmo em doses diluídas 1000 vezes, o Roundup® estimulou a morte das células de embriões humanos, o que poderia provocar malformações, abortos, problemas hormonais, genitais ou de reprodução, além de diversos tipos de cânceres. Um estudo publicado pelo mesmo autor levantou preocupações acerca da potencial toxicidade do milho geneticamente modificado (NK603) com e sem o herbicida glifosato. Dados bioquímicos confirmaram significativas deficiências renais crônicas em ratos com 76% dos parâmetros renais alterados. Sugeriram que tais resultados poderiam ser explicados pelas desregulação endócrina causada pelo Roundup®, mas também pelo aumento da expressão do transgene no Organismo Geneticamente Modificado (OGM) e suas consequências metabólicas (SÉRALINI et al., 2012).

Apesar deste alerta, a *European Food Safety Authority* (EFSA) concluiu que o estudo como foi publicado não impacta no curso da reavaliação do glifosato, não vendo também necessidade de reabrir a avaliação de segurança existente no milho NK603 ou outros relacionados (EFSA, 2012).

Um estudo epidemiológico conduzido nos Estados Unidos não conseguiu mostrar a associação da incidência de câncer e o uso de glifosato, mas De Roos (2005) sugeriu uma provável associação do glifosato com a incidência de mieloma múltiplo, sendo necessários maiores estudos para essa conclusão.

Rodrigues et al. (2009) descreveram os sintomas de intoxicação aguda de glifosato em humanos, a partir de uma revisão da literatura de casos de exposição por via oral. Os sintomas incluíram dores abdominais, vômitos, excesso de líquido nos pulmões, dores de cabeça, perda de consciência, destruição de células vermelhas do sangue, palpitações cardíacas, dormência facial, coceiras, formigamento, entre outros. Além desses sintomas, foram evidenciadas alterações no eletrocardiograma, lesões nos rins, pulmões e trato gastrointestinal, riscos de ocorrência de linfoma não-Hodgkin.

O glifosato não foi classificado sobre sua carcinogenicidade pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Já a agência de proteção ambiental dos

Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* - US EPA) classificou o glifosato como pertencente ao Grupo E: “Sem evidência de carcinogenicidade em humanos”, apesar de estudos mostrarem associação do glifosato, ou sua formulação comercial, com linfoma não-Hodgkin’s, mieloma múltiplo, lesão do DNA, leucemia e abortos espontâneos (IARC, 2013; US EPA, 1993; WATTS, 2009; HARDELL, ERIKSSON e NORDSTRÖM, 2002; MINK ET al., 2012).

2.2.2 Glifosato em alimentos

No Brasil, o glifosato é utilizado principalmente nas culturas de soja, milho, arroz, café, cacau e cana-de-açúcar, além do uso no controle de plantas aquáticas com seu uso regulamentado pela ANVISA. A **Tabela 6** apresenta as culturas, nas quais o glifosato pode ser utilizado, bem como o Limite Máximo de Resíduo (LMR) para cada uma.

Além do uso controlado e permitido, deve-se preocupar com o uso ilegal do glifosato pois, com frequência, as formulações contrabandeadas são mais tóxicas que o produto puro. O glifosato não é assimilado metabolicamente pela soja transgênica, muito utilizada na alimentação humana e de animais, podendo acumular no vegetal e em seus grãos, o que torna imprescindível o desenvolvimento de estudos e monitoramento deste herbicida nos grãos e derivados (ABREU, MATTA e MONTAGNER, 2008).

Ingestão Diária Aceitável (IDA) estipulada para o glifosato é de 0,042 mg/kg de peso corporal. Isso significa que esse valor é a quantidade máxima de glifosato que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais (ANVISA, 2013b). No entanto, sabe-se que os surfactantes usados nas preparações técnicas podem ser mais tóxicos que o princípio ativo, além de que nos alimentos ainda podem ser encontrados mais de um princípio ativo, sendo esse sinergismo desconhecido.

Tabela 6 - Limites máximos de resíduos (LMR) e intervalo de segurança de glifosato de acordo com a cultura onde é aplicado.

Cultura	Modalidade de Emprego (Aplicação)	LMR (mg/kg)	Intervalo de Segurança (Dias)
Algodão	Pós-Emergência	3,00	(1)
Ameixa	Pós-Emergência	0,20	17
Arroz	Pós-Emergência	0,20	(1)
Aveia Preta	Dessecante	20,00	4
Azevém	Dessecante	10,00	4
Banana	Pós-Emergência	0,02	30
Cacau	Pós-Emergência	0,10	30
Café	Pós-Emergência	1,00	15
Cana-de-açúcar	Maturador	1,00	30
Cana-de-açúcar	Pós-Emergência	1,00	(1)
Citrus	Pós-Emergência	0,20	30
Coco	Pós-Emergência	0,10	15
Eucalipto	Pós-Emergência	Uso Não Alimentar	
Feijão	Pós-Emergência	0,05	(1)
Fumo	Pós-Emergência	Uso Não Alimentar	
Maçã	Pós-Emergência	0,20	15
Mamão	Pós-Emergência	0,10	3
Milho	Pós-Emergência	1,00	(1)
Nectarina	Pós-Emergência	0,20	30
Pêra	Pós-Emergência	0,20	15
Pêssego	Pós-Emergência	0,20	30
Pinus	Pós-Emergência	Uso Não Alimentar	
Seringueira	Pós-Emergência	Uso Não Alimentar	
Soja	Dessecante	10,00	7
Soja	Pós-Emergência	10,00	(1)
Trigo	Pós-Emergência	0,05	(1)
Uva	Pós-Emergência	0,20	17

(1) O intervalo de segurança para a cultura é não determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. Fonte: ANVISA, 2013b.

Nos últimos anos, a questão dos agrotóxicos no Brasil vem ganhando contornos cada vez mais preocupantes. Há uma grande pressão das multinacionais que dominam o mercado, sobre o órgão regulador para liberação de alguns produtos e/ou aumento de seu LMR. Em fevereiro de 2004, foi publicada a Resolução nº 33 da ANVISA aumentando o LMR de glifosato na soja de 0,2 para 10,0 mg/kg, devido às demandas referentes ao plantio da soja transgênica. Paralelamente a essa iniciativa, ocorreu a liberação da soja geneticamente modificada Roundup Ready (RR®), da Monsanto que visava a comercialização legal do grão (ANVISA, 2004; PACHECO e SCHOTTZ, 2005).

A análise de glifosato e AMPA feita em soja transgênica (GMRR BRS 244 RR®) mostrou que os resíduos dessas moléculas nos grãos ultrapassam o LMR pela legislação brasileira, mesmo seguindo o manejo correto e o tempo de carência

recomendado. Isso enfatiza a necessidade de monitorização desses resíduos nos alimentos consumidos, principalmente na soja (BOHM et al., 2008).

Em 2010, o Brasil manteve e reforçou a sua posição como o segundo maior produtor mundial de culturas geneticamente modificadas, sendo então, responsável por 17% de toda a produção mundial. Dos 25,4 milhões de hectares de culturas transgênicas cultivadas no Brasil em 2010, mais de 70% da área plantada foi da soja RR® (JAMES, 2010).

Segundo a Céleres (empresa de consultoria especializada no agronegócio brasileiro) na safra 2010/11, lavouras de milho transgênico do Paraná, resistentes a insetos e tolerante a herbicidas, demandaram 24,7% menos defensivos na safra de verão do que um plantio convencional (4,5 quilos e não mais 6,2 quilos por hectare, como anteriormente) (FREITAS-JÚNIOR, 2012).

Contudo, as lavouras transgênicas de soja (cultura que demanda sozinha, 48% de todos os agrotóxicos vendidos no país) utilizam agrotóxicos de forma mais intensa do que as que não adotam essa tecnologia. No Paraná, por exemplo, as lavouras com a tecnologia RR®, da Monsanto, empregaram, em média, 3,6 quilos de agroquímicos por hectare, o que equivale a 16,2% de aumento em relação aos 3,1 quilos consumidos em lavouras convencionais. A vantagem do uso de glifosato para o produtor está no manejo, pois nas lavouras RR®, vários herbicidas são substituídos por um único produto, o glifosato, em dosagem maior (FREITAS-JÚNIOR, 2012).

2.2.3 Aspectos analíticos do glifosato

Os métodos analíticos para determinação de glifosato têm sido desenvolvidos principalmente em alimentos e água, mas também em matrizes mais complexas como solo, soro sanguíneo e urina. A determinação do teor de glifosato nestas matrizes serve para produzir informações a respeito da exposição humana a esse produto, contaminação do ambiente e estudos de cinética em animais e no próprio homem.

A molécula do glifosato apresenta baixo peso molecular, alta polaridade, quatro sítios de ionização e nenhum grupo cromóforo para sua visualização por detectores simples. Por apresentarem baixa volatilidade, compostos como o glifosato necessitam de uma etapa de derivação pré-coluna para a obtenção de um derivado volátil a ser analisado em cromatografia gasosa (MARTINS-JÚNIOR et al., 2009), mas atualmente, poucos pesquisadores utilizam tal técnica.

Alferness e Iwata (1994) desenvolveram um método para análise de glifosato e AMPA em água, solo e matrizes vegetais e de origem animal que tinha como derivatizantes o ácido trifluoroacético anidro (TFAA) e heptafluorobutanol (HFB). Os analitos derivatizados foram quantificados usando cromatografia gasosa acoplado a detector de massas em modo SIM (*Selected Ion Monitoring*).

Tsuji, Ariyama e Yano (1997) desenvolveram um método para determinação simultânea de glifosato, glifosinato e seus respectivos metabólitos em solo e trigo utilizando como derivatizantes ácido acético e trimetilorto-acetato (TMOA), sendo os analitos posteriormente analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector fotométrico de chama (*Flame Photometric Detector* - FPD).

Stalikas e Pilidis (2000) otimizaram um método para extração e análise de glifosato e AMPA (dentre outros agrotóxicos do grupo) em água também utilizando como derivatizantes ácido acético e TMOA. Tais analitos foram posteriormente analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em modo SIM.

Börjesson e Torstensson (2000), tendo como matrizes águas subterrâneas e solo, após derivatização de glifosato e AMPA com TFAA e trifluoroetanol (TFE), analisaram os produtos derivatizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Embora tenhamos trabalhos utilizando a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida tem sido a técnica mais comum para determinação do glifosato e AMPA com derivatização pré ou pós-coluna, transformando-os em derivados fluorescentes ou apenas aumentando sua massa. A derivatização pós-coluna utilizando orto-ftalaldeído (OPA) após separação em coluna de troca catiônica foi primeiramente proposta por Moye, Miles e Schere (1983). Outros derivatizantes também são citados na literatura (ABAKERLI e FAY, 2003; HEGENDOORN et al., 1999; KRUIVE et al., 2011) sendo o cloroformato de 9-fluorenil-metoxicarbonil (FMOC-Cl) atualmente o mais utilizado para análise de glifosato e AMPA por

cromatografia líquida, principalmente devido à sua especificidade de reação com aminas primárias e secundárias. Apesar de haver diferentes condições de reação descritas na literatura, todas apresentam elevadas concentrações de FMOC-Cl devido à alta reatividade deste composto que em meio aquoso reage formando hidróxido de 9-fluorenil-metoxicarbonil (FMOC-OH) (MARTINS-JÚNIOR, 2005).

Bernal et al. (2010), pesquisando a toxicocinética do glifosato e AMPA em plasma de rato, inicialmente utilizaram cromatografia líquida e detecção por fluorescência após derivação pós-coluna com FMOC-Cl, mas como a técnica não foi suficientemente sensível, eles melhoraram sua sensibilidade acoplado um quadrupolo simples (ESI-MS), analisando no modo SIM. Sendo assim, além do processo de derivatização é necessário também selecionar bem o método de detecção para os fins pretendidos, muitas vezes sendo ainda necessário métodos de purificação.

Ghanem et al. (2007) utilizaram um método de análise de glifosato e AMPA em lamas de depuração com derivatização com FMOC-Cl, purificação com resina de troca aniônica e concentração em coluna SPE Oasis HLB® sendo posteriormente analisado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em *tandem* com ionização em *eletrospray* (LC/ESI-MS/MS), para atingir a sensibilidade necessária e retirada de interferentes.

Martins-Júnior et al. (2009) desenvolveram um método simples e específico para análise de glifosato e AMPA em soja utilizando LC/ESI-MS/MS, sem necessidade de qualquer tipo de derivatização ou purificação.

Também sem derivatização, mas utilizando outro tipo de analisador de massas (*Ion-Trap*), Li et al. (2009) desenvolveram um método para análise direta de resíduos de glifosato e glifosinato visando controle de qualidade de produtos como melão, batata, tomate e espinafre, dentre outros. Nesse caso a derivatização não foi necessária para alcançar baixos níveis de detecção, já que a técnica analítica de detecção apresentou sensibilidade necessária para a análise.

2.3 Milho

O milho é considerado um alimento energético para a dieta humana e animal, devido à sua composição predominantemente de carboidratos e lipídeos. A composição média do milho em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo (PAES, 2006).

Em todas as regiões brasileiras consumidoras de milho, as principais formas de aquisição domiciliar ainda são: o milho em grão, o milho em espiga ou enlatado, o creme de milho, os flocos de milho, o fubá (farinha de milho) e o pão de milho. Portanto, os produtos ou derivados obtidos por meio da moagem seca do milho são os mais apreciados, tendo participação efetiva como componente básico na dieta alimentar, especialmente das camadas mais pobres da população. O milho pode suprir as necessidades nutricionais do organismo, além de ser excelente complemento alimentar, mas ele não possui apenas aplicação alimentícia, o uso dos seus derivados é feito também pelas indústrias química, farmacêutica, de papéis, têxtil, além de outros usos ainda mais nobres (PAES, 2006).

O milho é a cultura de maior destaque da agricultura mundial. A safra 2012/2013 de milho no mundo está estimada em 839 milhões de toneladas, com uma área plantada de 175,2 milhões de hectares. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, responsável pela produção de 70 milhões de toneladas, em uma área de 16 milhões de hectares, estando atrás apenas de Estados Unidos e China, responsáveis respectivamente pela produção de 271 e 200 milhões de toneladas. Sua produção mundial está concentrada nos Estados Unidos, China, Brasil, União Europeia e Argentina, que juntos respondem por 56,2% e 74,4% da área plantada e da produção mundial, respectivamente (USDA, 2012).

A produção nacional do milho é relativamente dispersa no país. No entanto, os principais estados produtores, Paraná e Mato Grosso concentram quase a metade (43,4%) da produção nacional (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Produção brasileira de milho ano safra 2012/2013, por Estado

Milho	Ano Safra 2012/2013	%
Produção Nacional	71.936,40	100
	Mil Toneladas	
Principais Estados Produtores		
Paraná	16.626,90	23,1
Mato Grosso	14.588,30	20,3
Minas Gerais	7.452,00	10,4
Goiás	7.356,30	10,2
Mato Grosso do Sul	5.666,10	7,9
Rio Grande do Sul	4.838,50	6,7
São Paulo	4.748,60	6,6
Santa Catarina	3.234,50	4,5
Bahia	2.181,20	3,0
Outros	5.244,00	7,3

Fonte: CONAB, 2012

2.4 Soja

A soja é fonte de proteínas, ferro, vitamina B, fibras e isoflavona e é o alimento com maior teor de proteína entre os vegetais. Apresenta 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidrato, e os alimentos a base de soja, em forma de leite, sucos, carnes ou mesmo bolos, substituem refeições de pessoas com restrições alimentares, como alergia a laticínios, ou opcionais, como vegetarianismo (APROSOJA, 2012).

A soja é uma importante cultura da agricultura mundial. A safra 2012/2013 de soja no mundo está estimada em 264,3 milhões de toneladas, com uma área plantada de 108,5 milhões de hectares, sendo o Brasil, maior produtor mundial desta oleaginosa, responsável pela produção de 81,0 milhões de toneladas, em uma área de 27,5 milhões de hectares (USDA, 2012).

A produção mundial de soja está concentrada em três países Brasil, Estados Unidos e Argentina, que juntos respondem por 71,7% e 80,6% da área plantada e da produção mundial da oleaginosa, respectivamente (USDA, 2012). O Brasil apresenta, contudo, a maior capacidade de crescimento da atual produção, tanto

pelo aumento da produtividade, quanto pelo potencial de expansão da área cultivada (VENCATO et al., 2010).

Atualmente a produção de soja no Brasil é liderada pelos estados de Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás que produzem 72,8% da soja nacional. Mas a produção de soja está evoluindo também para novas áreas como Maranhão, Tocantins e Piauí, as quais respondem atualmente por 5,8% da produção Brasileira (Tabela 8).

Tabela 8 – Produção brasileira de soja ano safra 2012/2013, por Estado.

Soja	Ano Safra 2012/2013	%
Produção Nacional	82.627,60 Mil Toneladas	100
Principais Estados Produtores		
Mato Grosso	23.803,70	28,8
Paraná	15.207,40	18,4
Rio Grande do Sul	11.955,60	14,5
Goiás	9.159,10	11,1
Mato Grosso do Sul	6.243,20	7,6
Bahia	3.755,70	4,5
Minas Gerais	3.321,00	4,0
Maranhão	1.682,40	2,0
Tocantins	1.649,70	2,0
Piauí	1.477,30	1,8
Outros	4.372,50	5,3

Fonte: CONAB, 2012

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia para determinação de glifosato e AMPA e Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos de trabalhadores expostos a agrotóxicos.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia para determinação do glifosato e AMPA em soja e milho, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS/MS) sem derivatização;
- Avaliar a prevalência de resíduos de glifosato e AMPA em amostras de milho coletadas no comércio;
- Caracterizar o trabalhador rural da agricultura familiar quanto a dados epidemiológicos, estilo de vida;
- Caracterizar os tipos de agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores quanto à classe toxicológica e mecanismo de ação;
- Caracterizar a exposição dos trabalhadores rurais quanto à utilização de EPI's, preocupação com a toxicidade das substâncias e tempo de exposição;
- Avaliar parâmetros hematológicas e bioquímicos em trabalhadores da agricultura familiar expostos a agrotóxicos.

4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE GLIFOSATO E AMPA EM SOJA E MILHO (FUBÁ)

A validação de um método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Um método deve ser validado quando não for normalizado, for desenvolvido pelo próprio laboratório, quando os métodos normalizados forem usados fora dos escopos para os quais são concebidos ou quando forem feitas ampliações e modificações nos métodos normalizados. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio utilizados conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2010).

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Amostragem

Amostras de grãos de soja orgânica foram utilizadas como branco nos experimentos de recuperação. Estas amostras foram adquiridas em um supermercado de Belo Horizonte. As amostras foram trituradas em moinho refrigerado e acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno congeladas a $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$, até a realização das análises.

Amostras de fubá orgânico foram utilizadas como branco nos experimentos de recuperação. Estas amostras foram adquiridas em um supermercado de Belo Horizonte. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno congeladas a $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$, até a realização das análises.

4.1.2 Reagentes e Padrões

Os padrões primários dos compostos Glifosato e AMPA utilizados são marca Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha). Água purificada foi obtida em um sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Bedford, USA). Os reagentes utilizados foram de padrão analítico (p.a.), de grau HPLC ou para análise de resíduos (p.a.r.). Os solventes orgânicos utilizados foram: metanol grau HPLC (J.T. Baker, Phillipsburg, USA), diclorometano p.a.r. (Macron/JT Baker, Phillipsburg, USA), hidróxido de amônio p.a. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), formiato de amônio p.a. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e ácido fórmico 98% p.a. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções estoque dos analitos foram preparadas separadamente, em Água Milli-Q, na concentração de 447,27 ng/μL para Glifosato e 819,00 ng/μL para AMPA. As soluções foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 50,0 mL, envoltos com papel alumínio, sob temperatura de refrigeração entre 2°C e 8°C.

Todas as soluções padrão utilizadas foram preparadas em Água Milli-Q por diluições adequadas das soluções estoque, sendo utilizadas duas soluções intermediárias constituídas da mistura dos dois analitos. Na primeira solução intermediária (SI-1) as concentrações de glifosato e AMPA são 4,0 ng/μL e 80,0 ng/μL respectivamente. Na segunda solução intermediária (SI-2) as concentrações de glifosato e AMPA foram de 0,275 ng/μL e 5,5 ng/μL respectivamente. Tais soluções foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 15 mL sob temperatura de refrigeração entre 2°C e 8°C. Os testes de recuperação utilizaram a SI-1 e as curvas foram obtidas a partir da SI-2.

4.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram: balança analítica marca Scientech modelo SA210; balança semi-analítica marca Sartorius modelo TE612; centrífuga refrigerada marca Jouan modelo CR3i; microcentrífuga refrigerada marca Eppendorf

modelo 5415R; agitador de tubos marca IKA modelo MS3 basic; banho de ultrassom marca UltraCleaner Unique modelo 1400A.

4.3 Procedimentos de Extração

Foram pesados, em tubos de polipropileno de 50 mL, $2,00 \pm 0,03$ g de amostra sendo conduzidos estudos de recuperação em amostras fortificadas. A extração dos analitos foi realizada com 20,00 mL de água purificada acidificada com 0,1% v/v de ácido fórmico em ultrassom por 10 minutos com agitação anterior em vortex por aproximadamente 15 segundos para homogeneização. Após essa primeira extração foi adicionado 5 mL de diclorometano, sendo repetido o processo em ultrassom por 10 minutos com agitação em vortex por aproximadamente 15 segundos repetindo-se por mais 5 minutos em ultrassom.

Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15,0 minutos a 15 °C. Uma alíquota de 500µL do sobrenadante foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL, em seguida, adicionou-se 500µL de metanol. Verteu-se o tubo 3 vezes para a precipitação de proteínas, centrifugando novamente a 13000 rpm durante 15,0 minutos a 8 °C. Após a centrifugação, 100,0 µL da amostra foram transferidos para vial cromatográfico de 2,0 mL e foram adicionados 900,0 µL de água para injeção no sistema LC/ESI-MS/MS.

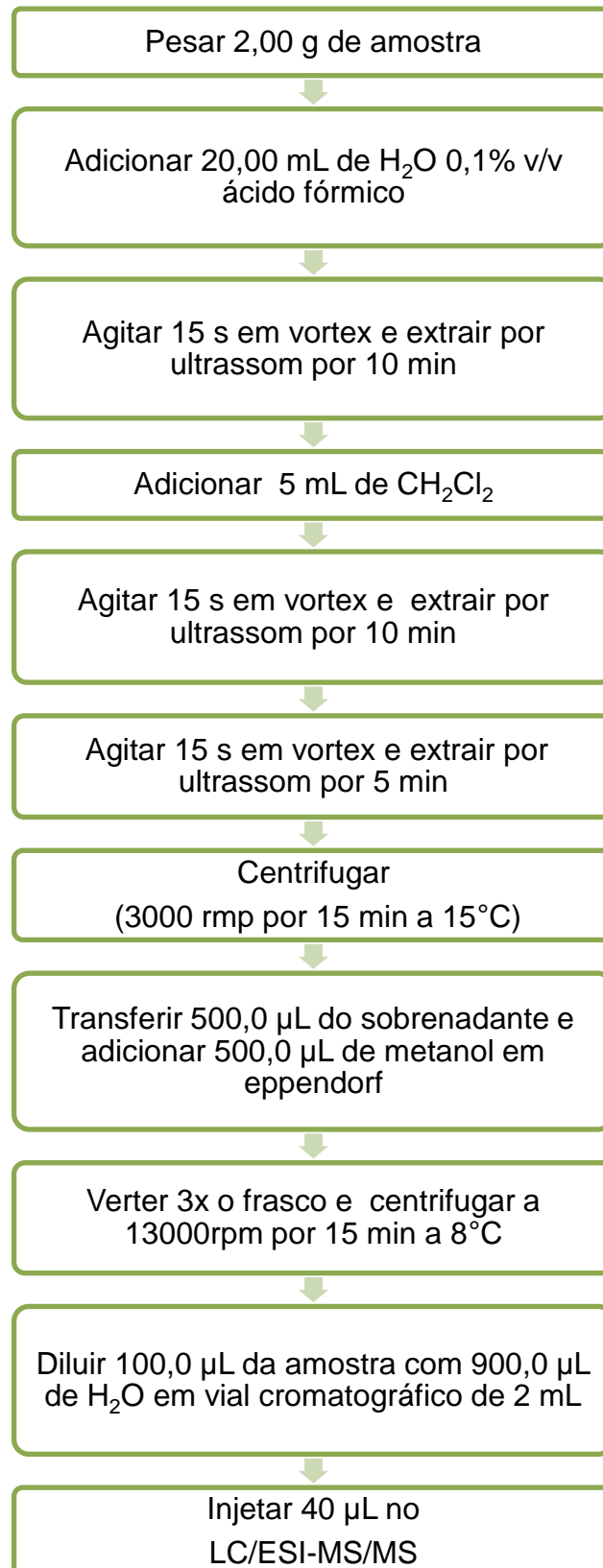


Figura 7 – Fluxograma do processo de extração

4.4 Espectrometria de massas

O espectrômetro de massas é um instrumento composto basicamente por três unidades fundamentais: fonte de íons com a finalidade de gerar os íons a serem analisados na fase gasosa a partir das amostras de interesse; analisador ou filtro de massas que emprega combinações entre campos elétricos e magnéticos para separar os íons gerados na fonte de ionização de acordo com as suas razões massa/carga (m/z) e detector que tem a finalidade de quantificar os íons provenientes do analisador de massas (MARTINS JR., 2005; KUSSUMI, 2007).

A espectrometria de massas em tandem é a área da espectrometria de massas interessada em estudar a geração de íons produtos formados por colisões de um íon precursor previamente selecionado. Este processo de fragmentação de um íon de m/z específica requer o isolamento deste íon, seguido da fragmentação do mesmo e da análise dos íons produtos formados por outro analisador de massas (HOFFMANN and STROOBANT, 2007; MARTINS JR., 2009).

Um sistema triploquadrupolar é composto por três analisadores quadrupolares dispostos em série. Neste sistema, o primeiro quadrupolo (Q1) e o terceiro quadrupolo (Q3) funcionam como filtro de massas. O segundo quadrupolo (q2) é operado como cela de colisão, onde, reações de dissociação de íons de interesse são realizadas (**Figura 8**) (MARTINS JR., 2009).

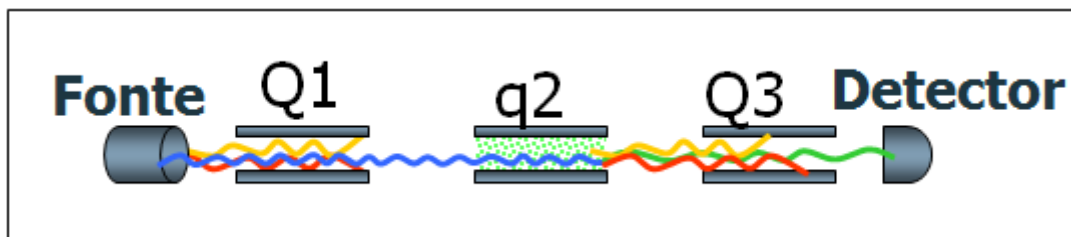


Figura 8 - Diagrama de um instrumento triploquadrupolo. Q1 e Q3 são espectrômetros de massas e o quadrupolo do meio (q2) é a célula de colisão.

4.5 Condições do sistema de cromatografia

Foi utilizado em um sistema LC/ESI-MS/MS composto de um espectrômetro de massas triploquadrupolo LC 6460 (Agilent Technologies, Waldbronn, AL) equipado com fonte de ionização API-ESI com tecnologia Agilent JetStream® (*electrospray*), conjunto compressor de ar / gerador de nitrogênio NG15 Atlas Copco com tecnologia *Pressure Swing Adsorption* e reservatório de 200 litros (Atlas Copco, Suécia). O espectrômetro de massas foi acoplado a um cromatógrafo líquido série Agilent Serie 1200 SL (Agilent Technologies) equipado com bomba binária, sistema micro-degaseificador *online* a vácuo, amostrador automático com controle de temperatura e capacidade para 54 + 54 frascos de amostra de 2,0 mL e forno para coluna analítica. O sistema de controle, aquisição e tratamento dos dados foram realizados com o *software* Agilent MassHunter Workstation versão B.03.02.

O espectrômetro de massas foi calibrado nos modos de íons positivos e negativos com uma solução de padrão (*Low Concentration Tuning Mix*). O nitrogênio obtido pelo gerador foi utilizado como gás nebulizante, gás secante e gás de dessolvatação na fonte. Como gás de colisão foi utilizado um Nitrogênio UltraPuro 6.0 da White Martins. As **tabelas 9** e **10** apresentam, respectivamente, os valores otimizados para a fonte JetStream® e para análise de glifosato e AMPA em soja e milho.

Tabela 9 - Parâmetros da fonte de ionização JetStream® empregados nas análises.

Parâmetro	Polaridade (+)	Polaridade (-)
GasTemp	345 °C	345 °C
DryingGasFlow	12 L/min	12 L/min
NebulizerGas	50 psi	50 psi
SheathGasTemp	350 °C	350 °C
SheathGasFlow	12 L/min	12 L/min
CapillaryVoltage	+5500 V	-4500 V
NozzleVoltage	500 V	500 V

Tabela 10 - Parâmetros otimizados para análise de glifosato e AMPA em amostras de soja e milho.

Composto	Transição (m/z)	Propósito	Dwell time	Fragmentor	Energia de Colisão	Polaridade (ESI)
Glifosato	170>88	Quantificação	250ms	62	2	Positiva
Glifosato	170>60	Confirmação	250ms	62	14	Positiva
AMPA	110>63	Confirmação	250ms	77	14	Negativa
AMPA	110>79	Quantificação	250ms	77	22	Negativa

4.6 Seleção da fase móvel

O glifosato e seu metabólito AMPA apresentam elevada polaridade, grande tendência em formar espécies iônicas e comportamento zwitteriônico. No caso dos compostos mencionados, os grupos fosfato e carboxílico têm maior caráter ácido que o amônio. Sendo assim, os eletrólitos adicionados à fase móvel participam dos processos de associação e dissociação dos analitos, isto porque, apesar dos analitos já estarem ionizados em fase líquida e por possuírem diferentes sítios ionizáveis, a carga dos compostos em fase líquida varia em função do pH da solução, devendo-se atentar a isso já que a transição pesquisada para cada composto leva em consideração a relação massa/carga (m/z) que será característica em uma faixa de pH, relacionado às constantes de dissociação, que no caso do glifosato são $pK_1 = 0,8$; $pK_2 = 2,2$; $pK_3 = 5,4$ e $pK_4 = 10,2$, conforme **Figura 9**.

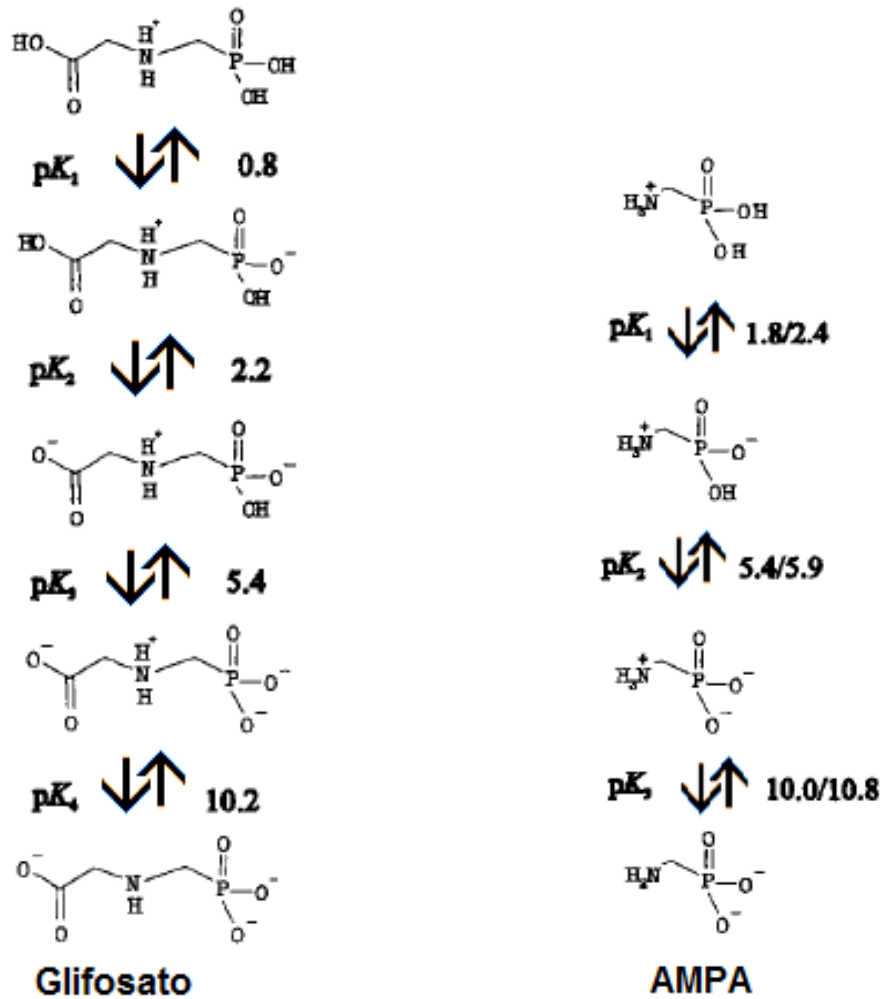


Figura 9 – Constantes de ionização do glifosato e AMPA. Fonte: CIKALO, 1996

De acordo com o trabalho de Martins-Júnior (2005) os melhores picos foram obtidos com o emprego de aditivos de pH alto, neste caso, carbonato de amônio e hidróxido de amônio sabendo-se que o aumento do pH da solução que contribui para o processo de dissociação dos analitos já na fase líquida. No presente trabalho optou-se pela seleção de um único aditivo que se adequasse aos modos de ionização positivo e negativo, uma vez que o glifosato e o AMPA apresentaram maior sensibilidade em modos de ionização de polaridade diferente. Empregou-se como aditivo o formiato de amônio 5 mmol/L e hidróxido de amônio 0,1 % v/v.

Empregou-se como fase móvel Solução A aquosa contendo formiato de amônio 5mmol/L e hidróxido de amônio 0,1 % v/v (pH \approx 9) e Solução B metanol. A proporção das fases foi de 85 % da fase A e 15 % da fase B (sem gradiente), com fluxo de 0,3 mL/min. A coluna utilizada foi uma Agilent Zorbax® SB-C18 2,1 x 50 mm x 1,8 μ m, mantendo-se o forno a 35 °C.

4.7 Parâmetros de Validação

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (EC, 2011). Tais processos de validação permitem avaliar não somente a exatidão e a precisão de um método, mas também outros importantes parâmetros típicos de desempenho como linearidade da curva de calibração, faixa de trabalho, sensibilidade, seletividade, efeitos de matriz, limites de detecção e de quantificação (SOUZA, 2007; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

O documento SANCO nº 12495/2011 é um guia específico para laboratórios oficiais envolvidos no controle de resíduos de agrotóxicos em alimentos da União Europeia e descreve métodos de validação e controle de qualidade de modo a padronizar e garantir a qualidade e comparabilidade dos resultados obtidos. Segundo tal documento, a validação de método intralaboratorial deve ser realizada para fornecer evidência de que um método é adequado ao propósito para o qual será utilizado (EC, 2011).

Sendo assim, a validação do método foi baseada em parâmetros da EUROPEAN COMMISSION (2002) e documento nº SANCO/12495/2011 (EC, 2011). Os testes estatísticos e as premissas associadas a esses testes foram baseados em Souza (2007). Foi conduzida por dois técnicos treinados na técnica, seguindo procedimentos baseados na NBR ISO/IEC 17025: 2005, executada em dias diferentes. O delineamento experimental incluiu curvas do analito em solvente e em matriz, amostras brancas e adicionadas. Os parâmetros analisados foram seletividade, linearidade, efeito de matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e quantificação e incerteza.

Para a validação, foram escolhidos soja e milho por apresentarem culturas representativas, com teor de óleo diferentes, alto consumo de glifosato e grande produção brasileira. A cultura de soja foi a principal consumidora de agrotóxicos do Brasil, em 2011, segundo dados do SINDAG, e o milho é uma das quatro culturas que mais impulsionaram o aumento de quase 30% do uso de agrotóxicos no primeiro trimestre do Brasil, quando se compara os anos de 2011 e 2012 (IEA, 2012;

SINDAG, 2012). O procedimento escolhido para extração foi adaptado dos trabalhos de Martins-Júnior (2005) e Krueve et al. (2011).

4.7.1 Linearidade e Curva de calibração

A linearidade é a capacidade de um método analítico gerar resultados diretamente proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada. A equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva de calibração e o ajuste desta equação geralmente é feito pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Exceto quando ocorrem grandes erros no preparo das curvas, os erros devidos à calibração correspondem aos menores componentes na compilação da incerteza total.

A curva de calibração de um método analítico é o intervalo entre os menores e maiores níveis (incluindo estes) que tenham demonstrado precisão, exatidão e linearidade utilizando o método pretendido. Dentro dessa faixa de trabalho a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A curva de calibração deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (HUBER, 1998; INMETRO, 2010; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

A linearidade foi avaliada baseando-se no procedimento descrito por Souza e Junqueira (2005). Foram preparadas curvas de calibração com oito níveis de concentração e três replicatas independentes, buscando-se selecionar apenas 6 níveis para os testes estatísticos de linearidade. As curvas foram injetadas de modo aleatório.

O modelo $Y = a + bX$, em que Y representa as respostas dos picos, no caso foi utilizado as áreas e X as concentrações dos padrões dos analitos. O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi utilizado para estimar os parâmetros da regressão a e b . O teste de resíduos padronizados Jackknife foi aplicado para a detecção de valores dispersos (*outliers*). As premissas da análise de regressão foram previamente verificadas utilizando testes de Ryan-Joiner, Brown-Forsythe e

Durbin-Watson para verificar, respectivamente, normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos. Análise de variância foi utilizada para verificar a adequação do ajuste ao modelo linear (SOUZA, 2007; THOMPSON et al., 2002).

As curvas foram preparadas em balões volumétricos de 5 mL, com três replicatas independentes de cada ponto de calibração para testes de linearidade e efeito de matriz. Os volumes dos balões foram completados com água Milli-Q. As faixas de concentração foram de 0,0025 a 0,060 ng/μL para glifosato e 0,050 a 1,00 ng/μL para AMPA. Estas soluções foram preparadas com frequência diária.

4.7.2 Seletividade e Efeitos de matriz

A seletividade é um parâmetro de desempenho relacionado à capacidade do método de determinar especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz, ou mesmo outros analitos, sob condições determinadas (EURACHEM, 1998; SOUZA, 2007).

A *European Commission* (EC) define como especificidade a capacidade de um método distinguir o analito de outra substância, pertencente da matriz ou não, sendo esta característica depende essencialmente da técnica de medição descrita (EC, 2002). Entretanto, segundo a IUPAC (VESSMAN et al., 2001), este conceito expressa a seletividade do método.

Estudos dos efeitos de matriz correspondem um tipo específico de estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). A matriz pode conter compostos que podem interferir na medida feita pelo detector selecionado. Dependendo de como a identidade do analito é estabelecida, interferentes podem inibir a detecção distorcendo o sinal proveniente do analito, inibindo a ionização da substância de interesse, por exemplo. Diferentemente, os interferentes também podem contribuir para o sinal atribuído ao analito, com efeito de aumentar a concentração do mesmo (EURACHEM, 1998).

A ausência de resultados falso-positivos para as amostras brancas em adição à combinação da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de

massa (LC-MS/MS) obtém-se uma seletividade que raramente é comprometida devido ao fornecimento simultâneo do tempo de retenção, relação entre os íons, abundância do analito, separação e detecção (VESSMAN et al., 2001).

Para a avaliação do efeito de matriz foi empregado o método de adição de padrão. Para comparação da inclinação, duas curvas de calibração exatamente iguais em concentração foram preparadas em três replicatas independentes, injetadas em ordem aleatória, no mesmo dia. A curva em solvente foi preparada conforme descrito nos experimentos de avaliação da linearidade, utilizando-se 100 μL de Água Milli-Q adicionada de 900 μL de cada ponto da curva, partindo-se dos balões volumétricos de 5 mL. Para o preparo da curva em matriz utilizou-se de 100 μL do extrato de amostras brancas adicionada de 900 μL de cada ponto da curva, provenientes dos balões volumétricos de 5 mL.

4.7.3 Exatidão

A exatidão é o grau de concordância entre o valor médio de uma série de resultados de ensaios e o valor de referência aceito, sendo assim, expressa os erros sistemáticos ou tendências (EC, 2002; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). Segundo Huber (1998), exatidão se define como a extensão na qual os resultados gerados por um método e os valores verdadeiros concordam. Para avaliação da exatidão de um método são utilizados materiais de referência certificados (MRC), materiais de referência (MR), métodos de referência ou ensaios de adição/recuperação (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

Segundo o documento nº SANCO/12495/2011, o método analítico deve ser capaz de fornecer valores médios de recuperação para cada nível adicionado na faixa de 70 a 120%, com RSD (desvio padrão relativo) de repetitividade $\leq 20\%$, para todos os compostos pesquisados usando o método (EC, 2011).

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de valores dispersos pelo teste de Grubbs. As premissas de normalidade (teste de Ryan-Joiner) e homoscedasticidade dos resíduos (teste de Brown-Forsythe) dos

resultados de recuperação, utilizados na análise de variância, foram previamente testadas como proposto por Souza (2007).

Exatidão foi pesquisada por meio das médias de recuperação obtida em ensaios com amostras de milho (fubá) e soja brancas adicionadas de padrão correspondentes aos níveis 1, 2, 3 e 7 da curva de calibração, sendo doze replicatas independentes de cada nível (EC, 2011). As concentrações de glifosato e AMPA nas amostras analisadas foram calculadas utilizando-se das curvas de calibração nas respectivas matrizes.

4.7.4 Precisão

A precisão diz respeito à distribuição dos erros aleatórios de um sistema de medição. Indica o grau de dispersão de diversos valores individuais em torno do valor mais provável, sendo então o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições pré-estabelecidas específicas. Normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio, sendo dependente da concentração do analito. Uma menor precisão é indicada através de um elevado desvio padrão (EC, 2002; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

As condições mais comuns para obtenção da precisão são repetitividade e reprodutibilidade. A repetitividade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. A precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório (EC, 2002; EURACHEM, 1998; INMETRO, 2010; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

Segundo o documento nº SANCO/12495/2011, o método analítico deve ser capaz de fornecer valores médios de recuperação com os desvios padrão relativos de repetitividade (DPRr) e os desvios padrão de reprodutibilidade parcial (DPRR) $\leq 20\%$ para todos os compostos pesquisados usando o método (EC, 2011).

Precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial), foi expressa em termos de desvios-padrão relativos e estimada por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos, sendo pesquisados em ensaios com amostras de milho (fubá) e soja brancas adicionadas de padrão em níveis correspondentes aos níveis 1, 2, 3 e 7 da curva de calibração, sendo doze replicatas independentes de cada nível. As amostras foram divididas em quatro lotes com três replicatas de cada nível, analisados em dois diferentes dias por dois analistas diferentes: dias 1 e 2 pelo analista 1 e dias 3 e 4 pelo analista 2 (EC, 2011; SOUZA, 2007). As concentrações de glifosato e AMPA nas amostras analisadas foram calculadas utilizando-se das curvas de calibração na matriz respectiva.

4.7.5 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O Limite de Detecção (LD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada pelo método, porém, não necessariamente corretamente quantificada, devido à presença de um erro muito grande. Pode ser definido também como a menor concentração do analito detectada em amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada e distinguida de zero (sinal/ruído ≥ 3) ou também como a média mais três desvios padrão das respostas obtidas para as amostras brancas (HUBER, 1998; SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis nas condições estipuladas do teste (EC, 2002) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

O LQ foi estabelecido como a menor concentração estudada na qual o método operou com exatidão e precisão aceitáveis, ou seja, valores médios de recuperação obtidos para as replicatas de amostras adicionadas, sendo considerado o menor nível de concentração estudado que atendeu os requisitos estipulados. Para cada nível adicionado na faixa de 70 a 120%, com RSD (desvio padrão relativo) de repetitividade $\leq 20\%$, para o composto pesquisado (SOUZA, 2007; EC, 2011).

O LD foi estabelecido como a concentração abaixo da qual o método não pode operar com exatidão e precisão aceitáveis de acordo com Souza (2007), sendo a menor concentração detectada em todas as amostras adicionadas, mas não necessariamente quantificada, diferente de zero, tendo um sinal-ruído pelo menos ≥ 3 . No presente trabalho, baseando-se também no método visual, considerando a concentração mínima adicionada confirmada e detectada com pelo menos com três replicatas independentes com adição de padrão neste nível foi considerado o nível logo abaixo do nível de LQ.

4.7.6 Incerteza da medição

A incerteza da medição é definida internacionalmente como o parâmetro associado ao resultado de uma medida que é característico da dispersão dos valores que pode ser razoavelmente atribuído à medida. O intervalo “ $a \pm 2u$ ” representa um nível de confiança de 95% que se encontrará o valor real, sendo “ a ” o valor medido e “ $2u$ ” a incerteza expandida (CODEX, 2004).

Não é um dos parâmetros de validação, mas é um requisito imprescindível da norma ISO/IEC 17025:2005, tendo como conceito a faixa que engloba o resultado reportado no qual o valor verdadeiro é encontrado em uma probabilidade específica (nível de confiança usualmente utilizado de 95%). Dados de incerteza podem ser calculados utilizando exatidão e reprodutibilidade, ou seja, a partir de dados de validação (EC, 2011).

De acordo com a norma ISO/IEC 17025:2005, todo laboratório de ensaio devem ter procedimentos para a estimativa das incertezas de medição. Nos casos onde a natureza do método de ensaio impedir o cálculo rigoroso (a análise de

resíduos se enquadra nesse caso), o laboratório deve pelo menos tentar identificar todos os componentes de incerteza e fazer uma estimativa razoável, baseada no conhecimento do desempenho do método e no escopo da medição, devendo fazer uso de experiência e dados de validação (ABNT, 2005).

A quantificação da incerteza da medição associada ao resultado de ensaio realizado neste trabalho foi baseada no conhecimento do desempenho do método e no escopo da medição, utilizando dados provenientes de processos de validação de métodos. No campo da incerteza de medição, o desvio padrão experimental denomina-se incerteza padrão de medição. Desse modo, neste trabalho, os parâmetros de desempenho do método, avaliados em ambiente intralaboratorial, foram adotados para estimativa da incerteza.

4.8 Resultados e Discussão

4.8.1 Seleção da fase móvel

Baseado na pesquisa de Martins-Júnior (2005) escolheu-se trabalhar com fase móvel básica, devido a uma melhor ionização tanto do glifosato em modo positivo quanto do AMPA em modo negativo. Os testes iniciais foram com o carbonato de amônio, mas logo nos primeiros ensaios houve entupimento do capilar de entrada do detector de massas. Além disso, o preparo dessa solução foi bastante trabalhoso, com grande precipitação do sólido.

Após a manutenção corretiva no aparelho, optou-se por utilizar solução de hidróxido de amônio, sendo esta muito volátil, foi utilizado o sal de formiato de amônio para formação de um tampão que estabilizasse a fase móvel e, conseqüentemente, os compostos analisados.

A escolha do metanol também foi baseada na pesquisa de Martins-Júnior (2005), devido à baixa solubilidade glifosato e do AMPA em acetonitrila somada à maior praticidade do uso do metanol levando-se em consideração que este já fazia parte da rotina de outras metodologias utilizadas no laboratório.

4.8.2 Linearidade e Curva de calibração

Valores dispersos foram detectados e retirados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife sendo excluídos um para o AMPA e quatro para o glifosato (Figura 10a e 10b).

A curva de calibração analítica obtida para cada um dos analitos é apresentada na Tabela 11 e Figuras 11 e 12. Foi confirmado que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, são independentes e homoscedásticos, permitindo a utilização dos testes de hipóteses de t e de F, além do emprego da análise de variância para estimativa da significância da regressão e do desvio da linearidade. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. A significância da regressão ($p < 0,01$) e os desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) indicaram linearidade nas faixas de concentração estudadas para cada analito. Os gráficos apresentados referem-se à testes de linearidade em solvente, para o AMPA e em matriz milho para Glifosato.

Tabela 11 – Faixa de operação analítica validada para glifosato e AMPA.

Analito	Faixa de operação validada	
	(ng/ μ L)	(mg/kg)
Glifosato	0,005 a 0,05	1,0 a 10,0
AMPA	0,10 a 1,0	20,0 a 200,0

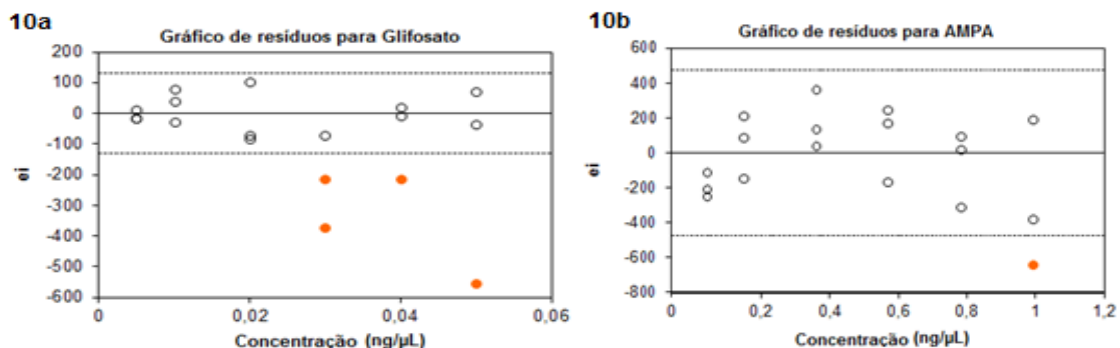


Figura 10 - Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão de glifosato e AMPA no ensaio de avaliação da linearidade com indicação dos respectivos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. e_i = resíduo da regressão, \bullet = valor extremo, ----

$$= \pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$$

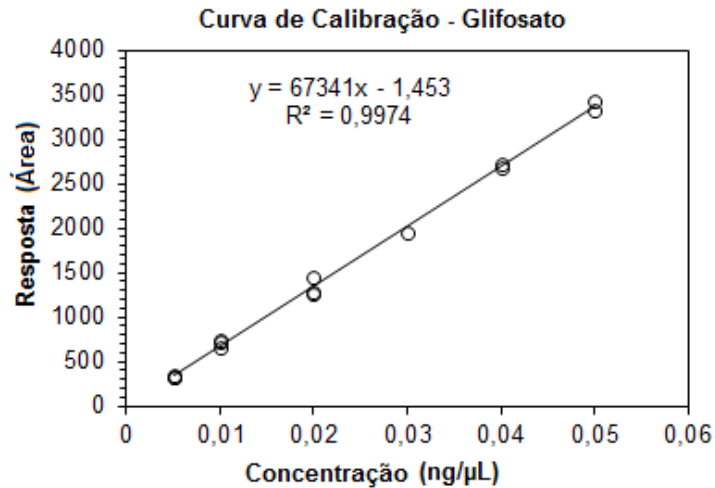


Figura 11 – Curva de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para Glifosato.

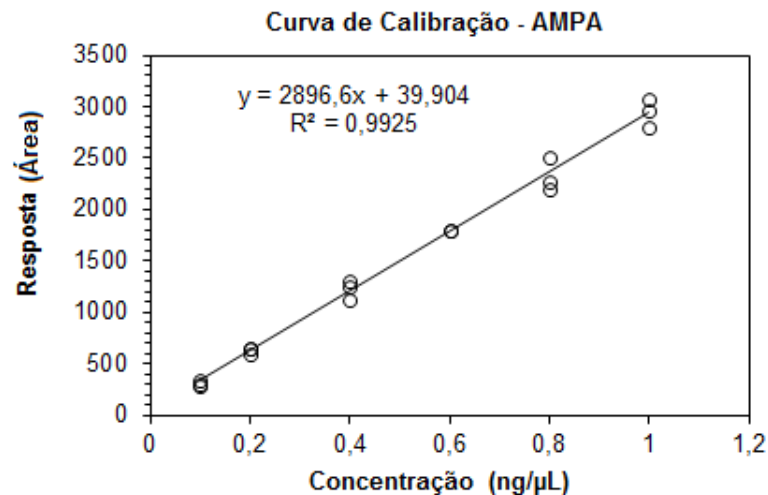


Figura 12 – Curva de calibração obtidas nos ensaios de avaliação da linearidade para AMPA.

Abakerli e Fay (2003) obtiveram uma linearidade do equipamento na faixa de concentração de 0,01 a 10,0 µg/mL com um coeficiente de correlação de 0,99. Já Martins-Júnior (2005) obteve uma linearidade na faixa entre 0,1 a 3,0 µg/L para análise em soja com coeficiente de correlação maior que 0,999 para ambos. Segundo Granby, Johannesen e Vahl (2003) a faixa linear de operação foi de 0,02 a 2,50 mg/kg de glifosato em cereais (correspondente a 0,0015 a 0,15 ng/µL), com coeficiente de determinação de 0,999121. Li Bo et al (2007) validaram uma faixa linear de 0,20 a 10,0 µg/L para alimentos.

É importante ressaltar a grande variedade de unidades utilizadas para verificação da linearidade. Tal variação é proveniente da sensibilidade do equipamento, do tipo de análise (direta ou com derivatizante), da massa de amostra

extraída e do método de extração utilizado, sendo que o mais útil seria informar a linearidade em mg/kg, unidade esta utilizada nos limites determinados pela ANVISA. Apenas Granby, Johannesen e Vahl (2003) informam claramente a correspondência entre os valores da curva quanto comparados aos limites obtidos. Nos outros, deve-se observar os fatores de diluição da amostra para fazer essa correspondência. Martins-Júnior (2005) utiliza 1000 como fator de diluição da amostra. No presente trabalho, o fator obtido foi 200. Deve-se observar também que a grande maioria dos trabalhos utiliza apenas o coeficiente de determinação (R^2) para verificar a linearidade da curva, sendo que um valor próximo de um não é necessariamente resultado de uma relação linear.

4.8.3 Seletividade e Efeito de matriz

A cromatografia clássica tem como um dos parâmetros principais a separação dos analitos de interesse por tempo de retenção. Tal parâmetro não tem tanta significância quando se trata de espectrometria de massas sequencial ou triploquadrupolar, já que os agrotóxicos, neste caso, são detectados e quantificados baseados nas transições características de cada um e na proporção entre as transições. De acordo com o documento SANCO, são necessárias apenas duas transições de m/z para autoconfirmação do resultado (EC, 2011).

As **Figuras 13** e **14** referem-se às amostras brancas (sem presença de agrotóxicos) e mostram o perfil de cada matriz. O cromatograma do branco de soja indica um possível interferente do AMPA. Na transição de quantificação foi detectado um pico com TR bem próximo ao do padrão, mas quando foi analisada a proporção entre as transições, verificou-se que se encontram fora dos parâmetros de aceitabilidade estipulados de tolerância máxima da relação entre os íons de $\pm 20\%$ (EC, 2011).

As **Figuras 15** e **16** mostram que apesar dos analitos de interesse apresentam tempos de retenção (TR) muito próximos (AMPA: TR 0,509 minutos e Glifosato: TR: 0,516 minutos), cada um apresenta pelo menos duas transições características de cada composto, sendo que nesse estudo, cada um foi analisado

em uma polaridade diferente (AMPA: ionização negativa; Glifosato: ionização positiva). Desse modo, o método foi capaz de identificar e quantificar isoladamente os compostos pesquisados.

Foram feitos testes utilizando colunas C8 e C18. Como os analitos não apresentaram retenção em nenhuma delas optou-se por utilizar uma C18 objetivando-se maior retenção dos interferentes.

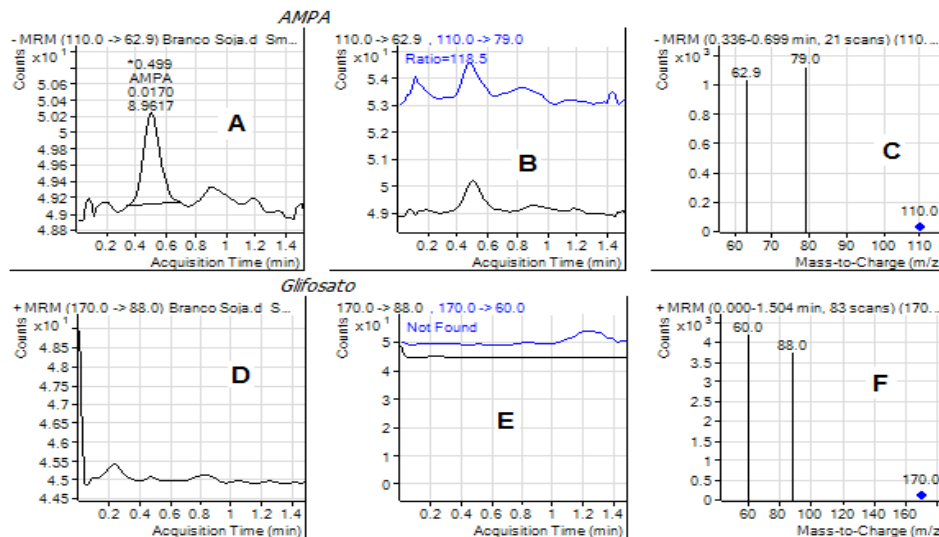


Figura 13 - Cromatogramas mostrando branco de soja. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.

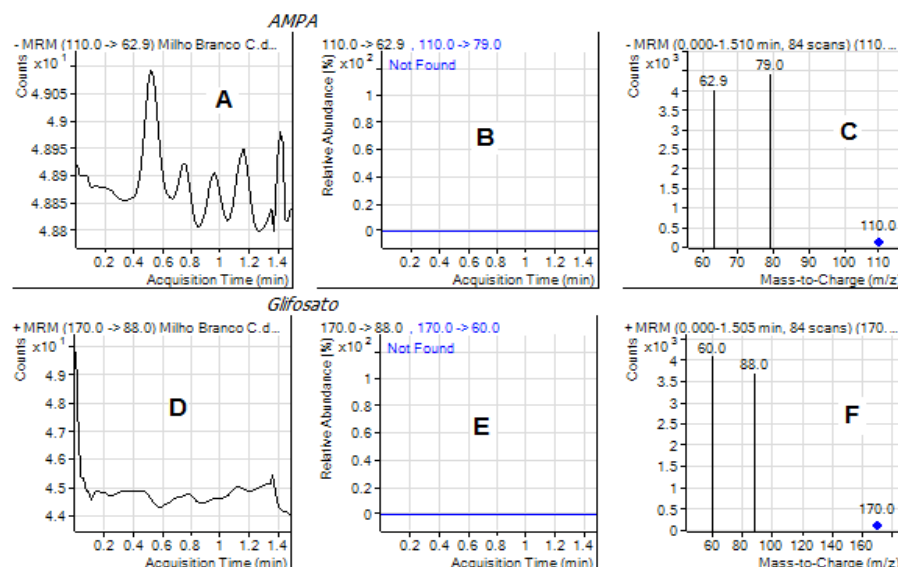


Figura 14 - Cromatogramas mostrando branco de milho. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.

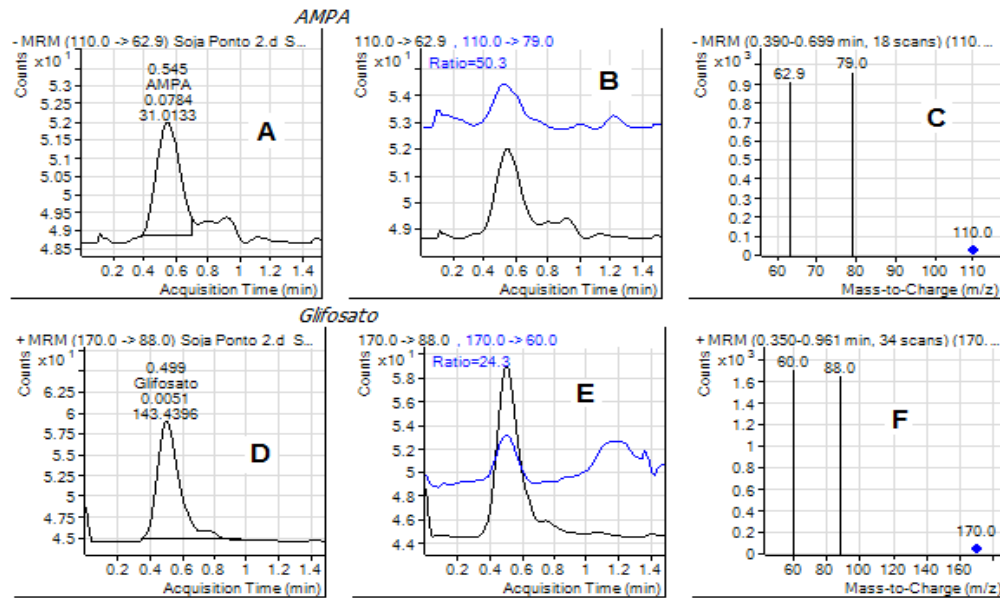


Figura 15 – Cromatogramas de solução padrão de glifosato na concentração de 1,0 mg/kg e solução padrão de AMPA na concentração de 20,0 mg/kg em soja. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.

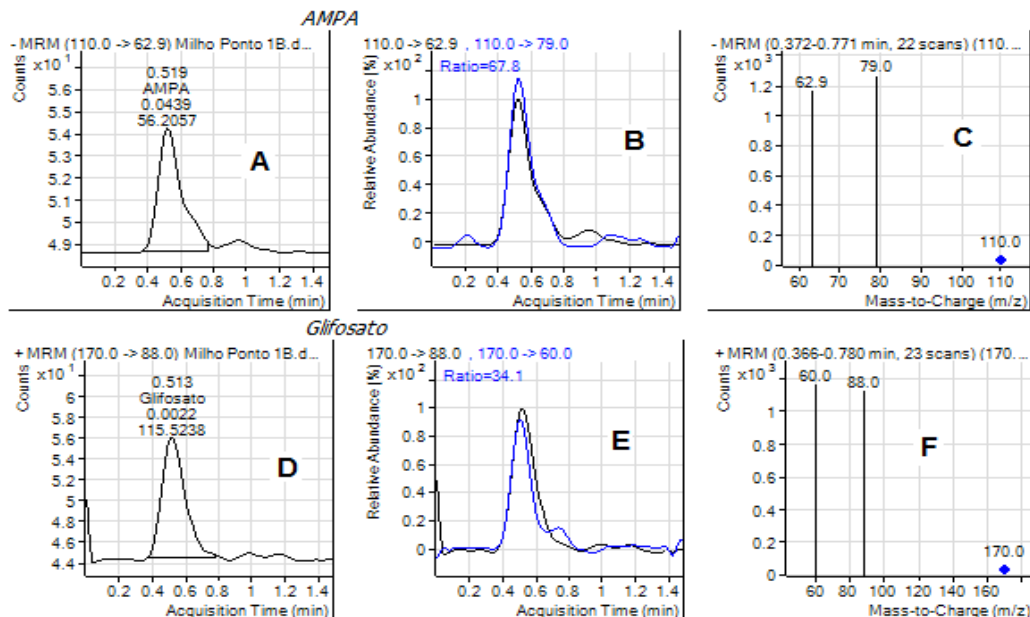


Figura 16 – Cromatogramas de solução padrão de glifosato na concentração de 0,50 mg/kg e solução padrão de AMPA na concentração de 10,0 mg/kg em milho. (A) Transição de quantificação do AMPA; (B) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do AMPA; (C) Íon pai com os dois íons filhos para o AMPA; (D) Transição de quantificação do Glifosato; (E) Relação entre as transições de Quantificação e Qualificação do Glifosato; (F) Íon pai com os dois íons filhos para o Glifosato.

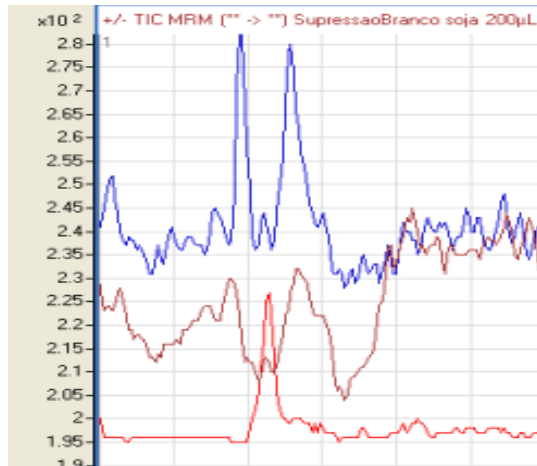


Figura 17 - Supressão de sinal da soja e milho.

Na **Figura 17** está exemplificado um dos testes de supressão de sinal por método de infusão pós-coluna, onde uma amostra de um branco da matriz é injetada ao mesmo tempo em que é adicionado um fluxo de infusão de um padrão concentrado do analito, analisa-se as possíveis perturbações que podem ocorrer na linha de base gerada pelo sinal do analito sob fluxo de infusão constante.

O sinal em linha vermelha é o padrão sem matriz, em azul é o padrão com infusão de extrato branco de milho, em marrom, é o sinal do padrão infundido com branco de soja. Percebe-se claramente como há uma supressão de sinal quando há competição da matriz pela ionização dos compostos, devido ao menos sinal do padrão, quando infundido com a matriz. Tal exemplo pode ser melhor visualizado com a comparação das curvas (**Figuras 18 e 19**):

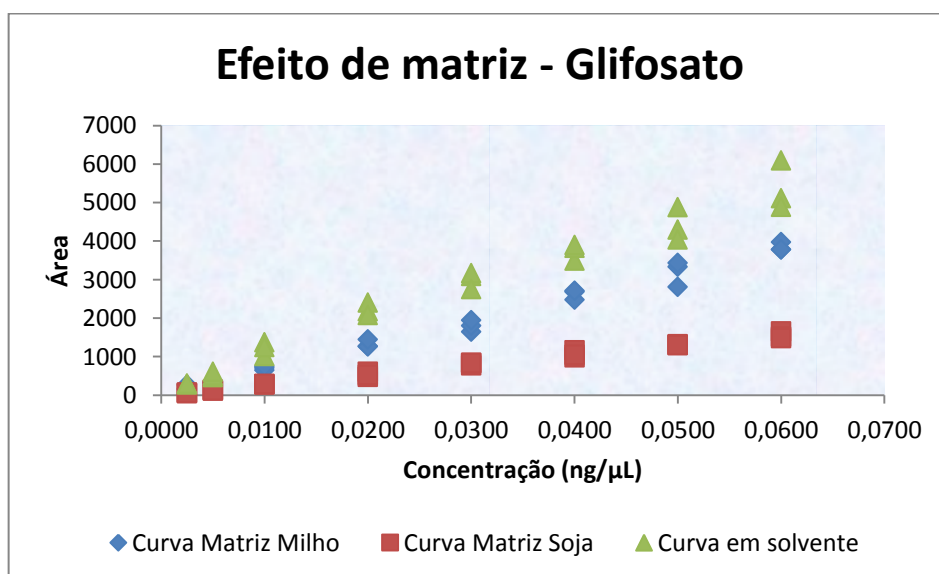


Figura 18 – Efeito de matriz para glifosato em soja e milho.

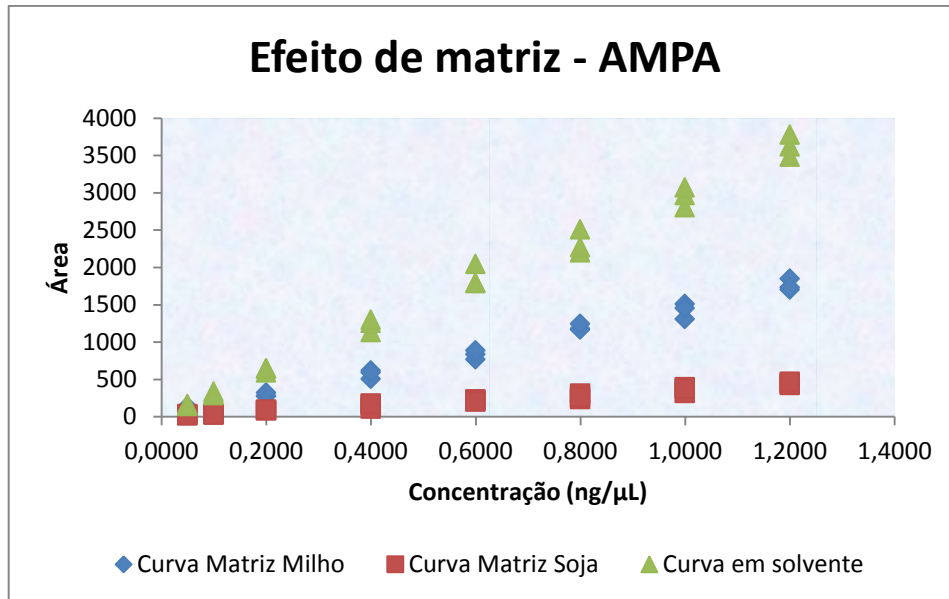


Figura 19 – Efeito de matriz para AMPA em soja e milho.

Para esse tipo de verificação do efeito de matriz, foram realizadas análises no mesmo dia e com concentrações idênticas, três curvas, uma em solvente, uma em milho e outra em soja. Quanto mais complexa a matriz, maior será seu efeito. Neste caso é claramente observada a supressão do sinal (diminuição da área), quando se compara padrões de mesma concentração.

De acordo com o trabalho de Martins-Júnior (2005), somente não houve efeito de matriz, quando utilizou uma diluição da amostra maior que 1000 vezes. Algumas vantagens de trabalhar sem efeitos de matriz é a utilização das soluções padrão de uso em solvente para curva de calibração, diminuindo gastos com obtenção e preparo de amostras sem presença de agrotóxico, menos gastos com manutenção do aparelho devido a problemas de interferentes gerados pela matriz e análise de matrizes variadas utilizando a mesma curva de quantificação. Mas como desvantagens, a diluição excessiva da amostra aumenta a incerteza e diminui a sensibilidade do método.

Os testes iniciais do presente estudo foram realizados em um aparelho da APPLIED API 4000 ION TRAP, utilizando-se uma coluna C8, obtendo-se uma sensibilidade capaz de utilizar uma diluição da amostra de até 2000 mas, devido às questões relacionadas à rotina dos laboratórios envolvidos, optou-se por trabalhar com uma coluna C18, em um aparelho da Agilent, com uma diluição menor para atingir o LQ de 1 mg/kg, utilizando, para isso, curva em matriz para correção do efeito de matriz presente.

Kruve et al. (2011) estudaram o efeito de matriz na análise de glifosato em cereais (trigo e centeio) também utilizando ionização por *electrospray* e detecção por LC/ES-MS/MS. De acordo com esses pesquisadores, o efeito de matriz (no caso, a supressão de sinal) é dependente do tamanho da partícula do cereal utilizada para a extração, sendo que quanto menor a partícula, maior será a supressão de sinal. Também encontraram que a supressão é dependente da matriz, sendo que o centeio tem maior supressão quando comparado ao trigo, mesmo considerando que sejam matrizes com características parecidas.

As **Figuras 20 e 21** exemplificam o efeito matriz relacionado ao fator de diluição da amostra vinculado ao processo de extração, enfatizando sua importância. Quanto maior a quantidade de amostra no extrato final de injeção, menor o fator utilizado e maior será o efeito matriz resultante dela, ou seja, menor será a área. Amostras mais diluídas apresentam menor efeito matriz, aproximando-se da inclinação da curva em solvente.

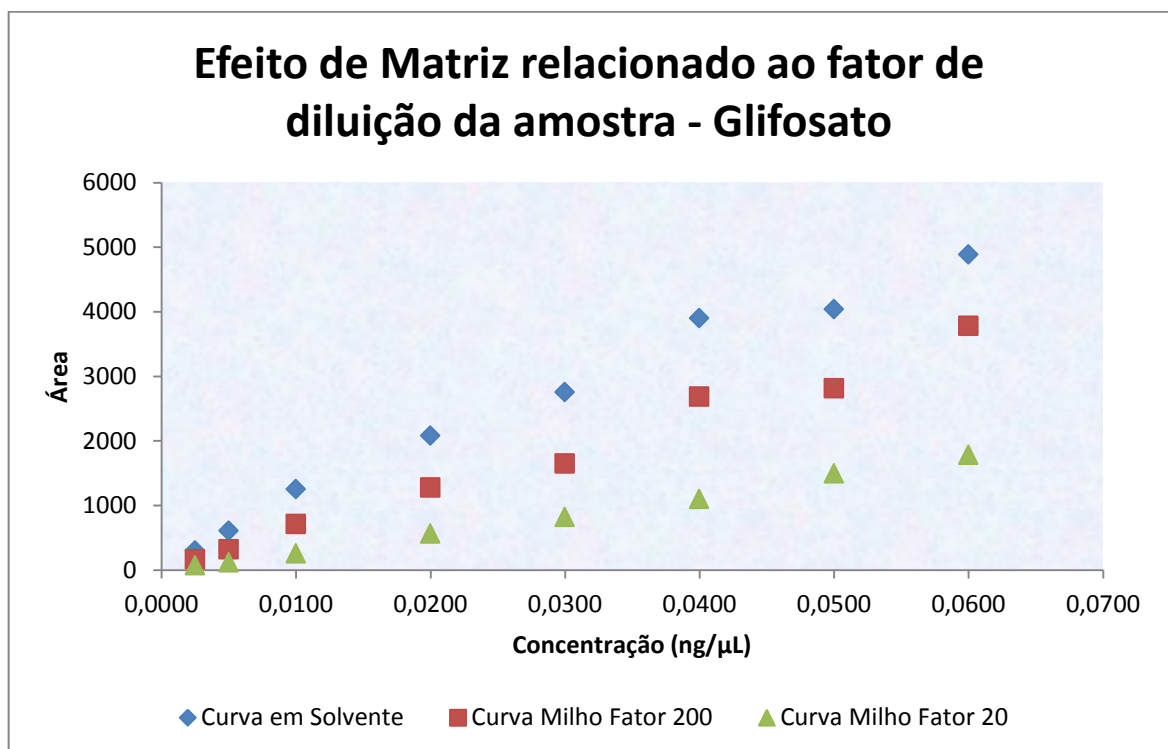


Figura 20 – Efeito de matriz relacionado ao fator de diluição da amostra- Glifosato em milho.

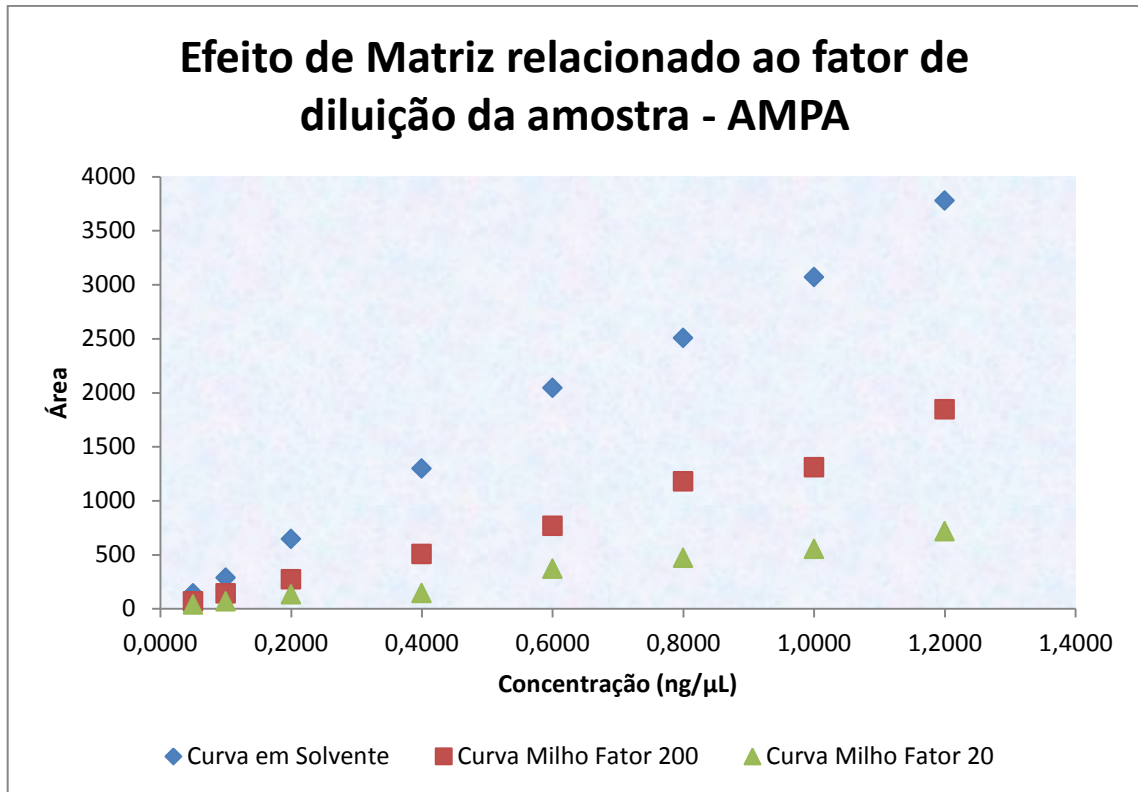


Figura 21 – Efeito de matriz relacionado ao fator de diluição da amostra- AMPA em milho.

4.8.4 Exatidão

Os resultados de recuperação obtidos para Glifosato e AMPA nas duas matrizes estudadas foram analisados quanto à presença de valores dispersos pelo teste de Grubbs, tendo sido retirado um valor no nível 20,0 mg/kg para AMPA em milho, um valor no nível 0,50 mg/kg para glifosato em milho e um no nível 10,0 mg/kg para glifosato em soja (**Tabelas 12 e 13**). Observa-se que os valores obtidos estão dentro dos parâmetros estabelecidos para exatidão, estando todas as médias de recuperação, para cada nível testado, dentro da faixa de 70 a 120%. Sendo inviável testar todos os níveis da curva, foram escolhidos os dois pontos mais baixos, principalmente para a escolha do limite de quantificação e o ponto mais alto da curva obtida após testes de linearidade.

4.8.5 Precisão

Exceto para o nível de 0,50 mg/kg de glifosato em milho, os resultados de recuperação obtidos apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$) e homoscedasticidade ($p > 0,05$), permitindo a estimativa de desvios padrão relativos de repetitividade e de reprodutibilidade parcial por análise de variância sem ponderação (**Tabelas 12 e 13**).

Tabela 12-Concentrações das recuperações, médias de recuperação, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial para matriz Milho

Analito	Concentração (mg/kg)	MR(%)	ANOVA	DPR_r (%)	DPR_R (%)
Glifosato	0,50	106,8	p>0,05*	10,39	13,27
	1,00	102,9	P<0,05	7,19	10,41
	10,00	104,0	p<0,001	5,44	5,44
AMPA	20,0	117,4	p>0,05*	14,25	15,66
	40,0	117,7	p<0,01	8,46	17,75
	200,0	117,0	p<0,001	5,80	15,07

MR= média de recuperação; DPR_r = desvio padrão relativo sob condições de repetitividade; DPR_R = desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade parcial.

* a distribuição da variável não segue a normal, não permitindo o emprego de ANOVA para estimativa da precisão

Tabela 13 - Concentrações das recuperações, médias de recuperação, desvios padrão relativos sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade parcial para matriz Soja

Analito	Concentração (mg/kg)	MR(%)	ANOVA	DPR_r (%)	DPR_R (%)
Glifosato	1,00	105,1	p<0,001	7,76	30,52
	2,00	96,0	p<0,001	4,85	12,47
	10,00	86,5	p>0,05*	5,44	5,44
AMPA	20,0	85,4	p<0,001	27,98	79,70
	40,0	88,9	p<0,01	16,66	35,13
	200,0	114,2	p>0,05*	10,84	11,52

MR= média de recuperação; DPR_r = desvio padrão relativo sob condições de repetitividade; DPR_R = desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade parcial.

* a distribuição da variável não segue a normal, não permitindo o emprego de ANOVA para estimativa da precisão

A **Tabela 12** resume os testes para análise de milho e mostra que os valores das MR estão dentro da faixa estabelecida para a exatidão. Apesar de todos os valores também estarem dentro do valor estabelecido ($\leq 20\%$ para precisão como repetitividade e reprodutibilidade), nos pontos mais baixos testados para glifosato e AMPA, a distribuição da variável observada não seguiu a normalidade, o que não permitiria o emprego de ANOVA para estimativa da precisão. Dessa forma, esses níveis não foram considerados para análise posterior do limite de quantificação.

A **Tabela 13** apresenta os resumos das análises de soja e mostra que os valores de todas as MR estão dentro da faixa estabelecida para a exatidão. Na análise de precisão, o ponto mais baixo testado para o glifosato apresentou uma variação em reprodutibilidade maior que a aceita, sendo que na análise do AMPA isso foi observado nos dois níveis mais baixos testados. Dessa forma, esses níveis não foram considerados para análise posterior do limite de quantificação. Além disso, a distribuição da variável observada em ambos os agrotóxicos no nível mais alto testado para cada um não seguiu a normalidade, o que não permitiria emprego de ANOVA para estimativa da precisão.

4.8.6 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O LQ foi estabelecido como a menor concentração estudada com valores médios de recuperação obtidos para as replicatas de amostras adicionadas na faixa de 70 a 120% e desvio padrão relativo de repetitividade (DPRr) $\leq 20\%$, para o composto pesquisado (SOUZA, 2007; EC, 2011).

Não foi considerado nenhum valor de LQ para o AMPA em soja, uma vez que nenhum dos testes realizados para os valores mais baixos da curva passou na avaliação estatística aceita e definida para o trabalho e novos testes com valores mais altos perderiam seu valor em análise de resíduos de agrotóxicos, ou seja, uma análise de resíduos. Tais dados foram confirmados considerando a alta incerteza calculada para análise de AMPA em soja, nos pontos mais baixos da curva (**Tabelas 14 e 15**). Mesmo o valor de LQ obtido para o AMPA em milho é considerado um valor alto, observando que a legislação brasileira não estipula limites para resíduos

de AMPA em alimentos e o LMR para glifosato (produto que pode originar o AMPA) em milho e soja é de 1,0 e 10,0 mg/kg, respectivamente. Dessa forma, devido aos baixos valores estabelecidos pela legislação brasileira, novos testes deverão ser realizados para aumentar a sensibilidade do método de modo a quantificar e detectar níveis reduzidos de resíduos.

O LD para o glifosato foi estabelecido como o primeiro ponto da curva logo abaixo do valor do LQ e para o APMA, como a menor concentração do analito detectada em amostras adicionadas e distinguida de zero (sinal/ruído ≥ 3).

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação de Glifosato e AMPA para Soja e Milho.

	LD (mg/kg)		LQ (mg/kg)	
	Soja	Milho	Soja	Milho
Glifosato	1,0	0,5	2,0	1,0
AMPA	40,0	20,0	NE	40,0

NE: Não estabelecido

Nos principais estudos da literatura, os limites de glifosato e AMPA foram muito próximos, mas no presente trabalho, a sensibilidade do AMPA é cerca de 200 vezes menor quando comparada ao glifosato. Apesar de ambos os padrões serem do mesmo fornecedor e estarem dentro da data de validade, a única explicação plausível seria a má qualidade do padrão de AMPA. Para o uso inicial dos padrões analíticos foram feitas duas soluções estoques de cada analito e estas foram comparadas entre si, de modo a evitar qualquer erro proveniente do preparo desta solução.

Abakerli e Fay (2003) obtiveram um LQ 0,08 mg/kg de glifosato e 0,8 mg/kg de AMPA em milho e 0,2 mg/kg de ambos em soja. No caso da análise de milho, percebe-se também uma grande diferença de resposta entre o glifosato e AMPA, apesar de não ser tão grande quanto à encontrada no presente trabalho. Mesmo assim, observa-se pelo limite mais baixo, que a matriz milho é uma matriz menos complexa quanto comparada à soja. Martins-Júnior (2005) obteve valores de LQ em soja bem próximos para glifosato (0,30 mg/kg) e AMPA (0,34 mg/kg). Tais valores também se aproximam do LQ para soja determinado por Abakerli e Fay (2003).

De acordo com Chen et al. (2012) para análise de vegetais, o LQ para o glifosato e AMPA foi de 5 μ g/kg e 50 μ g/kg respectivamente, com LD de 1,2 μ g/kg

para glifosato e 15,0 µg/kg para AMPA. Neste caso a sensibilidade conseguida foi muito alta, obtendo-se com isso valores muito baixos de LQ. Mas também se observa uma diferença de sensibilidade entre glifosato e AMPA quando observamos o LD obtido. Hogendoorn et al. (1999) obteve um LQ de 0,5 mg/kg de glifosato para cereais e Li Bo et al (2007) 0,05mg/kg em alimentos em geral.

Andersen, Bille e Granby (2007) fizeram um estudo de comparação entre seis laboratórios para determinação de glifosato (dentre outros) em trigo. Os LQ dos laboratórios variaram de 0,01 mg/kg a 0,15 mg/kg com porcentagem de recuperação variando de 29 a 109%. Tal variação também foi observada nos resultados obtidos pelos laboratórios participantes do estudo, indicando necessidade de otimização dos métodos de análise utilizados.

4.8.7 Incerteza da medição

Visando a ampliação do escopo de acreditação do LRP/Funed frente ao INMETRO, todas as análises utilizaram reagentes com certificado de pureza, vidrarias, pipetas e balanças com certificado de calibração, padrões rastreáveis e quaisquer outras exigências do INMETRO para acreditação do método validado, levando-se em consideração a rastreabilidade e valores de incerteza de cada equipamento ou instrumento.

A estimativa da incerteza de medição levou em consideração as contribuições de parâmetros da validação e da metodologia com exatidão, precisão, valores de pipetagem, diluições e preparo da curva. Os valores das incertezas expandidas para cada um dos pontos calculados estão descritos na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Valores de incertezas expandidas relativas de Glifosato e AMPA.

Analito	Matriz	Nível	Incerteza expandida relativa
Glifosato	Milho	1 mg/kg	22%
Glifosato	Milho	10 mg/kg	24%
Glifosato	Soja	1 mg/kg	31%
Glifosato	Soja	10 mg/kg	27%
AMPA	Milho	20 mg/kg	24%
AMPA	Milho	40 mg/kg	26%
AMPA	Soja	20 mg/kg	93%
AMPA	Soja	40 mg/kg	59%

Baseado em testes de proficiência, a União Europeia utiliza como referência uma incerteza expandida de 50% (que corresponde a um nível de confiabilidade de 95% com um fator de abrangência de 2), sendo seu uso recomendado para tomada de decisão das autoridades regulatórias. Mas a permissão de utilizar tal valor nos resultados tem como pré-requisito a determinação pelo laboratório de sua própria incerteza expandida devendo esta ter um valor menor que 50% (EC, 2011).

Os valores de incerteza calculados para análise de AMPA em soja foram elevados quando comparados aos outros calculados, demonstrando que o método não atende requisitos para quantificação deste analito nas amostras testadas, provavelmente por problemas do próprio padrão utilizado. Serão necessários novos estudos com novo padrão para validação do AMPA em milho e soja.

Como a natureza do método de ensaio para resíduos de agrotóxicos impede o cálculo rigoroso da incerteza, neste trabalho foram identificados os possíveis e mais prováveis componentes de incerteza de modo a fazer uma estimativa razoável, sendo estes exemplificados nas **Figuras, 22a, 22b, 23a e 23b.**

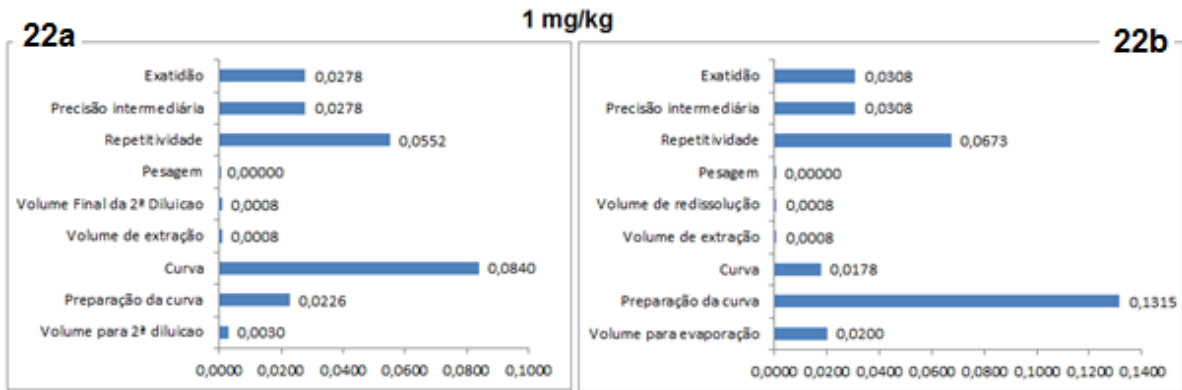


Figura 22 - Peso de alguns componentes da incerteza associada à análise de glifosato em milho e soja respectivamente.



Figura 23 - Peso de alguns componentes da incerteza associada à análise de AMPA em milho e soja respectivamente.

Observa-se um elevado valor de incerteza relacionado ao preparo da curva de glifosato possivelmente devido à grande diluição utilizada na metodologia somada às baixas concentrações obtidas na validação. Já na análise do AMPA, os maiores valores de incerteza estão relacionados à exatidão e repetitividade do método utilizado, confirmados pelos altos valores de incerteza.

4.9 Análise das Amostras de milho (fubá)

A escolha das matrizes para a validação foi baseada no SANCO (EC, 2011), optando-se por uma matriz do grupo de Alto Teor de Óleo (Grão de Soja) e uma do grupo de Alto Teor de Amido e/ou Proteína e Baixo Teor de Água e Gordura (Grão

de milho – como fubá). Após a conclusão da validação do método, foram feitas análises em amostras reais obtidas do comércio. Apenas o milho foi escolhido para esta análise, por ser, além de uma nova cultura do programa PARA, uma cultura interessante para a realização da análise de glifosato e AMPA.

Foram analisadas 75 amostras de fubá ou farinha de milho fina, de diversas marcas do mercado, coletados pelas vigilâncias sanitárias de cada Estado do Brasil, seguindo os procedimentos do Programa PARA/ANVISA. A quantidade de amostra coletada foi de 1 kg de diversas marcas.

As extrações, preparos dos padrões, curva de calibração em matriz, as detecções e quantificações foram baseadas no método validado.

O glifosato não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, foram encontrados resíduos de pirimifós metílico, bifentrina, cipermetrina, lambda-cialotrina, esfenvarelato e clorpirifós metílico em 54,7% do fubá, quando realizada análise de multirresíduos pelo mesmo laboratório, nas mesmas amostras.

Uma provável explicação para o resultado negativo para glifosato nas análises realizadas deve-se a não resistência ao glifosato das culturas de milho utilizadas. Apesar da maioria (72%) apresentar o símbolo de transgênico na embalagem, essa alteração genética refere-se à resistência a insetos e não para o glifosato, sendo assim, seu uso poderia comprometer a cultura. A alteração genética mais comum no caso do milho é a introdução de genes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, capaz de produzir inclusões proteicas cristalinas, denominadas proteínas Cry, obtendo ação inseticida a determinados tipos de insetos como lagartas de borboletas e mariposas, besouros e moscas (MONNERAT e BRAVO, 2000). Vale ressaltar que apesar da modificação genética para resistência a insetos, todos os resíduos encontrados em análise de multirresíduos foram de inseticidas (organofosforados e piretróides).

GRAMBY et al. (2003) pesquisaram glifosato anualmente em aproximadamente 50 amostras de cereais (cevada, aveia, centeio e trigo) durante os anos de 1998 a 2001 na Dinamarca. Os maiores valores foram encontrados em farelo de trigo (1,62 mg/kg) e cevada (1,25 mg/kg). Após uma proibição do uso de glifosato nos grãos usados para produção de pão, no ano de 2001 não foi encontrado resíduos de glifosato em amostras de trigo ou centeio com exceção de uma amostra de trigo em grão importado.

Dados recentemente publicados pelo MAPA, compreendendo um número restrito de amostras, relacionados ao monitoramento do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) referentes à safra 2010/2011 para glifosato mostram que em 2011, foram analisadas 26 amostras de milho e 25 de soja, com detecção de apenas uma não conformidade para milho e 8 para soja, sendo que em nenhum caso a não conformidade foi devido a resíduos de glifosato (BRASIL. MAPA, 2009; BRASIL. MAPA, 2011).

5 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE TRABALHADORES RUAIS EXPOSTOS A AGROTÓXICOS

5.1 Avaliação da Exposição Ocupacional a Agrotóxicos

A monitorização da exposição a agrotóxicos consiste em uma rotina de avaliação periódica e sistemática com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde, antes que uma doença (intoxicação) se instale. A exposição pode ser avaliada pela medida da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (monitorização ambiental), ou pela determinação de parâmetros biológicos (monitorização biológica) (AMORIM, 2003).

O conceito de monitorização biológica pode ser estendido para incluir também a detecção precoce de efeitos não adversos e reversíveis, cujos parâmetros são denominados como biomarcadores. A monitorização biológica da exposição aos agentes químicos propriamente ditos significa a medida da substância ou seus metabólitos (biomarcadores) em vários meios biológicos de modo a avaliar a intensidade da exposição e o risco à saúde, devendo existir uma correlação com a intensidade da exposição e/ou com o efeito biológico da substância (AMORIM, 2003).

Pesquisas relacionadas à monitorização biológica da exposição através da medição do agrotóxico ou dos seus metabolitos em matrizes biológicas fornecem uma medida quantitativa da dose interna, apesar de serem pouco usuais como monitorização por demandarem exames caros e pouco disponíveis principalmente quando se trata de saúde pública, devido ao alto custo dos equipamentos e reagentes, além da necessidade de pessoal treinado (BAKER et al., 2000). Dentre os biomarcadores de efeito relacionados à exposição a agrotóxicos, regulamentado pelo Ministério do Trabalho destaca-se a utilização da atividade das colinesterases sanguíneas, com Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) uma inibição da atividade da AChE, plasmática ou eritrocitária, em 50% (OGA, 2003). Infelizmente esse biomarcador abrange somente as classes dos anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos), sendo que para as demais classes de agrotóxicos

(como piretróides, benzimidazóis, ditiocarbamatos, dentre muitas outras) ainda não foram estabelecidos indicadores biológicos de exposição que sejam técnica e economicamente factíveis e que proporcionam boa correlação entre a exposição externa, a dose interna e os efeitos nocivos.

O monitoramento biológico de exposição a agrotóxicos, em geral, envolve a amostras de urina, sendo determinado o composto alvo ou um dos seus metabolitos conhecidos em seres humanos. A cinética da excreção humana do composto deve ser conhecida, e quando isso não é possível, pode-se considerar dados provenientes de animais, sendo importante conhecer a fração da dose administrada que será excretada na urina na forma do composto ou seu metabólito (APREA, 2012).

Schummer et al. (2012) pesquisaram 50 agrotóxicos em amostras de cabelo de trabalhadores rurais, que forneceram as amostras durante o período de aplicação de agrotóxicos, e o método desenvolvido por esses pesquisadores foi sensível para monitorar tanto intoxicação ocupacional quanto ambiental.

Curwin et al. (2006) estudaram a exposição a agrotóxicos em famílias rurais e urbanas através da pesquisa dos agrotóxicos e seu metabólitos na urina. Dentre os agrotóxicos pesquisados, o nível de glifosato detectado foi similar entre os dois grupos provavelmente por ser usado por ambos. Um estudo alemão testou a contaminação glifosato em uma população urbana, encontrado contaminação significativa em todas as amostras de urina com níveis 5 a 20 vezes acima do limite legal para a água potável (BRÄNDLI e REINACHER, 2012)

Acquavella et al. (2004) também fizeram o biomonitoramento do glifosato em trabalhadores rurais e suas famílias. Eles pesquisaram o herbicida na urina, tendo como referência que o glifosato, após absorvido, é eliminado na forma inalterada por via renal. No dia seguinte após a aplicação, foi detectado glifosato em 6% dos fazendeiros com concentrações variando de 3 a 233 ppb, em 4% das esposas, com valores máximos de 3 ppb e 12% dos filhos, com concentração máxima de 29 ppb. Tal estudo indicou a necessidade de se minimizar a exposição a agrotóxicos.

Yoshioka et al. (2011) desenvolveram um método para determinar simultaneamente herbicidas e seus maiores metabólitos (dentre eles glifosato e AMPA) em soro humano principalmente voltado para casos de ingestão voluntária, mas que também poderia ser usado como biomonitorização de exposição.

Sintomas não específicos presentes em diversas patologias como dor de cabeça, vertigens e dificuldade para dormir frequentemente são as únicas manifestações de intoxicação por agrotóxicos, razão pela qual raramente se estabelece esta suspeita diagnóstica (YONAMINE, 2005). As características clínicas das intoxicações por agrotóxicos não refletem uma relação simples entre o produto e a pessoa exposta. Fatores relacionados às características toxicológicas do produto, fatores relativos ao indivíduo e as condições de exposição participam de sua determinação. A monitorização da exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos de modo a detectar os possíveis riscos à saúde. Assim, sobretudo nos casos crônicos, o diagnóstico da intoxicação por agrotóxicos, quando feito, normalmente é determinado pelo conjunto do histórico e quadro clínico do paciente, exames bioquímicos e hematológicos (AMORIM, 2003; LONDRES, 2011 RODRIGUES, 2011).

5.2 Parâmetros hematológicos, plaquetários e bioquímicos

Embora os efeitos tóxicos agudos sejam facilmente reconhecidos, os efeitos resultantes da exposição a longo prazo, a doses baixas, são muitas vezes difíceis de serem reconhecidos em seu estágio inicial. Dessa forma, a determinação da toxicidade crônica por análises laboratoriais é muito mais difícil quando comparada à toxicidade aguda (ASTIZ et al., 2011). A exposição a níveis reduzidos de agrotóxicos produz uma variedade de alterações bioquímicas, sendo que alguns desses efeitos incluem indução ou ativação enzimática. Tais alterações bioquímicas podem ser detectadas antes do efeito adverso ocorra (BANERJEE et al., 1999).

O sangue é o fluido corporal mais frequentemente utilizado para fins analíticos. O hemograma avalia os elementos celulares do sangue sendo um dos exames mais solicitado na clínica médica. Constitui importante exame de auxílio diagnóstico para doenças hematológicas e sistêmicas (LIMA, 2001).

O fígado, além da grande importância para manutenção do metabolismo, também é o órgão responsável pela desintoxicação e excreção da maioria dos

compostos endógenos e exógenos, sendo o local de biotransformação, diminuindo a toxicidade de compostos exógenos. Esta atividade pode resultar em hepatotoxicidade, levando em aumento sérico de muitos biomarcadores, principalmente enzimas hepáticas. As transaminases hepáticas são enzimas responsáveis pelo catabolismo de biossíntese de aminoácidos, sendo consideradas indicadores específicos de lesão hepática. A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima citosólica responsável por auxiliar no metabolismo de proteínas. A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima mitocondrial, predominantemente encontrada no fígado, músculo esquelético e rins. Danos hepáticos estão associados com necrose celular e aumento da peroxidação lipídica tissular, sendo que ALT é mais específica para danos hepáticos quando comparada à AST. A gama glutamil transferase (GGT) encontra-se ligada à membrana plasmática de células com alta capacidade excretora ou absorviva, como hepatócitos ou túbulos renais proximais. Dessa forma, tais enzimas podem ser usadas como biomarcadores de lesões hepáticas provenientes do efeito da exposição prolongada a múltiplos agrotóxicos (PRIYANKA, PRIYANKA, PRADEEP, 2012; PALIWAL, GURJAR, SHARMA, 2009; SHAMSUDIN e YAP, 2011).

Os rins são críticos para a eliminação de produtos de degradação que são ingeridos ou produzidos pelo metabolismo incluindo as substâncias tóxicas que devem ser retiradas do organismo. A alteração da função renal frequentemente resulta da toxicidade tanto de medicamentos quanto de outras substâncias como os agrotóxicos (HENRY, 2008).

A ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo, sendo 90% excretados pelos rins. A determinação conjunta de ureia e a creatinina é de grande utilidade clínica. A razão ureia/creatinina séricas pode indicar estados patológicos diferentes. A análise dessa razão elevada pode ser feita de forma dicotomizada com a creatinina dentro do valor de referência, indicando processos que levam a diminuição do fluxo sanguíneo renal, aumento na ingestão protéica, ou sangramento gastrointestinal. Por outro lado, quando a creatinina está acima do valor normal, sugere processos obstrutivos pós-renais, como tumores ou estenose de vias urinárias (SODRÉ, COSTA e LIMA 2007).

A creatinina é um produto residual da creatina, e sua produção depende da massa muscular, não apresentando grandes variações diárias em um mesmo indivíduo. A creatinina é filtrada livremente no glomérulo e ao contrário da ureia, é

ativamente secretada em uma pequena parcela. Esta quantidade secretada diariamente não é constante e depende do indivíduo e da concentração plasmática dessa, dificultando a determinação de uma constante de secreção. Apesar de superestimar a taxa de filtração glomerular (TFG) e depender da massa muscular, o clearance de creatinina continua sendo um dos marcadores mais usados na avaliação da função renal (SODRÉ, COSTA e LIMA 2007). Devido a essa constância na taxa de formação e excreção da creatinina, tanto seus níveis plasmáticos quanto urinários têm sido utilizados como marcadores de função renal. No entanto, sua avaliação isolada constitui um parâmetro pouco sensível e pode ocorrer comprometimento de até 50% da função renal sem que sejam detectadas alterações em sua concentração (HENRY, 2008).

Cumprido ressaltar que, apesar dos avanços científicos, há limites técnicos para as avaliações toxicológicas e ambientais que implicam em diversos graus de incertezas e insuficiência de informações, que não permitem uma análise de risco perfeitamente conclusiva. Além disso, diferenças individuais ou nas condições de exposição, ocupacional e ambiental, também podem alterar o risco de intoxicação (FARIA, FASSA e FACCHINI, 2007).

5.2 Materiais e Métodos

O presente estudo foi previamente aprovado, sob o ponto de vista ético e formal, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE-0573.0.203.000-11) em 30 de novembro de 2011 (Anexo 1).

Os objetivos da pesquisa foram esclarecidos pelos pesquisadores a todos os participantes, utilizando-se linguagem clara e acessível e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtida em todos os casos (Anexo 2). Foi também feita uma entrevista, e utilizando um formulário próprio (Anexo 3) foram coletados dados pessoais, de anamnese e de exposição ocupacional, importantes para análise dos resultados. Uma palestra foi ministrada antes da abordagem dos voluntários, explicando os efeitos dos agrotóxicos à saúde, riscos de seu uso, utilização de equipamentos de proteção individual (EPI's), dentre outros assuntos.

5.3 Casuística

Este estudo tem caráter exploratório e visou o levantamento da característica populacional e epidemiológica do trabalhador rural da agricultura familiar, caracterizando também a exposição desses trabalhadores quanto à utilização de EPI's, preocupação com a toxicidade das substâncias, tempo de exposição, tipo de substâncias utilizadas, preocupação com a toxicidade dos produtos, dentre outras perguntas. Por fim, foi feita uma avaliação superficial de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos dos trabalhadores envolvidos no estudo.

A mobilização dos voluntários foi feita por representantes da Associação dos Produtores da Agricultura Familiar de Divinópolis (APRAFAD) e do Sindicato dos Trabalhadores Rurais de Divinópolis nas comunidades rurais de Lopes e Passagem (regiões ao norte e ao sul da cidade respectivamente).

O grupo de estudos foi composto por 49 trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos, integrantes da APRAFAD, Minas Gerais. Foi considerado como exposição ocupacional o manuseio para preparo da solução a ser aplicada nas plantações, assim como a aplicação propriamente dita. Nem todos os trabalhadores responderam ao questionário ou tiveram o sangue analisado, podendo variar o número amostral em cada etapa do estudo.

O município de Divinópolis, cidade polo do Centro-Oeste mineiro, tem uma área de 716 km² e está entre os dez principais municípios do estado, sendo a 5^a cidade com melhor IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) de Minas Gerais. De acordo com dados do último censo do IBGE, em 2010, apresentava uma população total de 213.076 habitantes, sendo apenas 5.503 (2,58%) na zona rural (PREFEITURA DE DIVINÓPOLIS, 2012).

Atualmente, a agricultura familiar gera mais de 80% da ocupação no setor rural e responde no Brasil por sete de cada dez empregos no campo e por cerca de 40% da produção agrícola, fornecendo a maior parte dos alimentos que abastecem a mesa dos brasileiros. Em 2009, cerca de 60% dos alimentos que compuseram a cesta alimentar distribuída pela CONAB originaram-se da Agricultura Familiar (CONAB, 2013).

A APRAFAD é uma associação de produtores da agricultura familiar fundada em maio de 2007 no município de Divinópolis/MG visando integrar todos os

produtores rurais que tem a agricultura familiar como fonte de subsistência, aumentando a produção agrícola do município. Atualmente, no município, mais de 40% dos gêneros alimentícios da alimentação escolar é proveniente da agricultura familiar, incentivada por programas do governo federal de aquisição de alimentos da agricultura familiar como o Programa de Aquisição de Alimentos (PAA) e o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) (APRAFAD, 2012).

5.3.1 Critérios de inclusão

- Trabalhadores da agricultura familiar da cidade de Divinópolis/MG;
- Trabalhadores expostos ocupacionalmente a agrotóxicos;
- Ambos os sexos;
- Maiores de 18 anos;
- Qualquer etnia.

5.3.2 Critérios de exclusão

- Menores de 18 anos
- Portadores de anemias de caráter hereditário,
- Portadores de neoplasias.
- Uso de medicamentos que provocam hepato ou nefrotoxicidade

5.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram comparados à faixa de referência de cada exame e metodologia, sendo determinados como porcentagens desses valores considerados normais.

5.5 Amostra biológica

As amostras foram coletadas nos dias 21 e 22 de março de 2012. No dia 21, a coleta de sangue de 27 voluntários foi feita a partir das 19 horas, e os participantes foram previamente orientados a fazer a última refeição até às 14 horas. No segundo dia a coleta foi feita pela manhã e os 22 voluntários foram orientados a comparecer ao local em jejum.

Foram coletados de cada participante do estudo, 10 mL de sangue, sendo 5 mL em EDTA e 5 mL sem anticoagulante, diretamente em tubos do sistema Vacutainer® (Becton Dickinson), devidamente identificados. Foram utilizados tubos e agulhas descartáveis. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas, o plasma e o soro foram transferidos para tubos eppendorf's que foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo e posteriormente transportados ao laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Dois filmes sanguíneos foram feitos em lâminas de microscopia imediatamente após a coleta do sangue e transportado ao mesmo laboratório para coloração e exame microscópico.

5.6 Características da população

As características da população estudada foram investigadas por meio de entrevista utilizando um formulário próprio (Anexo 3 – Ficha de coleta de dados). Os tópicos foram abordados pelo entrevistador de modo claro e fácil entendimento, sendo respondidos pelo agricultor e qualquer dúvida sobre o questionamento era solucionado rapidamente, com sinônimos compreendidos por estes participantes.

5.7 Características da exposição

As características da exposição do grupo estudado foram investigadas por meio de perguntas contidas no formulário utilizado na entrevista sobre a exposição ocupacional e suas práticas de uso dos agrotóxicos como quais produtos são mais utilizados, última vez que manipularam as misturas e fizeram a aplicação, utilização de EPI's, dentre outras.

5.8 Metodologias para as determinações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

O hemograma e a contagem de plaquetas foram feitos utilizando o contador automático Coulter T-890. Os resultados encontrados foram comparados com os valores de referência (Carvalho e Silva, 1988).

As determinações das atividades de AST e ALT (Analisa®) e GGT (Labtest®) foram feitas pelo método cinético-UV. A determinação de creatinina foi feita pelo método colorimétrico-ponto final (Analisa®) e de ureia, pelo método enzimático (Analisa®). Para monitorar o desempenho dos métodos analíticos utilizados foram empregadas amostras controle de diferentes concentrações (controlador).

5.9 Resultados e Discussão

5.9.1 Características da população

As características da população estudada foram obtidas a partir do questionário aplicado, sendo que três trabalhadores (dos 49 participantes) não

responderam ao questionário. Não foi relatado por nenhum participante problemas que os enquadrassem nos critérios de exclusão, sendo ainda perguntado sobre consumo regular de carnes e vegetais, retirada de baço e sintomas relacionados a problemas de coagulação.

Todos os entrevistados participantes eram do sexo masculino, com faixa etária média de $41,7 \pm 11,6$ anos, tendo o participante mais novo, 20 anos e o mais velho, 69 anos.

Em um estudo semelhante, desenvolvido por Araújo et al. (2007), no município de Nova Friburgo/RJ, a média de idade dos participantes foi de $34,82 \pm 11,15$, tendo sido incluído seis adolescentes entre 13-18 anos (com a anuência dos respectivos responsáveis) e 25% de mulheres. Em outro estudo envolvendo trabalhadores rurais em dois municípios do Piauí, todos os participantes foram do sexo masculino e a faixa etária foi $34,3 \pm 13,1$ anos (RODRIGUES, 2011).

No presente estudo, dos 45 trabalhadores que responderam ao questionário, 15 (33,3%) trabalhadores estudaram apenas até o 4º ano primário, 14 (31,1%) trabalhadores terminaram o primeiro grau, um (2,3%) trabalhador parou os estudos sem completar o segundo grau e 15 (33,3%) concluíram o segundo grau. Desse modo, mais de 64% dos trabalhadores estudaram somente até o primeiro grau ou menos, indicando a baixa escolaridade dessa parcela da população, como mostra a **Figura 24**.

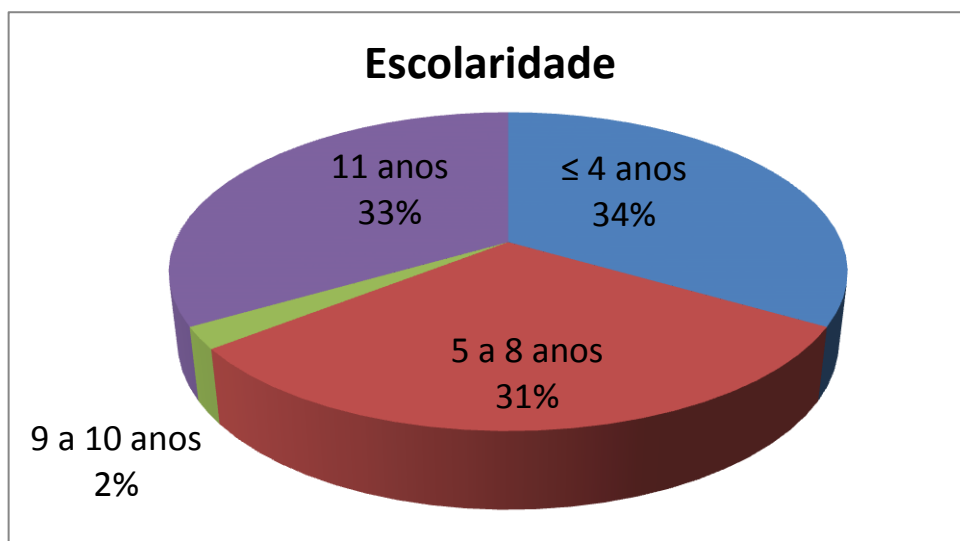


Figura 24 – Tempo de estudo dos trabalhadores rurais de Divinópolis pesquisados.

Dados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2007) onde cerca de 76% dos participantes tinha no máximo sete anos completos de estudo. Da mesma forma, observa-se a baixa escolaridade dos agricultores no estudo de Leite e Torres (2008) onde 85,7% dos participantes tinham sete anos de estudo ou menos, incluindo alguns analfabetos. Outro estudo incluindo 300 agricultores de cinco comunidades do distrito de Magé/RJ também revelou predomínio do nível baixo de escolaridade sendo encontrados 36% de analfabetos ou semi-analfabetizados e 35% com até seis anos de escolaridade (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001). Em outro estudo envolvendo trabalhadores rurais do estado do Rio de Janeiro, realizado em 1999, 80% dos entrevistados estudou até a 4ª série ou era analfabeto (CASTRO, 1999).

Os dados do presente estudo e os encontrados na literatura mostram o predomínio da baixa escolaridade entre os trabalhadores rurais.

Com relação ao tabagismo dentre os participantes do presente estudo, apenas 3 (6,5%) eram fumantes e 3 (6,5%) eram ex-fumantes. Para o etilismo, 18 (39,1%) participantes informaram que não consomem bebidas alcólicas, 20 (43,5%) informaram que consomem muito pouco (apenas nas festividades) e 8 (17,4) consomem moderadamente (nos finais de semana e comemorações). Estes dados divergiram daqueles apresentados em outros estudos no Brasil. Araújo et al. (2007) relataram que 60,8%, do grupo de agricultores estudados faziam uso constante de etanol sendo 45,2% deles com consumo elevado. Rodrigues (2011) verificou que 41,7% dos entrevistados tinham o hábito de fumar e 73,3% consumiam bebidas alcólicas regularmente.

O consumo de medicamentos de uso contínuo foi verificado entre 13 (28,3%) participantes, sendo os mais comuns aqueles para controle de pressão arterial. O histórico de câncer na família foi informado por 45,7% dos participantes. No entanto, cumpre destacar que no presente estudo havia muitos membros da mesma família (pais e filhos, primos, tios).

Com relação à forma de uso e aplicação de agrotóxicos, noção dos possíveis riscos, utilização de EPI's e ações após a aplicação mais de 61% dos trabalhadores informaram que utilizam EPI completo (**Tabela 16**). Quando o trabalhador informou que utiliza como EPI equipamentos inadequados como blusa de manga comprida e calça jeans, ou apenas luvas e botas, foi considerado como não uso de EPI.

Apesar do consenso que o agrotóxico é prejudicial à saúde, 20% dos trabalhadores afirmaram não terem medo de utilizar tal produto. Quase 23% dos entrevistados relataram que já sentiram mal logo após a aplicação das misturas de agrotóxicos. Os sintomas de intoxicação mais comuns relatados foram ardência nos olhos, dor de cabeça e tontura.

Tabela 16 – Dados relacionados à aplicação e uso das misturas de agrotóxicos

Informação	Não		Sim		n Total
	n	%	n	%	
Utiliza receituário agrônomo	14	31,8%	30	68,2%	44
Treinamento de como utilizar agrotóxico	15	34,1%	29	65,9%	44
Lê os rótulos das formulações	9	20,5%	35	79,5%	44
Segue as informações contidas no rótulo	11	25,0%	33	75,0%	44
Usa EPI	17	38,6%	27	61,4%	44
Troca de roupa logo após a aplicação	4	9,1%	40	90,9%	44
Acredita que o agrotóxico faz mal à saúde	0	0,0%	45	100,0%	45
Tem medo de usar o agrotóxico	9	20,0%	36	80,0%	45
Sentiu mal logo após aplicar agrotóxico	34	77,3%	10	22,7%	44

O uso correto de EPI's é fundamental. Oliveira-Silva et al. (2001) revelaram que 70% dos entrevistados faziam uso de EPI's mas somente 63% recebe assistência técnica especializada.

Os trabalhadores envolvidos neste estudo dispõem das orientações de um engenheiro agrônomo e um técnico da EMATER para auxiliá-los na correta utilização de agrotóxicos como quantidade a ser usada, tempo de carência, agrotóxicos recomendados para determinada praga em cultura específica, utilização de EPI's, descarte de embalagens, dentre outras dúvidas da rotina agrícola. A grande maioria teve treinamento específico e participa de reuniões nas propriedades onde suas demandas sobre agrotóxicos podem ser solucionadas.

No entanto, o percentual elevado de trabalhadores que relataram ter sentido mal após a aplicação de agrotóxicos (22,7%) sugere que nem sempre esses trabalhadores colocam em prática o conhecimento adquirido.

5.9.2 Características da exposição

Mais da metade (54,3%) dos trabalhadores entrevistados informou que faz uso do glifosato na agricultura. Embora a agricultura familiar não seja grande produtora de grãos, culturas que normalmente têm permissão de uso para tal substância. O glifosato provavelmente tem sido utilizado pelos trabalhadores envolvidos no presente estudo para fazer capina química e limpar o terreno para a plantação de outras culturas.

Quando perguntados sobre a última vez que manipularam as misturas, 63% dos entrevistados relataram que entraram em contato com agrotóxicos em menos de 30 dias da pesquisa. Desses, 17 trabalhadores informaram que tinham utilizado algum tipo de agrotóxico a menos de uma semana e 12 que utilizaram a menos de um mês (**Figura 25**). No estudo de Araújo et al. (2007) o uso contínuo de misturas de formulações é proveniente do mito de que aplicar vários produtos simultâneos leva a um risco menor de perda da safra, isso associado à pressão de vendedores de agrotóxicos que força o uso intermitente dessas substâncias.

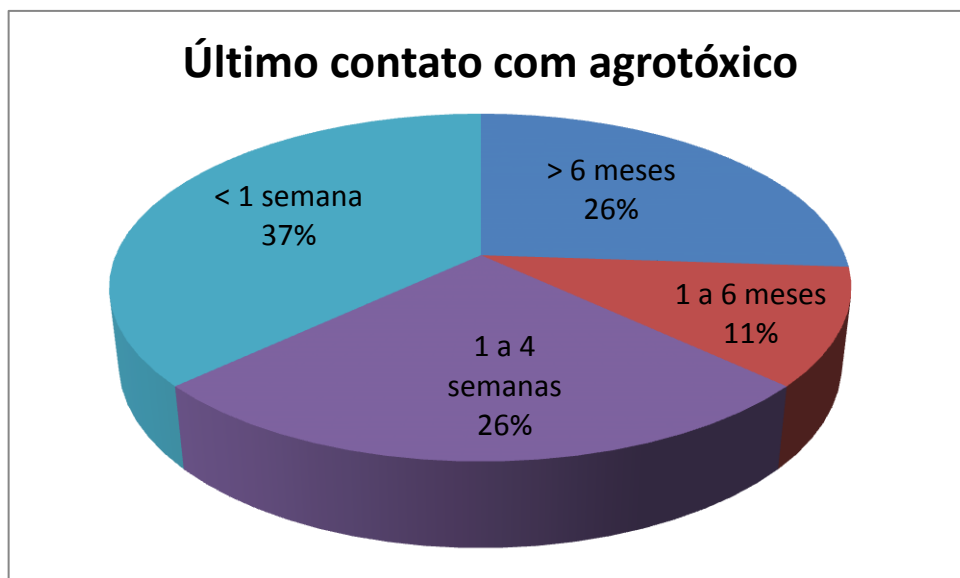


Figura 25 – Informação sobre a última vez que o trabalhador entrou em contato com algum tipo de formulação de agrotóxicos.

Em relação à classificação toxicológica do agrotóxico, a grande maioria pertence às classes III e IV, que são os menos tóxicos. Entretanto o uso de

agrotóxicos mais tóxicos (classes I e II) ainda é representativo (38%). Apesar de mais da metade dos trabalhadores ter informado o uso do herbicida glifosato, a classe mais utilizada por eles é de inseticidas (43%), seguida pelos herbicidas (31%) e fungicidas (26%), como mostram as **Figuras 26 e 27** e a **Tabela 17**. Esse resultado é semelhante ao de Oliveira-Silva et al. (2001), que também encontrou maior utilização de inseticidas (71%), em relação aos herbicidas (22%) e fungicidas (7%). Segundo esses autores, o maior uso de inseticidas é explicado pelas espécies mais cultivadas na região pesquisada.

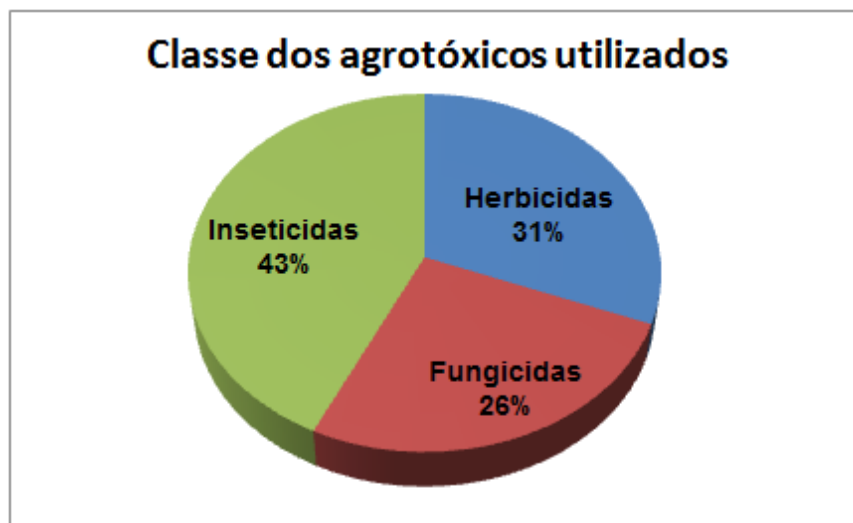


Figura 26 - Percentual dos agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais de Divinópolis segundo classe/mo de ação.

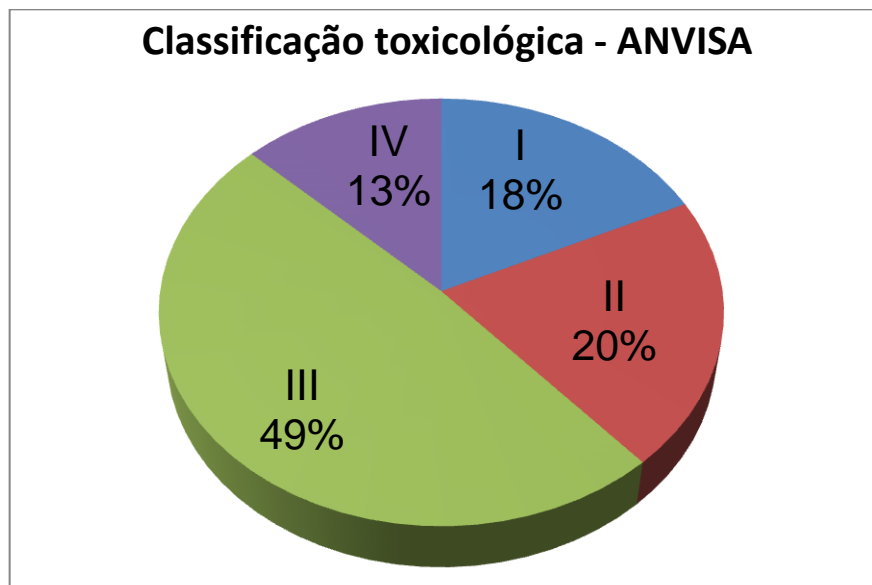


Figura 27 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos utilizados pelos trabalhadores rurais de Divinópolis.

Tabela 17 – Produtos formulados utilizados pelos trabalhadores rurais de Divinópolis

Nome comercial	Princípio Ativo	Grupo Químico	Classificação toxicológica	
			IMA	ANVISA
Prend	2,4-D	Ácido ariloxialcanóico	I	I
Abamectin	Abamectina	Avermectinas	III	I
Vertimec	Abamectina	Avermectinas	III	I
Mospilan	Acetamiprido	neonicotinóide	III	III
Atrazina	Atrazina	Triazina	III	III
Amistar	Azoxistrobina + Difenconazole	Estrobilurina + Triazol	III	I
Orthocide	Captana	Dicarboximida	I	I
Cartap	Cartap	Bis(tiocarbamato)	II	III
Pirate	Clorfenapir	Análogo de Triazol	III	II
Daconil	Clorotalonil	Isoftalonitrila	I	III
Cuprocarb	Cobre	Inorgânico	IV	II
Decis	Deltametrina	Piretróide	IV	III
Diuron	Diuron	Ureia	III	III
Advance	Diuron + Hexazinona	Uréia + Triazinona	III	III
Velpa	Diuron + Hexazinona	Uréia + Triazinona	III	III
Fortex	Diuron + MSMA	Organoarsênico	III	II
Sumidan	Esfenvarelato	Piretróide	I	II
Safety	Etofemprox	Éter Difênílico	III	IV
Danimen	Femproprina	Piretróide	I	II
Podium	Fenoxaprop-p Etílico	Ácido ariloxifenoxipropiônico	III	II
Roundap	Glifosato	Glicina Substituída	IV	IV
Confidor	Imidaclorprido	Neonicotinóide	IV	III
Evidence	Imidaclorprido	Neonicotinóide	IV	III
Rovral	Iprodione	Dicarboximida	III	IV
Provence	Isoxaflutol	Isoxazol	I	III
Karate	L-cialotrina	Piretróide	III	III
Malathion	Malation	Organofosforado	III	III
Dithane	Mancozebe	Alquilenobis (ditiocarbamato)	I	III
Manzate	Mancozebe	Alquilenobis (ditiocarbamato)	III	III
Ridomil	Metalaxil-M + Mancozebe	Acilalaninato	III	II
Tamaron	Metamidofós	Organofosforado	I	I
Sencor	Metribuzim	Triazinona	II	III
Volcane	MSMA	Organoarsênico	II	II
Gramoxone	Paraquat	Bipiridílio	I	I
Sialex	Procimidona	Dicarboximida	II	IV
Folicur	Tebuconazole	Triazol	III	IV
Actara	Tiametoxan	Neonicotinóide	III	III
Cerconil	Tiofanato Metílico + Clorotalonil	Benzimidazol (precursor) + Isoftalonitrila	I	III
Arrow	Trifluralina	Dinitroanilina	I	III
Triatox*	Amitraz	Bis(arilformamidina)	---	---
Colosso*	Cipermetrina + Clorpirifós	Piretróide + Organofosforado	---	---
Contratack*	Ivermectina + Fluazuron	Avermectinas + Benzoilfenil ureia	---	---

*Não são usados como agrotóxicos, são usados para tratamento de parasita em gado.

Fonte: IMA, 2013; ANVISA, 2013b.

Tais resultados divergem dos dados da SINDAG (**Tabela 18**) quando se observa que quase metade das vendas de agrotóxicos como produto comercial são herbicidas. Enfatizando que tal informação refere-se a toda comercialização de agrotóxicos do país sendo o Brasil o maior produtor de soja e um dos maiores de milho e outros grãos sendo tais culturas aos grande consumidores de herbicidas. Divergem também dos dados obtidos no estudo de RODRIGUES (2011), onde 81,1% dos produtos utilizados eram de herbicidas e 16,3% de inseticidas. Neste caso, a grande utilização de herbicidas foi relacionado às culturas da região pesquisada, dentre elas arroz de sequeiro, cana de açúcar e feijão. Mais de 70% dos trabalhadores informara fazer uso de produtos a base de glifosato.

Tabela 18 – Venda de agrotóxicos por classe em 2011 no Brasil

CLASSES	PRODUTO COMERCIAL (t)		INGREDIENTE ATIVO (t)		VALOR - US\$ 1.000	
		%		%		%
TOTAL:	826.683	%	352.048	%	8.487.944	%
HERBICIDAS	403.620	48,8	188.745	53,6	2.743.000	32,3
FUNGICIDAS	174.194	21,1	63.858	18,1	2.315.188	27,3
INSETICIDAS	170.932	20,7	61.169	17,4	2.944.726	34,7
OUTRAS	77.937	9,4	38.276	10,9	485.030	5,7

Fonte: SINDAG, 2012.

5.9.3 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

As médias e desvios-padrão dos parâmetros do hemograma (contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, percentual do hematócrito, índices hematimétricos, global de leucócitos) e da contagem de plaquetas estão apresentadas na **Tabela 19** e nas **Figuras 28 a 30**. As alterações hematológicas foram discretas e consistiram em diminuição da hemoglobina em 4% dos indivíduos, plaquetopenia (em 4%), neutrofilia (em 8,2%) e eosinofilia (em 10,5% dos indivíduos).

Abbassy e Mossa (2012), em estudos com piretróides, obtiveram um significativo decréscimo na contagem de hemácias e na concentração de hemoglobina comparando o grupo de indivíduos expostos a cipermetrina e deltametrina e o grupo controle. A diminuição do número de hemácias, segundo

estes investigadores, poderia estar relacionada à maior instabilidade dessas células e/ou à redução de sua síntese, devido ao efeito tóxico dos agrotóxicos nas membranas celulares ou mesmo na medula óssea. Banerjee (1999) propôs que enzimas ligadas ao sistema antioxidante celular foram afetadas após a exposição a agrotóxicos, levando à susceptibilidade de hemácias e linfócitos ao estresse oxidativo devido à exposição a agrotóxicos.

Tabela 19 - Parâmetros hematológicos dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

	Hemácia ($\times 10^6 \text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	MCH (pg)	Global de leucócitos (mm^3)	Plaquetas (mm^3)
n	49	49	49	49	49	49
M \pm DP	5,16 \pm 0,40	15,36 \pm 1,12	44,42 \pm 2,80	29,84 \pm 1,48	8167 \pm 1747	210348 \pm 33265
Min-Max	(4,16 - 5,99)	(12,6 - 17,6)	(37,1 - 49,9)	(24,8 - 33,4)	(4800 - 12500)	(134000 - 271000)
VR	4,50 a 6,00	13 a 17,5	40 a 54	27 a 32	4000 a 11000	150000 a 450000

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Entre parênteses, os valores mínimos e máximos. VR: faixa de referência de acordo com CARVALHO, 1988

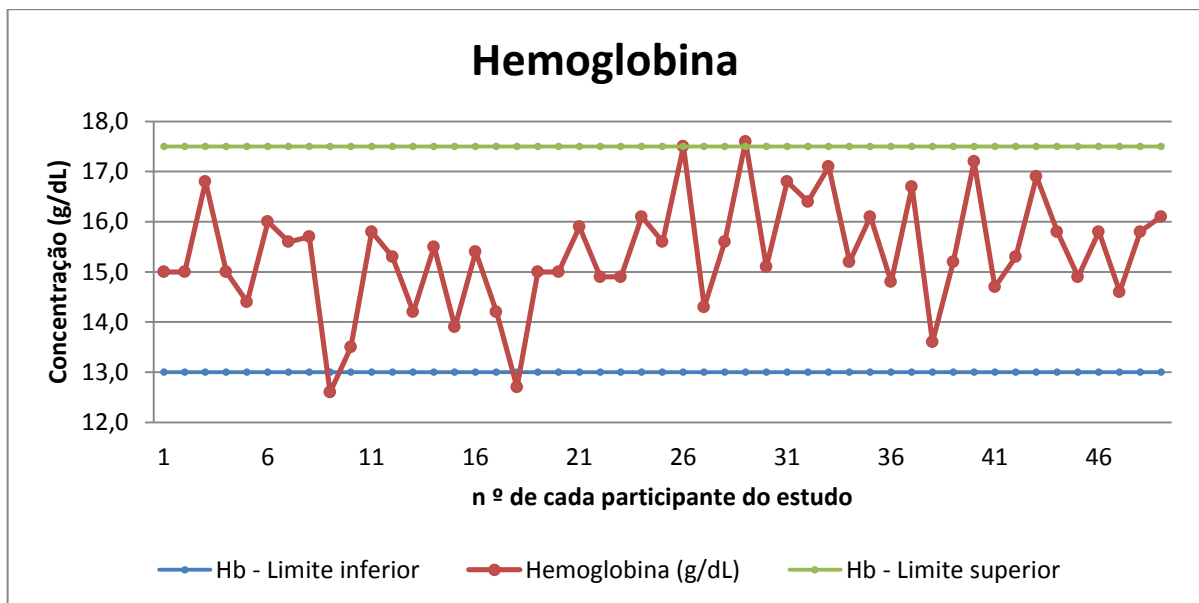


Figura 28 - Representação gráfica da determinação da concentração de hemoglobina nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

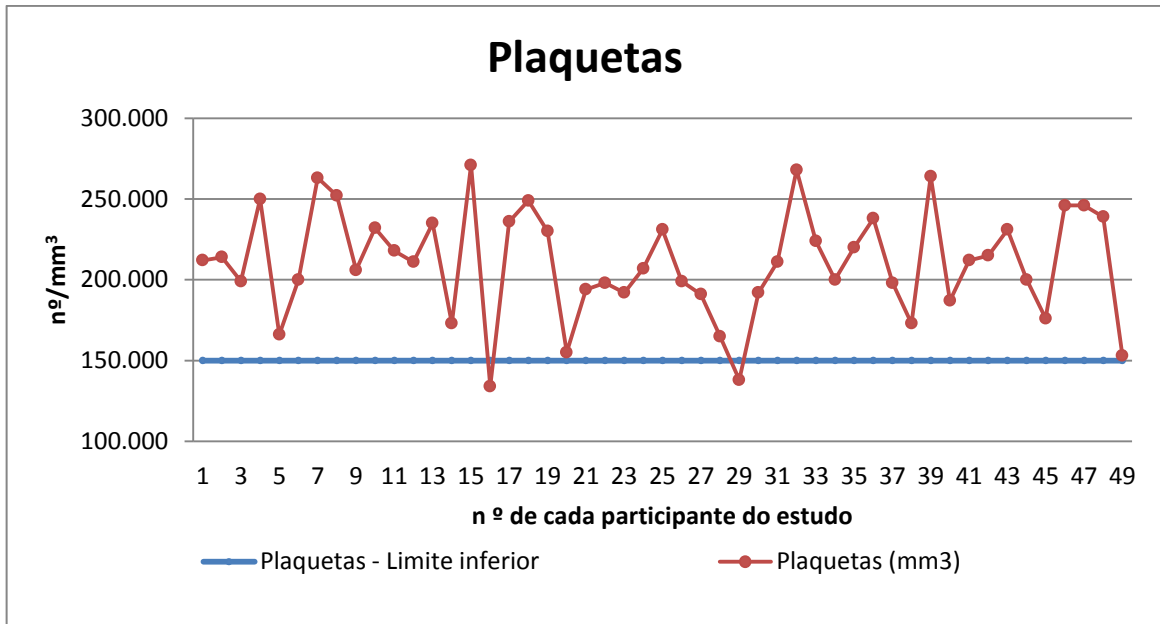


Figura 29 - Representação gráfica da determinação do número de plaquetas nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

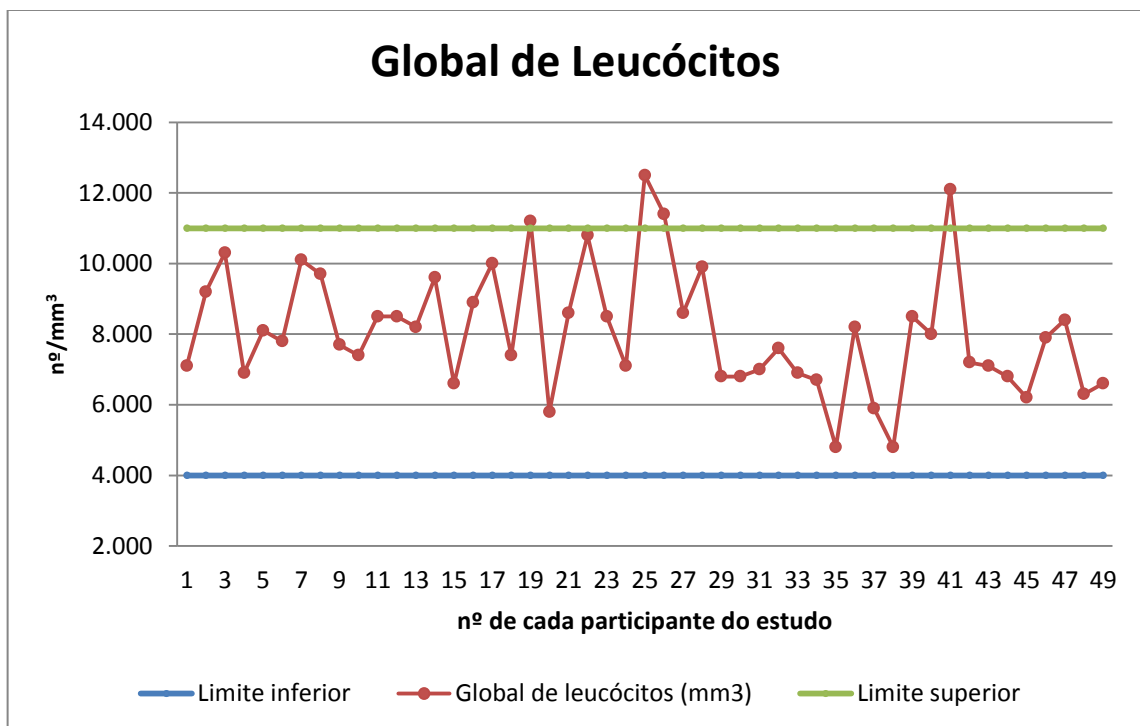


Figura 30 - Representação gráfica da determinação da global de leucócitos nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

As médias e desvios-padrão da contagem diferencial de leucócitos estão apresentadas na **Tabela 20**. Um aumento do número de eosinófilos foi verificado em 10,5% dos trabalhadores. Alergias dérmicas causadas pelos agrotóxicos poderiam explicar a eosinofilia observada nos trabalhadores. No entanto, não se pode descartar outras causas associadas ao aumento de eosinófilos circulantes.

Tabela 20 – Diferencial de leucócitos dos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

	Valores absolutos (mm³)					
	Neutrófilos Bastonetes	Neutrófilos Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfócito	Monócitos
n	49	49	49	49	49	49
M±DP	104 ± 122	4347 ± 1348	278 ± 293	68 ± 74	2905 ± 759	452 ± 206
Min-Max	(0 - 500)	(1914 - 7504)	(0 - 1207)	(0 - 288)	(1254 - 4600)	(68 - 1250)
VR	até 550	2000 a 7500	40 a 400	até 162	800 a 4950	200 a 800

Valores expressos como média ± desvio padrão. Entre parênteses, os valores mínimos e máximos. VR: faixa de referência.

As médias e desvios-padrão dos marcadores de função hepática (AST, ALT e GGT) e renal (ureia e creatinina) estão apresentadas na **Tabela 21**.

Tabela 21 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
n	47	49	49	49	47
M±DP	26,23 ± 8,92	19,03 ± 9,64	32,50 ± 27,25	40,07 ± 9,41	1,63 ± 0,53
Min-Max	(9,55-47,55)	(8,35-60,53)	(9,24-147,84)	(25,18-75,66)	(0,72-2,96)
VR	15 a 40	10 a 40	10 a 50	15 a 40	0,7 a 1,20

Valores expressos como média ± desvio padrão. Entre parênteses, os valores mínimos e máximos. VR: faixa de referência.

Os resultados revelaram que 19,1% dos trabalhadores tiveram alteração de AST, 16,3% de ALT, 14,3% de GGT como mostram as **Figuras 31 a 34**. Não foi possível quantificar a AST em dois trabalhadores e um deles apresentou uma alteração expressiva de ALT e dois de GGT. Os resultados são similares com os observados no estudo de Almeida e Martins (2008) onde 10% dos trabalhadores pesquisados apresentaram elevação da AST e 16% apresentaram elevação da ALT.

Apesar das alterações encontradas não serem significativas, estando muitas vezes relacionadas a doenças comuns, não se pode excluir a possibilidade de tais alterações resultarem de exposição a agrotóxicos, considerando que o fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação de substâncias exógenas. Vários trabalhos demonstraram diferenças entre os valores das enzimas hepáticas e

parâmetros hematológicos, quando comparados o grupo de estudo e grupo controle, tanto em estudos com animais ou em humanos (PATIL, PATIL e GOVINDWAR, 2003; ZAMA et al., 2005; YOUSEF, AWAD e MOHANEDM, 2006; ASTIZ, 2011; JOSEPH and RAJ, 2011; SHAMSUDIN and YAP, 2011; MOSSA and ABBASSY, 2012; PRIYANKA, PRIYANKA and PRADEEP, 2012; REDDY e KANOJIA, 2012)

Sabe-se também que alterações nas enzimas hepáticas possivelmente estão associadas ao alcoolismo e tabagismo que dificultam ainda mais o diagnóstico de intoxicação crônica por agrotóxicos. No entanto, a grande maioria dos trabalhadores declarou não fazer uso de álcool (82,6%) e cigarro (93,5%). Contrariamente, outros estudos sugeriram um consumo abusivo de álcool dentre os trabalhadores rurais. Araújo et al. (2007) revelaram que mais de um quarto dos entrevistados consumiam bebida alcoólica diariamente ou pelo menos três vezes por semana. Rodrigues (2011) revelou que 73,3% dos entrevistados ingeriam bebida alcoólica semanalmente e 41,7% têm o hábito de fumar.

Foi sugerido um acompanhamento dos trabalhadores que tiveram alterações hematológicas e bioquímicas, mesmo que os resultados desses exames não permitam estabelecer nexos causais com a exposição ocupacional aos agrotóxicos.

No estudo de Hernández et al. (2006) os resultados revelaram associação entre exposição a agrotóxicos e alteração de enzimas séricas, dentre elas a AST (com aumento da atividade) e componentes do soro como a creatinina e fósforo (diminuição e aumento dos níveis séricos, respectivamente) são influenciados por exposição a agrotóxicos, sugerindo que disfunções bioquímicas sutis resultam de algum nível de citotoxicidade.

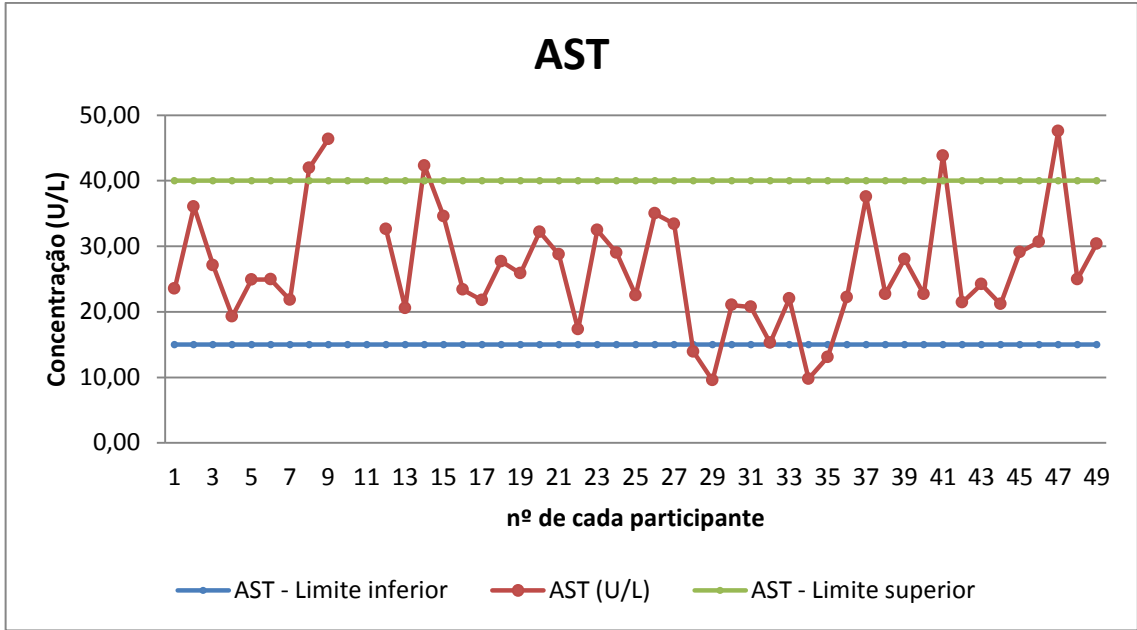


Figura 31 - Representação gráfica da determinação da concentração de AST sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

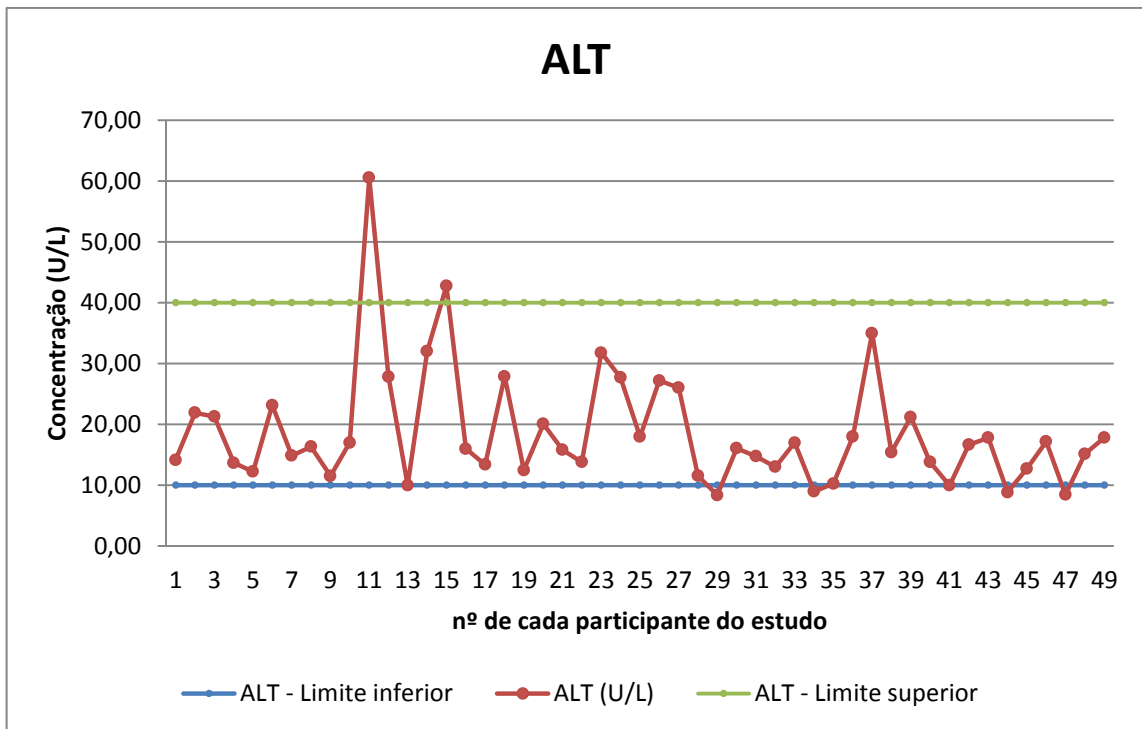


Figura 32 - Representação gráfica da determinação da concentração de ALT sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

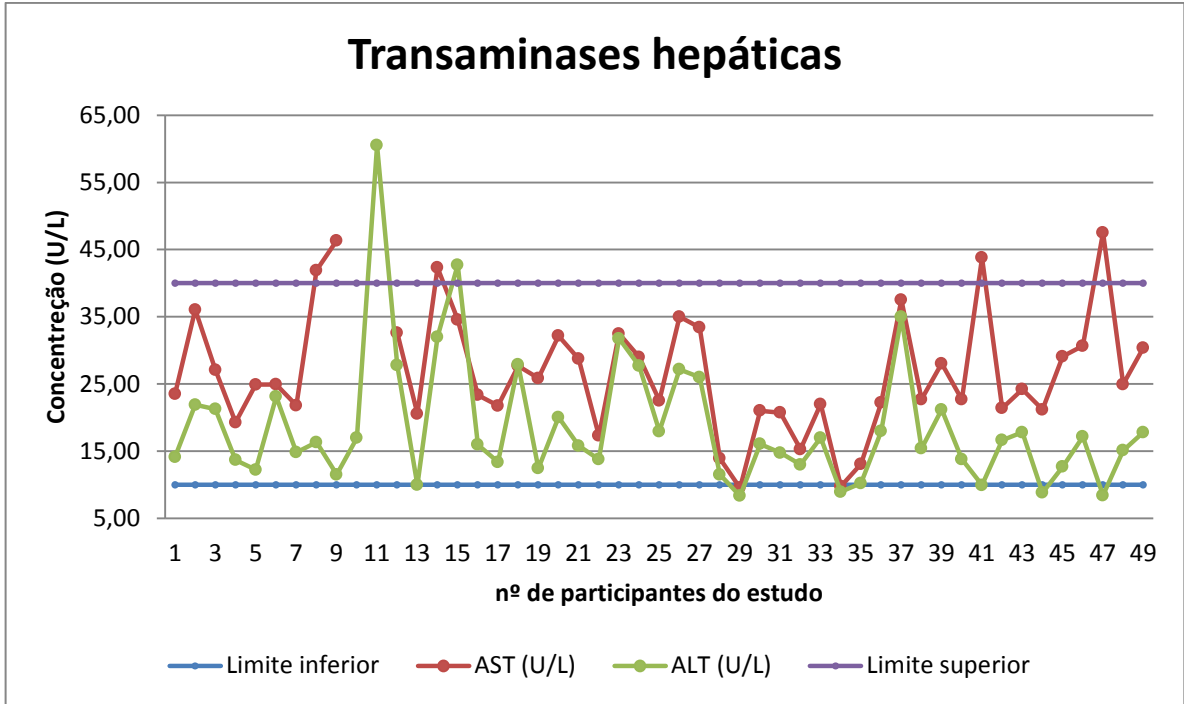


Figura 33 - Representação gráfica das transaminases hepáticas nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

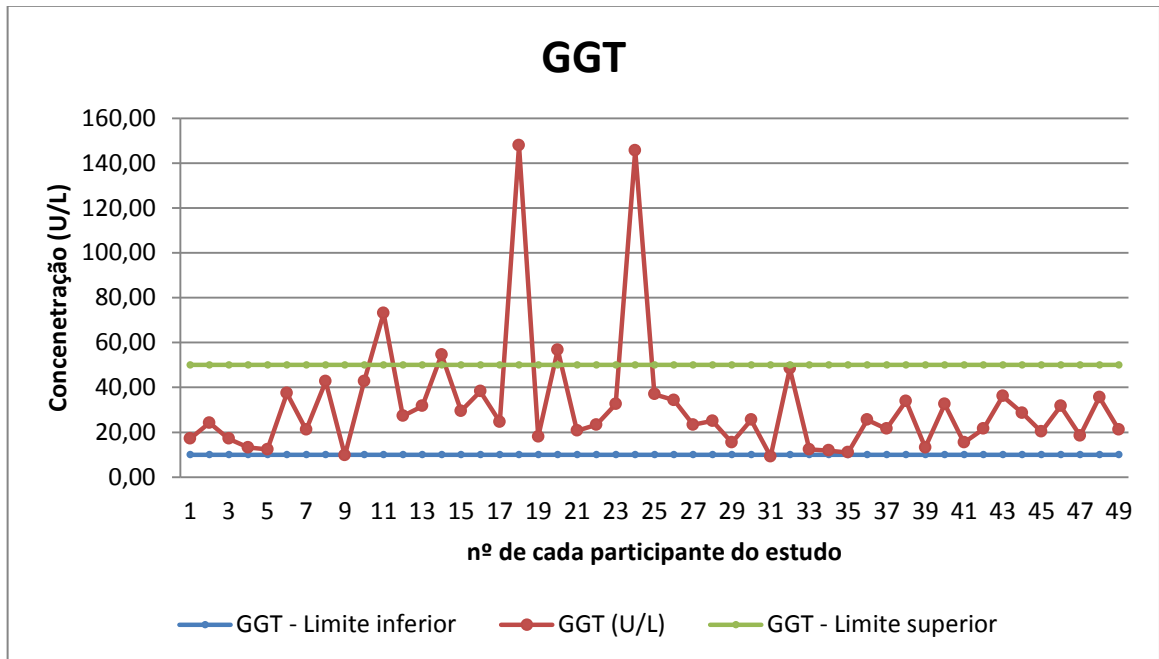


Figura 34 - Representação gráfica da determinação da concentração de GGT sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Os dois trabalhadores que tiveram aumento expressivo de GGT relataram que não tiveram contato recente com mistura de agrotóxicos, não consumiram etanol nas últimas 72h, não fumaram ou fizeram uso recente de qualquer medicamento capaz de induzir esta alteração.

Sabe-se que as características clínicas das intoxicações por agrotóxicos não refletem uma relação simples entre o uso desses e a pessoa exposta. São vários os fatores que participam deste processo, dentre eles os fatores relativos às características químicas e toxicológicas do produto, fatores relativos ao indivíduo exposto e às condições de exposição (RODRIGUES, 2011).

Embora os resultados obtidos neste estudo não permitam estabelecer nexo causal entre alteração hepática e exposição ocupacional aos agrotóxicos, um acompanhamento dos trabalhadores que apresentaram tais alterações é necessário. A orientação para procurar um clínico com os resultados dos exames foi feita aos representantes do Sindicato Rural, aos quais foi solicitado que repassassem aos trabalhadores em questão.

Com relação aos marcadores de função renal, os resultados mostraram que 92,5% que tiveram o sangue coletado após a jornada de trabalho (à noite) e 50% dos que coletaram sangue pela manhã apresentaram valores de creatinina superiores ao limite máximo do intervalo de referência (1,2 mg/dL). Esse valor representa 76,6% dos trabalhadores pesquisados com aumento de creatinina sérica. (Figura 35).

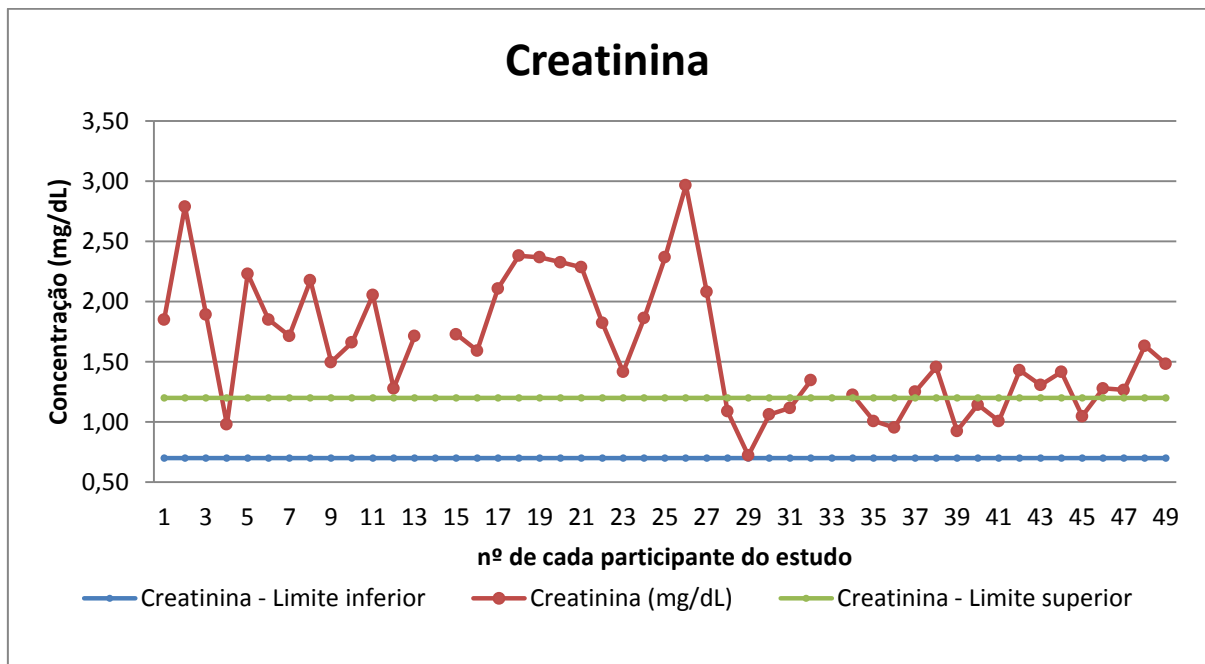


Figura 35 - Representação gráfica da determinação da concentração de creatinina sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

A creatinina é um produto residual da creatina oriunda do metabolismo muscular e da ingestão de carne. É gerada no músculo a partir de uma reação não enzimática da creatina e fosfocreatina. A produção e liberação de creatinina pelo músculo são praticamente constantes e diretamente proporcional à massa muscular (BURTIS & ASHWOOD, 1999).

A quase totalidade dos trabalhadores que tiveram o sangue coletado à noite, apresentou níveis elevados de creatinina, o que sugere que o somatório da massa muscular e do esforço físico contribuiu para esse resultado. No grupo que teve o sangue coletado após repouso, ou seja, pela manhã, o percentual de trabalhadores com níveis elevados de creatinina foi de 50% e pode ser associado à massa muscular. Todos os trabalhadores envolvidos neste estudo apresentavam musculatura proeminente, que provavelmente reflete a atividade laboral diária.

Este resultado reforça a necessidade do laboratório orientar corretamente o cliente sobre a interferência da atividade física antes da coleta de sangue para determinação de creatinina sérica. Além disso, o clínico deve considerar a massa muscular do indivíduo ao interpretar o resultado desse exame laboratorial. No entanto, uma busca no site dos principais laboratórios do país revelou que nenhuma instrução relativa ao exame “creatinina no sangue” é fornecida ao cliente.

A avaliação completa da função renal exige a coletada simultânea de urina de 12 ou 24 horas e amostras de sangue para determinação de creatinina e ureia séricas e urinárias. No entanto, a coleta de urina por 12 ou 24 horas é difícil de ser obtida em trabalhadores rurais, durante sua jornada diária.

No presente trabalho, os níveis de ureia foram discretamente aumentados em 8,2% dos trabalhadores, com exceção de um que apresentou um aumento acentuado (**Figura 36**).

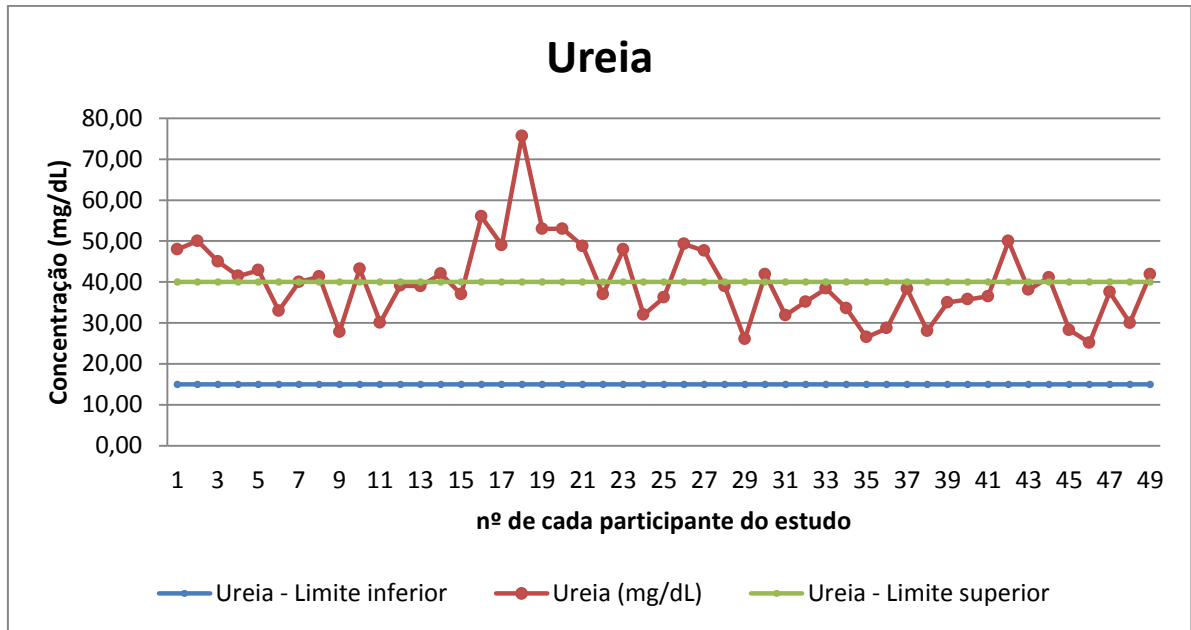


Figura 36 - Representação gráfica da determinação da concentração de ureia sérica nos trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos.

Reddy e Kanojia (2012) relataram que a ureia sérica apresentou resultados significativamente maiores em trabalhadores expostos a agrotóxicos quando comparada ao grupo controle, o que indicaria uma lesão renal. No entanto, estes dados verificados isoladamente são insuficientes para inferir sobre início da lesão renal, necessitando, desse modo, de exames complementares. Nesse mesmo estudo, outros parâmetros hematológicos e hepáticos (como contagem de hemácias, hematócrito, enzimas hepáticas ALT e AST) apresentaram valores significativamente diferentes quando comparados ao grupo controle.

Astiz et al. (2011) fizeram a comparação entre aplicadores de agrotóxicos e um grupo controle, e obtiveram dentre os trabalhadores expostos a agrotóxicos, valores de biomarcadores hematológicos, renais e hepáticos dentro da faixa de referência estabelecidas para a população em geral, incluindo a atividade da colinesterase. No entanto, a análise estatística revelou diferenças significativas entre os dois grupos. Como conclusão estes pesquisadores relataram que os testes laboratoriais de triagem não poderiam ser totalmente sensíveis para a detecção de exposição sub-clínica a agrotóxicos e sugeriram que biomarcadores de estresse oxidativo deveriam ser utilizados conjuntamente em protocolos de vigilância sanitária.

6 CONCLUSÕES

O procedimento utilizado foi adequado, possibilitando a validação intralaboratorial do método de análise para glifosato e AMPA em soja e milho sem derivatização, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, sendo que os resultados obtidos atenderam aos limites regulamentados pela ANVISA nas duas matrizes.

Foi evidenciado efeito de matriz dependente do fator de diluição e da própria matriz sendo necessária a construção de curva analítica com extratos de amostras orgânicas, precedida de extração sólido-líquido com partição em diclorometano e precipitação de proteínas com metanol.

O método apresentou exatidão e precisão aceitáveis na faixa do LQ para o glifosato em ambas as matrizes e para AMPA em milho. Não houve precisão nos níveis de adição estudados para AMPA em soja.

Não foram encontrados resíduos de glifosato e AMPA em nenhuma das amostras analisadas de milho (fubá).

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos pesquisados revelaram alterações hepáticas e hematológicas em alguns trabalhadores. No entanto, é difícil estabelecer onexo causal com a exposição ocupacional aos agrotóxicos, o que torna necessária uma avaliação clínica e laboratorial mais detalhada.

Os dados obtidos para as alterações hematológicas e bioquímicas em alguns trabalhadores incluídos neste estudo não são conclusivas, considerando que os percentuais obtidos não tem valor estatístico suficiente para confirmar os efeitos de nefro e hepatotoxicidade, o que torna necessária uma avaliação clínica e laboratorial mais detalhada.

A atividade física associada à massa muscular alterou de forma mais evidente a concentração plasmática da creatinina.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

São poucos os estudos sobre toxicidade do glifosato, seja em humanos ou animais. Somando-se a isso, pouco se sabe sobre dados de toxicidade de mistura de agrotóxicos, no Brasil e no mundo. Além disso, a toxicidade não se resume necessariamente à soma das toxicidades individuais de cada produto, pois as interações entre as substâncias podem levar aos efeitos de sinergismo e potencialização. Sabe-se que o uso de mistura de agrotóxico resulta num controle mais eficiente das pragas, não está claro se o efeito sinérgico será apenas para os organismos-alvo (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Recentemente, Demur et al. (2013) investigaram o impacto da exposição alimentar a doses reduzidas de misturas de agrotóxicos, utilizando camundongos como modelo. Relataram que a exposição alimentar a uma mistura de agrotóxicos diferiram entre os grupos estudados. Concluíram que o efeito final da mistura destes produtos nem sempre pode ser previsto partindo do efeito isolado de cada um dos compostos constituintes, ou seja, que, além da alimentação, diferenças individuais ou nas condições de exposição, ocupacional e ambiental, podem também alterar o risco de intoxicação.

Uma das limitações do desenho do presente estudo refere-se à avaliação da hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (parâmetros bioquímicos e hematológicos), por se tratar apenas de um estudo exploratório e os resultados obtidos para os parâmetros laboratoriais avaliados foram comparados com os valores de referência dos mesmos. Outra limitação está associada à dificuldade na coleta da amostra de sangue, especialmente pelo fato dos trabalhadores rurais encontrarem-se em comunidades isoladas, com pouca ou nenhuma atenção à saúde, sendo muitas vezes difícil parar a rotina de trabalho e justificou o número reduzido de trabalhadores avaliados. Finalmente a última limitação refere-se a não composição de um grupo controle para outras análises estatísticas apropriadas dos parâmetros hematológicos e bioquímicos para a avaliação da hepato e nefrotoxicidade.

8 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

Elaborar uma agenda de estudos sobre o glifosato que possam tratar dos seguintes temas:

- Pesquisar o sinergismo e a potenciação dos efeitos toxicológicos do glifosato e outras das classes de agrotóxicos;
- Implementar ações de vigilância da exposição ambiental e ocupacional ao glifosato visando conhecer a real magnitude dessa exposição;
- Estabelecer estratégias para estudos e pesquisas visando conhecer os possíveis efeitos na saúde decorrente do uso de agrotóxicos em populações expostas, que possam ser úteis para tomadas de decisão no âmbito da saúde pública;
- Realização novos testes para estipular o LQ de AMPA em soja;
- Realizar novos testes visando aumentar a sensibilidade analítica de glifosato e AMPA para análise em outras matrizes como trigo e feijão;
- Incluir o glifosato e o AMPA no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA, de modo a identificar e quantificar seus níveis de resíduos nos alimentos, mapear sua distribuição e subsidiar sua avaliação de risco e reavaliação;
- Incluir o glifosato e o AMPA nas análises ambientais de água, visando identificar e quantificar seus níveis de resíduos, mapear sua distribuição e atender aos parâmetros da portaria nº 2914/2011.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAKERLI R. B.; FAY E. F. Validação de método para análise de N-(fosfonometil) glicina (glifosato) e ácido aminometilfosfônico (AMPA) por HPLC e detecção por fluorescência em culturas. 2003. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, SP. Repositório Alice (Acesso Livre à Informação Científica da Embrapa). Artigo em anais de congresso (CNPMA). Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/15121>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

ABBASSY, M. A.; MOSSA, AT. H. Haemato-biochemical effects of formulated and technical cypermethrin and deltamethrin insecticides in male rats. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 7 (7), p. 312-321, 2012.

ABREU, A. G.; MATTA, M. 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

ACQUAVELLA J. F. et.al. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 3, p. 321-326, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução nº33 de 17 de fevereiro de 2004. **Diário Oficial da União**, p. 51. Seção 1. Brasília, DF, 18 fev. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40(2), p. 361-3, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Consulta Pública nº 02, de 25 de janeiro de 2011. 19 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Relatório ANVISA - UFPR sobre Mercado e Regulação de Agrotóxicos 2012**. Sala de Imprensa. Notícia do ano de 2012, 2012. In: PELAEZ, V. et al. Monitoramento do mercado de agrotóxicos. Programa de Mestrado e Doutorado em Políticas Públicas, UFPR, 2011. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/4Nb>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/z>>. Acesso em: 08 jan. 2013a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografia de Produtos Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 jan. 2013b.

ALFERNES, P. L.; IWATA, Y. Determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with Mass-Selective Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2751-2759, 1994.

ALMEIDA, C. G.; MARTINS L. B. Enzimas hepáticas e acetilcolinesterase como biomarcadores de efeitos dos agrotóxicos utilizados na cultura do *Allium sativum*. **Revista Biociências** (UNITAU), v. 14, n. 2, p. 117-126, 2008.

AMORIM, L. A. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 1, n. 2, p. 124-132, 2003.

ANDERSEN, J. H.; BILLE, R. L.; GRANBY, K. An intercomparison study of the determination of glyphosate, chlormequat and mepiquat residues in wheat. **Food Additives and Contaminants**, v. 24(2), p.140–148, 2007.

APREA, M. C. Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides. **Toxicology Letters**, v. 210, p. 110-118, 2012.

ARAÚJO, A. J. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12(1), p.115-130, 2007.

ARBUCKLE, T. E.; LIN, Z.; MERY, L. S. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. **Environmental Health Perspectives**, v. 109.8 p. 851, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) ISO (*International Standard Organization*). ABNT NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DA AGRICULTURA FAMILIAR DE DIVINÓPOLIS (APRAFAD). Disponível em: <<http://aprafad.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE SOJA (APROSOJA). Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/>>. Acesso em: 10 out. 2012.

ASTIZ M. et al. Occupational exposure characterization in professional sprayers: Clinical utility of oxidative stress biomarkers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 249–258, 2011.

AULING, R. **Development of LC-MS method for determination of glyphosate residues in wheat**. 2009. 32 p. [dissertation] - University Of Tartu, Faculty of Science and Technology Institute of Chemistry, Tartu, Estônia, 2009.

BANERJEE, B. D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicology Letters**, v. 107, p. 33-47, 1999.

BAKER, S. E. et al. Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**. v. 10, p. 789-798, 2000.

BENACHOUR N., SÉRALINI, G. E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chemical Research Toxicology**, v. 22(1), p. 97-105, 2008.

BERNAL, J. et al. Development and validation of a liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry method to measure glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rat plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 3290–3296, 2010.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12(1), p. 73-89, 2007.

BOHM, G. B. et al. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28(Supl.), p. 192-197, dez. 2008.

BOMBARDINI, L. M. 2011. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA** – Artigo do mês: setembro de 2011. ISSN 2177-4463.

BÖRJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. **Journal of Chromatography A**, v. 886, p. 207–216, 2000.

BRANDLI, D.; REINACHER, S. Herbicides found in human urine. **Ithaka Journal** 1/2012, p. 270-272, 2012. Disponível em: < <http://www.ithaka-journal.net/herbizide-im-urin?lang=en>>. Acesso em 28 jan. 2013.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jul. 1989.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Portaria Normativa nº84, de 15 de outubro de 1996. Registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental – (ppa) de agrotóxicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 out. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 40, de 11 de novembro de 2011. Promover a publicação dos resultados dos Programas Nacionais de Controle de Resíduos e Contaminantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 219, 16 nov. 2011. p 1-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 42, de 31 de dezembro de 2008. Institui o Plano de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 2, p 2-3, 5 jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária. 2013. AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Apresenta informações sobre produtos fitossanitários. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: OPAS/OMS, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Portaria Nº 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 239, Seção 1, p. 39-46. 14 dez.2011.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Decreto n. 4074 de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7802 de 11 de junho de 1989. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 1-12, 8 jan. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Departamento Técnico-Normativo. Portaria n.º 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - n.º 1, de 9 de dezembro de 1991”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 dez. 1991.

BURGER M.; FERNÁNDEZ S. Exposición herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. **Revista Médica del Uruguay**, v.20(3), p. 202-207, 2004.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Clinical Chemistry**. Philadelphia: Saunders, 1999.

CARVALHO, M. G.; SILVA, M. B. S. **Hematologia**: Técnicas Laboratoriais e Interpretação. Belo Horizonte: Imprensa Universitária, 1988. 139p.

CASTRO, J. M. **Práticas de uso de agrotóxicos no município de Cachoeiras de Macacu, RJ**: Um estudo de saúde ambiental. 1999. 159 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 1999.

CHAN, P.C.; MAHLER, J. F. NTP technical report on toxicity studies of glyphosate (CAS No. 1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. (NIH Publication 92-3135). **Toxicity report series No. 16**. United States Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institute of Health. 1992. 39 p. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST_rpts/tox016.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CHEN, M.-X. et al. 2012. Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A** (2010), Accepted Manuscript. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.069. In press.

CIKALO, M. G.; GOODALL, D. M.; MATTHEWS, W. Analysis of glyphosate using capillary electrophoresis with indirect detection. **Journal of Chromatography A**, v. 745, p. 189-200,1996.

CODEX ALIMENTARIUS. **Guidelines on Measurement Uncertainty CAC/GL 54-2004**. 2004. 8 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Indicadores da Agropecuária. Novembro e Dezembro - 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=538&t=2>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Agricultura Familiar. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1125&t=2>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

COSTANTINI, A. S. et al. A Multicenter Case-Control Study in Italy on Hematolymphopoietic Neoplasms and Occupation. **Epidemiology January**, v. 12, n. 1, p. 78-87, 2001.

DEMUR, C., et al., Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: The biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. **Toxicology** (2013), disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.03.004>>.

De ROOS, A. J. et al. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. **Environmental Health Perspectives**, v. 13 (1), p. 49 – 54, 2005.

EURACHEM. **The Fitness for purpose of analytical methods**. A laboratory guide to method validation and related topics, Teddington: LGC, 1998. 61p.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Document N° SANCO/12495/2011. 2011. 40 p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Review of the Séralini et al. (2012) publication on a 2-year rodent feeding study with glyphosate formulations and GM maize NK603 as published online on 19 September 2012 in Food and Chemical Toxicology. **EFSA Journal**, v.10, n. 10, p. 2910, 2012. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2910.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

FALCK, G. M. et al. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research**, v. 441, p. 225–237, 1999.

FARIA, N. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12 (1), p. 25-38, 2007.

FARZA, H. R.; CUNHA, J. M.; MALTY, J. S. **Revisão bibliográfica sobre os agrotóxicos à base de glifosato no Brasil. Uso agrícola e impacto na saúde do homem do campo**. 2009. 89 f. Monografia (Especialização em Toxicologia Aplicada a Vigilância Sanitária) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de Três Espécies de Peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: Cometa e dos Micronúcleos**. 2009. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Centro de Informação Científica e Tecnológica. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). Casos Registrados de Intoxicação Humana e Envenenamento. Dados nacionais, 2010. **Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil**, 2010. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Acesso em: 28 jan. 2013

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Centro de Informação Científica e Tecnológica. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). Casos Registrados de Intoxicação Humana e Envenenamento. Dados por agentes tóxicos, Agrotóxicos, Agrotóxicos em geral, 2009. **Casos de Intoxicação por Agrotóxicos em Geral por Unidade Federada, Segundo Zona de Ocorrência Registrado em 2009**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Acesso em: 28 jan. 2013

FLEMING, L. E. et al. National Health Interview Survey Mortality Among US Farmers and Pesticide Applicators. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 43, p. 227–233, 2003.

FREITAS-JÚNIOR, G. Uso de defensivos é intensificado no Brasil. **Valor Econômico**, São Paulo, 30/jul/2012. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/empresas/2768478/uso-de-defensivos-e-intensificado-no-brasil>>. Acesso em: 16 dez. 2012.

GALLI, A. B.; MONTEZUMA, M. B. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Monsanto do Brasil: ACADCOM, 2005. 66 p.

GARCIA, E. G.; BUSSACOS, M. A.; FISCHER, F. M. Harmonização e classificação toxicológica de agrotóxicos em 1992 no Brasil e a necessidade de prever os impactos da futura implantação do GHS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13(2), p. 2279-2287, 2008.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262(3), p.184-191,2009.

GHANEM, A. et al. Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 3794-3801, 2007.

GRANBY, K.; JOHANNESSEN, S.; VAHL, M. Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 8, p. 692–698, August 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 639 p.

HARDELL, L.; ERIKSSON, M.; NORDSTRÖM, M. Exposure to pesticides as risk factor for Non-Hodgkin's Lymphoma and Hairy Cell Leukemia: Pooled analysis of two swedish case-control studies. **Leukemia and Lymphoma**, v. 43 (5), p. 1043-1049, 2002.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20ed. São Paulo: Manole, 2008.1734 p.

HERNANDÉZ, A. F. et al. Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. **Environmental Research**, v. 102, p. 70-76, 2006.

HOFFMANN AND STROOBANT. 2007. Mass Spectrometry. Principles and Applications. Third Edition. Wiley.

HOGENDOORN, E. A. et al. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 67-73, 1999.

HOHENADEL, K. et al. Exposure to Multiple Pesticides and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in Men from Six Canadian Provinces. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 2320-2330, 2011.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods: Review and Strategy. Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn. **LC/GC Magazine**, 1997-1, Version Feb. 21, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil**. Brasília: IBAMA. 2010. 83 p.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA (IEA). **Defensivos agrícolas: comercialização record em 2011**. 2012. Disponível em: <<http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancoiea/defensivos.aspx>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

INSTITUTO MINEIRO AGROPECUÁRIO (IMA). **Agrotóxicos cadastrados aptos para comercialização no estado de Minas Gerais**. Gerência de Defesa Sanitária Vegetal - GDV Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/agrotoxicos/agrotoxicos-cadastrados>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

INSTITUTO MINEIRO AGROPECUÁRIO (IMA). SISAGRO. **Programa de Controle de Estoque do Estado de Minas Gerais**. Gerência de Defesa Sanitária Vegetal (GDV) - Setor de Agrotóxico, de 08 de agosto de 2012. Relatório por ingredientes ativos comercializados – Primeiro semestre de 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) – Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

JAMES, Clive. 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **ISAAA Brief No. 42**. ISAAA: Ithaca, NY.

JOSEPH, B. and RAJ S. J. Effect of Curacron toxicity on Aminotransferases (ALT and AST) in the serum of the fish *Cyprinus carpio*. **International Journal of Bioclogical Chemistry**, v. 5(3), p. 207-211, 2011;

KRUBE, A. et al. Study of liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry matrix effect on the example of glyphosate analysis from cereals. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, p. 3252–3258, 2011.

KUSSUMI, T. A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de massas em tandem e sua Certificação**. 2007. 150 f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materias) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (USP), São Paulo, 2007.

LEITE, K. C.; TORRES, M. R. O uso de agrotóxicos pelos trabalhadores rurais do assentamento catingueira Baraúna-RN. **Revista Verde** (Mossoró, RN – Brasil), v.3, n.4, p. 06-28 de outubro/dezembro de 2008.

LI Bo et al. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in foods using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 25(4), p. 486–490, 2007.

LI et al. Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography (HILIC) with DAD and Mass Spectroscopic Detection for Direct Analysis of Glyphosate and Glufosinate Residues and for Product Quality Control. **Acta Chromatographica**, v. 21 (4), p. 559-576, 2009.

LIMA, O. A. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 600 p.

LONDRES, F. 2011. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS- PTA. Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 190 p.

MAÑAS, F. et al. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetics tests. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 73(3), p. 834-837, 2009a.

MAÑAS, F. et al. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 28(1), p. 37-41, 2009b.

MARQUES, A. F. **Estudos de degradação do glifosato**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestre em Química Analítica e Controle de Qualidade) - Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2008.

MARTÍNEZ, A.; REYES I.; REYES, N. Citotoxicidad del glifosato em células mononucleares de sangue periférica humana. **Biomédica**, v. 27, p. 594-604, 2007.

MARTINS-JÚNIOR, H. A. **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por electrospray (LC-ESI/MS/MS)**. 2005. 112 f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (USP), São Paulo, São Paulo. 2005.

MARTINS-JÚNIOR, H. A. et al. An alternative and fast method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1029–1034, 2009.

MEINERT, R. et al. Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma in Childhood and Exposure to Pesticides: Results of a Register-based Case-Control Study in Germany. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, n. 7, p. 639-646, 2000.

MICHEL, O. R. **Toxicologia ocupacional**. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2000, 302p.

MINK, P. J. et al. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 440-452, 2012

MONNERAT, R. G, BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Ed.), **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 163-200, 2000.

MOSSA, AT. H. and ABBASSY, M. Adverse haematological and biochemical effects of certain formulated insecticides in male rats. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 6(4), p. 160-168, 2012.

MOYE, H. A.; MILES, C. J.; SCHERE, S. J. A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing post column fluorogenic labelin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 31, p. 69-72, 1983.

OGA, Seize. **Fundamentos de toxicologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474 p.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 35(2), p.130-135, 2001.

OLIVEIRA, R. G. **Hemograma**: como fazer e interpretar. 1ªEd. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2007.505 p.

PACHECO, M. E.; SCHOTTZ, V. Uso de Agrotóxicos, uma ameaça à alimentação saudável. **Carta ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. 2005. 9 p.

PAES, M. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. **Circular Técnica 75** – EMBRAPA Milho e Sorgo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). ISSN 1679-1150, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/489376>>. Acesso em 17 fev 2013

PALIWAL, A., GURJAR, R. K., SHARMA, H. N. Analysis of liver enzymes in albino rat under stress of λ -cyhalothrin and nuvan toxicity. **Biology and Medicine**, v. 1(2), p. 70-73, 2009.

PALMA, D. A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva). Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

PATIL, J. A., PATIL, A. J., GOVINDWAR s. P. Biochemical effects of various pesticides on sprayers of grape gardens. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 18(2), p. 16-22, 2003;

PAZ-Y-MIÑO, C. et al. Evaluation of DNA damage in Ecuadorian population exposed to glyphosate. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30(2), p.456-460, 2007.

PREFEITURA de DIVINÓPOLIS. Disponível em:
<<http://www.divinopolis.mg.gov.br/>>. Acesso em: 16 dez. 2012.

PRIYANKA R., PRIYANKA, M., PRADEEP, B. Effect of cyfluthrin (synthetic pyrethroid – Solfac 050EW) on aspartate and alanine aminotransferase profiles in acute an sub-chronic study with swiss albino mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4(5), p. 477-479, 2012.

REDDY, P. B., KANOJIA, J. Clinico pathological effects of pesticides exposure on farm workers. **DAV International Journal of Science**, v. 1(2) p. 119-121, 2012.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.10(14), p. 149-158, 2009.

RICHARD, S. et al. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 113 (6), p. 716-720, 2005.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**, v. 22(1), p. 7-16, 2009.

RODRIGUES, V. B. **Avaliação das alterações hematológicas, bioquímicas e genotóxicas nos trabalhadores expostos a agrotóxicos em municípios do estado do Piauí**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestre em Farmacologia Clínica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2011.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; OLIVEIRA, C. A. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência**, v. 5(2), p. 359-372, 2009.

SAVOY, 2011. Palestra. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.91-92, jan./jun., 2011.

SCHUMMER, C. et al. Determination of farm works' exposure to pesticides by hair analysis. **Toxicology Letters**, v. 210, p. 203-210, 2012.

SÉRALINI, G-E. et al. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4221-4231, 2012.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). Estatísticas de Mercados do Sindicato Nacional da Indústria de Agrotóxicos. <<http://www.sindag.org.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.

SHAMSUDIN, S. B., yap, H. Occupational Exposure of Pesticides on activities of alanine aminotrasferase and gama glutamyltraspeptidase in blood among vegetables farmers. **American Medical Journal**, v. 2(2), p. 87-92, 2011.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. B.; LIMA, J. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 329-337, 2007.

SOUZA, S.C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia (UFMG), Belo Horizonte, 2007.

SOUZA, S.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552 p. 25–35, 2005.

STALIKAS, C. D.; PILIDIS, G. A. Development of a method for the simultaneous determination of phosphoric and amino acid group containing pesticides by gas chromatography with mass-selective detection Optimization of the derivatization procedure using an experimental design approach. **Journal of Chromatography A**, v. 872, p. 215–225, 2000.

TEÓFILO, R. F. **Planejamentos Experimentais para a Otimização da Resposta Voltamétrica na Determinação do Herbicida Glifosato em Solo, Água e Vegetais**. 2003. 96 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. Divulgação técnica. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142, 2002.

TRAPÉ, A. Z. Efeitos toxicológicos e registro de intoxicações por agrotóxicos. In: Fórum Nacional de secretários da Agricultura, Ministério do Meio Ambiente, Programa de Defesa Ambiental Rural, **Textos orientadores...**, Belo Horizonte: MMA, 2001. p. 45-50

TRAPÉ, A. Z. Uso de agrotóxicos e a saúde humana 2003. Escrito para apresentação no **Workshop Tomate na Unicamp**: Perspectivas e Pesquisas. Campinas, 28 maio 2003.

TSUJI, M.; ARIYAMA, Y.; YANO, M. Simultaneous determination of glifosinate and its metabolite, and glyphosate in crops. **Analytical Sciences**, vol. 13 p. 283-285, abril 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Production, Supply and Distribution Online**. 2011. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 31 ago. 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF ENERGY - Bonneville Power Administration (USDOE-BPA). **Glyphosate Herbicide Fact Sheet**. Washington, DC. 12 p. March 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). 1993. Reregistration eligibility decision (RED): glyphosate. EPA 738-R-93-014. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. Washington, DC: US EPA. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/old_reds/glyphosate.pdf>. Acessado em: 21 jan. 2013.

VENCATO, A. Z. et al. **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, p. 144, 2010. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/a%20cultura%20da%20soja.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p.1381-1386, 2001.

WALSH, L. P.; et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v 108 n. 8, p. 769-776, aug. 2000.

WATTS, M. 2009. **Monograph on Glyphosate**. Pesticide Action Network Asia and the Pacific (PAN AP).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). IPCS International programme on chemical safety. Glyphosate, **Environ Health Criteria** 159, Geneva, Switzerland, 1994.

YONAMINE, Luciana. Contaminantes Químicos/Intoxicação por Substâncias Químicas. Informe-Net DTA In: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Manual das Doenças Transmitidas por Água e Alimentos, Dez. 2003.

Atualizado em Fev. 2005. Disponível em:

<ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ifnet_quimicos.pdf>.

Acesso em: 06 mar. 2013.

YOSHIOKA, N. et al. Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialophos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3675-3680, 2011.

YOUSEF, M. I.; et al. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 30(4), p. 513-34, 1995.

YOUSEF, M. I., AWAD, T. I., MOHANEDM E. H. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. **Toxicology**, v. 227, p. 240-247, 2006.

ZAMA. D. et al. Assessment of the changes in some diagnostics enzymes and other parameters in *Wistar albino* rats treated with pesticides during gestation. **Sciences & Technologie C**, v. 23, p. 51-56, 2005.

10 ANEXO

10.1 Anexo 1 – Aprovação pelo COEP/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0573.0.203.000-11

Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 30 de novembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento de metodologia para determinação do glifosato em alimentos e avaliação de alterações hematológicas em trabalhadores expostos a esse herbicida" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

10.2 Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os integrantes do grupo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: projeto "DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO EM ALIMENTOS E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM TRABALHADORES EXPOSTOS A ESSE HERBICIDA."

Prezada Sr. (Sra.)

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar se o glifosato pode causar alguma alteração à sua saúde.

Caso queira participar deste estudo, iremos colher 10mL do seu sangue para realização dos exames laboratoriais. Os resultados destes exames serão entregues a você após um mês.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em sigilo.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum problema.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Luci Dusse

Vanessa Faria

Participante

Nome completo do participante: _____

Professoras responsáveis: Luci Maria Sant'Ana Dusse – telefone: 31-3409-6880

Leiliane Coelho André Amorim - telefone: 31-3409-6889

Mestranda: Vanessa Heloisa Ferreira de Faria- telefone: 31-3314-4684 / 31-88052105

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha –
Campus UFMG, Unidade Administrativa II, Sala 2005, 2ºandar. CEP: 31270-901.
Telefone: 3409-4592.

AGRADECEMOS SUA VALIOSA PARTICIPAÇÃO!

10.3 Anexo 3 – Ficha de coleta de dados



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
FICHA DE COLETA DE DADOS



Projeto: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO EM ALIMENTOS E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM TRABALHADORES EXPOSTOS A ESSE HERBICIDA

Data: / /

1. Identificação Pessoal

Nome:

Nacionalidade:

Naturalidade:

Data de nascimento:

Idade:

Estado civil:

Endereço:

Rua/Avenida:

Número:

Complemento:

Bairro:

CEP:

Cidade:

Estado:

Telefone: ()

Escolaridade:

2. Local de Trabalho

Trabalha por conta própria: SIM NÃO

SE NÃO. Qual o nome da Empresa/Empregador:

Trabalha com qual (is) cultura (s)?

3. Anamnese (Presença de doenças no trabalhador e na sua família)

Quando foi sua última refeição?

há pelo menos 5h menos de 5h

Fumante?

SIM NÃO

Se SIM, desde que idade?

antes dos 12 anos 13 a 18 anos após 18 anos

Se SIM, qual a quantidade (por dia)?

1 a 3 4 a 7 mais de 7

ex-Fumante? SIM NÃO

Se SIM, há quanto tempo?

menos de 1 mês 1 a 6 meses mais de 6 meses

Consumo de álcool? SIM NÃO

Se SIM, qual a quantidade (por dia)?

muito pouco ou raramente 1 a 3 doses mais de 4

Parou de beber? SIM NÃO

Se SIM, há quanto tempo?

menos de 1 mês 1 a 6 meses mais de 6 meses

Pratica exercício físico? SIM NÃO

Se SIM, qual a frequência:

1-2 vezes 3-4 vezes 5-7 vezes por semana

Qual?

Uso de medicamentos? SIM NÃO

SE SIM. Quais medicamentos?

Histórico de câncer na família? SIM NÃO

Se SIM, qual?

Você ou alguém da sua família já tirou o baço? SIM NÃO

NÃO SEI

Você ou alguém da sua família tem epilepsia? SIM NÃO

NÃO SEI

Você ou alguém da sua família perde muito sangue quando se corta? SIM NÃO NÃO SEI



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA DE COLETA DE DADOS

Projeto: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO EM ALIMENTOS E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM TRABALHADORES EXPOSTOS A ESSE HERBICIDA

Você ou alguém da sua família tem infecção com frequência? SIM NÃO NÃO SEI

Você ou alguém da sua família tem problema de rim? SIM NÃO NÃO SEI

Você ou alguém da sua família tem problema de fígado Pessoas com "tirica"?

SIM NÃO NÃO SEI

Sentiu alguns desses sintomas no último mês? SIM NÃO

SE SIM. Pode marcar quais sintomas sentiu?

Ardência nos olhos Formigamento Náusea/ânsia de vômito

Dor de cabeça Suor excessivo Diarreia

Alergia na pele Tosse Vômito

Visão turva Falta de ar Dor abdominal

Tonturas Câimbra Outro Qual?

Se SIM, qual a frequência: 1-4 vezes 5-10 vezes mais de 10 vezes no último mês

4. Exposição Ocupacional

Quais os nomes dos agrotóxicos você aplica normalmente?

.....

Quando foi a última vez que manipulou algum tipo de agrotóxico? 1-3 dias 4-7 dias mais de uma semana

Quais:

Tem orientação do Engenheiro Agrônomo? Utiliza o receituário agrônomo? SIM NÃO

Se SIM, segue corretamente o receituário agrônomo? SIM NÃO

Tem treinamento sobre como usar o agrotóxico? SIM NÃO

Lê os rótulos das formulações? SIM NÃO

Segue as informações contidas no rótulo? SIM NÃO

SE NÃO, por que?

Qual o local de armazenamento dos agrotóxicos?

É responsável pelo descarte das embalagens vazias? SIM NÃO

Se SIM, como este descarte é feito?

É responsável pelo preparo da mistura? SIM NÃO

SE SIM, como esta mistura é preparada?

Existe um espaço específico para isso?

Existe material exclusivo e ideal para o preparo?

Afasta crianças e animais do local de preparo?

Coloca as quantidades indicadas na embalagem (dosagem recomendada)?

É responsável pela aplicação das formulações? SIM NÃO

Usa equipamento de proteção individual (EPI) para misturar e/ou aplicar as formulações? SIM NÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA DE COLETA DE DADOS

Projeto: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO GLIFOSATO EM ALIMENTOS E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM TRABALHADORES EXPOSTOS A ESSE HERBICIDA

SE SIM. Quais equipamentos de proteção usa:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Mascaras de papel | <input type="checkbox"/> Avental |
| <input type="checkbox"/> Respirador | <input type="checkbox"/> Roupas especiais |
| <input type="checkbox"/> Luvas | <input type="checkbox"/> Óculos |
| <input type="checkbox"/> Botas | <input type="checkbox"/> Outros |

Qual? _____

SE NÃO. Quais os motivos?

- Preço
 O EPI é incômodo
 O EPI estragou
 Não conhece os EPI's
 Outros

Qual? _____

Troca de roupas logo após aplicar ou preparar o agrotóxico?

SIM NÃO

Lava as mão logo após aplicar ou preparar o agrotóxico?

SIM NÃO

Toma banho logo após aplicar ou preparar o agrotóxico?

SIM NÃO

Já se sentiu mal LOGO após aplicar o agrotóxico?

SIM NÃO

SE SIM. Pode descrever o que sentiu?

- | | | |
|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Ardência nos olhos | <input type="checkbox"/> Formigamento | <input type="checkbox"/> Náusea/ansia de vômito |
| <input type="checkbox"/> Dor de cabeça | <input type="checkbox"/> Suor excessivo | <input type="checkbox"/> Diarréia |
| <input type="checkbox"/> Alergia na pele | <input type="checkbox"/> Tosse | <input type="checkbox"/> Vômito |
| <input type="checkbox"/> Visão turva | <input type="checkbox"/> Falta de ar | <input type="checkbox"/> Dor abdominal |
| <input type="checkbox"/> Tonturas | <input type="checkbox"/> Cãibras | <input type="checkbox"/> Outro |

Qual? _____

Acredita que o agrotóxico faz mal à saúde?

SIM NÃO

Tem medo de aplicar/usar o agrotóxico?

SIM NÃO

Dezalaria comentar mais alguma coisa? Fique à vontade.