



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE UNB PLANALTINA

Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural

NAYARA LUIZ PIRES

**EXPANSÃO DA FRONTEIRA AGRÍCOLA E PRESENÇA DE GLIFOSATO E AMPA
EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA REGIÃO DE SANTARÉM (PA): DESAFIOS
ANALÍTICOS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL**

BRASÍLIA/DF
2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE UNB PLANALTINA

Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural

NAYARA LUIZ PIRES

**EXPANSÃO DA FRONTEIRA AGRÍCOLA E PRESENÇA DE GLIFOSATO E AMPA
EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA REGIÃO DE SANTARÉM (PA): DESAFIOS
ANALÍTICOS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural da Faculdade UnB Planaltina, Universidade de Brasília. Linha de Pesquisa: Monitoramento Ambiental e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Sousa Passos

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Martín Infante Córdova

BRASÍLIA/DF
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LP667e Luiz Pires, Nayara
EXPANSÃO DA FRONTEIRA AGRÍCOLA E PRESENÇA DE
GLIFOSATO E AMPA EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA REGIÃO DE
SANTARÉM (PA): DESAFIOS ANALÍTICOS PARA O
MONITORAMENTO AMBIENTAL / Nayara Luiz Pires;
orientador Carlos José Sousa Passos; co-orientador
Carlos Martín Infante Córdova. -- Brasília, 2015.
112 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Meio Ambiente
e Desenvolvimento Rural) -- Universidade de Brasília,
2015.

1. Água . 2. Contaminação ambiental . 3.
Desenvolvimento Rural . 4. Glifosato. 5. HPLC. I.
José Sousa Passos, Carlos, orient. II. Martín Infante
Córdova, Carlos, co-orient. III. Título.

**EXPANSÃO DA FRONTEIRA AGRÍCOLA E PRESENÇA DE GLIFOSATO E AMPA
EM AMOSTRAS DE ÁGUA DA REGIÃO DE SANTARÉM (PA): DESAFIOS
ANALÍTICOS PARA O MONITORAMENTO AMBIENTAL**

NAYARA LUIZ PIRES

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural da Faculdade UnB Planaltina, Universidade de Brasília.
Linha de Pesquisa: Monitoramento Ambiental e Saúde.

Aprovado em 28 outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos José Sousa Passos
Universidade de Brasília (FUP/UnB) - Presidente

Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré – Membro efetivo externo
Universidade de Brasília (IQ/UnB)

Prof. Dr. Jean Rémy Davée Guimarães
Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBFCCF/UFRJ) – Membro efetivo externo

Prof. Dr. Sérgio Sauer
Universidade de Brasília (FUP/UnB) – Membro suplente interno

Dedico este trabalho às pequenas comunidades agrícolas da área rural planalto de Santarém e Mojuí dos Campos, pela perseverança e resistência em se manter em seus lares e suas terras, a despeito da expansão do agronegócio e do uso extensivo de agrotóxicos no interior da Amazônia.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento dessa dissertação de mestrado contou com uma grande equipe. Aproveito a oportunidade para agradecer à todos que, de alguma forma, contribuíram com a realização deste trabalho, em especial:

- ❖ À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural (PPG-MADER) pela oportunidade de realização do curso de mestrado.
- ❖ Aos orientadores deste trabalho, professores Carlos Passos e Carlos Infante.
- ❖ À professora Eloisa Dutra Caldas pelas orientações durante o desenvolvimento do método analítico, e por possibilitar o uso do Laboratório de Toxicologia e todo o material utilizado durante a realização das análises.
- ❖ À toda a equipe do Laboratório de Toxicologia, em especial à Eveline Camillo, Denise Carvalho, Érica Pacheco, Patrícia Diniz, Jéssica Pinheiro e Mariana Rocha pelo suporte técnico prestado, pelos treinamentos e por tirar as dúvidas quanto ao uso dos equipamentos do laboratório.
- ❖ Às comunidades da região do planalto de Santarém (PA): Açaizal, Guaraná, Boa Sorte, do Reservatório Curuá-Una e do Rio Moju pela colaboração com a pesquisa.
- ❖ Ao Dr. Robert Davidson, Profs. Frédéric Mertens e Sérgio Sauer, ao Sr. Gilson Rego e outros assistentes de campo pelo auxílio durante as coletas e aplicação do questionário nas comunidades.
- ❖ Aos mentores do projeto Glifosato na Amazônia Rural (GAR): Marc Lucotte, Mathieu Canton, Robert Davidson e Carlos Passos.
- ❖ À Universidade de Quebec em Montreal (UQÀM, Canadá) e aos Institutos de Pesquisa em Saúde do Canadá (IRSC, em francês), pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa, por meio do Projeto GAR acima mencionado.
- ❖ Ao projeto Terra e Direitos em Águas Turbulentas (*Lands and Rights in Troubled Waters – LAR Project*) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.
- ❖ Aos professores membros da banca de qualificação e defesa final da dissertação, Drs. Eduardo Cyrino Oliveira-Filho, Sérgio Sauer, Jean Rémy Davée Guimarães e Fernando Fabríz Sodré pelas contribuições e por aceitarem o convite.
- ❖ À Elton Souza Oliveira por ajudar na construção do mapa de localização da área de estudo.

- ❖ Aos colegas de curso PPG-MADER pelo incentivo e apoio.
- ❖ Ao Instituto Federal de Goiás - campus Formosa e a Ruana Brandão pelo apoio e colaboração.
- ❖ À Luiz Henrique Pires Chagas pela ajuda, apoio e compreensão.

Sem toda essa equipe nada disso seria possível. Muito obrigada pelo convívio e aprendizado.

“Mantidas as condições do atual modelo de desenvolvimento econômico e social em escala global, vislumbra-se um futuro com crescentes ameaças a vulnerabilidades socioambientais”

Organização Pan-Americana de Saúde (2014)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da expansão de cultivos de soja na zona rural dos municípios de Santarém e Mojuí dos Campos, região oeste do Pará, na Amazônia brasileira, por meio da análise de herbicidas a base de glifosato e glufosinato em amostras de água, e de um questionário de cunho descritivo e exploratório aplicado a pequenos agricultores rurais que vivem próximos a grandes lavouras de soja. Foi desenvolvido um método analítico para determinação de glifosato, seu produto de degradação AMPA, e glufosinato, outro herbicida de relevância toxicológica, em amostras de água por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FL, em inglês). O método analítico otimizado foi validado quanto aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD). Amostras de água fortificadas com os analitos de interesse foram filtradas (45 µm) e 200 µL foram injetados diretamente no HPLC para análise de AMPA, ou concentrada (10x) por liofilização para análise de glufosinato e glifosato. A separação cromatográfica foi obtida em coluna de troca iônica (PRP-X100, 10 µm, 250x4,1 mm) e fase móvel isocrática: 0,010 M fosfato de potássio, pH 2,1, ajustado com ácido fosfórico (H₃PO₄), 4% de metanol, com fluxo de 0,5 mL por minuto. Na caixa de reação pós-coluna mantida a 33° C, os analitos foram oxidados com hipoclorito de cálcio, complexados com *o*-ftalaldeído e 2-mercaptoetanol, e o produto fluorescente detectado (excitação a 340 nm e emissão 455 nm). LOQs para AMPA, glifosato e glufosinato foram estabelecidos em 0,5; 0,3 e 0,2 µg/L, respectivamente. O método analítico foi utilizado na análise de 63 amostras de água provenientes de córregos situados em pequenas comunidades agrícolas adjacentes a grandes fazendas de soja na região de estudo. Glifosato e glufosinato não foram detectados em nenhuma amostra analisada (< LOQ) e AMPA foi detectado em 6 amostras, com faixa de concentração de 0,65 a 1,93 µg/L. Informações obtidas por meio do questionário indicam um provável risco de exposição humana a agrotóxicos, principalmente pela via respiratória. É importante ampliar as possibilidades de análise em outras matrizes ambientais e humanas (e.g., solo, ar, urina e sangue) para subsidiar uma avaliação dos possíveis efeitos sobre a saúde desta população e sobre o meio ambiente. Os dados deste estudo são de grande importância para o planejamento de estratégias de monitoramento ambiental na região, visto que eventuais contaminações ambientais representam um importante potencial de exposição humana, com danos ao meio ambiente.

Palavra-chave: Água, Contaminação ambiental, Desenvolvimento Rural, Glifosato, AMPA, Glufosinato, HPLC.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of the expansion of soybean crops in rural areas of the municipalities of Santarém and Mojuí dos Campos, western Pará, in the Brazilian Amazon, through the analysis of glyphosate- and glufosinate-based herbicides in water samples, and the application of a descriptive exploratory survey to small rural farmers living near the large soybean crops. An analytical method was developed for the determination of glyphosate, its degradate AMPA, and glufosinate, another herbicide of toxicological relevance in water samples, by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL). The improved analytical method was validated considering the parameters of selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD). Water samples spiked with the analytes of interest were filtered (45 µm) and 200 µL injected directly into the HPLC for the analysis of AMPA, or the sample was concentrated (10x) by lyophilisation for analysis of glufosinate and glyphosate. The chromatographic separation was achieved in an ion exchange column (PRP-X100, 10 µm, 250x4.1 mm) and isocratic mobile phase: 0.010 M potassium phosphate, pH 2.1, adjusted with phosphoric acid (H₃PO₄), 4% methanol, at a flow rate of 0.5 mL per minute. In the post-column reaction box kept at 33° C, the analytes were oxidized with calcium hypochlorite, complexed with *o*-phthalaldehyde and 2-mercaptoethanol, and the product detected by fluorescent detector (excitation at 340 nm and emission at 455 nm). LOQ for AMPA, glyphosate and glufosinate was 0.5; 0.07 and 0.2 respectively. The analytical method was used in the analysis of 63 water samples from streams located in small farming communities adjacent to large soybean farms. Glyphosate and glufosinate were not detected in any sample analyzed (<LOQ) and AMPA was detected in 6 samples, at a concentration range of 0.65 to 1.93 µg/L. Information obtained through the questionnaire indicated a possible risk of human exposure to pesticides, mainly through the respiratory route. It is important to expand the possibilities of analysis in other environmental and human matrices (e.g. soil, air, urine and blood) to support an assessment of possible health effects on this population and the environment. Data from this study are of great importance for planning environmental monitoring strategies in the region, considering that environmental contamination represents a significant potential for human exposure with environment damage.

Key-words: Water, Environmental Contamination, Rural Development, Glyphosate, AMPA, Glufosinate, HPLC.

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários

AMPA – Aminomethyl Phosphonic Acid

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APP - Áreas de Preservação Permanente

APVMA – Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority

AQRQ - Avaliação Quantitativa de Risco Químico

CE₅₀ - Concentração Efetiva Cinquenta

CG - Cromatografia Gasosa

CNTBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV - Coeficiente de Variação

DDT - Dicloro-difenil-tricloroetano

DL₅₀ - Concentração Letal Cinquenta

DP - Desvio Padrão

DRf - Dose de Referência

EPI - Equipamentos de Proteção Individual

EPSP - 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate

EUA - Estados Unidos da América

FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos

FL – Fluorescência

HFBA - Heptafluorobutyric Acid

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IA – Ingrediente Ativo

IARC – International Agency for Research on Cancer

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA – Ingestão Diária Aceitável

LMR – Limite Máximo de Resíduo

LOD – Limit of detection

LOQ – Limit of Quantitation

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MPPA - Methylphosphinicpropionic Acid

NOAEL – Non Observed Adverse Effect Level

OGM - Organismos Geneticamente Modificados

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPA - *o*-ftalaldeído

PA - Pará

PIB - Produto Interno Bruto

POEA - Polyoxyethylene Amine

POPs - Poluentes Orgânicos Persistentes

SINAV - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TFAA - Trifluoroacetic Anhydride

TFE - Trifluoroetanol

USEPA – United States Environmental Protection Agency

UV - Ultravioleta

VMP - Valor Máximo Permitido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do glifosato ($C_3H_8NO_5P$).....	25
Figura 2. Via metabólica para síntese de aminoácidos, e mecanismo de ação do glifosato. ...	26
Figura 3. Esquema de degradação do glifosato.	27
Figura 4. Estrutura química do glufosinato ($C_5H_{12}NO_4P$)	29
Figura 5. Degradação do glufosinato.....	30
Figura 6. Representação esquemática do destino de agrotóxicos no ambiente.....	31
Figura 7. Evolução temporal da área plantada de soja no Estado do Pará.	42
Figura 8. Categorias dos estudos utilizando glifosato no Brasil entre os anos de 2007 e 2012.	43
Figura 9. Localização da região de Santarém (a). Localização da área de coleta no Município de Santarém (b). Localização do Estado do Pará no Brasil (c). Localização de Santarém no Estado do Pará (d).	49
Figura 10. Sistema cromatográfico Shimadzu® do Laboratório de Toxicologia: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) soluções de derivatização pós coluna; d) bomba de alta pressão; e) bomba de alta pressão; f) módulo comunicador; g) injetor; h) coluna; i) detector; j) caixa de reação química; l) resíduos e m) Software.....	53
Figura 11. (a) Esquema de derivatização pós coluna. (b) reação do glifosato com hipoclorito de cálcio (OCl^-). (c) AMPA e glicina e seus derivados fluorescentes com o-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol (OPA 2-ME).	54
Figura 12. (a) Pré-coluna Hamilton (b) Forno de coluna da Shimadzu.	57
Figura 13. Cromatograma obtido com solução trabalho mistura, concentração 100 $\mu g/L$, (1) AMPA, (2) glufosinato, (3) glifosato. A unidade da abscissa é tempo em minutos. No eixo y, tem-se a resposta do detector. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 5 μM , metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 μL , caixa de reação química: 38°C.....	58
Figura 14. Cromatogramas obtidos variando-se a concentração de hipoclorito de cálcio na solução de derivação pós-coluna: preto 0,015g/L e rosa 0,030g/L. (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 5 μM , metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 μL , caixa de reação química: 38°C.	59
Figura 15. Estudo da variação do fluxo das soluções de derivatização pós-coluna: hipoclorito de cálcio e solução OPA: rosa: 0,5 e 0,5 mL/min; marrom 0,3 e 0,3 mL/min e azul 0,4 e 0,3 mL/min, respectivamente. (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. Condições: fase móvel:	

fosfato de potássio 5 μ M, metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: 38°C. 60

Figura 16. Estudo da variação de metanol na fase móvel, preto 4%; rosa: 8%; azul: 12%; marrom 16%; verde 20%. 1. AMPA; 2. glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, pH 2,1 e metanol variando de 8% a 20%; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: 38°C. 61

Figura 17. Teste da variação de metanol na fase móvel; preto 4%; rosa: 8%; azul: 12%. 1. AMPA; 2. glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol variando de 4% a 12%, pH 2,1; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: 38°C. 62

Figura 18. Comparação dos cromatogramas em diferentes concentrações de fosfato de potássio na fase móvel: preto: 5 μ M e rosa: 10 μ M. 1. AMPA; 2. glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio variando 5 μ M e 10 μ M, metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: 33°C. 63

Figura 19. Cromatogramas obtidos com diferentes temperaturas da caixa de reação química: preto 58°C; rosa 48°C; azul 38°C e marrom 28°C. 1) AMPA; 2) glufosinato e 3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: variando entre 28° C e 58°C. 64

Figura 20. Cromatogramas de diferentes volumes de injeção: marrom (a) 300 μ L; azul (b) 200 μ L (b); rosa (c) 100 μ L; e preto (d) 50 μ L (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção variando de 50 a 300 μ L, caixa de reação química: 33°C. 66

Figura 21. Curva de calibração em água ultrapura. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Concentrações de 3; 10; 20; 50; 75 e 100 μ g/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C. 67

Figura 22. Curva de calibração em fosfato de potássio. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Concentrações de 3; 10; 20; 50; 75 e 100 μ g/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C. 68

Figura 23. Curva de calibração em fase móvel. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Concentrações de 3; 10; 20; 50; 75 e 100 μ g/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato

de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.	68
Figura 24. Ponto da curva de calibração (100 μ g/L) em diferentes solventes: água ultrapura (preto), fosfato de potássio (rosa) e fase móvel (azul). Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.	70
Figura 25. Estudo da variação de pH na fase móvel. Preto: pH 2,2 e rosa: pH 2,1. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Ponto da curva de calibração 25 μ g/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH variando de 2,1 a 2,2; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.....	71
Figura 26. Estudo da variação do pH na fase móvel. Preto: pH 2,1 e rosa: pH 1,9. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Ponto da curva de calibração 100 μ g/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH variando de 1,9 a 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.....	72
Figura 27. Equilíbrio e dissociação do herbicida glifosato	73
Figura 28. Amostra de água superficial, fortificada com 10, 15 e 20 μ g/L, liofilizada e analisada. (1) glufosinato e (2) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.	74
Figura 29. Acidificação das amostras: 3 amostras acidificadas (lado esquerdo) e 3 amostras não acidificada (lado direito).....	75
Figura 30. Cromatograma de amostras fortificadas com 10 μ g/L. Preto: sem acidificação e rosa: acidificada. (1) glufosinato e (2) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.	76
Figura 31. Esquema geral do procedimento laboratorial de determinação de AMPA, glifosato e glufosinato em água por HPLC-fluorescência.....	77
Figura 32. Ensaio da seletividade. Preto: branco (água ultrapura), marrom (1): AMPA; rosa (2) glufosinato e azul (3) glifosato. Ponto da curva de calibração 100 μ g/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação.....	78
Figura 33. Curvas analíticas obtida para o AMPA, glufosinato e glifosato.....	80
Figura 34. Curva de calibração no intervalo de 50 a 600 μ g/L. 1. AMPA, 2. Glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μ L, caixa de reação química: 33°C.	81

Figura 35. Cromatograma da amostra 30/2015 (reservatório), concentração: 1,93µg/L de AMPA. (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. (a) rosa: amostra real; (b) preto: curva, concentração: 2 µg/L AMPA; 3 µg/L; 2 µg/L.....	87
Figura 36. Gafanhoto pulverizando agrotóxico na lavoura próximo à comunidade de Porto Alegre, Santarém – PA. (Janeiro de 2014).	93
Figura 37. Córrego tributário do Rio Moju. Santarém – PA (Fevereiro de 2015).	94
Figura 38. Comunidade rural da região do Planalto de Santarém – PA (Fevereiro de 2015).	95
Figura 39. Escola Municipal de Ensino Fundamental São Francisco. Comunidade Boa Sorte, Município de Mojuí dos Campos-PA (Março de 2013).	96
Figura 40. Visão interna da sala de aula da Escola Municipal de Ensino Fundamental São Francisco. Comunidade Boa Sorte, Município de Mojuí dos Campos-PA (Fevereiro de 2015).	97

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Classificação Toxicológica para Agrotóxicos de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ibama.	33
Quadro 2. Classificação toxicológica para agrotóxicos de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Anvisa.	33
Quadro 3. Lista de agrotóxicos registrados no MAPA cujo ingrediente ativo é glifosato ou glufosinato, e suas respectivas classificações toxicológica (Anvisa) e ambiental (Ibama), atualizada em 02/05/2015.	34
Quadro 4. Parâmetros envolvidos no processo de validação de um método analítico (Lanças, 2009).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e biológicos do glifosato.	25
Tabela 2. Classificação de águas doces segundo a Resolução Conama nº 357, de acordo com seu uso preponderante e a concentração máxima de glifosato.	38
Tabela 3. VMP de glifosato e AMPA de acordo com a Resolução Conama nº 396.	39
Tabela 4. Análise de Glifosato e AMPA por HPCL/Fluorescência com derivatização pós coluna utilizando OPA e 2-mercaptoetanol.	46
Tabela 5. Coordenadas geográficas de todos os pontos de coleta de amostras de água.	50
Tabela 6. Preparo da solução de hipoclorito de cálcio	56
Tabela 7. Preparo da solução OPA.	56
Tabela 8. Área integrada dos analitos glifosato, AMPA e glufosinato em função da variação da concentração de tampão na fase móvel (n=2).	64
Tabela 9. Teste da temperatura da caixa de reação química (n=3).	65
Tabela 10. Área de integração dos analitos em função do volume de injeção.	66
Tabela 11. Integração da curva de calibração para diferentes solventes	69
Tabela 12. Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) para as curvas de calibração obtidas com diferentes solventes (água ultrapura, fase móvel e fosfato de potássio).	69
Tabela 13. Teste de Cochran para homocedasticidade considerando 7 níveis em triplicata. ...	79
Tabela 14. Ensaio de repetitividade e precisão intermediária com matriz branca fortificada. Médias, coeficientes de variação (CV, %) e desvio padrão.	83
Tabela 15. Ensaio de recuperação com matriz branca fortificada e liofilizada. Coeficientes de Variação (%CV), obtidos em 3 níveis de concentração.	84
Tabela 16. LOD e LOQ do método desenvolvido e validado.	85
Tabela 17. Resultados das amostras positivas, coletadas em campo.	86
Tabela 18. Dados sócio-demográficos das comunidades rurais da região de Santarém e Mojuí dos Campos (PA).	89
Tabela 19. Percepção de mudança em famílias de pequenos agricultores da região de estudo.	90
Tabela 20. Percepção de risco ambiental.	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Qualidade da água	23
2.2 Glifosato: toxicologia e cinética ambiental	24
2.3 Glufosinato: toxicologia e cinética ambiental	29
2.4 Legislação brasileira sobre agrotóxicos.....	30
2.5 Plantas transgênicas e uso dos agrotóxicos glifosato e glufosinato.....	39
2.6 Expansão da fronteira agrícola do bioma Cerrado para o bioma Amazônia	41
2.7 Determinação de glifosato, glufosinato e metabólitos em água	43
2.8 Validação de métodos analíticos	46
3. OBJETIVOS	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Área de estudo	49
4.2 Questionário sociopolítico e ambiental	50
4.3 Coleta de amostras de água	50
4.4 Desenvolvimento do método analítico para determinação de glifosato, AMPA e glufosinato	52
4.5 Preparo das soluções padrão	55
4.6 Preparo da fase móvel.....	55
4.7 Preparo da solução oxidante de hipoclorito de cálcio	55
4.8 Preparo da solução de reação o-ftaldialdeído (OPA)	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1. Desenvolvimento e otimização da metodologia analítica	57
5.1.1. Ajuste de equipamento	57
5.1.2 Ajuste na degaseificação da solução OPA.....	58
5.1.3 Estudo da variação de concentração do hipoclorito de cálcio.....	58
5.1.4 Estudo da variação de fluxo das soluções de derivatização	59
5.1.5 Estudo da proporção de metanol na fase móvel.....	60
5.1.6 Estudo da variação na concentração de fosfato de potássio na fase móvel.....	62

5.1.7 Estudo da temperatura da caixa de reação química.....	64
5.1.8 Estudo do volume de injeção	65
5.1.9 Estudo da curva de calibração em diferentes solventes	67
5.1.10 Estudo da variação de pH.....	70
5.1.11 Estudo da concentração das amostras por liofilização	73
5.1.12 Acidificação das amostras	74
5.2 Definição das condições cromatográficas	76
5.3 Validação do método otimizado	77
5.3.1 Seletividade	78
5.3.2 Linearidade, intervalo da curva de calibração e faixa de aplicação	79
5.3.4 Precisão do sistema HPLC - FL	82
5.3.5 Precisão, e exatidão do procedimento de concentração de amostras por liofilização	83
5.3.6 Robustez	84
5.3.7 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	85
5.4 Análise de amostras de água coletadas em campo na região de estudo	86
5.3 Percepção de famílias de agricultores sobre os riscos ambientais e de saúde associados à expansão dos cultivos de soja em Santarém e Mojuí dos Campos.....	88
6. CONCLUSÃO	98
7. REFERÊNCIAS.....	99
8. APENDICE.....	108

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos para o controle de plantas daninhas e outras pragas tem sido uma prática comum por milhares de anos. Há registros de que 400 a.c. os romanos usavam produtos residuais (cinzas, sais, lodo de fornalhas) tóxicos para a maioria das plantas afim de manter estradas (Solomon et al., 2010). No século XVII, o uso de herbicidas orgânicos foi intensificado na agricultura, visto que o cultivo de monoculturas deu início ao desenvolvimento de pragas (Kageyama, 2004; Solomon *et al.*, 2010). No século XX, com a produção sintética do inseticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) por Paul Hermann Müller em 1931, é reconhecida a eficiência do controle químico, marcando o início da era química na produção de alimentos (Tavella *et al.*, 2011).

Além dos inseticidas organoclorados e posterior surgimento dos organofosforados, o avanço científico permitiu a formulação de novas formas de controle de pragas (Solomon *et al.*, 2010). Em 1970, o glifosato foi sintetizado por um grupo de pesquisadores da Companhia Monsanto (EUA), liderado pelo químico J. Franz. O glifosato é comercializado atualmente em mais de 119 países, com registro para mais de uma centena de culturas (Toni, Santana e Zaia, 2006), e, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), é o ingrediente ativo de maior comercialização no Brasil, tendo sido registrada a venda de 185.956,13 toneladas no ano de 2013 (Ibama, 2014).

Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (Silva *et al.*, 2015). De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o setor da agropecuária cresceu 0,4% em 2014 e contribuiu com a arrecadação de R\$ 262,3 bilhões para o Produto Interno Bruto (PIB) do país. O desempenho do setor agropecuário foi resultado do crescimento da produção, e a soja foi responsável pelo crescimento de 5,8% (IBGE, 2015).

Segundo projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na próxima década a lavoura de soja é a que mais deve expandir no Brasil. A área de soja deve aumentar 10,3 milhões de hectares, chegando em 2024 com 40,4 milhões de hectares, tendo tido acréscimo de 34,1% sobre a área de soja em 2013/14. Este crescimento se dará não só nas regiões já consolidadas de cultivo, como a região Centro-Oeste, mas também avançará rumo à floresta tropical amazônica na região norte do país (Schlesinger, 2008).

Dentre os municípios do Estado do Pará, Santarém destaca-se como o maior produtor de soja nas safras dos últimos anos, provavelmente estimulada pela instalação de um grande porto graneleiro da empresa Cargill às margens do Rio Tapajós (Oliveira, 2015). Diante desse cenário, e sabendo que a produção de soja guarda uma ligação direta com uso de agrotóxicos

em geral, e especificamente o uso do glifosato, é importante destacar a necessidade do monitoramento ambiental constante em regiões de cultivo agrícola que utilizam esse herbicida.

Alguns estudos indicam um potencial risco do glifosato à saúde de animais da fauna silvestre (Gasnier *et al.*, 2009; Shehata *et al.*, 2012; Séralini *et al.*, 2012), e recentemente o glifosato foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, em inglês) como provável cancerígeno para humanos (Fritschi *et al.*, 2015).

A despeito desse contexto mostrando a crescente importância desses compostos em termos de riscos ecotoxicológicos e à saúde humana, observa-se uma grande carência de métodos analíticos que permitam determinar resíduos desses compostos em matrizes ambientais, tais como água, biota aquática, sedimentos e solos (Amarante Júnior *et al.*, 2002). Assim, um dos desafios aceitos pelo presente trabalho foi o de desenvolver e validar um método analítico para determinação de glifosato, seu produto de degradação *Aminomethyl Phosphonic Acid*, (AMPA, em inglês) e glufosinato (outro herbicida utilizado no país), em amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por fluorescência (HPLC-FL, em inglês). Em seguida, o método foi aplicado a amostras de água provenientes da região de cultivo extensivo de soja na região de Santarém e Mojuí dos Campos, na região oeste do Estado do Pará.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Qualidade da água

O conceito de qualidade da água está associado a um conjunto de condições químicas, físicas e biológicas no que diz respeito à sua adequação e finalidade específica. As águas que refletem o meio por onde atravessam e são influenciadas por uma série de fatores, divididos em naturais (cobertura vegetal, hidrografia, tipo de solo, clima e topografia do terreno) e antropogênicos (despejo de resíduos domésticos, agrícolas e industriais, entre outros) (Brasil, 2006). Infelizmente, em diversos locais, as características naturais da água vêm sendo afetadas pela poluição, resultando em diversas consequências negativas à biodiversidade em geral e à qualidade de vida das pessoas. Uma das principais ameaças à qualidade da água em áreas agrícolas é a contaminação por agrotóxicos (Filizola *et al.*, 2005).

No cenário mundial o Brasil é privilegiado por ter a maior reserva de água doce do planeta, cerca de 13%. A distribuição em território nacional não é uniforme e a região Norte é a que detém a maior bacia fluvial do mundo. Apesar da riqueza dos rios da bacia hidrográfica do Amazonas e Tocantins, onde ocorrem aproximadamente 80% das descargas de água dos rios do Brasil, verificam-se problemas de contaminação das águas nas cidades de Manaus, Santarém e Belém (Waichman, 2008). Na área urbana desses municípios essa contaminação ocorre por falta de saneamento básico, e em áreas agrícolas os corpos hídricos são contaminados por agrotóxicos, além de sofrerem com assoreamento e destruição das Áreas de Preservação Permanente (APPs) e outros danos (Rebouças, 2003; Waichman, 2008; Aguiar, Peleja e Sousa, 2014).

A água contaminada por agrotóxicos em áreas rurais pode representar um risco às espécies aquáticas e a outras espécies que vivem próximas a fonte de contaminação, e também à saúde humana, já que pode afetar os sistemas de abastecimento das cidades, cujos processos de tratamento não são capazes de remover esses contaminantes (Mafioleti, 2015).

Um dos fatores de proteção dos corpos hídricos é a presença de mata ripária, que corresponde à vegetação localizada nas margens dos cursos d'água. Essa vegetação é importante para manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, pois exerce as funções de proteção, filtragem e amortecimento dos impactos ambientais (Merten e Minella, 2002). Tais funções estão relacionadas com a capacidade que a vegetação tem de conter processos erosivos, reter sedimentos e substâncias tóxicas provenientes de atividades agrícolas (Martins *et al.*, 2002; Merten e Minella, 2002; Parron e Coser, 2009).

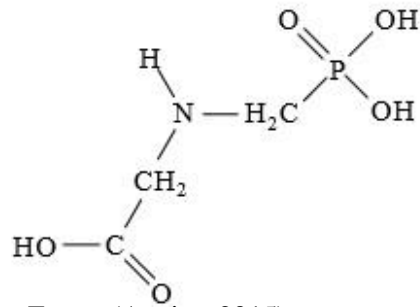
A mata ripária funciona como uma zona tampão, onde a matéria orgânica depositada é mineralizada por microrganismos e depois absorvida pelas plantas. Os microrganismos também podem mineralizar certos poluentes tóxicos ou convertê-los a substâncias menos nocivas (Primack e Rodrigues, 2001). Em solos com cobertura vegetal há maior infiltração da água das chuvas e menor compactação, que além dos benefícios ecossistêmicos mantidos na superfície do solo também promove uma melhor alimentação dos lençóis freáticos e manutenção das nascentes (Albuquerque *et al.*, 2002). A destruição da vegetação ripária causa redução do volume e da qualidade da água (Coelho, Buffon e Guerra, 2011). O antigo Código Florestal Brasileiro (lei nº 4.771/1965) já estabelecia o que a nova Lei Federal nº 12.651/2012 determina, ou seja, que para os corpos d'água de menos de 10 (dez) metros de largura a APP seja de no mínimo 30 metros (Brasil, 2012).

Diversos trechos dos corpos hídricos da área rural de Santarém, maior município da região oeste do Estado do Pará, como por exemplo as comunidades agrícolas de Açaizal e Guaraná, além de comunidades situadas na zona rural do município de Mojuí dos Campos (e.g., Boa Sorte, Riacho Verde, e Porto Alegre) em função da expansão da fronteira agrícola nas últimas décadas tem sofrido alterações na sua paisagem, antes ocupada por floresta ou agricultura familiar, provocando alterações ambientais com impacto nos recursos hídricos (Aguiar, Peleja e Sousa, 2014).

2.2 Glifosato: toxicologia e cinética ambiental

O glifosato é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas (Figura 1), sistêmico, não-seletivo, tendo sido utilizado amplamente na agricultura para controlar plantas daninhas perenes, de folhas largas, e gramíneas perenes antes do plantio ou após a colheita da maioria das culturas (Castro, 2005).

O composto também é amplamente utilizado como tratamento para remover plantas daninhas anuais emergentes antes do plantio. Na forma de aplicação foliar ou injeção no caule, é eficaz no controle de plantas lenhosas e trepadeiras, além de ser amplamente utilizado por pulverização direta no controle de plantas daninhas que crescem na base de árvores em pomares, plantações e áreas paisagísticas (Solomon *et al.*, 2010).

Figura 1. Estrutura química do glifosato (C₃H₈NO₅P).

Fonte: (Anvisa, 2015).

O glifosato é utilizado principalmente na agricultura, mas também para o controle de plantas daninhas aquáticas em tanques de criação de peixes e em lagos, em reflorestamento e jardinagens (Galli e Montezuma, 2005). É caracterizado por ser um herbicida não-seletivo, com amplo espectro de ação (Castro, 2005), e de acordo com dados disponíveis na Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ), o glifosato e especificamente o *roundup* produzido pela empresa Monsanto apresenta as principais características físico-químicas e biológicas apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos e biológicos do glifosato.

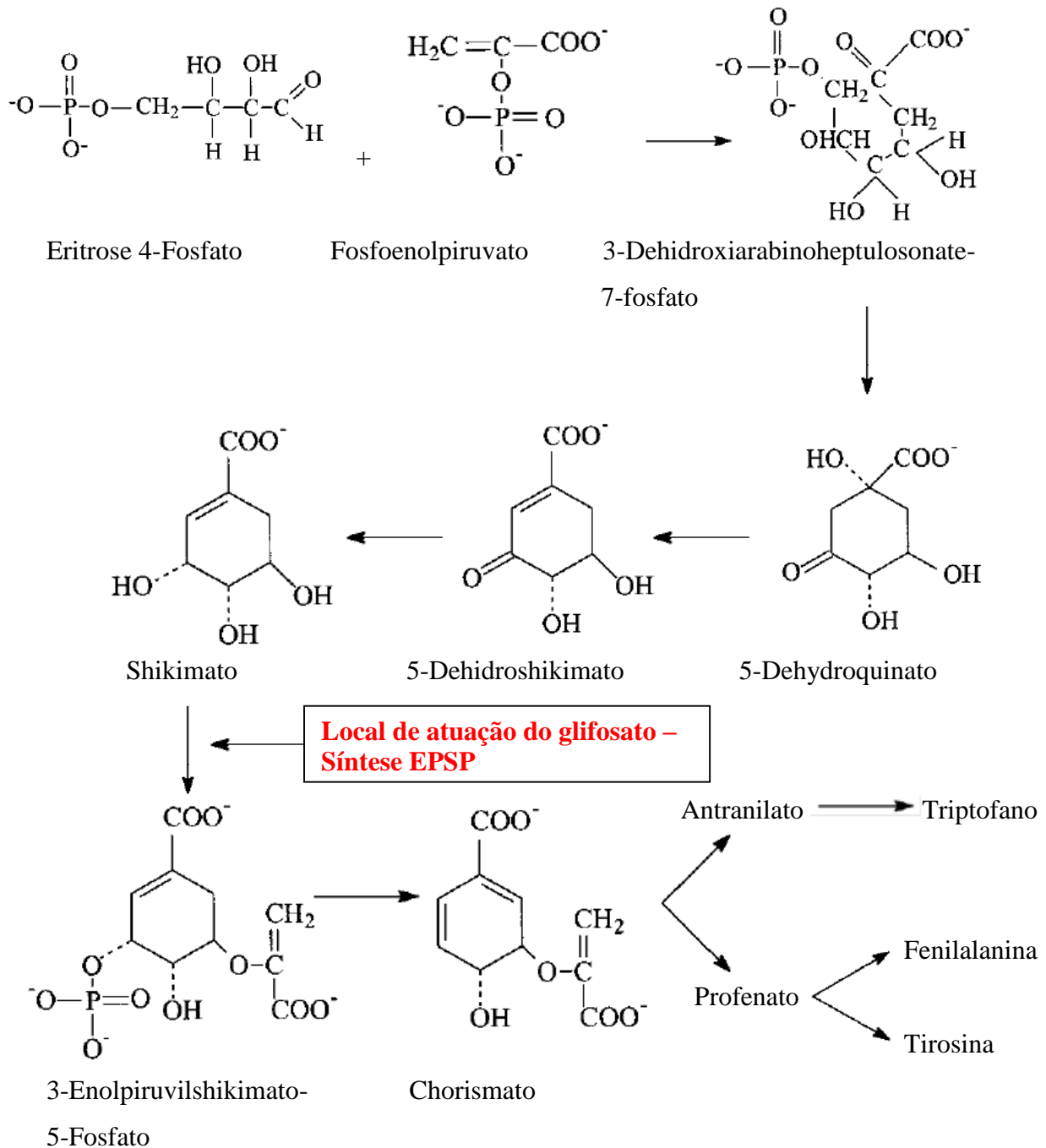
Parâmetros	Valores
Densidade	1163,9 kg/m ³
Solubilidade em água (mg/L)	11600 mg/L
Coefficiente de partição octanol/água Log Kow	0,17x10 ⁻²
Meia-vida	35 dias (água)
	96 dias (solo aeróbio)
	22 dias (solo anaeróbio)
DL ₅₀ oral para ratos	5400 mg/kg
DL ₅₀ dérmica em coelhos	5000 mg/kg
CE(I)50 para algas <i>Selenastrum capricornutum</i>	4910 mg/L/96 h
CL ₅₀ para microcrustáceos <i>Artêmia salina</i>	250 mg/L/48h
CL ₅₀ para peixes da espécie <i>Coho salmon</i>	22 mg/L/96h

Fonte: Adaptado de Monsanto (2008); Fernandes Neto (2010).

O glifosato é absorvido pelas folhas das plantas, não pelas raízes, e apresenta um mecanismo de ação baseado na inibição da enzima enolpiruvil-shikimato-fosfato (EPSP, em inglês), enzima da via biossintética dos aminoácidos aromáticos (ou via metabólica do ácido shiquímico) que sintetiza os aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina, essenciais para as

plantas (Giesy, Dobson e Solomon, 2000). A Figura 2 abaixo apresenta a via metabólica para síntese dos aminoácidos acima citados.

Figura 2. Via metabólica para síntese de aminoácidos, e mecanismo de ação do glifosato.



Fonte: Adaptado de Williams, Kroes e Munro (2000).

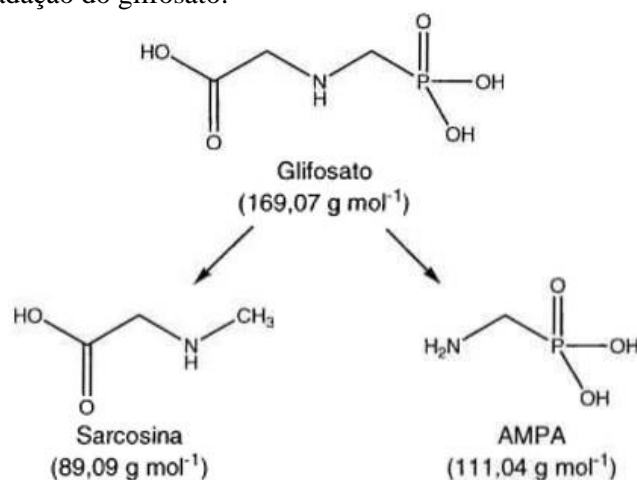
Na literatura científica estudos mostram que herbicidas a base de glifosato são tóxicos a células humanas e causam alterações nas funções fisiológicas do organismo, agindo como

perturbadores endócrinos (Gasnier *et al.*, 2009). Casos de intoxicação aguda com glifosato têm sido relatados (Faria, Rosa e Facchini, 2009), sendo que estudos reportam que adições contínuas de glifosato podem alterar a estrutura e a função de muitos ambientes aquáticos naturais (Pérez *et al.*, 2007), além de afetar seriamente a comunidade microbiana do solo e os fungos (Kremer e Means, 2009), tudo isso sendo agravado pela sua persistência no meio ambiente conforme indicado por (Castro, 2005). A persistência da molécula de glifosato varia bastante em função da capacidade de adsorção e da atividade microbiana do solo (Solomon *et al.*, 2010), com taxas de degradação maiores em solos florestais (Giesy, Dobson e Solomon, 2000).

O glifosato possui duas principais rotas de degradação microbiológica (Figura 3). A primeira consiste na clivagem oxidativa da ligação carbono nitrogênio e produzindo o AMPA, o qual pode ser degradado a fosfato inorgânico. A segunda rota consiste na clivagem da ligação fósforo-carbono por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase) produzindo a sarcosina (Martins-Júnior e A., 2005). Em alguns estudos foram observadas outras vias metabólicas de degradação posterior do AMPA em fosfato inorgânico e metilamina ($\text{CH}_3\text{-NH}_3$); e a via sarcosina em glicina (Liu *et al.*, 1991).

O glifosato se liga ao sedimento em ambientes aquáticos (Moraes e Rossi, 2010), e é degradado a AMPA pela microbiota da água (Giesy, Dobson e Solomon, 2000), e eventualmente em dióxido de carbono (Toni, Santana e Zaia, 2006).

Figura 3. Esquema de degradação do glifosato.



Fonte: Adaptado de Martins-Junior (2005).

A degradação do glifosato é mais rápida do que a do AMPA. A meia-vida do AMPA varia 76 a 240 dias (Giesy, Dobson e Solomon, 2000), enquanto a do glifosato é de 35 a 96 dias

(Monsanto, 2008). A persistência de glifosato em água é mais curta que sua persistência em solo. O processo de degradação independente da matriz ambiental varia de acordo com, as características físicas, químicas e biológicas; número de aplicações, influência de forma direta ou indireta de microrganismos presentes no solo e na água (Moraes e Rossi, 2010).

Os organoclorados, por serem considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), ou seja, compostos que apresentam alta estabilidade e que persistem no ambiente por um longo período de tempo foram substituídos pelos herbicidas organofosforado, como glifosato em função da degradação dessa molécula ser mais rápida. Embora os herbicidas organofosforados apresentem menores riscos ao meio ambiente em relação aos organoclorados, os mesmos apresentam maior toxicidade aos seres humanos, especialmente as pessoas que os manipulam, e para algumas espécies de mamíferos (Silva, 2012).

O glifosato possui alta solubilidade em água, e isso faz com que sua mobilidade no meio ambiente seja aumentada. Um estudo em condições de campo realizado por (Relyea, 2005) para verificar o efeito da aplicação direta de glifosato sobre anfíbios aquáticos e terrestres, observou que após três semanas da aplicação do glifosato houve morte de 96-100% das larvas dos anfíbios. Quando se realizou a aplicação em período pós metamorfose (juvenil), foi verificada a morte de 68-86% dos anfíbios juvenis um dia após tratamento, e o autor conclui que o produto proporciona elevadas taxas de mortalidade em anfíbios.

Em estudos realizados por (Shehata *et al.*, 2012), o glifosato causou impactos negativos em bactérias gastrointestinais de aves, e os resultados demonstraram que as bactérias patogênicas como *Salmonella enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. tyhimurium*, *Clostridium perfringens* e *C. botulinum* são resistentes ao herbicida, enquanto que bactérias benéficas como *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Lactobacillus ssp* são altamente suscetíveis ao glifosato.

Formulações de glifosato normalmente contêm agentes surfactantes, como etilaminas, cuja função é aumentar a dispersão do produto na planta (Amarante Júnior *et al.*, 2002). O surfactante polietoxietileno amina (POEA), presente no herbicida Roundup® é mais tóxico do que o próprio glifosato e seu subproduto de degradação AMPA (Williams, Kroes e Munro, 2000).

Devido à toxicidade do produto a base de glifosato não estar relacionada única e especificamente com a molécula química desse composto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a toxicidade das formulações comerciais (Mesquita, Rodrigues e Mendonça Júnior, 2011). Quando concentrações de glifosato são encontradas no meio ambiente (alimento, água, solo e outros) os resíduos são da formulação total do herbicida, entretanto na literatura

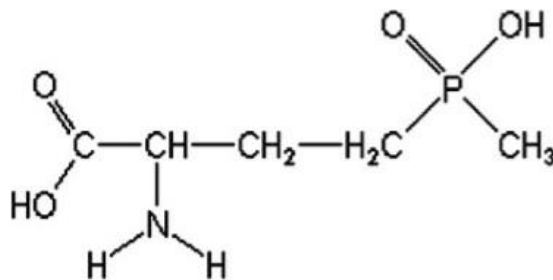
geralmente a toxicidade do herbicida é testada com o ingrediente ativo puro (Dallegrave *et al.*, 2007).

2.3 Glufosinato: toxicologia e cinética ambiental

Originalmente uma empresa farmacêutica japonesa, chamada Meiki Seika Kaisa, descobriu que a bactéria do solo *Streptomyces viridochromogenes* produzia bialafos, um antibiótico que também possui atividade herbicida. A empresa começou a produzir o composto por fermentação e desenvolveram-se os bialafos como um herbicida comercial denominado Herbiace. Bialafos por si só não são herbicidas, eles são metabolizados pelas plantas e dão origem à fosfinotricina. Em 1980, os químicos da Hoechst AG na Alemanha, atualmente *Bayer Crop Science*, descobriram o processo para sintetizar a porção da molécula fosfinotricina, denominada glufosinato de amônio (Solomon *et al.*, 2010).

A L-fosfinotricina, glufosinato de amônio, ou simplesmente glufosinato (Figura 4) é um herbicida não seletivo do grupo químico homoalanina substituída (Silva, 2012). Geralmente é utilizado pós-emergência, sofre rápida degradação microbiana e não tem atividade no solo; possui mecanismo de ação amplo e tóxico para maioria das plantas (Marchi, Marchi e Guimarães, 2008).

Figura 4. Estrutura química do glufosinato (C₅H₁₂NO₄P)

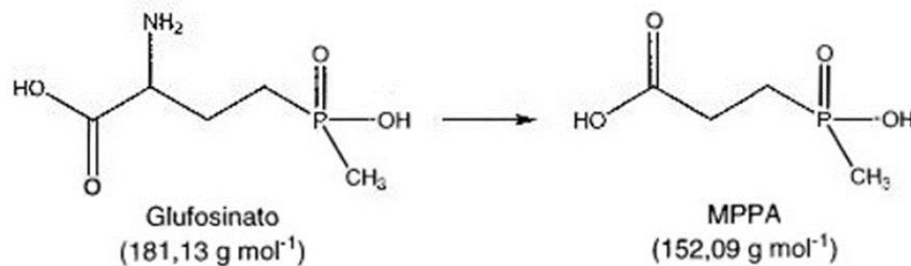


Fonte: (Anvisa, 2015)

O seu mecanismo de ação se dá por atuação direta no metabolismo do nitrogênio, especificamente ocorrendo a inibição da enzima glutamina sintetase que resulta no aumento da concentração de amônio nos tecidos da planta, e conseqüentemente a ruptura da estrutura dos cloroplastos, que interfere na fotossíntese e ocorre morte celular (Petersen e Hurle, 2001). Após aplicação de glufosinato, os níveis de amônio nas plantas aumentam drasticamente, dentro de poucas horas após o tratamento podendo chegar a dez ou mais vezes maior que em plantas não tratadas (Hess, 2000).

O glufosinato apresenta baixa toxicidade em sistemas biológicos de mamíferos. Em ratos, a DL_{50} por via oral é de 1,910 mg/kg, a DL_{50} por via dérmica é de 1,380 mg/kg, e a CL_{50} inalatória é de 3,73 mg/L/4h. Com relação à ecotoxicidade, para algas da espécie *Desmodesmus subspicatus* a CE_{50} (72 h) é de 36mg/L; para microcrustáceos da espécie *Daphnia magna* a CE_{50} (48h) é de 26,8 mg/L, e para o peixe *Oncorhynchus mykiss* a CL_{50} (96h) é de 34mg/L (Bayer, 2011). A degradação microbiológica do glufosinato produz o ácido metilfosfínico propiônico (MPPA, em inglês) como mostrado na Figura 5.

Figura 5. Degradação do glufosinato



Fonte: (Martins-Junior, 2005).

O glufosinato é similar ao glifosato na sua estrutura química e no seu uso, e justamente por esse motivo foi adicionado no processo de desenvolvimento do método analítico, apesar de não haver registro oficial de uso desse herbicida na área de estudo da região dos municípios de Santarém e Mojuí dos Campos (PA). Como o objetivo central é analisar glifosato em amostras de água, o glufosinato não será abordado extensivamente.

2.4 Legislação brasileira sobre agrotóxicos

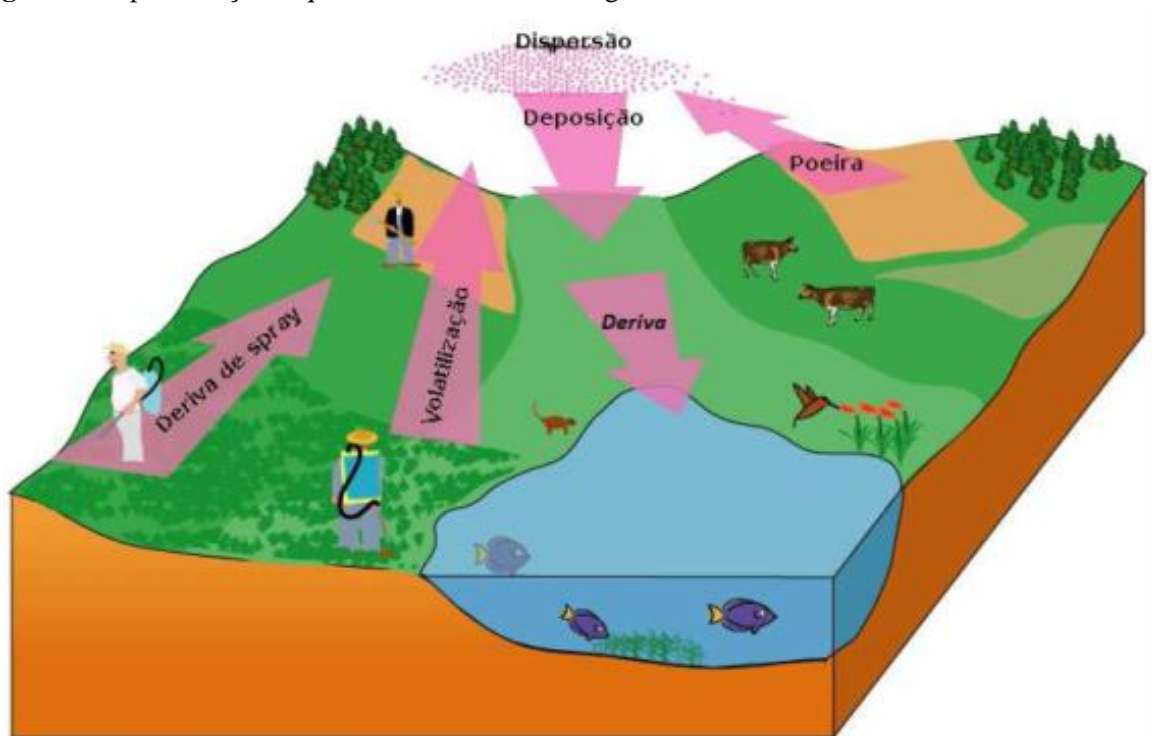
Agrotóxicos, pesticidas, praguicidas, defensivos agrícolas, biocidas, agroquímicos, e/ou remédios de planta são denominações utilizadas para definir um grupo de substâncias químicas que são capazes de controlar pragas que comprometem a produção agrícola no campo (Peres e Moreira, 2003). A denominação utilizada pela legislação brasileira é “agrotóxicos”, definidos pela Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, como sendo:

“Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados aos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas e também em ambientes

urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como aqueles empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento” (Brasil, 1998).

Os agrotóxicos são sintetizados para causar danos a organismos vivos e são deliberadamente lançados no meio ambiente, onde vários organismos não alvo podem ser expostos a estas substâncias (Rebelo e Caldas, 2014). A Figura 6 abaixo ilustra alguns dos possíveis processos (dispersão, deposição, poeira, deriva, volatilização e deriva de *spray*) envolvidos no ciclo dos agrotóxicos no ambiente desde a sua aplicação no campo.

Figura 6. Representação esquemática do destino de agrotóxicos no ambiente



Fonte: Rebelo (2013).

Os seres humanos podem estar expostos a agrotóxicos quando envolvidos na atividade de trabalho, durante a fabricação desses produtos, transporte e comércio, e principalmente na atividade agrícola. A baixa escolaridade dos trabalhadores rurais que muitas vezes não sabem ler e/ou escrever, possuem alfabetização de adultos ou ensino fundamental incompleto, potencializa o risco de intoxicação pois os trabalhadores não conseguem ler as instruções das embalagens dos produtos agrícolas, e muitas vezes não utilizam as dosagens de forma correta (Pasiani *et al.*, 2012). O desconhecimento sobre os danos reais dos agrotóxicos e a falta de

utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), além da precariedade nos mecanismos de vigilância são todos fatores que agravam ainda mais a situação (Inouye *et al.*, 2015).

Segundo dados do Sistema Brasileiro de Informação de Agravos de Notificação (Sinav), entre 2007 e 2011 houve um crescimento de 67,4% de novos casos de acidentes de trabalho não fatais devido aos agrotóxicos. Nesse mesmo período, as intoxicações aumentaram 126,8%, sendo que entre as mulheres o crescimento foi ainda maior, 178% (Santana, 2012). Com relação a esses dados é preciso observar também que a Portaria Ministerial n° 104, de janeiro de 2011 estabelece que intoxicações por substâncias químicas são consideradas agravo de notificação compulsória, e logo se espera que essa medida tenha um impacto importante no número de registros nos sistemas (Brasil, 2011).

A população em geral está exposta a agrotóxicos principalmente pelo consumo de alimentos diretamente tratados com estes produtos (Jardim e Caldas, 2012), ou pelo consumo de produtos de origem animal, como leite, carne e ovos, quando os animais produtores se alimentam de pastagem tratadas com agrotóxicos (Romano, Romano e Oliveira, 2009). Adicionalmente, análises de amostras de água da chuva de zonas rurais e urbanas mostraram a presença de diferentes resíduos de agrotóxicos, indicando que moradores dessas regiões podem estar expostos a agrotóxicos pela rota ambiental, especificamente pelo ciclo da água (Belo *et al.*, 2012).

Um dos fatores que contribuem para contaminação ambiental por agrotóxicos é o uso além do necessário. O monitoramento da presença de resíduos de compostos agrotóxicos no ambiente é algo complexo e diversas variáveis estão envolvidas, como vento, chuva, e modo de aplicação do produto (Rebello e Caldas, 2014). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA, em inglês), a Comissão Europeia sobre Meio Ambiente, a Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA, em inglês), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a IARC são referências quando se trata de regulamentação e classificação de substâncias químicas. No Brasil, o registro de agrotóxicos para uso agrícola envolve os seguintes órgãos: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, Ministério da Saúde), responsável pela avaliação toxicológica, estabelecimento de Limite Máximo de Resíduos nos alimentos, e avaliação de risco à saúde humana; o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (Ibama, Ministério do Meio Ambiente), responsável pela avaliação de periculosidade ambiental; o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pela avaliação agrônômica e registro final.

A classificação dos agrotóxicos segundo seu potencial de periculosidade ambiental considera os parâmetros de persistência, bioacumulação, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico. Esta classificação está mostrada no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação Toxicológica para Agrotóxicos de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Ibama.

Classe de perigo	Descrição da classificação
I	Produto altamente perigoso
II	Produto muito perigoso
III	Produto perigoso
IV	Produto pouco perigoso

Fonte: Adaptado de Ibama (1996).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos, conforme estabelecida pela Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992 da Anvisa, tem como alvo o trabalhador rural e está mostrada no Quadro 2 (Anvisa, 1992). Neste sistema, cada produto tem uma faixa que indica a classificação, um meio direto de comunicação com o trabalhador.

Quadro 2. Classificação toxicológica para agrotóxicos de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Anvisa.

Classe Toxicológica	Cor da Faixa	Grau de toxicidade
I	 Vermelha	Extremamente tóxico
II	 Amarela	Altamente tóxico
III	 Azul	Mediamente tóxico
IV	 Verde	Pouco tóxico

Fonte: Adaptado de Anvisa (1992).

O Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do MAPA disponibiliza informações sobre os produtos agrotóxicos formulados e registrados no Brasil. Em maio de

2015 foram encontrados 89 produtos agrotóxicos registrados, cujo princípio ativo é o glifosato e/ou seus sais, e 3 agrotóxicos cujo princípio ativo é o sal de glufosinato, sendo todos esses produzidos por diferentes empresas, com diferentes formulações.

A lista de agrotóxicos registrados no MAPA cujo ingrediente ativo é glifosato ou glufosinato, bem como suas respectivas classificações de acordo com a Anvisa e o Ibama são apresentadas na Quadro 3 abaixo.

Quadro 3. Lista de agrotóxicos registrados no MAPA cujo ingrediente ativo é glifosato ou glufosinato, e suas respectivas classificações toxicológica (Anvisa) e ambiental (Ibama), atualizada em 02/05/2015.

Produto formulado	Ingrediente ativo	Toxicológica	Ambiental
<i>Glifosato e seus sais</i>			
Aliado 480 SL	Glifosato	III	III
Alteza	Glifosato e imazetapir	III	III
Alteza 30	Glifosato e Imazetapir	III	II
Alteza 30 SL	Glifosato e Imazetapir	III	II
Credit	Glifosato	III	III
Crucial	Glifosato-sal de isopropilamina e glifosato-sal de potássio	I	III
Direct	Glifosato-sal de amônio	III	III
Fera	Glifosato	III	III
Fera ultra	Carfentrazona-etílica e glifosato	I	I
Fusta WG	Glifosato-sal de amônio	III	III
Gillanex	Atrazina e glifosato	IV	III
Gil ouro	Glifosato	III	III
Gil over	Glifosato	III	III
Gliato	Glifosato	II	III
Gliforte	Glifosato	I	I
Glifos	Glifosato	II	III
Glifos plus	Glifosato	III	III
Glifosato agripec 720 WG	Glifosato-sal de amônio	II	III
Glifosato Atanor	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Glifosato Atanor 48	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Glifosato Atar	Glifosato	III	III
Glifosato Atar 48	Glifosato	III	III
Glifosato CCAB 480 SL	Glifosato	II	III
Glifosato Fersol	Glifosato	III	III
Glifosato Nortox	Glifosato	III	III
Glifosato Nortox WG	Glifosato e glifosato-sal de amônio	IV	III
Glifosato Nortox 480 BR	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Glifosato Nortox 480 SL	Glifosato	III	III
Glifosato nuf	Glifosato	II	III

Produto formulado	Ingrediente ativo	Toxicológica	Ambiental
Glifosato nufarm	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Glifosato nutritop	Glifosato e glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Glifosato TK	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Glifosato Zamba	Glifosato	III	III
Glifosato 408 SL Sinon	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Glifosato 480 Agripec	Glifosato	I	III
Glifosato 480 Helm	Glifosato	IV	III
Glifosato 720 WG Rainbow	Glifosato	I	I
Glifoxin	Glifosato	III	III
Glyphogan 480	Glifosato	III	III
Glister	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
GLI-UP 480 SL	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Gliz Plus	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Gliz 480 SL	Glifosato	III	III
Glizmax	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Glizmaz Prime	Glifosato	III	III
Glydur	Diuron e glifosato	III	II
Glyox	Glifosato	IV	III
Glyphotal	Glifosato	II	III
Glyphotal TR	Glifosato	II	III
Glyweed	Glifosato	I	III
Grassato	Glifosato	II	III
Grassato SL	Glifosato	II	III
Grassato 480 SL	Glifosato	II	III
Knock out	Glifosato	III	III
Mademato	Glifosato	I	III
Oneshot	Glifosato e imazaquim	I	III
Pilarsato	Glifosato	I	III
Pocco 480 SL	Glifosato	III	III
Polaris	Glifosato	IV	III
Preciso	Glifosato	III	III
Pretorian	Glifosato	III	III
Radar	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Radar WG	Glifosato	III	III
Rodeo	Glifosato	IV	III
Ronat-A	Glifosato	III	III
Roundup Original	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Roundup Original DI	Glifosato-sal de di-amônio	II	III
Roundup Ready	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Roundup Ready Milho	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Roundup Transorb	Glifosato-sal de isopropilamina	II	III
Roundup Transorb R	Glifosato-sal de potássio	II	III
Roundup Ultra	Glifosato-sal de amônio	II	III
Roundup WG	Glifosato de amônio	III	III
Rustler	Glifosato	III	III

Produto formulado	Ingrediente ativo	Toxicológica	Ambiental
Rustler WG	Glifosato-sal de amônio	III	III
Scout	Glifosato-sal de amônio	III	III
Sequence	Glifosato e s-metolacoloro	I	II
Shadow 480 SL	Glifosato	III	III
Stinger	Glifosato	IV	III
Stinger WR	Glifosato-sal de amônio	III	III
Sucession	Glifosato e metalocloro	I	II
Sumô	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Touchdown	Glifosato-sal potássio	III	III
Tradicional	Glifosato-sal isopropilamina	III	III
Trop	Glifosato-sal de isopropilamina	III	III
Tropazin	Glifosato e simazina	I	II
Tropuron	Diurom e glifosato	III	II
Wipe Out	Glifosato	III	III
Zapp QI 620	Glifosato-sal de potássio	III	III
Ingrediente ativo: sal de glufosinato			
Finale	Glufosinato-sal de amônio	I	II
Liberty	Glufosinato-sal de amônio	I	III
Liberty BCS	Glufosinato-sal de amônio	I	II

Fonte: Agrofit (2015).

De acordo com os dados apresentados acima, observa-se que na classificação toxicológica 53,93% dos agrotóxicos cujos princípios ativos são o glifosato e seus sais são classificados como classe III, 24,72% na classe II, 13,49% na classe I e 7,86% na classe IV. Para classificação ambiental 89,89% são classificados como classe III, 6,74% na classe II, 3,37% na classe I, e nenhum é classificado com classe IV. Com relação ao glufosinato, os três produtos registrados são classificados como classe I, para classificação toxicológica, enquanto para classificação ambiental dois produtos são registrados como classe II, e um dos produtos como classe III.

No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914 de dezembro de 2011, regulamenta parâmetros para potabilidade da água. De acordo com essa portaria, 27 agrotóxicos devem ser monitorados no mínimo semestralmente na água para consumo humano, onde o Valor Máximo Permitido (VMP) para glifosato é de 500 µg/L, isoladamente ou em combinação com seu principal subproduto de degradação, o AMPA. O monitoramento é de responsabilidade de quem oferece o abastecimento coletivo ou de quem presta serviços alternativos de distribuição da água. O processo de vigilância cabe às autoridades de saúde de diferentes instâncias do governo (Brasil, 2011; Barbosa, 2013). Os padrões de potabilidade de água para substâncias químicas nessa portaria são estabelecidos com base na metodologia de Avaliação Quantitativa do Risco Químico (AQRQ), a qual é realizada com base em evidências toxicológicas e seguindo as

seguintes etapas: (i) identificação do perigo; (ii) avaliação da exposição; (iii) avaliação da dose-resposta, e (iv) caracterização do risco (WHO, 2011).

A dose de referência (DRf), Ingestão Diária Tolerável (IDT) ou Ingestão Diária Aceitável (IDA) são diferentes denominações de uma estimativa da quantidade de uma substância presente no alimento ou na água potável, expressa em relação ao peso corpóreo, que pode ser ingerida ao longo da vida, sem risco apreciável à saúde e com uma margem de segurança (Umbuzeiro *et al.*, 2012). O seu cálculo é realizado conforme fórmula abaixo:

$$IDA = \frac{NOAEL}{FI}$$

Sendo:

IDA: Ingestão Diária Aceitável

NOAEL: Nível de Efeito Adverso não Observado

FI: Fator de Incerteza

O NOAEL (*non-observed-adverse-effect-level*, em inglês) representa a maior dose na qual nenhum efeito adverso foi observado, e é determinado em estudos toxicológicos com modelos animais, principalmente roedores. O fator de incerteza é uma medida de segurança na extrapolação dos dados de experimentos com animais para a população humana, inclusive a mais sensível, como crianças e idosos (WHO, 2011).

O critério de potabilidade ou VMP é calculado a partir da IDA, considerando peso corporal médio; o fator da fração da IDA e o consumo médio diário por meio da equação:

$$VMP = \frac{IDA \times pc \times Fa}{C}$$

Sendo:

pc = peso corporal

Fa = fração de IDA proveniente da água potável

C = consumo diário de água

A OMS sugere considerar 20% a fração de IDA proveniente de água potável quando não se tem informações exatas sobre esse valor. Considerando a variação no consumo diário de água e do peso corpóreo são atribuídos os valores de 2 litros de água por dia e 60 kg para peso corpóreo. Porém, a OMS não oferece um valor referência, e justifica que as concentrações de glifosato na água estão muito abaixo daquelas em que os efeitos tóxicos podem ocorrer (WHO, 2011).

Fazendo uma comparação entre o limite máximo de glifosato na água potável no Brasil (500 µg/L) e as diretrizes de outros países, é possível observar uma grande variabilidade nesses

valores. Por exemplo, no Uruguai de acordo com o *Instituto Nacional de Normatización* (INN), o limite é de 900 µg/L (Inn, 2006); nos EUA, o valor estabelecido pela USEPA é de 700 µg/L (Epa, 2009); no Canadá, o limite para a *Health Canada Pest Management Regulatory Agency (PMRA)* é de 280 µg/L (Health, 2008); e na Austrália de acordo com a agência APVMA, a concentração é de 10 µg/L (Nhmrc, 2004). Na Europa, para qualquer agrotóxico, a concentração máxima permitida individualmente é de 0,1 µg/L e o total de agrotóxicos na água para consumo humano não deve ultrapassar 0,5 µg/L, de acordo com a *European Glyphosate Enviromental Information Source* (Egeis, 2010). Em alguns países como Argentina, Chile e Venezuela, valores máximos de glifosato em água potável não são estabelecidos.

Além da portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde do Brasil, há outras duas Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama) nº 357 (água superficial) e nº 396 (água subterrânea) que preveem limites máximos para parâmetros físicos e químicos e teores microbiológicos na água para diferentes usos.

De acordo com a Resolução Conama nº 357, estabelecida em 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, a concentração de glifosato em água doce para Classe 1 e 2, é de 65 µg/L, enquanto para Classe 3 a concentração é de 280µg/L, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Classificação de águas doces segundo a Resolução Conama nº 357, de acordo com seu uso preponderante e a concentração máxima de glifosato.

Classes de água doce	Usos preponderantes	Concentração máxima de glifosato
Classe 1	Para abastecimento e consumo humano após tratamento simplificado; proteção das comunidades aquáticas; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e a proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.	65 µg/L
Classe 2	Para abastecimento e consumo humano após tratamento convencional; proteção das comunidades aquáticas; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer com os quais o público possa vir a ter contato direto e aquícultura e à atividade de pesca.	65 µg/L

Classes de água doce	Usos preponderantes	Concentração máxima de glifosato
Classe 3	Para o abastecimento e consumo humano após tratamento convencional ou avançado; irrigação de arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário; dessedentação de animais.	280µg/L

Fonte: Conama (2005)

A Resolução Conama nº 396, estabelecida em 2008, que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas, estabelece VMP para glifosato e/ou AMPA de acordo com uso preponderantes, conforme Tabela 3. Na portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde, e nas resoluções nº 357 e 396 do Conama não são estabelecidos valores para o herbicida glufosinato.

Tabela 3. VMP de glifosato e AMPA de acordo com a Resolução Conama nº 396.

Parâmetro Glifosato + AMPA	Usos preponderantes da água			
	Consumo humano	Consumo animal	Irrigação	Recreação
VMP (µg.L ⁻¹)	500	280	0,13 (*); 0,06 (**); 0,04 (***)	200

*Taxa de irrigação ≤ 3500 m³/ha; **3500 < taxa de irrigação ≤ 7000 m³/há; ***7000 < taxa de irrigação ≤ 12000 m³/ha

Fonte: Conama (2005).

2.5 Plantas transgênicas e uso dos agrotóxicos glifosato e glufosinato

As descobertas científicas e tecnológicas inovam o sistema de produção agrícola. O Brasil é hoje o maior produtor de soja do mundo, com produção anual de 68 milhões de toneladas. Os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás somam juntos 81,55% do total da produção nacional (BELO et al. 2012). Utilizando-se do tripé: soja geneticamente modificada; plantio direto e o uso do herbicida glifosato, mantém-se elevados os índices de produção. No entanto é preciso pensar nos impactos ambientais e sociais que esse modelo agrícola pode causar (Guanziroli, 2006).

O comércio mundial de agrotóxicos cresce a cada ano. Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, há entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, onde o uso de herbicidas é destacado (Langiano,

2006). A produção de plantas ou organismos geneticamente modificados (OGMs), ou transgênicos, em escala comercial, iniciou com a produção do tomate transgênico em 1994 nos Estados Unidos (Peláez e Schmidt, 2000). Com o advento dessa biotecnologia, muitos tipos de plantas transgênicas têm sido desenvolvidos, incluindo plantas resistentes a herbicidas, insetos e vírus causadores de doenças; plantas com frutos ou sementes com qualidades nutricionais melhoradas ou de melhor conservação pós-colheita, e plantas com o crescimento modificado e melhor adaptação ao estresse ambiental (Monquero, 2005).

Durante a década de 1990, pesquisadores da empresa Monsanto transferiram dois genes que codificam as enzimas EPSPS de bactérias, para culturas que expressam superprodução da enzima na planta ou produção de enzima insensível ao glifosato. Outro gene bacteriano foi utilizado para tornar a planta capaz de desintoxicar metabolicamente o glifosato, de modo que a planta geneticamente modificada seria tolerante ao herbicida (Solomon *et al.*, 2010). A partir desses desenvolvimentos, o glifosato tornou-se um dos herbicidas seletivos líderes para o controle pós-emergente de plantas daninhas nas principais culturas resistentes a herbicidas, como milho, soja e algodão. Além do glifosato, plantas resistentes ao herbicida glufosinato vêm sendo desenvolvidas.

Apesar dos benefícios econômicos do cultivo de OGMs resistentes a herbicidas ainda não serem totalmente conhecidos ou estabelecidos, o Governo Federal liberou em 2003 a produção em escala comercial de soja transgênica da companhia Monsanto, resistente ao glifosato. Após aprovação da Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005), a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBio) ampliou as possibilidades de liberação para cultivos e produção comercial de OGMs (Sauer, 2010).

Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas podem oferecer diversos riscos, dentre os quais podem ser destacados: (a) riscos à segurança alimentar no uso das plantas transgênicas para seres humanos e outros animais; (b) riscos de interferência das plantas transgênicas ao trocar genes com as variedades nativas; (c) riscos em termos de impacto ambiental do uso de plantas transgênicas resistentes a herbicidas, podendo implicar no uso indiscriminado desses herbicidas, contaminando o solo, os rios e os lençóis freáticos, além do monopólio por parte das empresas que comercializam as sementes transgênicas e os herbicidas; (d) riscos das plantas resistentes a herbicidas poderem tornar-se daninhas de difícil controle; (e) plantas resistentes a pragas e insetos, que podem modificar a população natural dos insetos (Monquero, 2005).

2.6 Expansão da fronteira agrícola do bioma Cerrado para o bioma Amazônia

A instalação do terminal graneleiro da Cargill no porto de Santarém se apresentou como um dos principais atores da dinamização da expansão do agronegócio da soja no município de Santarém (Carvalho e Tura, 2006). A facilidade de escoamento via transporte fluvial através dos rios que cortam a bacia amazônica para o oceano Atlântico e daí para mercados consumidores na América do Norte, Europa e Ásia, e a abundância de terras agriculturáveis, são elementos que chamam a atenção das grandes empresas nacionais e internacionais, que visam o mercado interno, mas principalmente o agronegócio exportador (Flexor, Viégas e Lima, 2006).

A Cargill, maior empresa norte-americana do setor agrícola, fundada em 1865, no Iowa/EUA, atua na comercialização, processamento e distribuição de produtos agrícolas e alimentícios e está presente em 67 países com 153.00 funcionários. No Brasil, atua em 17 Estados, em 200 municípios, 5 portos e 22 fábricas. Em Santarém, o porto que atualmente tem a capacidade de elevação de 2 milhões de toneladas de grãos, está em fase de ampliação e passará para 5 milhões de toneladas de grãos até 2016 (Feres *et al.*, 2015).

A soja, originária da China, surgiu como planta domesticada por volta do século X a.c., e com o passar dos séculos foi disseminando-se para outros países de clima e latitude semelhantes. No Brasil o primeiro registro de cultivo de soja data de 1882, e o cultivo comercial com expressão econômica iniciou em 1940, no Rio Grande do Sul. Por volta do início dos anos de 1980, e incentivado pelo governo militar, o cultivo desse grão começou a se expandir para a região tropical do Brasil com objetivo de atender a demanda interna, externa, e suprir a escassez de áreas agrícolas no sul do país (Souza *et al.*, 2007).

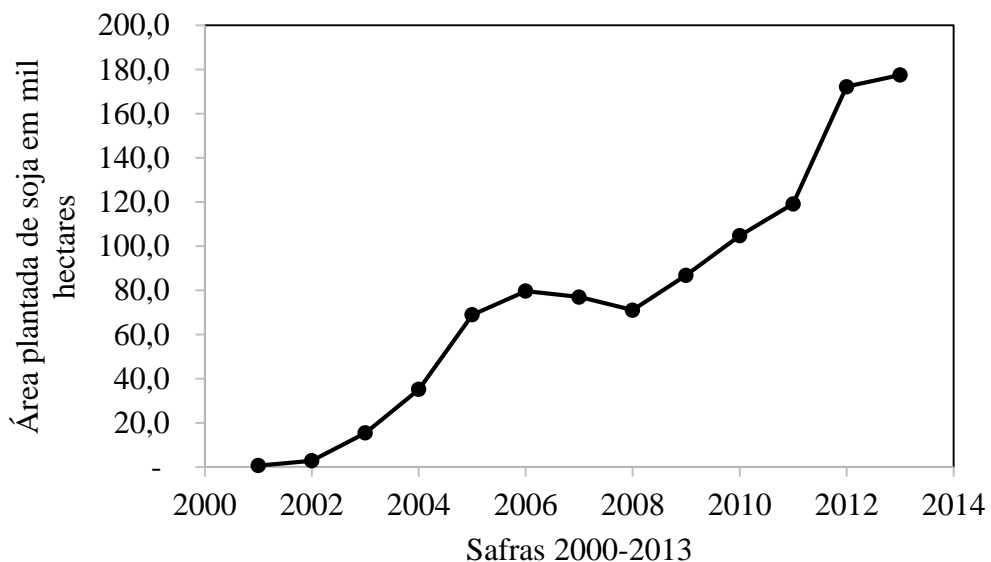
A soja brasileira faz sucesso no exterior principalmente por produzir óleo de alta qualidade e de cor amarelo-ouro, aspecto valorizado pelos compradores. Estas características são influenciadas principalmente pela insolação o ano todo e clima favorável, tornando o Brasil o segundo maior exportador mundial de soja, perdendo apenas para os Estados Unidos (Sobrinho, 2006).

Mais recentemente, a expansão da fronteira agrícola brasileira da região Centro-Oeste (Cerrado) para a região de floresta tropical amazônica (região norte), tem estimulado o cultivo de grandes áreas de soja na região oeste do Estado do Pará (como nos municípios de Santarém e Mojuí dos Campos), e conseqüentemente o uso intenso de agrotóxicos. Esse fato tem o potencial de gerar processos de contaminação ambiental de corpos hídricos e organismos aquáticos, e também riscos de exposição humana por vias alimentar, dérmica e/ou respiratória,

implicando assim em importantes riscos à saúde tanto de famílias de pequenos agricultores nativos que vivem nas adjacências de grandes fazendas produtoras, como também à saúde de trabalhadores das grandes propriedades produtoras desse grão na região.

Atualmente, a economia de Santarém está assentada nos setores de comércio e serviços, ecoturismo, nas indústrias e principalmente no setor agropecuário. Nos últimos anos o setor agropecuário vem representando a maior parte da participação do PIB, e cresce juntamente com investimentos na agricultura mecanizada, e principalmente em grãos como soja que abastecem o mercado externo. Por exemplo, nas safras de 2009/2010 e 2010/2011 o Estado do Pará apresentou o segundo maior crescimento de área e produção de soja no Brasil, com aumento de 20,6% e 35%, respectivamente (Leite, Soares e Oliveira-Junior, 2011). Dos municípios do Estado do Pará, Santarém destaca-se como o maior produtor de soja nas safras dos últimos anos (Figura 7).

Figura 7. Evolução temporal da área plantada de soja no Estado do Pará.



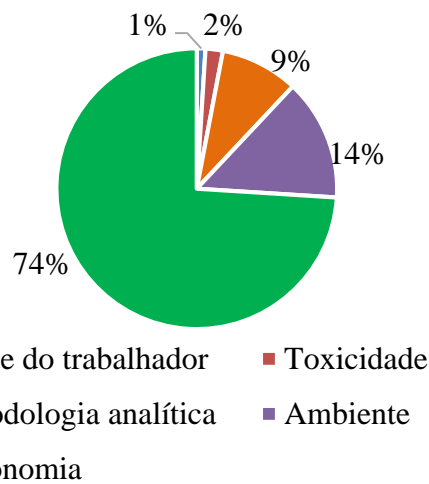
Fonte: Conab (2014).

Estudos relatam que a expansão do cultivo de soja nos municípios de Santarém e Mojuí dos Campos degrada os ecossistemas e ameaça o modo de vida de comunidades locais; há desmatamento, perda de biodiversidade, assoreamento de corpos hídricos e contaminação de outras matrizes ambientais por agrotóxicos e afins (Carvalho e Tura, 2006). A expansão da soja no bioma amazônico traz consigo importantes mudanças de uso da terra, com consequentes processos de contaminação ambiental tanto terrestre quanto aquática, e gera conflitos socioambientais devido, entre outras coisas, aos riscos ambientais e à saúde humana acima mencionados.

2.7 Determinação de glifosato, glufosinato e metabólitos em água

Um estudo publicado recentemente traçou o perfil da produção acadêmica sobre o tema dos agrotóxicos e saúde no Brasil. A pesquisa foi realizada com base no banco de dados da Plataforma Lattes - <http://lattes.cnpq.br> - do CNPq, em função da estrutura de financiamento da pesquisa pública brasileira ser fortemente baseada em recursos daquela agência e disponibilizada por meio dessa ferramenta. No levantamento, foram encontrados 4.896 currículos de pesquisadores brasileiros que publicaram artigos, capítulos de livro, resumos e materiais técnicos com a temática agrotóxicos entre os anos de 2007 a 2012. Dentre os agrotóxicos selecionados, o glifosato foi destaque, citado por 10% de todos os pesquisadores que estudam o tema (Carneiro, 2015). As categorias de estudos utilizando glifosato de acordo com esse estudo foram organizadas na Figura 8.

Figura 8. Categorias dos estudos utilizando glifosato no Brasil entre os anos de 2007 e 2012.



Fonte: Dados de Carneiro (2015)

Percebe-se que a grande maioria (74%) dos pesquisadores investiga o uso do glifosato na agronomia, as espécies de plantas daninhas combatidas e a eficiência de aplicação para diferentes culturas. Em seguida, 14% dos estudos avaliaram efeitos sobre o ambiente, espécies atingidas, e também monitoramento em solo e água, e 9% referiam-se a estudos sobre o desenvolvimento de metodologias para o monitoramento desse herbicida. Os estudos que avaliaram aspectos da toxicidade do glifosato correspondiam a apenas 2%, e 1% deles se referiam a aspectos da saúde do trabalhador. É possível concluir que há poucos estudos sobre metodologia analítica para análise de glifosato no ambiente e poucos estudos que envolve a temática saúde e ambiente no Brasil.

Os métodos de identificação e de quantificação dos herbicidas glifosato e glufosinato e metabólitos têm sido de grande interesse nos últimos anos em função do grande uso desses herbicidas no ambiente. Os riscos e preocupações com a segurança da água exigem esforços para o desenvolvimento de métodos capazes de detectar e quantificar esses resíduos.

As concentrações de glifosato e AMPA encontradas em amostras de águas superficiais geralmente são baixas quando comparadas aos limites brasileiros de referência estabelecidos para segurança da saúde humana e ambiental. No estado de São Paulo, foi detectada a presença de glifosato nas amostras de águas superficiais do Rio Corumbataí em concentrações inferiores a 1 µg/L (Armas *et al.*, 2007), ao passo que em outro estudo no estado do Rio Grande do Sul, foi detectada a presença de glifosato em 46,7% das amostras de água analisadas de um rio em concentrações da ordem de 20 a 30 µg/L (Silva, Peralba e Mattos, 2003; Belo *et al.*, 2012) encontraram 88% de 70 amostras de urina de moradores de Lucas do Rio Verde (MT) contendo glifosato (entre 0,21 a 3,35 µg/L na área urbana e 0,38 a 5,05 µg/L na área rural), indicando a exposição de toda a população a este herbicida.

Em amostras de água em área agrícola de cultivo de soja na Argentina, foram encontradas concentrações de glifosato entre 100 e 700 µg/L (Peruzzo, Porta e Ronco, 2008). Nos Estados Unidos em um estudo envolvendo 51 cursos de água próximos a áreas agrícolas, as concentrações de glifosato foram maiores ou iguais a 0,1 µg/L em 35% das amostras coletadas em pré-emergência, em 40% de amostras pós-emergência e em 31% de amostras na fase de colheita, com uma concentração máxima de 8,7 µg/L. O AMPA foi detectado acima de 100 µg/L em 53% das amostras em pré-emergência, em 83% das amostras pós-emergência, e 73% na fase de colheita, com concentração máxima de 3,6 µg/L (Battaglin *et al.*, 2005).

Técnicas analíticas para análise desses compostos são geralmente complexas em função da elevada solubilidade em água e insolubilidade em solventes orgânicos (Stalikas e Konidari, 2001). A Cromatografia Líquida de Alto Desempenho ou Eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) é a técnica mais empregada (Amarante Júnior *et al.*, 2002; Martins-Júnior e A., 2005). Nesta técnica, a fase móvel é um solvente líquido, e a amostra na forma de uma mistura de solutos é injetada nessa fase móvel, que corre através da fase estacionária separando os componentes da mistura. O mecanismo de separação inclui: partição ou cromatografia líquido-líquido; adsorção ou cromatografia líquido-sólido; troca iônica ou cromatografia de íons; cromatografia por exclusão ou cromatografia por afinidade, e cromatografia quiral (Collins, Braga e Bonato, 2006). O princípio do método de cromatografia de troca iônica baseia-se na troca dos íons entre a fase estacionária e móvel, a fase estacionária sendo constituída por uma coluna altamente carregada por grupos funcionais ionizáveis de

carga negativa ou positiva, por onde passa a fase móvel (Skoog *et al.*, 2008). Os solutos com cargas de sinais contrários à da fase estacionária interagem com esta, e para reter os ânions na coluna é necessário adicionar sítios ativos carregados positivamente, e no caso dos cátions os sítios ativos carregados negativamente (Collins, Braga e Bonato, 2006).

Os detectores UV, fluorescência e espectrometria de massa são os mais utilizados para a detecção desses compostos. O detector de fluorescência tem alta sensibilidade e seletividade comparada com a detecção por absorção no UV-VIS (Martins-Júnior e A., 2005). A dificuldade de analisar esses compostos utilizando cromatografia líquida se refere à forma de detecção dos compostos, visto que ambos não possuem grupos cromóforos ou fluoróforos que possam ser detectados diretamente por detector de fluorescência, ou colorimétricos ou de UV acima de 200 nm. Faz-se necessário, portanto, o uso de reações de derivatização, geralmente em pós-coluna, a fim de se obter um derivado que responda a estes detectores (Amarante Júnior *et al.*, 2002). Após a derivatização o composto formado deve apresentar uma ou mais das seguintes vantagens em relação ao composto de partida: deve ser mais facilmente extraído ou separado cromatograficamente, medido com maior sensibilidade ou exatidão, ou mais facilmente separado de interferentes.

Frequentemente, na cromatografia gasosa os analitos glifosato, AMPA e glufosinato são derivatizados com uso de anidrido trifloroacético (TFAA, em inglês), trifluoroetanol (TFE, em inglês) e anidrido trifloroacético (HFBA, em inglês). Já na cromatografia líquida os reagentes mais utilizados para derivatização são o *o*-oftalaldeído (OPA), o FMOC-Cl e o cloreto de *p*-toluenosulfonila (Amarante Júnior *et al.*, 2002).

A Tabela 4 resume as condições cromatográficas utilizadas em alguns estudos para análise de glifosato e AMPA por HPLC-FL, com derivatização pós coluna com OPA e 2-mercaptoethanol.

Tabela 4. Análise de Glifosato e AMPA por HPCL/Fluorescência com derivatização pós coluna utilizando OPA e 2-mercaptoetanol.

Analito	Condições (HPLC)	LOD	Referência
Glifosato e AMPA	250x4,1 mm I.D., PRP-X400 cátion, fase móvel: 0,005 M KH ₂ PO ₄ em 4% MeOH, pH 2,1. Fluxo: 0,4 ml/min	2 µg/L	Abdullah <i>et al.</i> 1995
Glifosato e AMPA	300x4,6 mm I.D., Animex A-9 fase móvel: 0,005 M KH ₂ PO ₄ em 4% MeOH, pH 1,9. Fluxo: 0,5 ml/min	0,05 mg/kg	Cowell <i>et al.</i> 1986
Glifosato e AMPA	150x4,0 mm I.D, cátion Exchange, K ⁺ , fase móvel: 0,005 M KH ₂ PO ₄ , pH 2,0 – 2,5% KOH (100:0, v/v) e 15 min (0:100) por 17 min, Fluxo: 0,7 ml/min	2 e 4 µg/L	Mallat <i>et al.</i> 1998
Glifosato	250x 4 mm, Bio-Rad, Aminex A-9. Fase móvel: 0,005 M KH ₂ PO ₄ , água: metanol (24:1), pH 1,9, Fluxo: 0,5 mL/min	25 µg/L	Winfield, Bashe e Baker, 1990
Glifosato e AMPA	25x4.6 mm Chromolith flash C ₁₈ monolitica da Merck.	0,11 e 0,06 µg/L	Colomb, 2014

2.8 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é necessária para demonstrar que os resultados obtidos com o desenvolvimento de um determinado método são reprodutíveis e confiáveis. Validação é o “ato ou efeito de validar, dar validade, tornar válido, tornar legítimo ou legal – visa diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado apresentado” (Lanças, 2009).

No Brasil diversas instituições como o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Anvisa e MAPA, apresentam diretrizes próprias e requisitos distintos para validação de métodos analíticos (Ribani *et al.*, 2004). Os parâmetros que geralmente são utilizados para validação de métodos analíticos são descritos no Quadro 4.

Quadro 4. Parâmetros envolvidos no processo de validação de um método analítico (Lanças, 2009)

Parâmetro	Definição
Exatidão	Expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como a referência.
Precisão	É a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra.
Fidelidade	Expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas a partir de ensaios múltiplos em uma mesma amostra homogênea em determinadas condições.
Linearidade	É a resposta obtida em virtude da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.
Limite de detecção	Corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato.
Limite de quantificação	Corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada.
Sensibilidade	Indica a capacidade do método em discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito.
Seletividade	Refere-se à extensão até a qual o método pode determinar analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes da mistura.
Recuperação	É uma medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente.
Robustez	É uma medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método.
Estabilidade	Refere-se ao tempo em que as soluções padrão e da amostra contendo o analito podem ser utilizadas sem que haja decomposição apreciável dentro das condições experimentais fixadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da expansão de cultivos de soja na zona rural dos municípios de Santarém e Mojuí dos Campos (PA), por meio da análise de herbicidas em água e por meio de avaliação das percepções de famílias de agricultores sobre os riscos ambientais e à saúde humana.

3.2 Objetivos Específicos

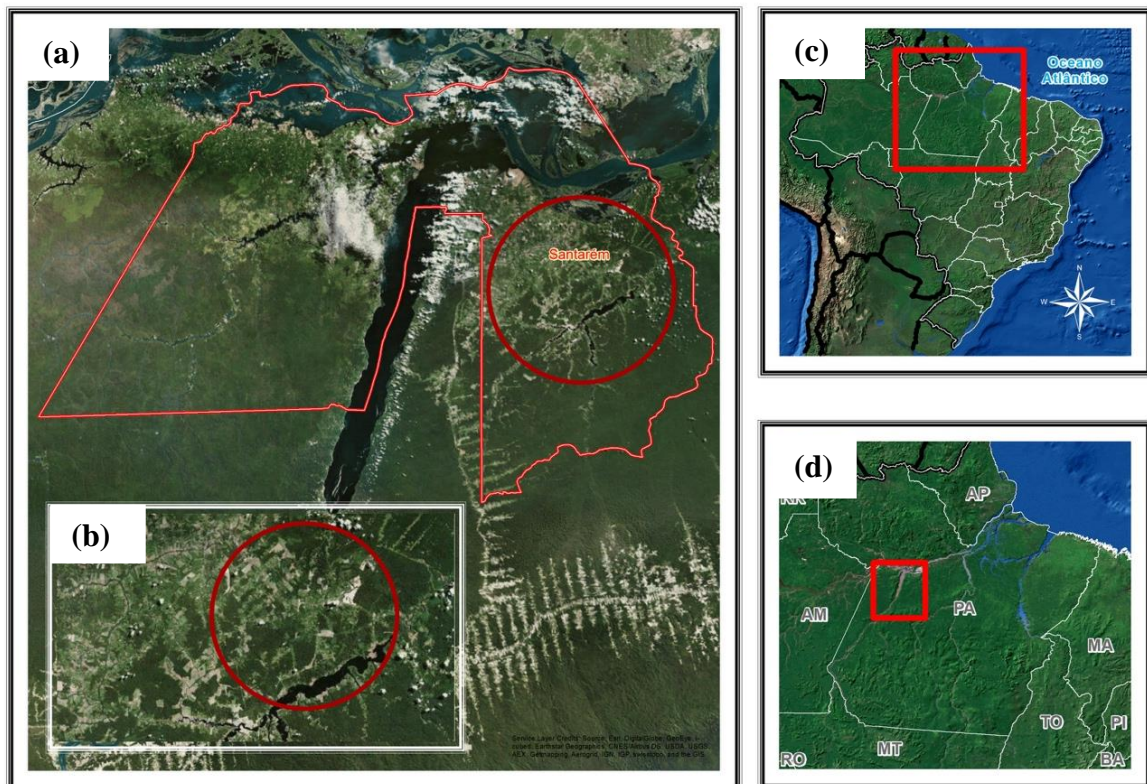
- ✓ Desenvolver e validar um método analítico para determinação do herbicida glifosato e seu principal produto de degradação (AMPA), e do herbicida glufosinato, por HPLC-FL
- ✓ Determinar os níveis de concentração de glifosato, AMPA, e glufosinato em amostras de água da região de estudo
- ✓ Analisar as percepções sobre os riscos ambientais e à saúde humana associados à expansão da soja, em famílias de agricultores na região rural de Santarém.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A área de estudo corresponde à região do planalto do município de Santarém, oeste do Estado do Pará (Figura 9), que desde alguns poucos anos também engloba o novo município de Mojuí dos Campos. Essa região de planalto é formada pela bacia hidrográfica do rio Curuá-Una, que possui vários igarapés (córregos) e outros rios tributários, como o rio Moju. A paisagem local é composta por um mosaico de floresta tropical (Bioma Amazônia) cortada por uma densa rede de drenagem hídrica e ocupada por lavouras de soja e pecuária, esta última tanto de subsistência quanto comercial. A área foi escolhida devido à grande influência que tem recebido da expansão da fronteira agrícola ao longo dos últimos 10 a 15 anos (Aguiar, Peleja e Sousa, 2014).

Figura 9. Localização da região de Santarém (a). Localização da área de coleta no Município de Santarém (b). Localização do Estado do Pará no Brasil (c). Localização de Santarém no Estado do Pará (d).



Fonte: Software ArcGis da ESRI. Imagens BaseMap.

4.2 Questionário sociopolítico e ambiental

Foi administrado um questionário (Apêndice 1) de cunho descritivo e exploratório para buscar capturar percepções sociopolíticas e ambientais das famílias de pequenos agricultores rurais acerca do contexto de possível risco criado com a chegada e expansão da soja na região rural desses dois municípios.

O questionário buscou explorar também em que medida os pequenos produtores rurais e suas famílias utilizam-se de técnicas agrícolas implantadas em grandes fazendas do agronegócio, além de explorar as percepções de risco de contaminação ambiental e de exposição humana associados a essas práticas e técnicas. Foram realizadas entrevistas em residências com os agricultores e membros de suas famílias, onde os critérios para inclusão nesta atividade foram: ter idade igual ou superior a 18 anos e aceitar voluntariamente participar do estudo.

4.3 Coleta de amostras de água

Amostras de água foram coletadas estrategicamente em cursos d'água próximos a plantações de soja. Os sítios de amostragem foram definidos com base em imagens de satélite levando-se em conta o sistema natural de drenagem local, assim como demandas apresentadas pelas próprias comunidades potencialmente expostas aos agrotóxicos utilizados nas lavouras de soja. As amostras foram coletadas em setembro de 2012 (período de seca), em março de 2013 e fevereiro de 2015 (período chuvoso) em pontos georreferenciados, conforme a Tabela 5 abaixo.

Tabela 5. Coordenadas geográficas de todos os pontos de coleta de amostras de água.

Nº	Amostra	Latitude	Longitude	Local	Data da coleta
1	1/2012	02°62'84,7"S	054°50'40,2"W	Açaizal	05/09/2012
2	6/2012	02°76'48,1"S	054°38'58,6"W	Guaraná	06/09/2012
3	12/2012	02°90'59,6"S	054°46'34,7"W	Reservatório	06/09/2012
4	13/2012	02°90'80,5"S	054°46'73,1"W	Reservatório	06/09/2012
5	14/2012	02°90'59,6"S	054°46'34,7"W	Reservatório	06/09/2012
6	17/2012	02°66'88,6"S	054°57'88,8"W	Rio Moju	07/09/2012
7	1/2013	02°62'62,6"S	054°50'55,5"W	Açaizal	25/03/2013
8	2/2013	02°62'71,2"S	054°50'50,4"W	Açaizal	25/03/2013
9	3/2013	02°63'55,9"S	054°50'69,8"W	Açaizal	25/03/2013
10	4/2013	02°64'75,7"S	054°51'02,9"W	Açaizal	25/03/2013
11	5/2013	02,62'85,8"S	054°50'39,9"W	Açaizal	25/03/2013

Nº	Amostra	Latitude	Longitude	Local	Data da coleta
12	6/2013	02,76'48,5"S	054°38'54,3"W	Guaraná	25/03/2013
13	7/2013	02,66'27,3"S	054°55'12,9"W	Rio Moju	25/03/2013
14	8/2013	02°65'85,2"S	054°55'43,3"W	Rio Moju	26/03/2013
15	9/2013	02°66'87,8"S	054°57'88,8"W	Rio Moju	26/03/2013
16	10/2013	02°68'48,1"S	054°60'55,2" W	Rio Moju	26/03/2013
17	11/2013	02°68'65,6"S	054°64'32,9"W	Rio Moju	26/03/2013
18	12/2013	02°70'11,1"S	054°68'39,2"W	Rio Moju	26/03/2013
19	13/2013	02°83'42,7"S	054°74'79,4"W	Rio Moju	26/03/2013
20	14/2013	02°96'04,1"S	054°54'32,7"W	Rio Moju	27/03/2013
21	15/2013	02°93'54,7"S	054°49'47,1"W	Reservatório	27/03/2013
22	16/2013	02°94'82,3"S	054°49'20,9" W	Reservatório	27/03/2013
23	17/2013	02°94'16,5"S	054°48'41,8"W	Reservatório	27/03/2013
24	18/2013	02°94'18,2"S	054°49'92,4"W	Reservatório	27/03/2013
25	19/2013	02°87'58,6"S	054°39'13,7"W	Reservatório	28/03/2013
26	20/2013	02°87'60,4"S	054°39'09,4"W	Reservatório	28/03/2013
27	21/2013	02°87'92,8"S	054°38'64,7"W	Reservatório	28/03/2013
28	22/2013	02°88'20,7"S	054°38'24,6"W	Reservatório	28/03/2013
29	23/2013	02°88'00,3"S	054°40'36,4"W	Reservatório	28/03/2013
30	24/2013	02°87'72,1"S	054°40'39,9"W	Reservatório	28/03/2013
31	25/2013	02°87'49,1"S	054°40'50,9"W	Reservatório	28/03/2013
32	26/2013	02°87'30,5"S	054°40'81,8"W	Reservatório	28/03/2013
33	27/2013	02°88'63,8"S	054°41'90,3"W	Reservatório	28/03/2013
34	1/2015	02°37'34,4"S	054°30'19,8"W	Açaizal	23/02/2015
35	2/2015	02°37'42,6"S	054°30'14,1"W	Açaizal	23/02/2015
36	3/2015	02°38'07,0"S	054°30'26,4"W	Açaizal	23/02/2015
37	4/2015	02°37'34,4"S	054°30'19,8"W	Açaizal	23/02/2015
38	5/2015	02°37'35,7"S	054°30'21,9"W	Açaizal	23/02/2015
39	6/2015	02°37'35,8"S	054°30'21,8"W	Açaizal	23/02/2015
40	7/2015	02°37'35,7"S	054°30'21,9"W	Açaizal	23/02/2015
41	8/2015	02°45'51,2"S	054°23'51,8"W	Guaraná	23/02/2015
42	9/2015	02°45'53,3"S	054°23'09,6"W	Guaraná	23/02/2015
43	10/2015	02°48'02,0"S	054°26'09,3"W	Boa Sorte	23/02/2015
44	11/2015	02°53'13,5"S	054°28'40,7"W	Riacho verde	23/02/2015
45	12/2015	02°52'00,5"S	054°27'23,5"W	Riacho verde	23/02/2015
46	13/2015	02°52'48,6"S	054°28'08,7"W	Riacho verde	23/02/2015
47	14/2015	02°40'07,6"S	054°34'44,1"W	Rio Moju	24/02/2015
48	15/2015	02°39'29,8"S	054°33'16,2"W	Rio Moju	24/02/2015
49	16/2015	02°39'30,9"S	054°33'15,5"W	Rio Moju	24/02/2015
50	17/2015	02°39'30,5"S	054°33'15,6"W	Rio Moju	24/02/2015
51	18/2015	02°41'12,6"S	054°38'35,2"W	Rio Moju	24/02/2015
52	19/2015	02°39'30,9"S	054°33'15,5"W	Rio Moju	24/02/2015
53	20/2015	02°40'28,6"S	054°35'02,4"W	Rio Moju	24/02/2015
54	21/2015	02°41'04,6"S	054°36'20,1"W	Rio Moju	24/02/2015
55	22/2015	02°41'12,0"S	054°33'35,6"W	Rio Moju	24/02/2015
56	23/2015	02°41'21,0"S	054°35'59,8"W	Rio Moju	24/02/2015
57	24/2015	02°52'19,2"S	054°23'24,0"W	Reservatório	27/02/2015
58	25/2015	02°52'54,8"S	054°24'31,5"W	Reservatório	27/02/2015

Nº	Amostra	Latitude	Longitude	Local	Data da coleta
59	26/2015	02°52'17,6"S	054°24'31,5"W	Reservatório	27/02/2015
60	27/2015	02°52'42,2"S	054°23'37,7"W	Reservatório	27/02/2015
61	28/2015	02°51'50,6"S	054°22'51,1"W	Reservatório	27/02/2015
62	29/2015	02°52'13,2"S	054°23'00,0"W	Reservatório	27/02/2015
63	30/2015	02°53'22,9"S	054°24'24,6"W	Reservatório	27/02/2015

As amostras foram coletadas mergulhando um balde a cerca de 15 a 20 cm de profundidade em cada ponto, e com auxílio de uma seringa e um filtro de 0,45 µm aproximadamente 100 mL foram filtrados e transferidos para frascos de polietileno. As amostras coletadas foram mantidas sob refrigeração em uma caixa térmica com gelo reutilizável até a chegada ao laboratório no final de cada dia de amostragem de campo, onde eram congeladas (APHA, 1998).

4.4 Desenvolvimento do método analítico para determinação de glifosato, AMPA e glufosinato

O desenvolvimento e validação do método analítico e a análise das amostras foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília (UnB), que possui o Sistema de Qualidade ISO 17025. Para tanto, foi utilizado sistema HPLC-FL da marca Shimadzu® (Figura 11), modelo LC20AT, com injetor automático modelo SIL-20SA, sistema quaternário de bombas LC, 20AT, forno de coluna modelo CTO-20SAC, módulo comunicador CBM-20A, forno de reação pós coluna modelo CRB-6A, e detector de fluorescência modelo 10AXL conectado ao *software* LC Solution®.

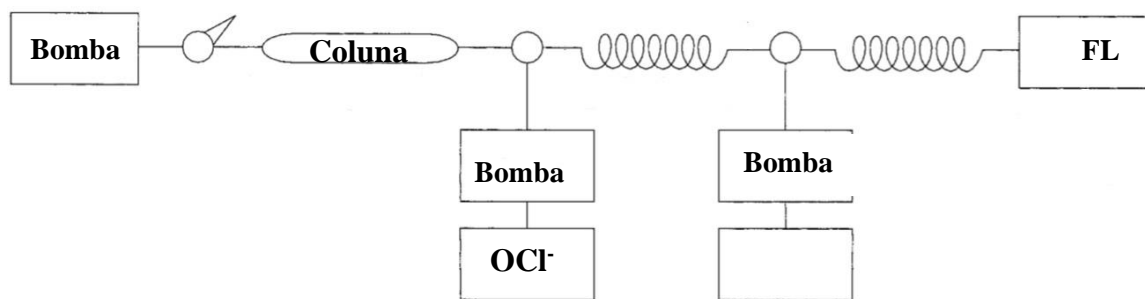
O sistema de funcionamento de um HPLC, conforme Figura 10, baseia-se em: (a) reservatório da(s) fase(s) móvel(is), que é aspirado por uma bomba de alta pressão (b), em direção à coluna (h). Por uma válvula de injeção (g), a amostra é introduzida e arrastada juntamente com a fase móvel para a coluna, onde ocorre a separação. O efluente da coluna recebe na caixa de reação química (j) as soluções de derivatização pós coluna (c) com auxílio das bombas de alta pressão (d) e (e), o eluente finalmente é direcionado para um detector (i), que acusa a presença dos analitos eluídos na amostra. No detector, o sinal gerado é captado por um *software* apropriado (m), com auxílio do módulo comunicador (f). Tratado no computador, um cromatograma é gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise. Os resíduos são dispensados em (l) (Lanças, 2009).

Figura 10. Sistema cromatográfico Shimadzu® do Laboratório de Toxicologia: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) soluções de derivatização pós coluna; d) bomba de alta pressão; e) bomba de alta pressão; f) módulo comunicador; g) injetor; h) coluna; i) detector; j) caixa de reação química; l) resíduos e m) Software.

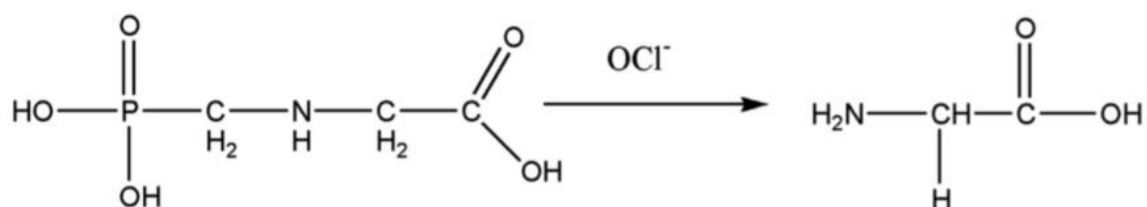


A determinação de glifosato e AMPA utilizando derivatização com *o*-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol é a mais citada na literatura para cromatografia líquida (Amarante Júnior *et al.*, 2002) Neste caso, o glifosato é previamente oxidado a glicina, com hipoclorito de cálcio em meio alcalino, em seguida reage com OPA e 2-mercaptoetanol para formação do composto fluorescente. A Figura 11 mostra as reações desse processo.

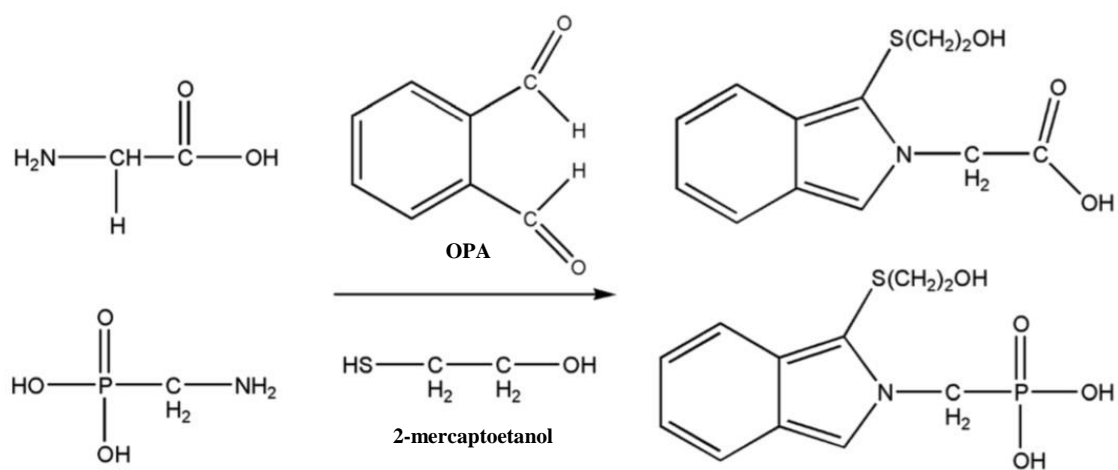
Figura 11. (a) Esquema de derivatização pós coluna. (b) reação do glifosato com hipoclorito de cálcio (OCl^-). (c) AMPA e glicina e seus derivados fluorescentes com o-ftaldialdeído na presença de 2-mercaptoetanol (OPA 2-ME).



(a)



(b)



(c)

Fonte: Adaptado de Colombo e Masini (2014); Apha (1998).

4.5 Preparo das soluções padrão

O padrão analítico de AMPA foi adquirido da empresa Aldrich® (pureza 99%), o de glifosato da empresa Fluka (pureza 99%), e o de glufosinato da empresa Fluka (pureza 98,3%).

Soluções estoque dos padrões sólidos foram preparadas em água ultrapura (Millipore®) com concentração de 1 mg/mL. A massa necessária de cada padrão foi pesada em balança analítica Shimadzu® AUW220D (5 casas decimais) e então dissolvida em água ultrapura e o volume completado para 10 mL em balão volumétrico calibrado (Laborglass®). A solução resultante foi armazenada em *vial* âmbar a -20 °C.

A partir da diluição da solução estoque, obtiveram-se as soluções trabalho de cada analito preparada diariamente, e a partir dessas foram preparadas as soluções mistas, contendo os analitos em estudo. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se pipetas automáticas calibradas de volumes variados e balões calibrados de 10 mL.

4.6 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada diluindo-se 1,36 g de fosfato de potássio (KH₂PO₄) (Vetec®) em água ultrapura no balão volumétrico de 1000 mL (0,010M). O pH da solução foi ajustado para 2,1 com ácido fosfórico (H₃PO₄) (Merck®), utilizando-se pHmetro da marca AJ Micronal®, modelo AJX-512, com eletrodo de vidro combinado pH/ATC 201T-M. Após o preparo, a solução foi filtrada em membrana PTFE 0,45 µm (Millipore®) com o auxílio de um sistema a vácuo. Em seguida, a solução foi levada ao Ultrassom Modelo USC – 3300 da marca Unique® por 15 minutos para retirada de bolhas. Além da solução de fosfato de potássio, a fase móvel continha 8% de metanol grau HPLC (pureza 98%; Merck®), ambos misturados pelo sistema de bombas do cromatógrafo. Ao final, a fase móvel foi fosfato de potássio 0,010 M (pH 2,1) 92%: metanol 8%.

4.7 Preparo da solução oxidante de hipoclorito de cálcio

Para obter a solução oxidante de hipoclorito de cálcio foi dissolvido 1,36 g de KH₂PO₄; 11,6 g de cloreto de sódio (NaCl) (Dinâmica®); 0,4 de hidróxido de sódio (NaOH) (Dinâmica®) em aproximadamente 500 mL de água ultrapura no balão volumétrico de 1000 mL. Após homogeneizado, adicionou-se 0,015 g de hipoclorito de cálcio (Merk®) e o volume foi completado para 1000 mL. A solução foi filtrada a vácuo em membrana PTFE 0,45 µm e

levada ao ultrassom por 15 minutos. O preparo da solução de hipoclorito de cálcio é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Preparo da solução de hipoclorito de cálcio

Reagentes	Quantidade (g)	Concentração (mol/L)	pH final
KH ₂ PO ₄	1,36	0,0099	8,5
NaCl	11,6	0,1984	
NaOH	0,4	0,0100	
(Ca(ClO) ₂)	0,015	0,0001	

4.8 Preparo da solução de reação o-ftaldialdeído (OPA)

Dissolveu-se 19,1 g de tetraborato de sódio (Na₂B₄O₇·10H₂O) (Dinâmica®) em água ultrapura no balão volumétrico de 1000 mL. Em seguida, dissolveu-se 0,1 g de O-phthalaldehyde (Merck®) em 10 mL de metanol e adicionou-se na solução de Na₂B₄O₇·10H₂O. Então, filtrou-se a vácuo em membrana PTFE 0,45 µm e a solução foi levada ao ultrassom por 15 minutos.

Em um tubo eppendorff e utilizando-se pipeta automática calibrada foram adicionados 50µL de 2-mercaptoetanol (Sigma®) e 50 uL de acetonitrila (Merck®). Após homogeneizada, a essa mistura foi adicionado borato de sódio, preparado inicialmente. O preparo da solução OPA é apresentado na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7. Preparo da solução OPA.

Reagentes	Quantidade	pH final
Borato de sódio	19,1 g	9,2
o-phthalaldehyde	0,100 g	
Metanol	10 mL	
Mercaptoetanol	50 uL	
Acetonitrila	50 uL	

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e otimização da metodologia analítica

Inicialmente foram desenvolvidas e otimizadas condições analíticas para metodologia analítica. Os testes e as técnicas utilizadas como, composição, pH e vazão da fase móvel utilizada na cromatografia, assim como, temperatura do forno da caixa reação, visando um otimizar o tempo de análise, boa resolução e separação entre os picos dos analitos de interesse foram alguns dos testes realizados. Os testes e resultados dessa fase são descritos abaixo.

5.1.1. Ajuste de equipamento

Para conectar a coluna Hamilton (PRP-X100, 10 μm , 250x4,1mm), de troca aniônica, amônia quarternária e pré-coluna no forno de coluna modelo CTO-20SAC da marca Shimadzu® foi realizada uma adaptação da pré-coluna cortando a tubulação das extremidades, conforme setas indicam na figura 12 (a). A Figura 12 (b) mostra a coluna Hamilton (PRP-X100) e pré-coluna dentro do forno de coluna modelo CTO-20SAC da marca Shimadzu®.

Figura 12. (a) Pré-coluna Hamilton (b) Forno de coluna da Shimadzu.

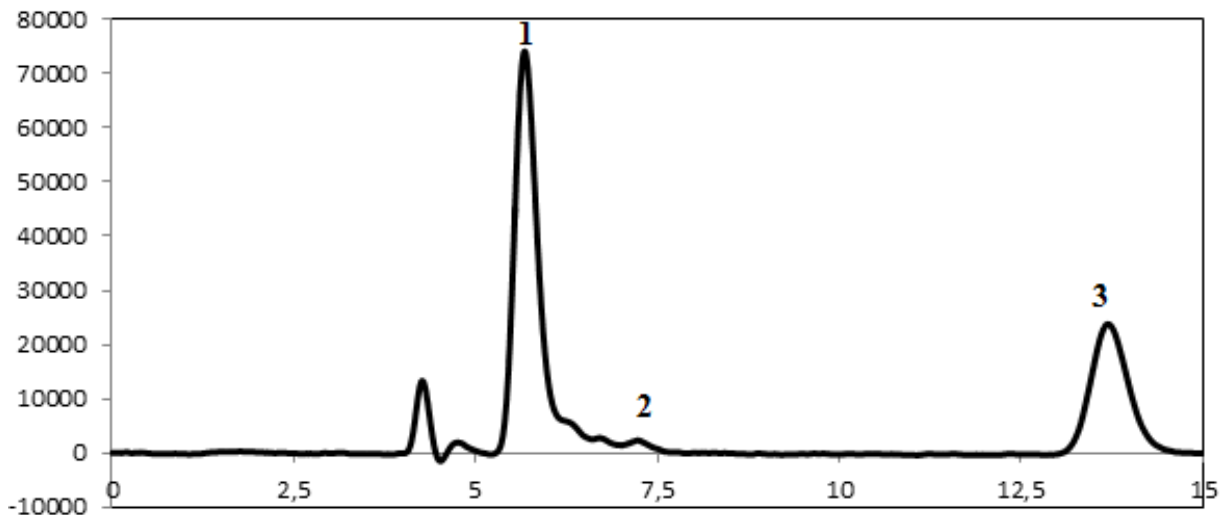


5.1.2 Ajuste na desgaseificação da solução OPA

Um dos procedimentos de rotina no preparo das soluções para o cromatógrafo é a desgaseificação. As bombas de HPLC são muito eficazes no bombeamento de líquidos, mas se uma bolha de ar entrar no sistema de bombas, observa-se uma redução no fluxo e uma queda na pressão do sistema. Se a bolha é grande o suficiente, a bomba não irá empurrar o solvente, e se a pressão cair abaixo de um limite predefinido, a bomba para.

O cromatógrafo do Laboratório de Toxicologia possui o desgaseificador DGU-20^a acoplado ao sistema, e mesmo com esse sistema um procedimento padrão de rotina do laboratório é desgaseificar no ultrassom todas as soluções antes de colocar no equipamento. Nos primeiros testes, e utilizando esse procedimento de desgaseificação das soluções no ultrassom, não foi possível observar os picos dos analitos. A desgaseificação pode ter comprometido a estabilidade do 2-mercaptoetanol, necessário para a formação do produto fluorescente com o OPA. Quando a desgaseificação foi realizada antes de acrescentar o 2-mercaptoetanol, os analitos foram então observados (Figura 13).

Figura 13. Cromatograma obtido com solução trabalho mistura, concentração 100 µg/L, (1) AMPA, (2) glufosinato, (3) glifosato. A unidade da abscissa é tempo em minutos. No eixo y, tem-se a resposta do detector. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 5µM, metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 µL, caixa de reação química: 38°C.



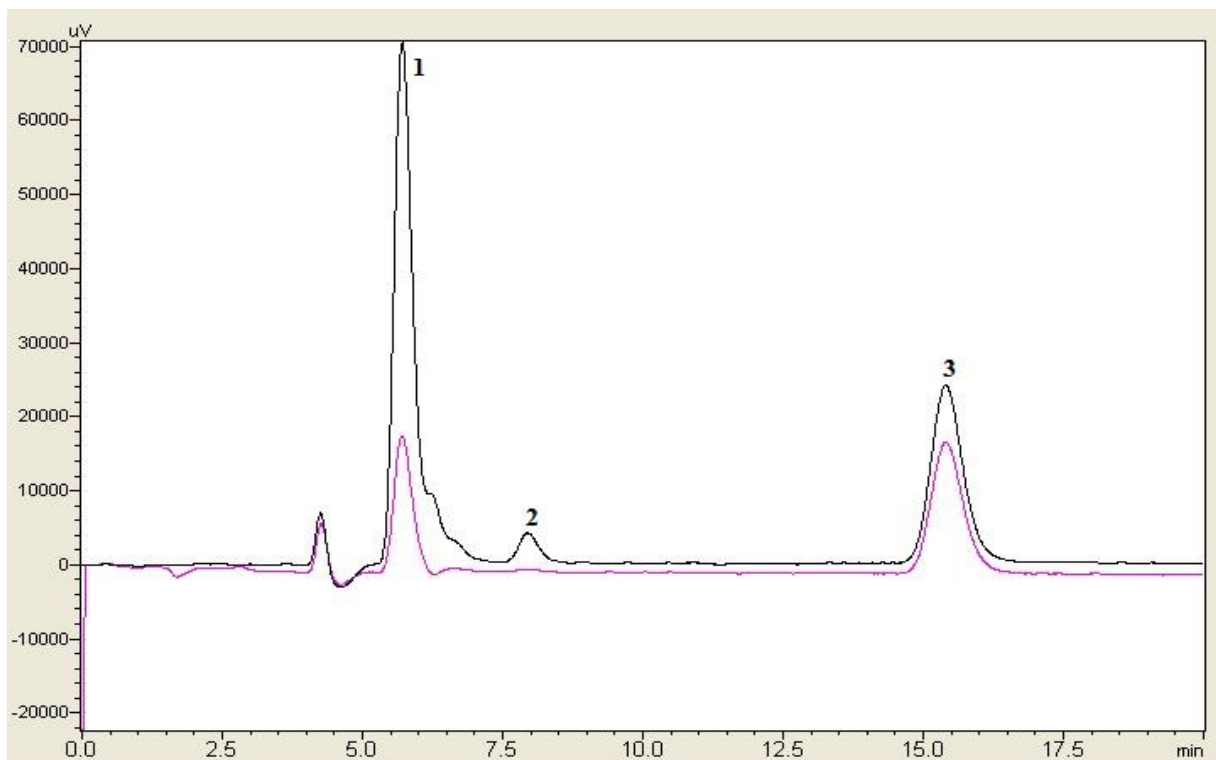
5.1.3 Estudo da variação de concentração do hipoclorito de cálcio

A solução de hipoclorito de cálcio deve ser preparada diariamente em função da sua rápida degradação (Winfield, Bashe e Baker, 1990). Estudou-se a possibilidade de variar a

concentração de hipoclorito de cálcio de 0,015g/L para 0,030g/L para aumentar a estabilidade da solução. Para cada uma dessas condições foram injetadas 3 amostras fortificadas com 100 µg/L de AMPA, glufosinato e glifosato.

Visualmente foi avaliado, conforme cromatograma apresentado na Figura 14, que a concentração de 0,015g/L é a mais adequada, fornecendo uma melhor resposta para os três analitos, principalmente AMPA e glufosinato. Nas injeções realizadas com a concentração de 0,030g/L o glufosinato não apareceu e a área do pico do AMPA diminuiu muito.

Figura 14. Cromatogramas obtidos variando-se a concentração de hipoclorito de cálcio na solução de derivação pós-coluna: preto 0,015g/L e rosa 0,030g/L. (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 5µM, metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 µL, caixa de reação química: 38°C.



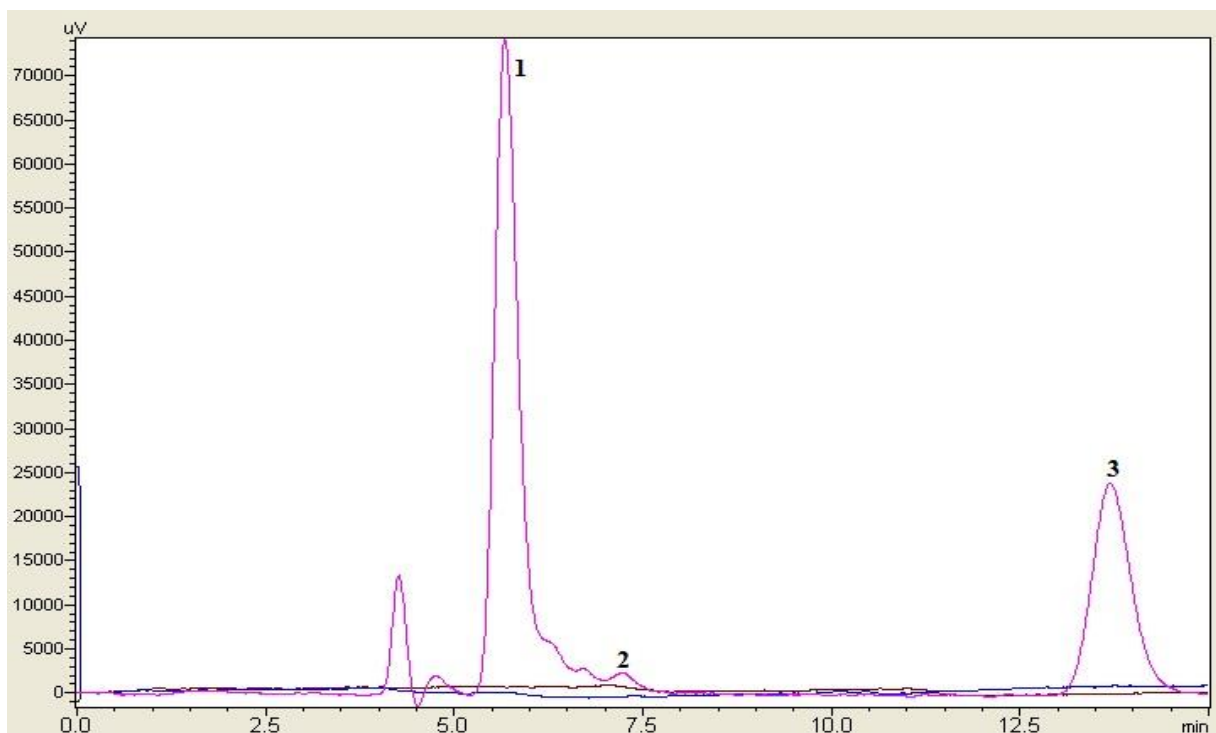
5.1.4 Estudo da variação de fluxo das soluções de derivatização

A solução OPA não reage com aminas secundárias, sendo necessário realizar uma oxidação prévia do glifosato a glicina com a solução de hipoclorito de cálcio. Nesse procedimento a solução oxidante pode suprimir a fluorescência e o ajuste na relação dos fluxos dos reagentes pós-coluna deve ser rigorosamente controlado para se obter respostas

equivalentes para os compostos. Essa relação é extremamente importante para que o glifosato seja quantificado sem prejuízo da sensibilidade (Abakerli e Fay, 2003).

Na literatura, o fluxo das soluções de derivatização pós coluna apresenta diversos valores, sendo em alguns métodos o mesmo fluxo para as várias soluções, como 0,5 mL/min (Winfield, Bashe e Baker, 1990; Epa, 2009) ou variáveis, como 0,2 mL/min para solução oxidante e 0,4 mL/min para OPA (Abakerli e Fay, 2003). Realizou-se um estudo variando o fluxo das soluções de hipoclorito e solução OPA: 0,3 ou 0,5 mL/min para ambas ou 0,4 e 0,3 mL/min para hipoclorito e OPA, respectivamente. A Figura 15 mostra que o fluxo de 0,5 mL/min para ambas soluções é o mais adequado. Nas outras condições, não foi possível visualizar os analitos.

Figura 15. Estudo da variação do fluxo das soluções de derivatização pós-coluna: hipoclorito de cálcio e solução OPA: rosa: 0,5 e 0,5 mL/min; marrom 0,3 e 0,3 mL/min e azul 0,4 e 0,3 mL/min, respectivamente. (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 5µM, metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 µL, caixa de reação química: 38°C.



5.1.5 Estudo da proporção de metanol na fase móvel

Foi realizado um teste sobre a proporção de metanol mais adequada para uso na fase móvel, conforme os seguintes valores: 4%, 8%, 12%, 16% e 20%. Os cromatogramas obtidos

são apresentados na Figura 16, onde as proporções 16 e 20% foram descartadas em função do alargamento dos picos e aumento exagerado do tempo de retenção do glifosato (18 e 21 minutos respectivamente) e diminuição na área de integração do analito AMPA. Descartadas as concentrações de 16 e 20% de metanol, foi realizado um novo teste utilizando as concentrações de 12%, 8%, e 4%. Para cada uma dessas condições foram injetadas três soluções trabalho, mistura de 100 µg/L de AMPA, glufosinato e glifosato, e os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 17.

Figura 16. Estudo da variação de metanol na fase móvel, preto 4%; rosa: 8%; azul: 12%; marrom 16%; verde 20%. 1. AMPA; 2. glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10µM, pH 2,1 e metanol variando de 8% a 20%; volume de injeção 50 µL, caixa de reação química: 38°C.

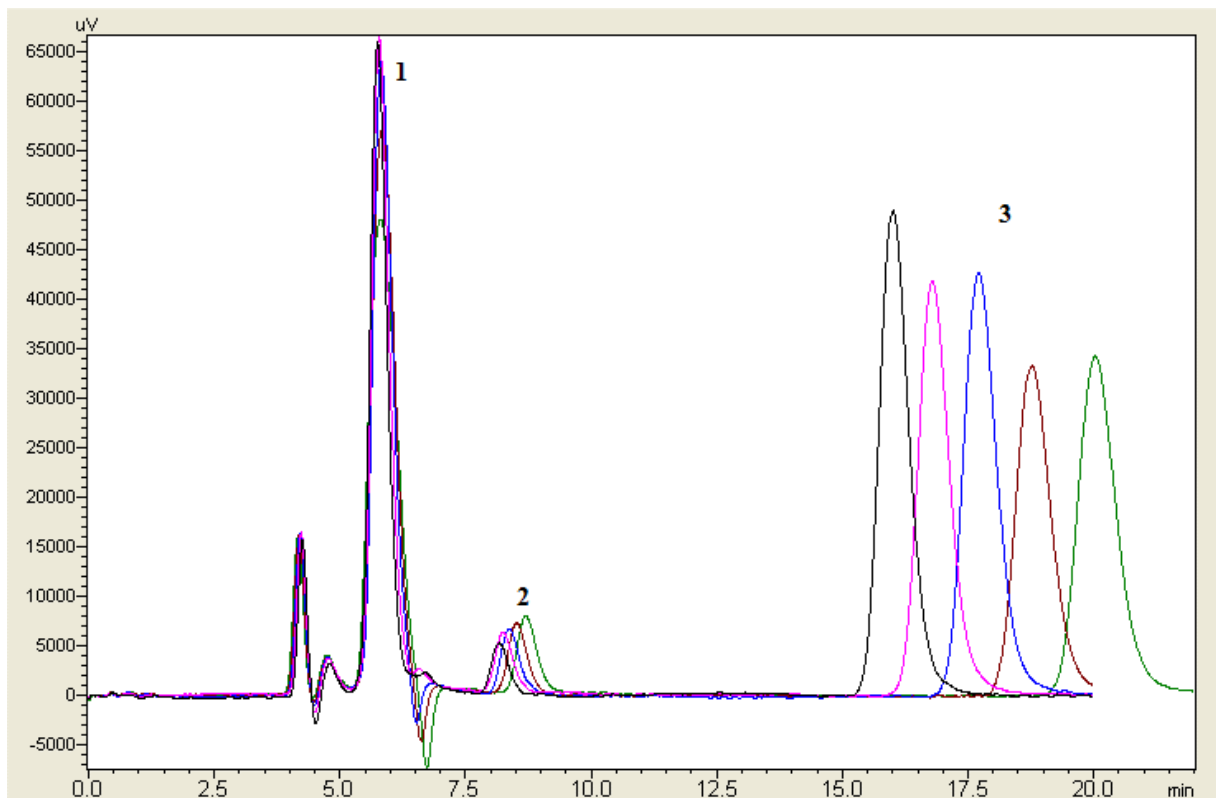
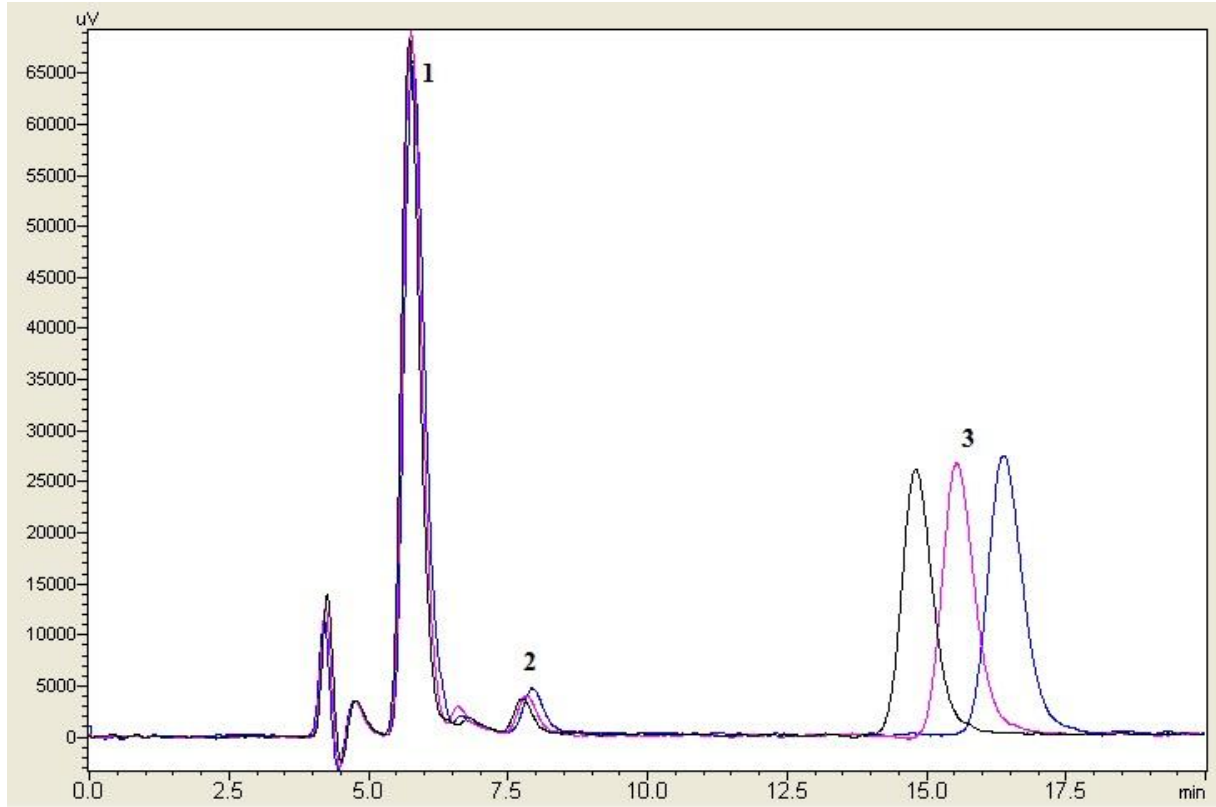


Figura 17. Teste da variação de metanol na fase móvel; preto 4%; rosa: 8%; azul: 12%. 1. AMPA; 2. glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol variando de 4% a 12%, pH 2,1; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: 38°C.

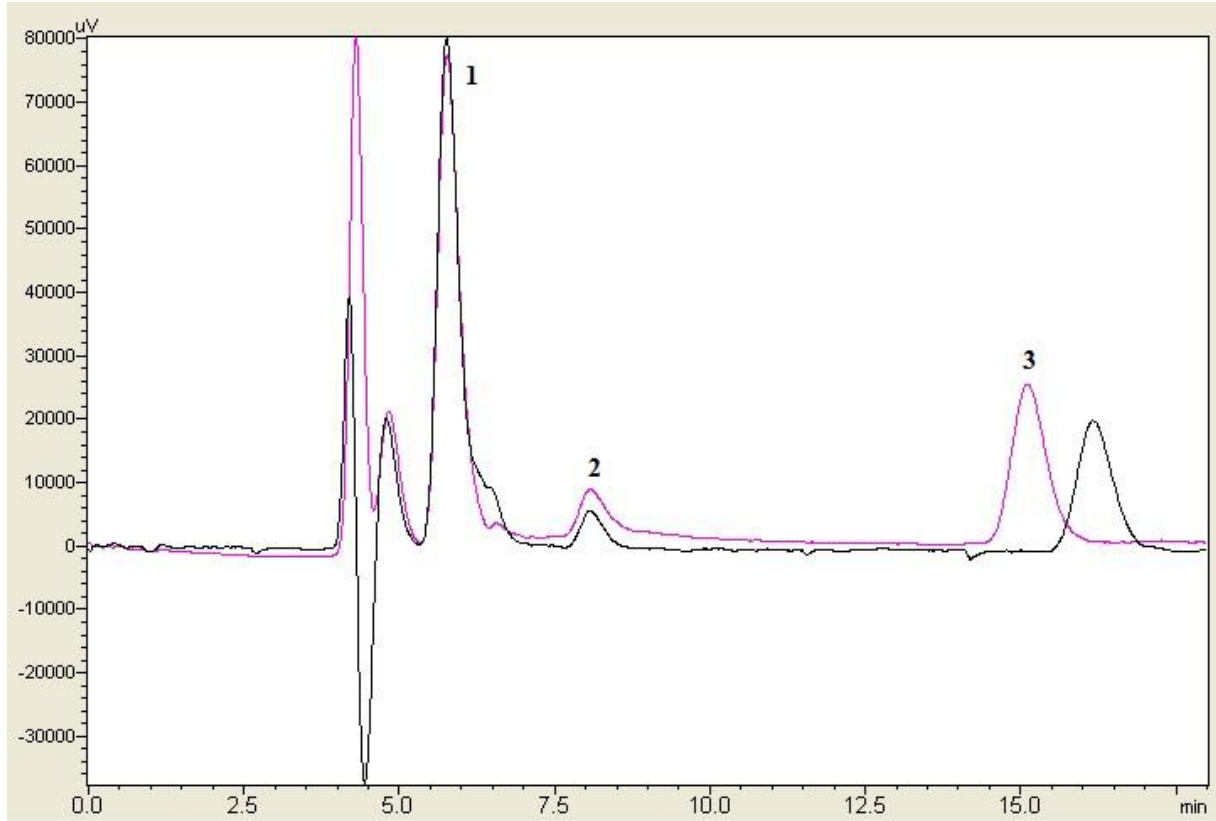


Apesar da concentração de 12% de metanol ter levado ao aumento da área do glufosinato, o tempo de retenção do glifosato aumentou, e para economia de solvente e tempo, sem comprometer significativamente os analitos, foi definido a concentração de metanol a 8% na fase móvel.

5.1.6 Estudo da variação na concentração de fosfato de potássio na fase móvel

Com o objetivo de diminuir alguns interferentes próximos da área de retenção do AMPA e melhorar a estabilidade, linha de base e seletividade do sistema, foi realizado um estudo variando a concentração do tampão fosfato de potássio na fase móvel de 5 μ M para 10 μ M. Os cromatogramas estão mostrados na Figura 18.

Figura 18. Comparação dos cromatogramas em diferentes concentrações de fosfato de potássio na fase móvel: preto: 5 μM e rosa: 10 μM . 1. AMPA; 2. glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio variando 5 μM e 10 μM , metanol 4%, pH 2,1; volume de injeção 50 μL , caixa de reação química: 33°C.



Analisando-se visualmente o comportamento de cada analito frente à variação da concentração do tampão na fase móvel, e a integração de suas respectivas áreas (Tabela 8), observa-se que a concentração de 10 μM leva a um pequeno aumento na área do pico de glifosato e glufosinato. Além disso, a resolução de linha de base para integração do AMPA se mostrou mais eficiente, e sendo assim a concentração de 10 μM foi selecionada para o método.

Tabela 8. Área integrada dos analitos glifosato, AMPA e glufosinato em função da variação da concentração de tampão na fase móvel (n=2).

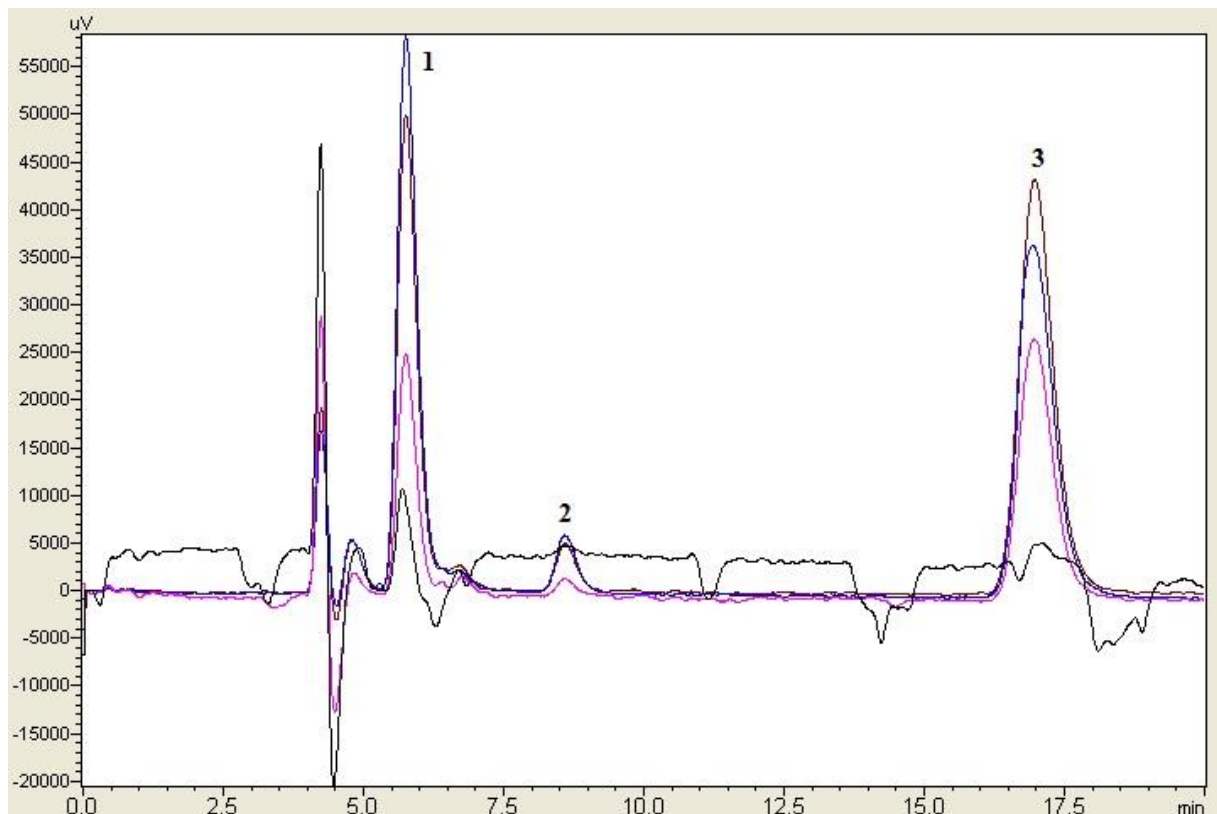
Analito	Fase móvel 5 μ M		Fase móvel 10 μ M	
	Média (área)	CV, %	Média (área)	CV, %
AMPA	1582372	2,2	1531132	0,47
Glufosinato	99284	2,3	100790	2,1
Glifosato	1124480	0,81	1207565	6,1

CV= coeficiente de variação

5.1.7 Estudo da temperatura da caixa de reação química

Foi realizado o teste com diferentes temperaturas da caixa de reação química. Inicialmente testaram-se as seguintes temperaturas: 58°C, 48°C, 38°C e 28°C, e para cada uma dessas temperaturas foi injetada uma solução trabalho mistura de 100 μ g/L AMPA, glufosinato e glifosato. A Figura 19 apresenta os cromatogramas obtidos.

Figura 19. Cromatogramas obtidos com diferentes temperaturas da caixa de reação química: preto 58°C; rosa 48°C; azul 38°C e marrom 28°C. 1) AMPA; 2) glufosinato e 3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μ M, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 50 μ L, caixa de reação química: variando entre 28° C e 58°C.



O uso da caixa de reação química a 58°C foi descartado em função da provável formação de bolhas e desaparecimento dos picos de interesse. Utilizando-se 48°C, os picos de todos os analitos diminuem, indicando que essa não é a melhor condição. Para o analito glifosato, 38°C é a melhor condição e para o AMPA 28°C se apresentou melhor. As temperaturas de 38°C e 28°C influenciam pouco na área do pico do glufosinato.

Quando se determina mais de um analito no método, é preciso escolher condições intermediárias para não afetar negativamente nenhum dos analitos. Seguindo esse princípio testou-se uma temperatura intermediária de 33°C, juntamente com 38°C e 28°C. Para cada uma dessas temperaturas foram injetadas 3 soluções trabalho mistura de 100 µg/L AMPA, glufosinato e glifosato, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9. Foi possível observar que a temperatura da caixa de reação mais adequada para o método seria 33°C, a qual apresentou o melhor resultado para AMPA e glufosinato e não comprometeu muito o sinal do glifosato.

Tabela 9. Teste da temperatura da caixa de reação química (n=3).

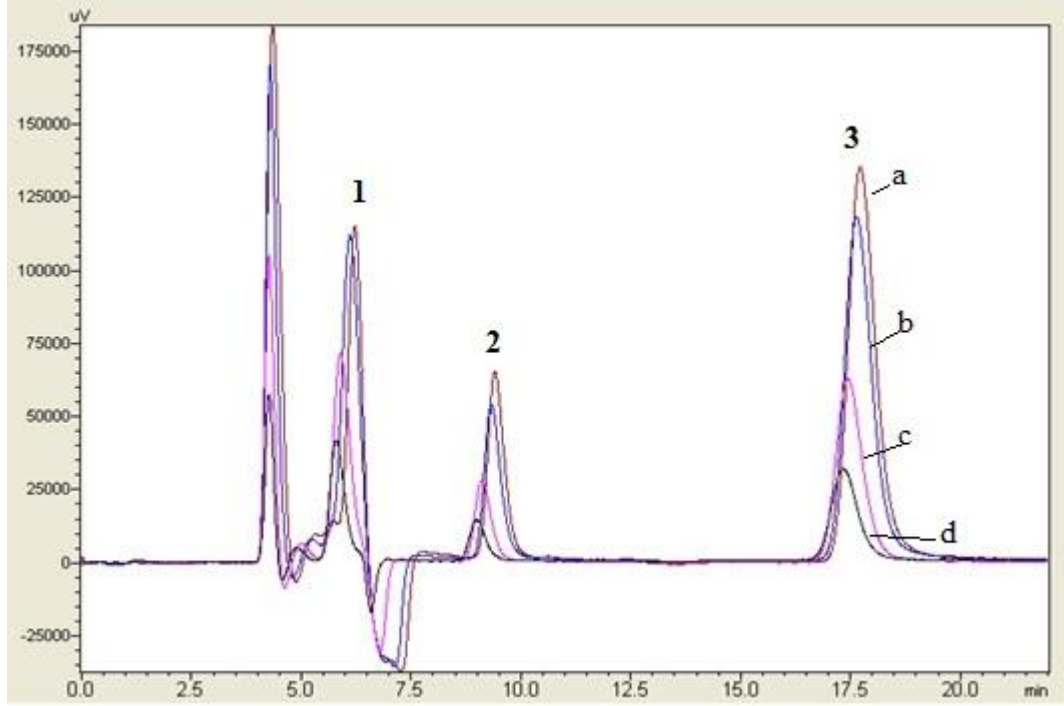
Analito	38°C		33°C		28°C	
	Média (área)	CV (%)	Média (área)	CV (%)	Média (área)	CV (%)
AMPA	1443394	3,66	1512661	0,96	1452510	1,0
Glifosato	1132197	0,74	1073030	0,92	1071543	0,92
Glufosinato	173616	5,14	176409	2,81	164298	3,02

CV= coeficiente de variação

5.1.8 Estudo do volume de injeção

O *loop* de injeção do equipamento é de 100 µL, e para a otimização do método foram estudados quatro volumes de injeção (50; 100; 200 e 300 µL) para uma mesma solução mista, de concentração 100 µg/L para analitos (AMPA, glifosato e glufosinato). Os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 20.

Figura 20. Cromatogramas de diferentes volumes de injeção: marrom (a) 300 μL ; azul (b) 200 μL (b); rosa (c) 100 μL ; e preto (d) 50 μL (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção variando de 50 a 300 μL , caixa de reação química: 33°C.



Pela análise dos cromatogramas e suas respectivas áreas de integração mostradas na Tabela 10, foi definido o volume de injeção de 200 μL como o mais adequado para os três analitos. Apesar das áreas de integração serem maiores para o glufosinato e glifosato para o volume de injeção de 300 μL , para o AMPA ela diminui e perde resolução de linha de base.

Tabela 10. Área de integração dos analitos em função do volume de injeção.

Volume de injeção μl	Área integrada - concentração 100 $\mu\text{g/L}$		
	AMPA	Glufosinato	Glifosato
50	1016583	358289	1305665
100	1977160	686880	2637767
200	2851300	1392569	4936315
300	2208449	1620200	5744713

5.1.9 Estudo da curva de calibração em diferentes solventes

Com o intuito de melhorar o cromatograma e evitar a perturbação que provoca um pico negativo próximo ao AMPA, buscou-se compatibilizar os padrões e a fase móvel. Para isso foi realizado o teste construindo a curva de calibração em diferentes solventes: água ultrapura; fosfato de potássio 0,010 M e metanol 8% com pH ajustado para 2,1 (fase móvel) e com fosfato de potássio 0,010 M apenas. Cada uma dessas curvas foi injetada em 6 pontos nas concentrações de 3, 10, 20, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/L}$ para cada analito. Os cromatogramas para cada uma das curvas estão mostrados nas Figuras 21, 22 e 23.

Figura 21. Curva de calibração em água ultrapura. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Concentrações de 3; 10; 20; 50; 75 e 100 $\mu\text{g/L}$ para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μL , caixa de reação química: 33°C.

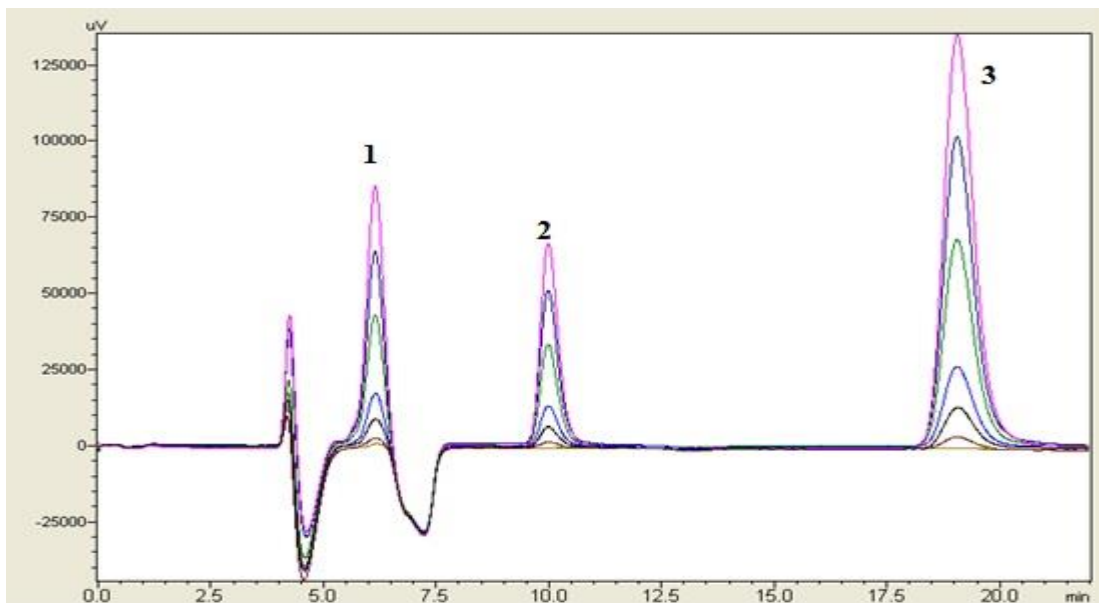


Figura 22. Curva de calibração em fosfato de potássio. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Concentrações de 3; 10; 20; 50; 75 e 100 $\mu\text{g/L}$ para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μL , caixa de reação química: 33 $^{\circ}\text{C}$.

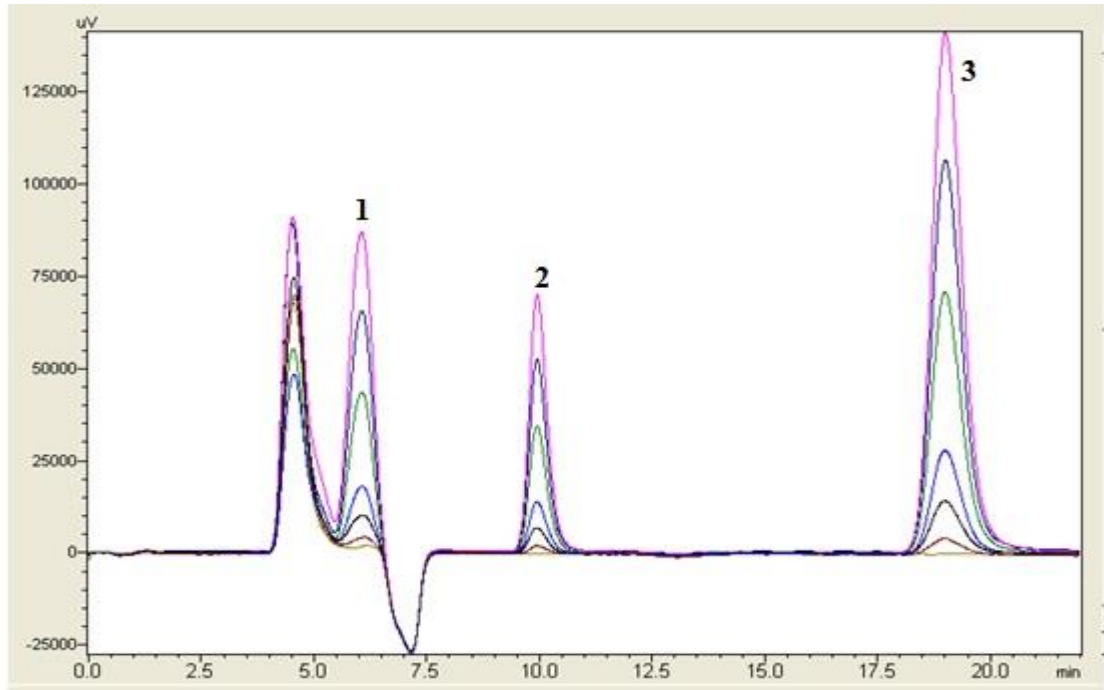
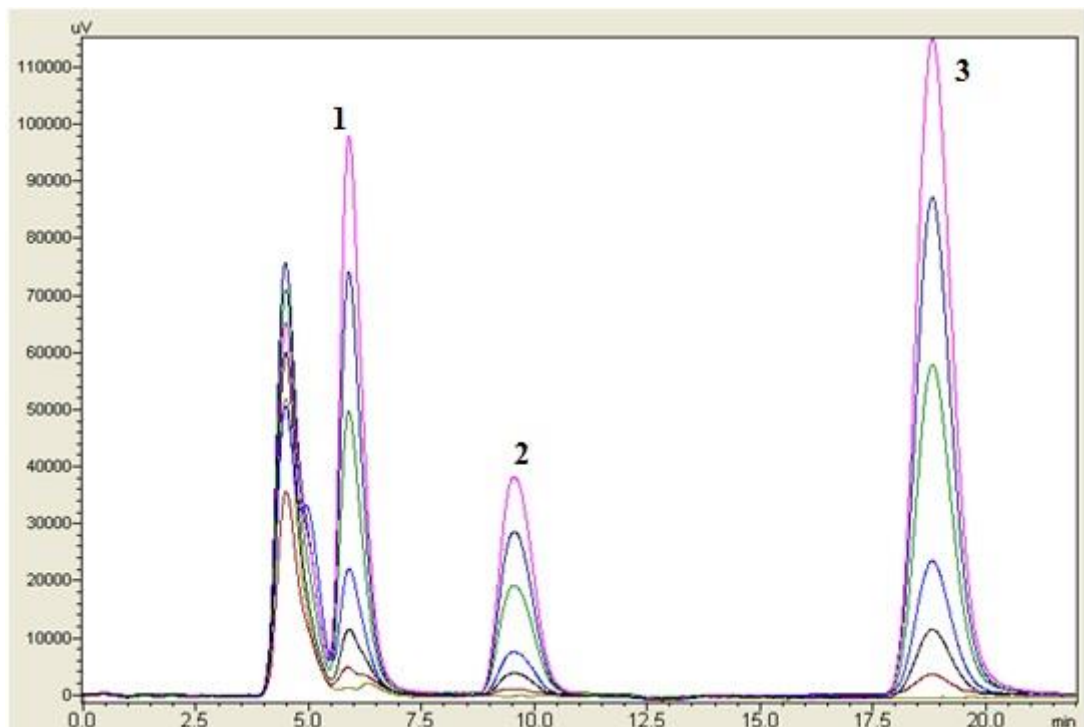


Figura 23. Curva de calibração em fase móvel. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Concentrações de 3; 10; 20; 50; 75 e 100 $\mu\text{g/L}$ para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μL , caixa de reação química: 33 $^{\circ}\text{C}$.



A Tabela 11 apresenta os valores de integração de cada ponto, em diferentes solventes. As injeções de cada ponto foram realizadas uma única vez. A equação da reta e os respectivos coeficiente de correlação r^2 para cada curva em diferentes solventes são apresentados na Tabela 12.

Tabela 11. Integração da curva de calibração para diferentes solventes

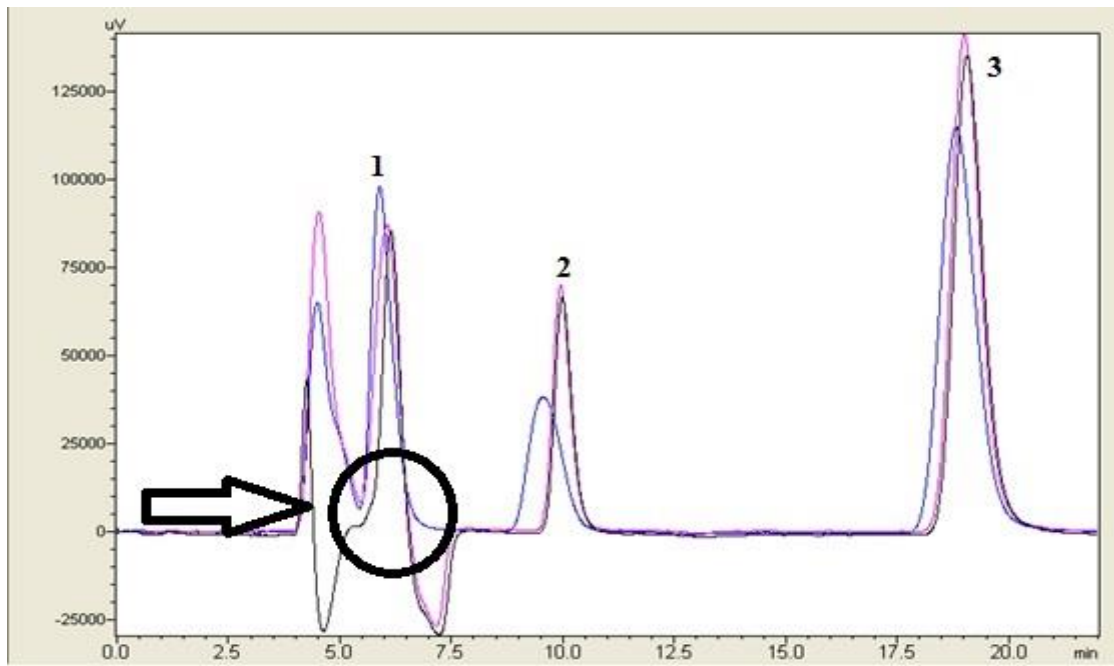
Analito	Concentração (µg/L)	Água ultrapura	Fase móvel	Fosfato de potássio 0.010 M
AMPA	3	84828	95930	62002
	10	217128	281470	323811
	20	447062	515877	578361
	50	1166431	1532378	1482858
	75	1676915	2280299	2203779
	100	2173513	3044878	2859719
Glufosinato	3	48409	34397	52476
	10	184685	171412	189142
	20	369095	387210	402881
	50	931716	961865	977327
	75	1429765	1461988	1465960
Glifosato	3	179373	155815	195838
	10	610365	629036	663078
	20	1218851	1306746	1330972
	50	3232713	3264398	3375879
	75	4848565	4934482	5030196
	100	6481119	6599386	6730195

Tabela 12. Equação da reta e coeficiente de correlação (r^2) para as curvas de calibração obtidas com diferentes solventes (água ultrapura, fase móvel e fosfato de potássio).

Analito	Solvente	Equação da Reta	r^2
AMPA	Água ultrapura	$y = 21867x + 20707$	0,9987
	Fase móvel	$y = 30804x - 32774$	0,9991
	Fosfato de potássio 0,010 M	$y = 28838x + 11731$	0,9992
Glufosinato	Água ultrapura	$y = 19005x - 8805,7$	0,9999
	Fase móvel	$y = 19877x - 23553$	0,9999
	Fosfato de potássio 0,010 M	$y = 19734x - 4545,8$	0,9999
Glifosato	Água ultrapura	$y = 65233x - 43185$	0,9999
	Fase móvel	$y = 66296x - 35759$	0,9999
	Fosfato de potássio 0,010 M	$y = 67360x - 8768,1$	0,9999

Na curva preparada com a fase móvel houve alargamento dos picos, o que pode prejudicar a análise se houver algum interferente na região dos analitos. Na curva preparada com solvente fosfato de potássio e fase móvel, percebe-se que para o analito AMPA perde-se resolução de linha de base, conforme pode ser observado na Figura 24.

Figura 24. Ponto da curva de calibração (100 µg/L) em diferentes solventes: água ultrapura (preto), fosfato de potássio (rosa) e fase móvel (azul). Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10µM, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 µL, caixa de reação química: 33°C.

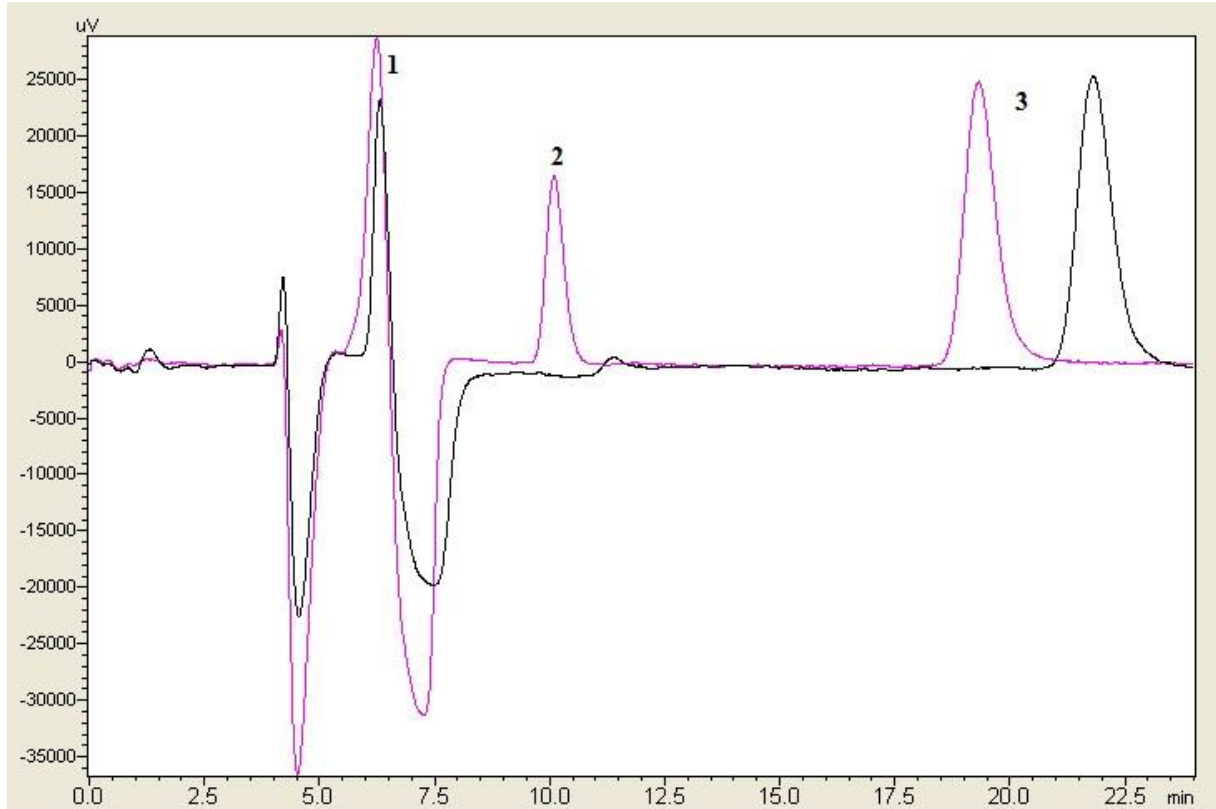


Optou-se pela praticidade e facilidade em se preparar a curva com água ultrapura.

5.1.10 Estudo da variação de pH

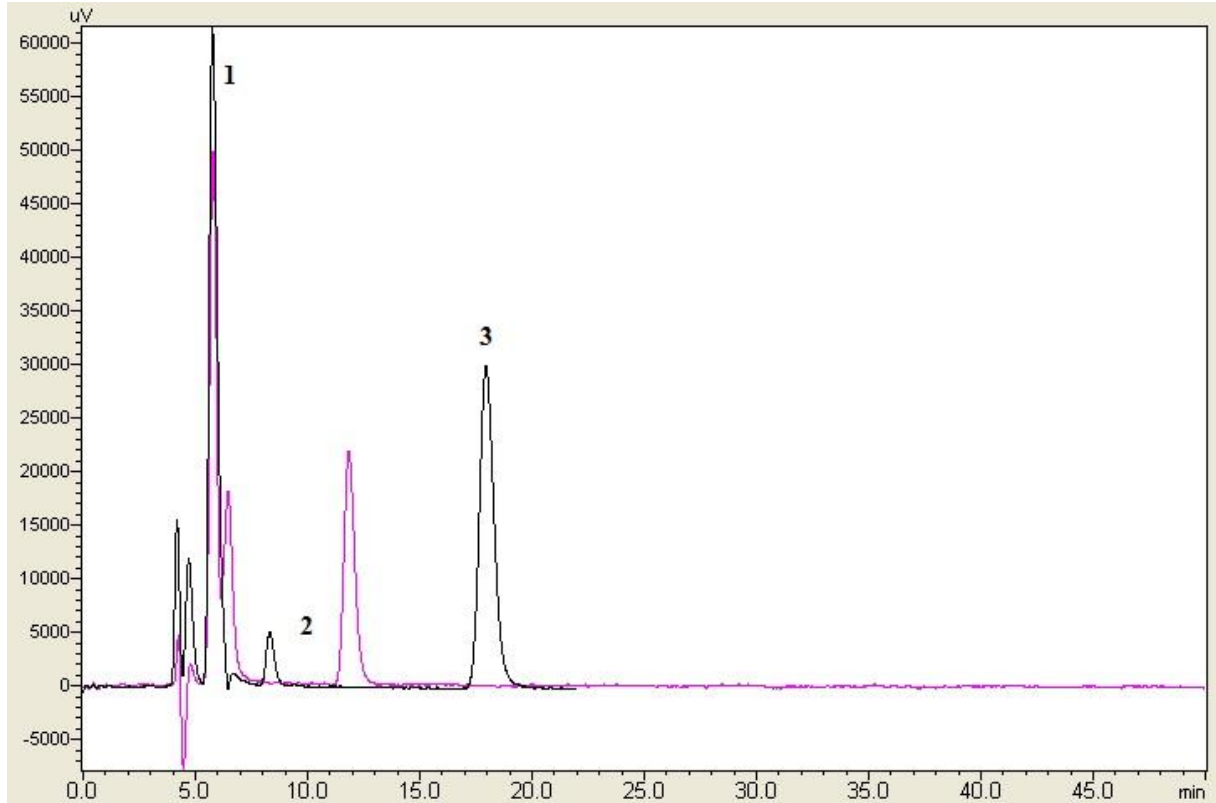
Foi realizado um estudo variando-se a concentração de pH da fase móvel e injetando-se pontos da curva para o pH 2,1 e 2,2. A Figura 25 mostra um dos cromatogramas obtidos de um dos pontos da curva. É possível perceber que quando aumenta-se o pH para 2,2, o pico do analito glufosinato desaparece e por esse motivo esse valor de pH foi descartado.

Figura 25. Estudo da variação de pH na fase móvel. Preto: pH 2,2 e rosa: pH 2,1. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Ponto da curva de calibração 25 µg/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10µM, metanol 8%, pH variando de 2,1 a 2,2; volume de injeção 200µL, caixa de reação química: 33°C.

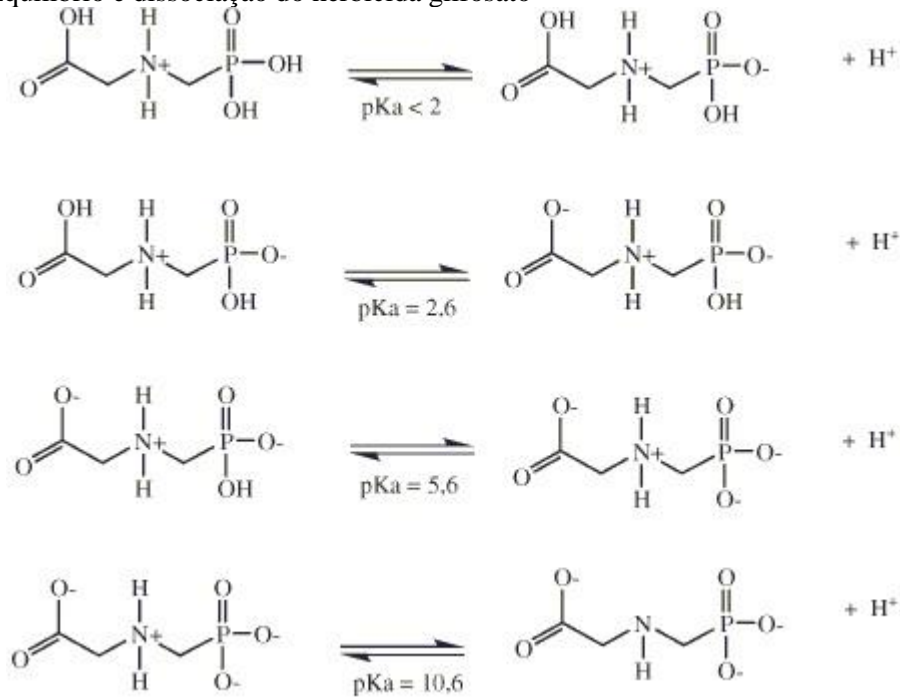


Realizou-se também um ensaio variando-se a concentração de pH da fase móvel entre 2,1 e 1,9. A Figura 26 apresenta um dos cromatogramas obtidos de um dos pontos da curva, onde é possível perceber que quando diminui-se o pH para 1,9 aumenta-se área do pico do glufosinato e perde-se em seletividade para o glifosato. Como pode ser observado na figura, aumentou-se o tempo de corrida para 50 minutos e mesmo assim não foi possível perceber sinal do pico do analito glifosato, ficando descartada a possibilidade de trabalhar com pH 1,9. A variação do pH em 0,1 unidades se mostrou como parâmetro crítico para a metodologia.

Figura 26. Estudo da variação do pH na fase móvel. Preto: pH 2,1 e rosa: pH 1,9. (1) AMPA; (2) glufosinato e (3) glifosato. Ponto da curva de calibração 100 $\mu\text{g/L}$ para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH variando de 1,9 a 2,1; volume de injeção 200 μL , caixa de reação química: 33 $^{\circ}\text{C}$.



O pK_a da primeira ionização do glifosato (Figura 27) é abaixo de 2, e manter o pH 2,1 da fase móvel garantiu a ionização da molécula e sua interação com a coluna aniônica. É possível também que o pH 1,9 não tenha favorecido a ionização e a formação do derivado OPA, o que justifica a ausência de resposta do glifosato no cromatograma.

Figura 27. Equilíbrio e dissociação do herbicida glifosato

Fonte: Coutinho e Mazo (2005).

5.1.11 Estudo da concentração das amostras por liofilização

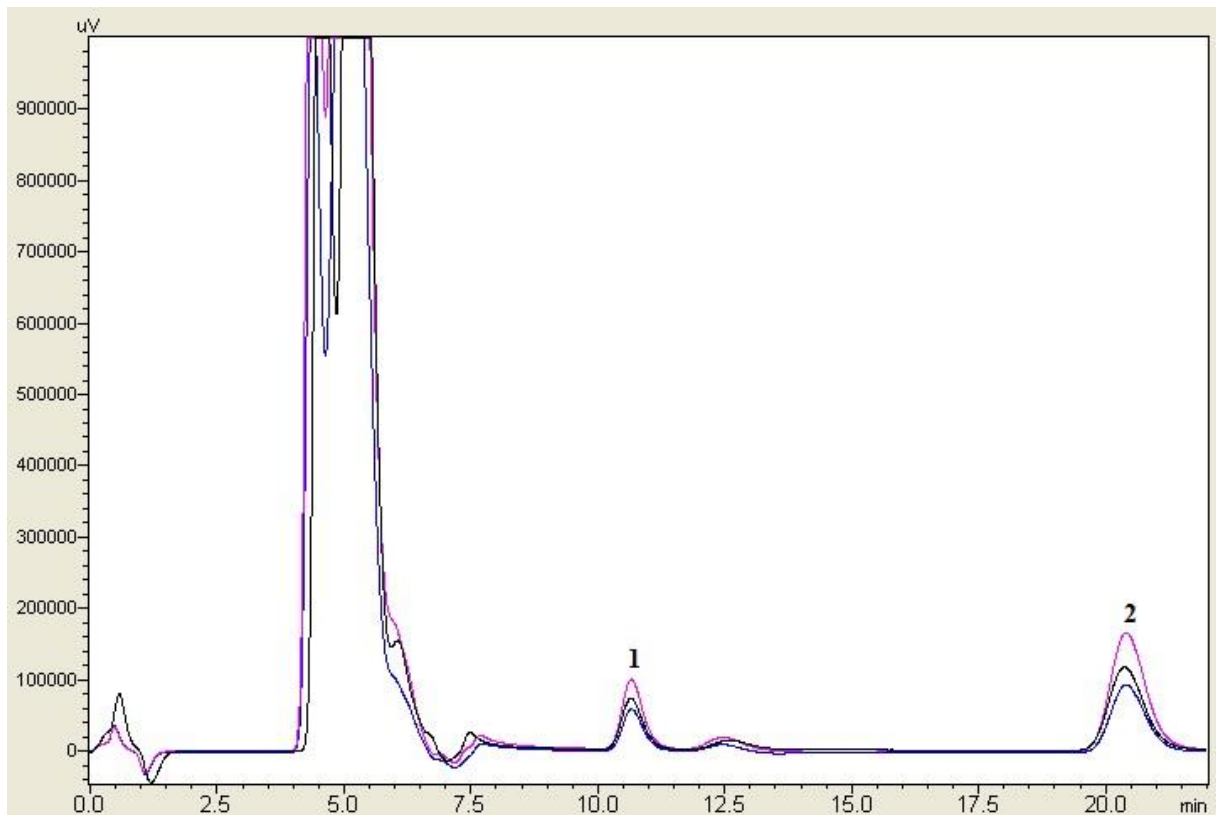
As concentrações de glifosato, AMPA e glufosinato em amostras reais coletadas em campo geralmente encontram-se em níveis bastante baixos. Há diversos métodos analíticos desenvolvidos nos quais o Limite de Quantificação (LOQ) é alto quando comparado às concentrações encontradas em amostras reais. Buscou-se então desenvolver um método com menor LOQ do método por meio da concentração das amostras por liofilização.

Na liofilização o produto congelado a uma temperatura abaixo de $-30^{\circ}C$ é submetido a alto vácuo, fazendo com que a água que foi transformada em gelo seja sublimada, ou seja, passe diretamente do estado sólido para o estado gasoso, resultando num produto final com uma estrutura porosa livre de umidade e capaz de ser reconstituída pela simples adição de água. Na literatura foi encontrado apenas um artigo que utiliza liofilização como técnica de pré-concentração para análise do herbicida glifosato e seu metabólito AMPA (Ramirez, Bellmund e Gardinali, 2014).

O procedimento de liofilização foi testado utilizando-se o liofilizador K105 a temperatura abaixo de $-70^{\circ}C$ e pressão inferior a $100\ \mu Hg$ (LIOBRAS). Inicialmente amostras de água superficial foram fortificadas em três níveis para cada analito: 10, 15 e $20\ \mu g/L$. Um volume de 5 mL de cada uma dessas amostras fortificadas foi liofilizado e ressuspenso em

500 μL , isto é, concentrado 10 vezes. Após injeção das amostras liofilizadas observou-se que não seria eficiente para o analito AMPA, em função de interferentes no seu tempo de retenção (vide cromatogramas na Figura 28). Entretanto, para os analitos glufosinato e glifosato o método se mostrou eficiente com recuperação entre 95 e 110%.

Figura 28. Amostra de água superficial, fortificada com 10, 15 e 20 $\mu\text{g/L}$, liofilizada e analisada. (1) glufosinato e (2) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μL , caixa de reação química: 33 $^{\circ}\text{C}$.



5.1.12 Acidificação das amostras

Na literatura há diversos procedimentos analíticos para análise de água, dentre os quais acidificação da amostra com ácido fosfórico até o pH 2,0 e filtração posterior com membrana de 0,45 μm antes da injeção no sistema HPLC (Silva, 2009). O procedimento faz com que ocorra decantação de ácidos húmicos dissolvidos nas amostras, que são removidos com procedimento de filtração, sem afetar os analitos.

O procedimento de tratamento com as amostras foi testado, injetando-se três amostras de água superficial acidificadas e três sem o procedimento de acidificação. Todas as amostras

foram fortificadas com a concentração de 100 µg/L de AMPA, glifosato e glufosinato. A inclusão dessa etapa não alterou as áreas do pico integradas para nenhum dos analitos. Com relação aos interferentes nos cromatogramas, não foi observada diferença significativa entre o procedimento com e sem acidificação.

O procedimento foi testado para amostras liofilizadas, no objetivo de reduzir os interferentes nas amostras concentradas. O volume de ressuspensão após a liofilização é pequeno (apenas 500 µl), e dessa forma não seria possível acidificar após a liofilização. Foi realizado um teste com seis amostras fortificadas, acidificando-se três amostras ao pH 2 antes do procedimento de liofilização, e as outras três amostras foram usadas para controle, sem a etapa de acidificação. A Figura 29 mostra os tubos *falcon* das respectivas amostras testadas, onde percebe-se que em todos os tubos cujas amostras foram acidificadas há formação de um precipitado amarelo no final do dito tubo. No cromatograma dessas amostras não foi possível detectar nenhum dos analitos (Figura 30), e assim optou-se em não acidificar as amostras nessa metodologia.

Figura 29. Acidificação das amostras: 3 amostras acidificadas (lado esquerdo) e 3 amostras não acidificadas (lado direito).

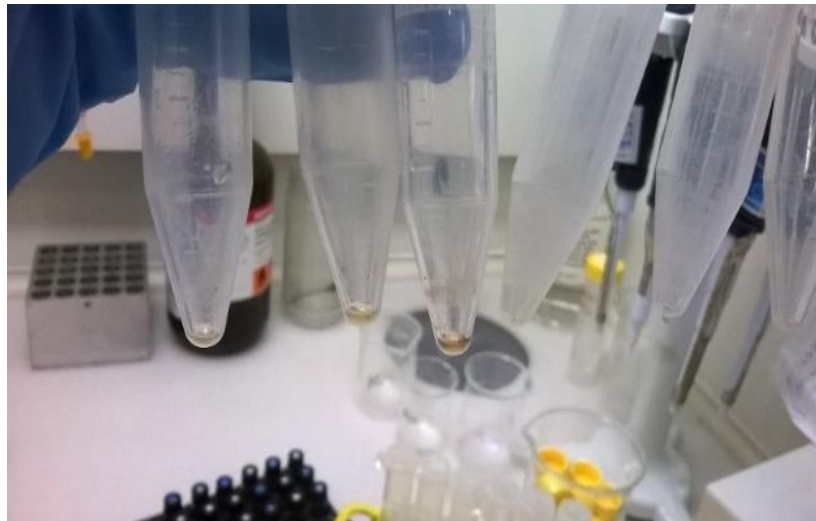
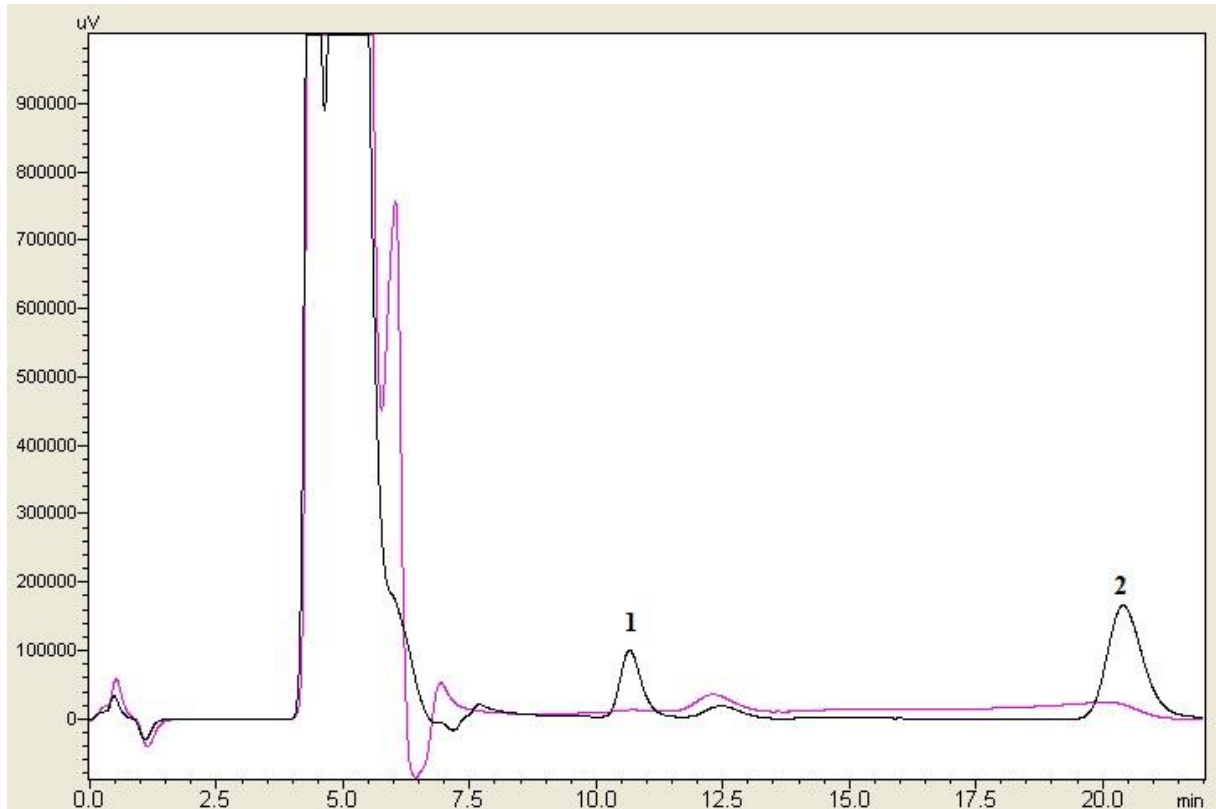


Figura 30. Cromatograma de amostras fortificadas com 10 µg/L. Preto: sem acidificação e rosa: acidificada. (1) glufosinato e (2) glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10µM, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200µL, caixa de reação química: 33°C.



5.2 Definição das condições cromatográficas

As condições cromatográficas finais do método otimizado foram as seguintes:

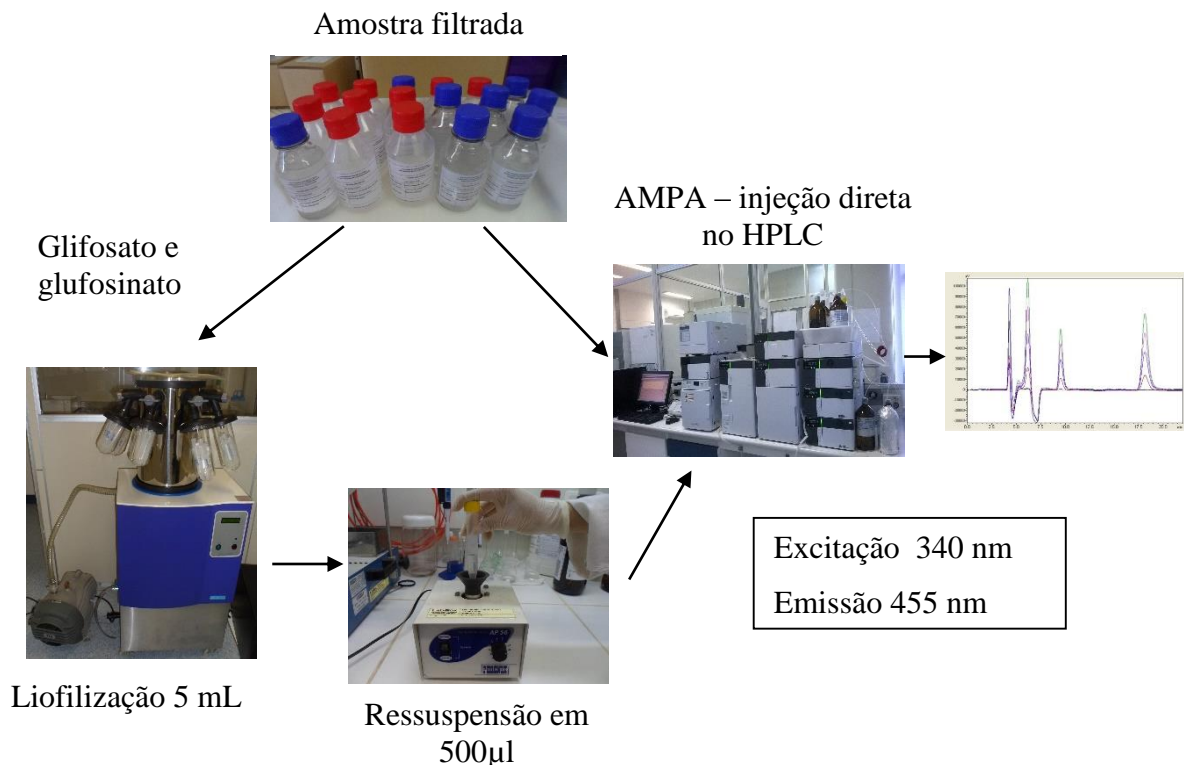
- ✓ Sistema de bombeamento isocrático, fluxo constante de 0,5 mL/min, fase móvel e soluções de derivatização pós coluna.
- ✓ Coluna de troca iônica da Hamilton (PRP-X100, 10 µm, 250x2,1 mm), acondicionada a 26°C
- ✓ Tempo de corrida: 22 min
- ✓ Volume de injeção: 200 µL
- ✓ Fase móvel isocrática: metanol 8% e fosfato de potássio 10 µM, pH = 2,1.
- ✓ Caixa de reação química: 33°C

Após eluição na coluna, o analito foi oxidado com hipoclorito de cálcio, o produto (glicina) reage com OPA a 33° C, e o produto fluorescente é detectado no detector de

fluorescência com excitação a 340 nm, com detecção de emissão a 455 nm. A quantificação do analito é feita contra uma curva analítica preparada em água ultrapura (Milli-Q).

Em resumo, no método de análise de glifosato e glufosinato em água e otimizado neste estudo, 5 mL da amostra de água é filtrada em um filtro de 0,45 µm e liofilizada, o resíduo ressuspensionado em 500 µL, homogeneizado em *vortex* e injetado no HPLC. Para análise de AMPA, a amostra não foi submetida ao processo de liofilização, e uma alíquota é injetada diretamente no sistema. A Figura 31 ilustra o procedimento de maneira esquemática.

Figura 31. Esquema geral do procedimento laboratorial de determinação de AMPA, glifosato e glufosinato em água por HPLC-fluorescência



5.3 Validação do método otimizado

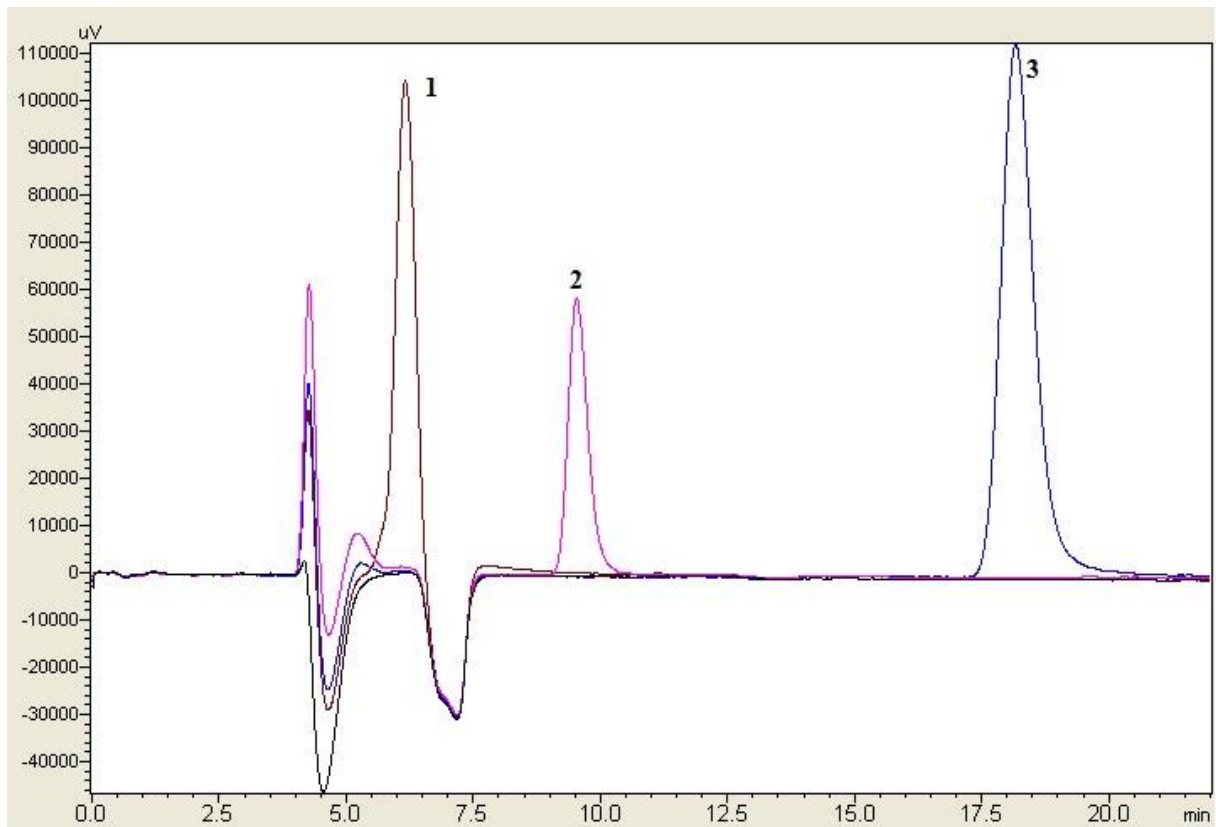
Após a definição do método otimizado, foram realizados ensaios para validação analítica de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Anvisa (Anvisa, 2006).

5.3.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método consistiu em injetar uma alíquota de amostra branca (água ultrapura) e compará-la com uma amostra fortificada com os respectivos analitos. A ausência de resposta, no mesmo tempo de retenção, para cada analito na matriz branca indica que o método é seletivo. O método de concentração das amostras por liofilização foi testado, liofilizando-se uma amostra branca, e uma amostra do branco fortificado.

A Figura 32 ilustra a seletividade do método por meio de cromatogramas obtidos da matriz branca e da matriz branca fortificada. A matriz branca não apresentou nenhum pico interferente no mesmo tempo de retenção dos analitos, indicando que as condições de extração e análise cromatográfica foram satisfatórias, e evidenciando a seletividade do método.

Figura 32. Ensaio da seletividade. Preto: branco (água ultrapura), marrom (1): AMPA; rosa (2) glufosinato e azul (3) glifosato. Ponto da curva de calibração 100 µg/L para cada analito. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10µM, metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200µL, caixa de reação química: 33°C.



Para o procedimento de concentração das amostras por liofilização, a metodologia analítica não se mostrou seletiva para o analito AMPA em função de picos interferentes no mesmo tempo de retenção desse analito (Figura 28 – seção 5.1.11).

5.3.2 Linearidade, intervalo da curva de calibração e faixa de aplicação

A linearidade de um método pode ser observada nas curvas de calibração e da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear (Inmetro, 2010).

A linearidade foi avaliada com a construção de uma curva analítica de 7 níveis em matriz branca fortificada com três replicatas autênticas. A homocedasticidade da curva foi avaliada pelo teste de *Cochran* (ISO, 2001). A Tabela 13 traz os valores calculados pelo teste de *Cochran* para cada analito, onde observa-se que para todos os analitos os valores calculados foram menores do que o valor tabelado, indicando assim homocedasticidade.

Tabela 13. Teste de Cochran para homocedasticidade considerando 7 níveis em triplicata.

Analito	C calculado
AMPA	0,462
Glufosinato	0,070
Glifosato	0,426
C tabelado = 0,561 (para K= 7; n=3)	

Após o teste de Cochran, ficou estabelecida a construção da curva analítica empregando regressão linear por mínimos quadrados. A correlação entre o sinal (área do pico) e a concentração da espécie é definida por uma equação matemática, que pode ser expressa como uma equação de reta:

$$y = ax + b$$

Sendo:

y = resposta medida ou sinal analítico

x = concentração do analito, variável independente

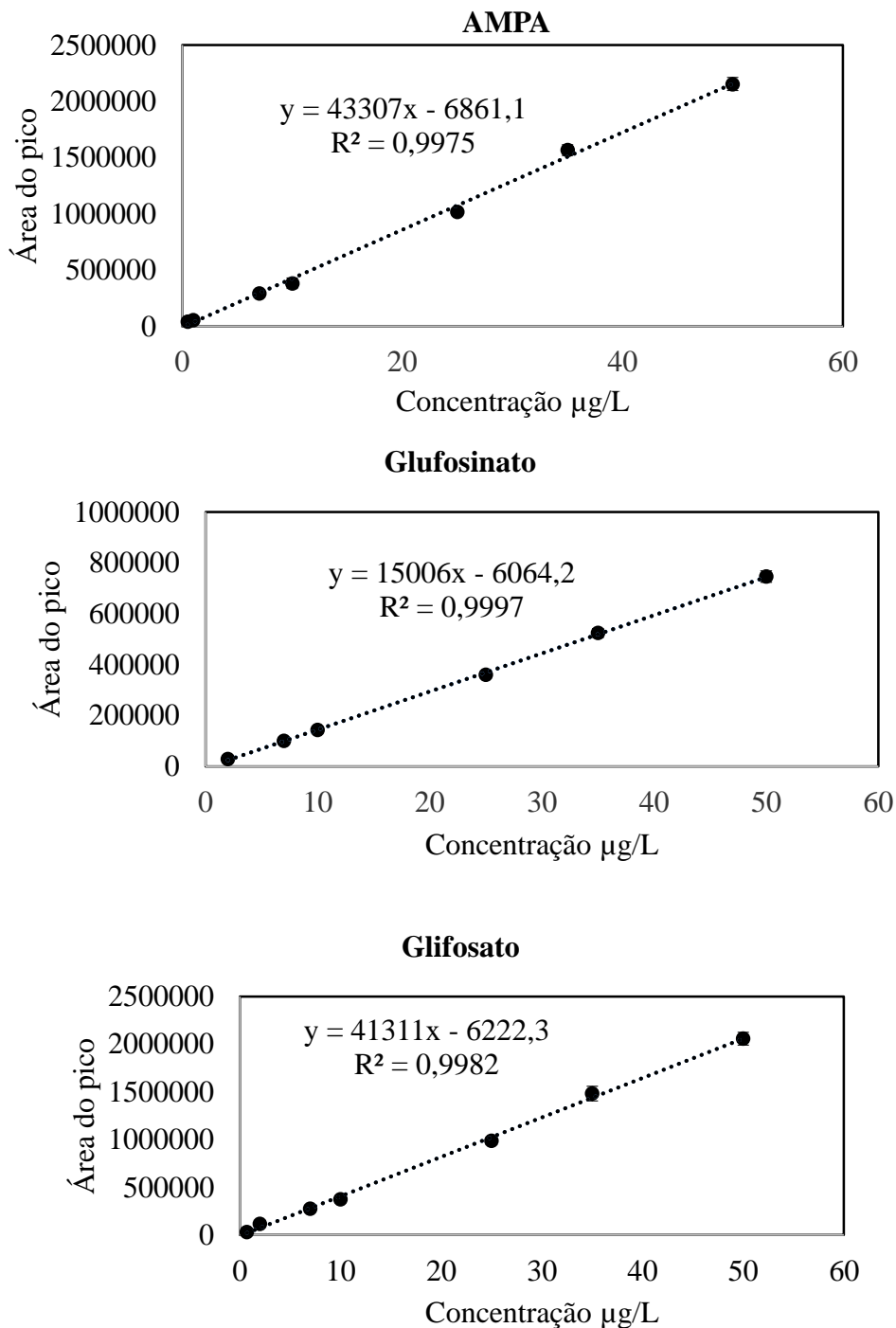
a = inclinação da curva analítica

b = intersecção da curva com a ordenada (coeficiente linear)

Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as curvas analíticas devem ser construídas por no mínimo cinco pontos (Ribani *et al.*, 2004). Além dos coeficientes de regressão a e b, foi calculado a partir de pontos experimentais o coeficiente de correlação r^2 . A recomendação do Inmetro para o coeficiente de correlação é de valores acima de 0,90, enquanto que a Anvisa recomenda valores superiores a 0,99 (Anvisa, 2003; Inmetro, 2003).

A linearidade foi avaliada por meio de 6 curvas analíticas da matriz branca fortificada nos níveis 0,5; 1; 7; 10; 25; 35 e 50 µg/L para AMPA: 2; 7; 10; 25; 35 e 50 µg/L para glifosato e 0,7; 2; 7; 10; 25; 35 e 50 para glufosinato (n=6 em cada nível). A curva analítica, a equação da reta e os respectivos coeficientes de correlação para cada analito são apresentados nas Figura 33.

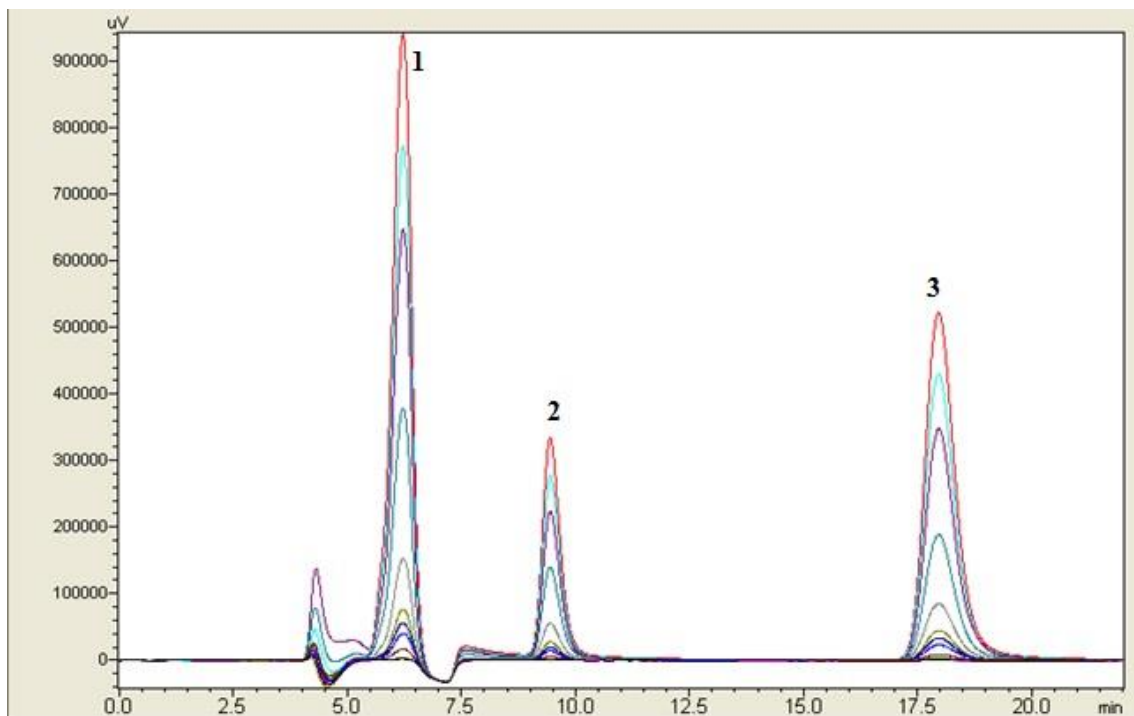
Figura 33. Curvas analíticas obtida para o AMPA, glufosinato e glifosato.



O intervalo da curva de calibração para quantificação das amostras ficou definido: 0,5, 1;10; 25; 35 e 50 $\mu\text{g/L}$ para AMPA; 2; 7; 10; 25; 35 e 50 $\mu\text{g/L}$ para glifosato e 0,7; 2; 10; 25; 35 e 50 para glufosinato. O último ponto da curva dos três analitos ficou definido como 50 $\mu\text{g/L}$, sabendo-se níveis acima deste valor não são esperados na água (Silva, 2009).

De acordo com a portaria brasileira do Ministério da Saúde nº 2.914 de dezembro de 2011 o VMP para glifosato é de 500 $\mu\text{g/L}$ isoladamente ou em combinação com seu principal metabólito, o AMPA. Foi realizado um teste injetando-se concentrações dos analitos em valores acima de 50 $\mu\text{g/L}$ até 600 $\mu\text{g/L}$, para testar se o método desenvolvido poderia ser utilizado em uma faixa acima do que é estabelecido na legislação. A Figura 34 apresenta os resultados da curva com injeções de concentração até 600 $\mu\text{g/L}$. O método indica valores significativos dentro dessa faixa de concentração e poderia ser utilizado para a quantificação até esse valor.

Figura 34. Curva de calibração no intervalo de 50 a 600 $\mu\text{g/L}$. 1. AMPA, 2. Glufosinato e 3. Glifosato. Condições: fase móvel: fosfato de potássio 10 μM , metanol 8%, pH 2,1; volume de injeção 200 μL , caixa de reação química: 33°C.



5.3.4 Precisão do sistema HPLC - FL

A precisão do sistema HPLC foi avaliada pela repetitividade e pela precisão intermediária utilizando-se matriz branca (água ultrapura) fortificada. A repetitividade é avaliada como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, pelo mesmo analista, com o mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e repetições em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, e indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias (Ribani et al., 2004).

Na avaliação da repetitividade e precisão intermediária, a matriz branca foi fortificada em 6 níveis diferentes: 0,5; 1; 10; 25; 35 e 50 µg/L para AMPA; 2; 7; 10; 25; 35 e 50 µg/L para glifosato e 0,7; 2; 7; 10; 25; 35 e 50 µg/L. A repetitividade foi avaliada pela análise de amostras fortificadas em sextuplicata no mesmo dia pela mesma analista. A precisão intermediária foi avaliada por 7 dias consecutivos para cada nível pela mesma analista, e para descrever a precisão e precisão intermediária do conjunto de repetições de dados foi utilizado o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV), que apresentam significância estatística para análise da precisão (Skoog, 2002).

Os resultados obtidos dos ensaios de precisão e precisão intermediária são apresentados na Tabela 14. Todos os analitos apresentaram CV menor que 20% para repetitividade e precisão intermediária em todos os níveis testados, demonstrando que o método apresenta precisão satisfatória para a faixa de concentração avaliada (Skoog *et al.*, 2008).

Tabela 14. Ensaio de repetitividade e precisão intermediária com matriz branca fortificada. Médias, coeficientes de variação (CV, %) e desvio padrão.

	Concentração em µg/L	Repetitividade n=6		Precisão intermediária n=7	
		Média (área)	CV (%)	Média (área)	CV (%)
AMPA	0,5	43356	7,1	30474	18,8
	1	53640	7,3	49338	16,5
	10	387845	10,9	240497	7,1
	25	1022770	4,2	715913	11,5
	35	1569952	2,7	942088	15,3
	50	2140704	2,4	1557630	16
Glufosinato	2	27474	11,5	32101	16,9
	7	98585	4,6	120084	15,3
	10	144135	3,0	183116	9
	25	362480	1,8	474009	15,1
	35	519867	3,1	683895	12,5
	50	742316	2,7	961185	13,8
Glifosato	0,7	30130	5,9	35028	17
	2	116045	6,3	335353	11,3
	10	378862	4,4	472837	13,9
	25	1002737	3,7	1326355	13,6
	35	1478085	4,6	1764275	12,5
	50	2053124	2,9	2655075	12,4

5.3.5 Precisão, e exatidão do procedimento de concentração de amostras por liofilização

Os parâmetros de exatidão, precisão e recuperação do método de concentração de amostras por liofilização foram avaliados pela comparação da concentração esperada e presente na amostra após a fortificação e liofilização, considerando as áreas dos picos dos analitos obtidos antes e depois da fortificação. O analito AMPA foi desconsiderado nesses ensaios já que sua determinação não envolve liofilização.

As comparações foram realizadas em 3 níveis de fortificação para glufosinato (0,3, 1,2 e 2 µg/L) e glifosato (0,2, 0,6 e 1 µg/L). Um volume de 5 mL da amostra fortificada foi liofilizado e o resíduo ressuspendido em 500 µL (concentração 10x), homogeneizado em *vortex* e injetado no sistema para análise. A repetitividade foi avaliada pela análise de amostras fortificadas em sextuplicata no mesmo dia pela mesma analista. A precisão intermediária foi avaliada em sextuplicata em 2 dias diferentes pela mesma analista. A recuperação média (exatidão), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) obtidos nos estudos de concentração das amostras por liofilização para análise de glufosinato e glifosato estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Ensaio de recuperação com matriz branca fortificada e liofilizada. Coeficientes de Variação (%CV), obtidos em 3 níveis de concentração.

	Conc. em µg/L	Repetitividade n=6		Precisão intermediária n=6	
		Média da recuperação (%)	CV (%)	Média da recuperação (%)	CV (%)
Glufosinato	3	72	1,8	72	2,6
	12	86	5,9	87	5,4
	20	94	4,0	91	3,4
Glifosato	2	74	2,1	73	3,0
	6	84	7,9	90	9,4
	10	82	9,1	86	9,9

Dado que os valores estabelecidos como aceitáveis para recuperação se encontram na faixa de 70-120%, pode se afirmar que a recuperação média do método para quantificação de glufosinato e AMPA em água está dentro dos valores regulamentados (Inmetro, 2010). As recuperações apresentaram valores acima de 70% para todos os níveis, com CV < 20%, indicado que o método tem boa precisão e exatidão (Anvisa, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

5.3.6 Robustez

Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$ ou o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH. Se estas

mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (Ribani, 2004).

Durante o processo de desenvolvimento do método, foram realizados vários testes de diversos parâmetros para otimizar o método como variação do pH, da concentração de metanol na fase móvel e variação da temperatura da caixa de reação. Esses testes foram consideradas para análise da robustez. Para os parâmetros de variação de metanol e temperatura do forno da caixa de reação química, o método se apresentou robusto, em termos de variação de pH o método não é robusto, sendo bastante sensível a pequenas variações de pH.

5.3.7 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Para os parâmetros acima, a resolução da Anvisa (Brasil, 2012) não menciona nenhum método a ser aplicado. O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida por um procedimento analítico. Na determinação do LOQ, é importante assegurar-se que os critérios de precisão e recuperação sejam atendidos neste nível de concentração do analito. Na literatura diversos trabalhos recomendam entre o sinal e o ruído da linha de base a razão de 2 ou 3:1 para o LOD. O LOD pode ser definido também pelo método visual, onde emprega-se a menor concentração visível de tal modo que o ruído e o sinal analítico possam ser distinguíveis (Ribani et al., 2004).

Neste trabalho o LOQ foi estabelecido como a mais baixa concentração que pode ser quantificada no equipamento, dentro dos parâmetros de precisão e exatidão. O LOD foi estabelecido como a metade do LOQ. A Tabela 16 abaixo apresenta os valores.

Tabela 16. LOD e LOQ do método desenvolvido e validado.

Analito	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)
AMPA	0,5*	0,25*
Glufosinato	0,3**	0,015**
Glifosato	0,2**	0,1**

*amostra não liofilizada, ** amostra liofilizada

Segundo o *Standard Methods* o limite de detecção reportado com tal método é de 25 µg/L para o glifosato e AMPA (Apha, 1998). O presente trabalho otimizou o método, com limites de detecção abaixo, sendo: 0,5 e 2 µg/L para AMPA e glifosato. Se a etapa de pré-concentração por glifosato for incluída no procedimento analítico, o limite de detecção pode ser reduzido até 0,2 µg/L.

5.4 Análise de amostras de água coletadas em campo na região de estudo

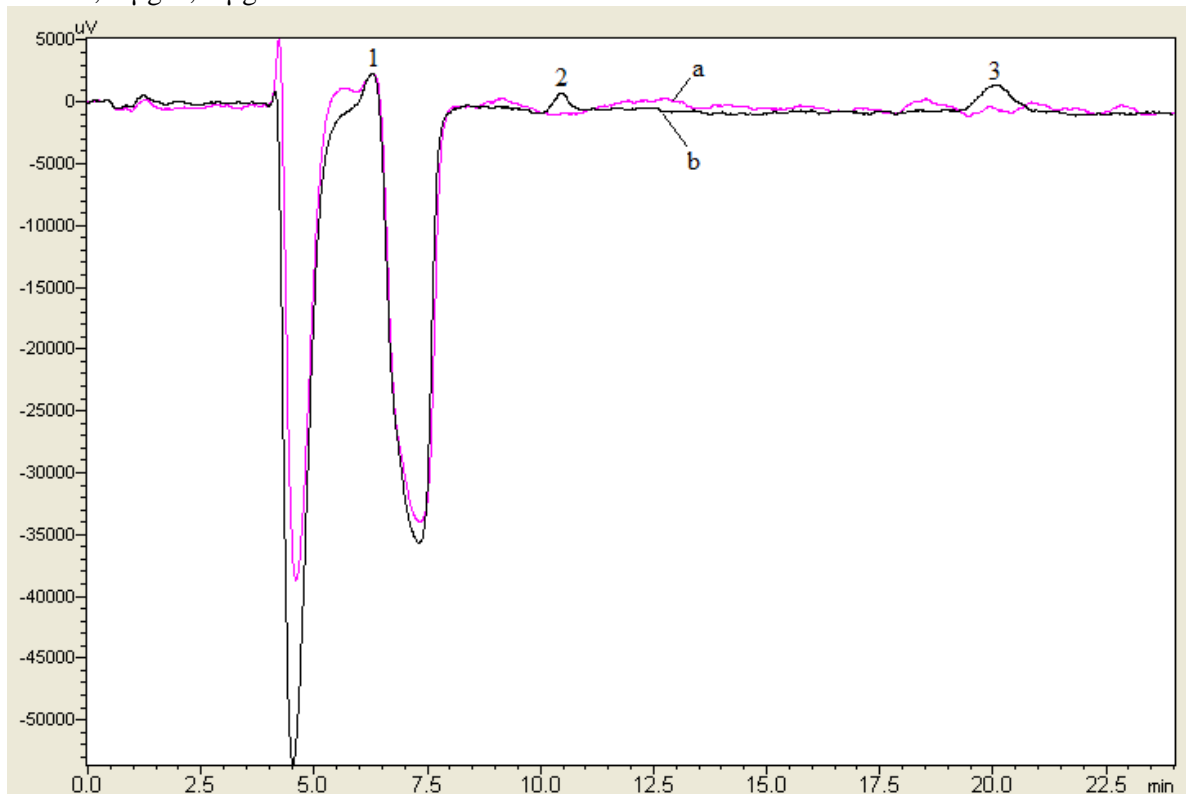
O protocolo analítico foi aplicado em 63 amostras de água provenientes de córregos situados em pequenas comunidades agrícolas adjacentes a grandes fazendas de soja, na região planalto do município de Santarém, região oeste do Pará, na Amazônia brasileira. As amostras coletadas foram analisadas em julho de 2015. Nas 33 amostras coletadas em 2012 e 2013 não foi detectada presença dos analitos AMPA, glifosato e glufosinato (< LOQ), ao passo que em 6 de 30 amostras coletadas em 2015 foi encontrado o analito AMPA (Tabela 17).

Tabela 17. Resultados das amostras positivas, coletadas em campo.

Amostra	Local	Data da coleta	AMPA (µg/L)
12/2015	Riacho verde	23/02/2015	0,86
13/2015	Riacho verde	23/02/2015	0,65
14/2015	Rio Moju	24/02/2015	0,65
15/2015	Rio Moju	24/02/2015	0,87
16/2015	Rio Moju	24/02/2015	1,21
30/2015	Reservatório	27/02/2015	1,93

Um dos cromatogramas obtidos das amostras positivas é apresentado na Figura 35.

Figura 35. Cromatograma da amostra 30/2015 (reservatório), concentração: 1,93 µg/L de AMPA. (1) AMPA, (2) glufosinato e (3) glifosato. (a) rosa: amostra real; (b) preto: curva, concentração: 2 µg/L AMPA; 3 µg/L; 2 µg/L.



A presença de AMPA nas amostras indica que em algum momento o glifosato esteve presente na água como um resultado da sua aplicação no campo e suscitou importantes questionamentos sobre o(s) risco(s) de exposição humana ambiental a tais compostos orgânicos, os quais atualmente são objeto de bastante controvérsia em termos de potencial tóxico ao ser humano (Fritschi *et al.*, 2015; Gasnier *et al.*, 2009).

As concentrações de AMPA encontradas nas amostras positivas estão abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira com a Resolução Conama nº 357, que prevê como limite máximo de glifosato na água doce para classe 1 o valor de 65 µg/L (BRASIL, 2005), e estão abaixo do que é estabelecido pelo ministério da saúde, VPM: 500 µg/L (BRASIL, 2011).

Apesar das concentrações serem baixas e compatíveis com as normas brasileiras para uso de água potável, é importante um monitoramento constante nos corpos hídricos próximos a regiões agrícolas que utilizam os agrotóxicos, a fim de melhor compreender os processos ambientais com relação aos impactos na bacia hidrográfica.

As amostras de água foram coletadas na região de Santarém em setembro de 2012, março de 2013 e fevereiro de 2015. As amostras foram mantidas a -20 °C e analisadas em junho de 2015. Todas as amostras positivas foram coletadas em fevereiro de 2015. É possível que

tenha havido degradação dos analitos durante o período de estocagem, inclusive para as amostras positivas de 2015, cujos os níveis detectados podem estar sub-estimados.

Um estudo sistemático poderia ser realizado posteriormente sobre os possíveis fatores físicos e/ou químicos que provavelmente influenciam o período máximo que se pode esperar para fazer as análises dos analitos glifosato, AMPA e glufosinato em amostras de água bruta sem que haja degradação e perda do analito.

Na literatura alguns autores sugerem recomendações para análise de agrotóxico em água, incluindo que a análise seja feita o mais rapidamente possível após a coleta (Parron, Muniz e Pereira, 2009). Se uma análise imediata não é possível, as amostras devem ser estocadas à temperaturas entre 2 e 5 °C, não mais que 2 a 3 dias. O período de estocagem das amostras pode ser mais longo apenas a temperaturas abaixo de -20 °C, em frascos plásticos (Spadatto *et al.*, 2004). Outros autores não indicam qual a forma adequada para armazenamento e preservação de amostra de água para esse tipo de análise em seus protocolos (Colombo e Masini, 2014; Silva, 2009).

5.3 Percepção de famílias de agricultores sobre os riscos ambientais e de saúde associados à expansão dos cultivos de soja em Santarém e Mojuí dos Campos

A expansão da soja em Santarém vem causando polêmica entre os moradores, principalmente em função da especulação criada a respeito dos danos ambientais advindos do desmatamento, da venda indiscriminada de pequenas propriedades, causando o êxodo rural e por todo tipo de degradação e poluição do meio ambiente local que já estão ou poderão acontecer na região (Carvalho e Tura, 2006).

O objetivo dessa seção do estudo foi analisar por meio de um questionário de cunho descritivo e exploratório as percepções de famílias de agricultores sobre os possíveis riscos ambientais e à saúde humana associados à expansão dos cultivos da soja na região rural de Santarém e Mojuí dos Campos.

O questionário em anexo foi aplicado de forma individual para um total de 28 pessoas de 3 comunidades, sendo 10 da comunidade de Açaizal, 10 da comunidade de Porto Alegre, e 8 da comunidade de Boa Sorte. As repostas dos indivíduos foram anotadas pela pesquisadora no momento da entrevista e analisadas posteriormente. Do total, 60% são do sexo masculino e 40% do sexo feminino, e cerca de 93% são naturais do município de Santarém. A faixa etária variou bastante, de 14 a 66 anos de idade.

Observou-se um nível socioeconômico muito baixo entre os entrevistados, com mais de 70% das pessoas com renda abaixo ou igual a um salário mínimo. A escolaridade da maioria das pessoas entrevistadas (94%) não passa do secundário incompleto, e cerca de 57% daquelas pessoas não completou o ensino fundamental. A Tabela 18 apresenta os dados sócio demográficos obtidos.

Tabela 18. Dados sócio-demográficos das comunidades rurais da região de Santarém e Mojuí dos Campos (PA).

(N= 28) - Frequência (%)		
Comunidade	Açaizal	36
	Boa Sorte	29
	Porto Alegre	36
Sexo	Masculino	61
	Feminino	39
Faixa etária	14 a 26	18
	27 a 39	25
	40 a 52	32
	53 a 66	25
Naturalidade	Santarém	93
	Outros	7
Escolaridade	Analfabeto	7
	Primário incompleto	50
	Primário completo	21
	Secundário incompleto	14
	Secundário completo	4
	Nível superior	4
Nível Socioeconômico	≥ R\$ 724,00	71
	≥ R\$ 1.448,00	18
	> R\$ 1.448,01	11
Trabalha na agricultura	Sim	100
	Não	0
Local de trabalho	Propriedade própria	100
	Grandes fazendas	0
Modelo de agricultura	Orgânico	82
	Convencional	18
Produção	Subsistência	11
	Abastecimento local	89

Todos os entrevistados são agricultores, e possuem seus pequenos pedaços de terra onde trabalham com agricultura de subsistência e abastecimento do comércio local. Cerca de 82% dos agricultores não utilizam agrotóxico e vários citaram que atualmente está difícil a plantação

de orgânico: “*as pragas aumentaram. Aqui tem um besouro que ataca a plantação. Na agricultura artesanal não dá para aplicar veneno. A mandioca está dando lagarta. Após a vinda dos sojeiros tudo está mudando*” (relato do entrevistado 12).

É possível observar nas declarações dos entrevistados mudanças no processo do manejo tradicional, com a introdução de inovações químicas e mudanças na biodiversidade local; segundo relato do entrevistado 8 “*Imagino que a fartura que tinha com o açaí hoje está acabando. O açaí diminuiu por causa do veneno. Os gaúchos jogam veneno, quando chove a enxurrada joga tudo onde tinha açaí*”.

A região agrícola de Santarém e Mojuí dos Campos está passando por um rápido crescimento de atividades agrícolas de larga escala, especialmente as monoculturas de soja, o desmatamento da floresta tropical, e a mudança de vida de pequenas comunidades tradicionais, o que ficou evidenciado durante as entrevistas. Com base nas respostas obtidas sobre os processos de mudanças, algumas questões são apresentadas de forma esquemática na Tabela 19.

Tabela 19. Percepção de mudança em famílias de pequenos agricultores da região de estudo.

		(N= 28) Frequência (%)
Com relação à agricultura, o que mudou na região em Santarém nos últimos anos ou em sua comunidade	Perspectiva positiva: oportunidade de emprego, uso da tecnologia na agricultura	29
	Perspectiva negativa: como diminuição da agricultura familiar, aumento do número de praga e/ou contaminação da água	61
	Perspectiva positiva e negativa	11
Pretende ficar na região de Santarém	Sim	96
	Não	4
Gostaria que seus filhos ficassem aqui?	Sim	71
	Não	29
Conhece pessoas que já saíram da região?	Sim	96
	Não	4
Porque as pessoas se mudaram da região?	Má qualidade das estradas, transporte e/ou falta de energia elétrica	36
	Saíram em busca de uma melhor qualidade de vida e/ou trabalho	50
	Outros	14

		(N= 28) Frequência (%)
Como você vê a sua vida, da sua família, para sua comunidade daqui a 10 anos	Associou a perspectivas positivas, como acesso à escola, saúde, qualidade de vida e transporte	43
	Associou a perspectivas negativas como contaminação da água venda, de terras, ocupação da soja e diminuição do número de pessoas na comunidade.	46
	Associou a aspectos positivos e negativos	11

A contaminação pode ocorrer pela dispersão do ar e atingir as casas, contaminando os moradores da região que sequer trabalham na agricultura utilizando esses produtos químicos. Informações obtidas através do questionário indicam risco de exposição à agrotóxicos, principalmente pela via respiratória; quando passam nas estradas próximos a lavoura, alguns relataram que: “**respigam gotículas de veneno no corpo**” (Relato entrevistado 9). É importante ampliar as possibilidades de análise em outras matrizes, como solo, ar, urina e sangue, para subsidiar uma avaliação dos possíveis efeitos sobre a saúde desta população e sobre o meio ambiente.

Pouco mais de 92% dos entrevistados tem noção do perigo à saúde que os agrotóxicos podem trazer; segundo relato da entrevistada 11: “**quando eles jogam veneno, sinto dor de cabeça. Fico tonta**”. Cem por cento dos entrevistados percebe que o mesmo pode contaminar a água e peixes, e a maioria alegou não beber água dos igarapés (78%), dizendo não considerar a água do igarapé própria para o consumo.

Somente 17,8% dos agricultores entrevistados disseram incorporar em suas práticas as técnicas utilizadas em grandes fazendas. Um fato relevante é que os moradores das comunidades não conseguem emprego nas grandes fazendas. Segundo relatos: “**Os sojeiros não dão serviços para os comunitários; trazem tudo de fora (pessoas e máquinas) e não dão trabalho, serviço para as pessoas locais**” (entrevistado 7). Mais de 60% veem o aumento da agricultura na região de maneira negativa, e somente 4% deles disseram querer sair da região, mas quase 30% gostaria que seus filhos buscassem um lugar com melhores perspectivas de futuro.

Quase 100% deles conhece pessoas que se mudaram dali em busca de um futuro melhor, sendo que 50% das pessoas mencionadas foram em busca de qualidade de vida. Quanto às perspectivas de futuro, os agricultores se mostraram divididos, em geral não sabem se a vida pode melhorar ou piorar com o avanço da fronteira agrícola.

As fazendas que plantam soja são altamente mecanizadas e seus proprietários são originários das regiões sul e centro-oeste do Brasil. Eles têm escolaridade superior e dominam bem as noções de base em agronomia, contrariamente aos pequenos agricultores familiares do interior da região de estudo. Segundo o entrevistado número 1: “*Se continuar com as pessoas vendendo terreno para os gaúchos, vai acabar as comunidades. O preço por hectare é de R\$ 1.000,00*”.

Nas falas dos trabalhadores, percebe-se as dificuldades encontradas para a manutenção de suas atividades agrícolas, sejam elas de infraestrutura ou financeiras. Segundo o entrevistado número 2: “*Quando iam trazer a soja, disseram para agente que iria trazer desenvolvimento, porém as áreas que eles utilizam são grandes, mas os funcionários são poucos*”. O agronegócio é um modelo agrícola que aumenta a produtividade, mas também incentiva a monocultura em grandes extensões de terra, causando a perda da biodiversidade e excluindo pequenos agricultores familiares, que sobrevivem da produção em pequena escala, causando entre outros, o êxodo rural. Tal prática traz consigo impactos sociais, ao meio ambiente e à saúde humana (Delgado, 2010). Os dados de percepção de risco ambiental são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Percepção de risco ambiental

(N= 28) Frequência (%)		
Utiliza agrotóxico	Não	79
	Sim (glifosato)	21
O trabalho na agricultura pode trazer alguma problema para sua saúde	Sim	39
	Não	57
Intoxicou com agrotóxico	Sim	36
	Não	64
Agrotóxicos pode trazer problema para saúde	Sim	93
	Não sabe	7
Agrotóxico causa contaminação das águas e dos peixes	Sim	100
	Não	0
Bebe água do Igarapé	Não	79
	Sim	21
Qual a qualidade dos igarapés	Não sei	7
	Boa	18
	Ruim	75
Utiliza técnicas de agricultura aprendidas em grandes fazendas da região	Sim	18
	Não	82

Abaixo, estão presentes as fotos que descrevem e mostram diversas situações presentes no cotidiano dos agricultores da região de estudo. O trabalho de campo para coleta de amostras

de água e aplicação de questionário se mostrou muito importante para evidenciar algumas características do local, tais como: biodiversidade presente nas pequenas comunidades, como plantas da região e pequenas plantações, como pimenta, contrastando com os grandes plantações de soja. Além de haver a monocultura, há também a retirada da vegetação nativa, responsável pela manutenção do equilíbrio no ecossistema local.

Conforme pode ser observado na Figura 36, é comum a aplicação de agrotóxico ao lado de pequenas comunidades tradicionais da região, e grande parte do território é atingida por essas substâncias químicas assim como diferentes grupos populacionais estão envolvidos (Inouye *et al.*, 2015). Vários entrevistados relataram que a qualidade da água diminuiu: “*água fica suja, a água fica estranha*” (relato entrevistado 10). Na comunidade de Açaizal alguns relataram uma série de problemas relacionados à saúde dos moradores da comunidade: “*quando começou a utilizar o agrotóxico aqui várias pessoas da comunidade começaram a ter coceiras na pele, problema de pele*” (relato entrevistado 7).

Figura 36. Gafanhoto pulverizando agrotóxico na lavoura próximo à comunidade de Porto Alegre, Santarém – PA. (Janeiro de 2014).



Fonte: Autora

É inquestionável que a utilização de agrotóxicos é hoje uma ferramenta de grande importância para produção agrícola, entretanto é preciso que essa ocorra de forma produtiva, saudável e sustentável e não afete a vida de comunidades tradicionais.

As implicações quanto à aplicação de agrotóxico na agricultura estão relacionadas principalmente à qualidade ambiental, como por exemplo, em Santarém diversos igarapés tiveram suas águas comprometidas. Há riscos para as comunidades aquáticas e para populações ribeirinhas que se utilizam destas águas para pesca e/ou recreação, e para populações que utilizam águas para consumo humano.

Conforme pode ser observado na Figura 37 do córrego tributário do Rio Moju, há crianças tomando banho e uma pessoa lavando verdura que provavelmente será utilizada na alimentação. É importante destacar que o córrego passa por grandes áreas de lavoura até chegada desse ponto.

Figura 37. Córrego tributário do Rio Moju. Santarém – PA (Fevereiro de 2015).



Fonte: Autora.

A paisagem da região do planalto de Santarém é atualmente dominada por grandes áreas de cultura de soja, as quais rodeiam comunidades menores de pequenos agricultores. Em muitas áreas só permaneceram algumas poucas casas espalhadas, e conforme observa-se na Figura 38 a plantação de soja encontra-se a poucos metros da estrada e envolve pequenas propriedades rurais como as da imagem. Nota-se também o cultivo de alimentos orgânicos, em pequenas hortas próximas a grandes plantações de soja.

O avanço da soja no bioma amazônico traz consigo importantes mudanças de uso da terra, com consequentes riscos de processos de contaminação ambiental tanto terrestre quanto aquática, o que por sua vez gera conflito socioambiental devido, entre outras coisas, aos riscos à saúde humana de pequenas comunidades tradicionais. É razoável considerar a possibilidade de contaminação dos cursos d'água e poços dos quais se abastecem a população.

Figura 38. Comunidade rural da região do Planalto de Santarém – PA (Fevereiro de 2015).



Fonte: Autora.

A crescente utilização de glifosato torna importante a avaliação constante de suas concentrações no ambiente, visto que eventuais contaminações ambientais podem representar importantes vias de exposição humana, com potencial de danos à saúde humana e à biodiversidade.

O desmatamento da região é grande e afeta a qualidade da bacia hidrográfica que sofre vários impactos como a eliminação de matas de galerias em áreas de preservação permanente, impermeabilização do solo, e erosão formada pelo escoamento superficial indisciplinado, além de deposição de solo gerado pelos processos de assoreamento (Aguiar, Peleja e Sousa, 2014).

Na Figura 39, observa-se a Escola Municipal de Ensino Fundamental São Francisco completamente cercada por lavoura de soja, e demonstra que a ocupação do solo não é feita de maneira adequada e pode impactar negativamente a qualidade de vida da comunidade.

Figura 39. Escola Municipal de Ensino Fundamental São Francisco. Comunidade Boa Sorte, Município de Mojuí dos Campos-PA (Março de 2013).



Fonte: Autora

Na Figura 40, é possível visualizar uma das salas de aula da Escola Municipal São Francisco. Observa-se que não há uma vedação própria entre os alunos e a área de cultivo, e a parede apresenta várias frestas que possibilitam a entrada de agrotóxicos por dispersão do ar com facilidade.

Figura 40. Visão interna da sala de aula da Escola Municipal de Ensino Fundamental São Francisco. Comunidade Boa Sorte, Município de Mojui dos Campos-PA (Fevereiro de 2015).



Fonte: Autora.

A fotografia da Figura 38 foi tomada em março de 2013 e a da Figura 39 em fevereiro de 2015, sendo assim a produção contínua e evidencia o estabelecimento da área de cultivo de soja próximo da escola.

O entrevistado número 2 relata: “*A reclamação maior com relação a saúde é na escola que fica no meio da plantação de soja. Os alunos reclamam do cheiro, de coceira nos olhos*”.

É preciso realizar estudos sobre as consequências da exposição humana ao agrotóxico glifosato. Poucos estudos têm-se centrado na mobilidade de glifosato e seus derivados em ambientes aquáticos e na cadeia alimentar, particularmente no contexto amazônico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados dos parâmetros avaliados na validação (Seletividade, Linearidade, LOQ, precisão, exatidão e robustez) mostram que o método analítico otimizado neste estudo pode ser aplicado em amostras reais. O procedimento de concentração por liofilização mostrou-se satisfatório para os analitos glufosinato e glifosato, porém o método deverá ser melhorado para aplicação utilizando o analito AMPA.

Glifosato e glufosinato não foram detectados nas 63 amostras de água coletadas em córregos situados em pequenas comunidades agrícolas adjacentes a grandes fazendas de soja na região rural dos municípios de Santarém e Mojuí dos Campos, oeste do Estado do Pará. AMPA foi detectado em 6 amostras analisadas, sugerindo que o monitoramento de glifosato e seu subproduto de degradação na água é de grande relevância devido à ampla utilização do herbicida. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, que observaram que o glifosato é rapidamente degradado após a aplicação.

Os resultados obtidos experimentalmente indicam que os córregos da região de Santarém e Mojuí dos Campos foram contaminados com glifosato e AMPA em algum momento da aplicação. As informações fornecidas pelos próprios agricultores por meio do questionário indicam altas chances de riscos de exposição humana aos agrotóxicos, principalmente pelas vias dérmica e respiratória.

Os dados deste estudo são de grande importância para o planejamento de estratégias de monitoramento ambiental na região, e portanto de grande valia para a população local e regional. É importante ampliar as possibilidades de análises em outras matrizes, como solo, ar, urina e sangue, para subsidiar uma avaliação dos potenciais efeitos sobre a saúde desta população e sobre o meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS

- 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. **Congresso virtual iberoamericano sobre gestión de calidad en laboratorios 2006**. Disponível em: <
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/13663/1/artcongressA64.pdf>>. Acesso em: 12 de abr. 2015.
- ABDULLAH, M.P.; DAUD, J. HONG, K.S.; YEW, C.H. Improved method for the determination of glyphosate in water. **Jornal of Chromatography A**. v. 697, p. 363-369, 1995.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário**. Disponível em: <
www.agricultura.gov.br/serviços-e-sistemas/sistemas/agrofit> Acesso em: 02 de maio de 2015.
- AGUIAR, C. P. O.; PELEJA, J. R. P.; SOUSA, K. N. S. Qualidade da água em microbacias hidrográficas com agricultura nos municípios de Santarém e Belterra, Pará. **Revista árvore**, v. 38, 2014.
- ALBUQUERQUE, A. W.; LOMBARDI NETO, F.; SRINIVASAN, V. S.; SANTOS, J. R.. Manejo da cobertura do solo e de práticas conservacionistas nas perdas de solo e água em Sumé, PB. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 1, p. 136-141, 2002.
- AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L., Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, v. 25, p. 420-428, 2002.
- ANVISA. **Diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins de 16 de janeiro de 1992**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 03/MS/SNVS 1992.
- ANVISA. Resolução RE. nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos**, 2003.
- ANVISA. **Guia para qualidade em química analítica: um assistência à habilitação**, 2006.
- APHA, A. P. H., ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20th. WASHINGTON: APHA, 1998.
- ARMAS, E. D. D; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B.; ABAKERLI, R. B. Spatial-temporal diagnostic of herbicide occurrence in surface waters and sediments of Corumbataí River and main affluents. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

BARBOSA, A. M. C. **O monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil: uma avaliação crítica**. 2013. 115 f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina: Londrina: 115 p. 2013.

BATTAGLIN, W. A.; KOLPIN, D. W.; SCRIBNER, E. A.; KUIVILA, K. M.; SANDSTROM, M. W. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, 20021. **Journal of the American Water Resources Association (JAWRA)**, p. 323-332, 2005.

BAYER, C. S. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos**: Finale. São Paulo: Brasil, 2011. Disponível em: <
http://www.bayercropscience.com.br/produtos/downloads/Finale%20FISPQ_Atualizada_04_11.pdf>. Acesso em: 11 de maio 2015.

BELO, M. S. S. P.; PIGNATI, W., P.; DORES, E. F. G. C.; MOREIRA, J. C.; PERES, F., Uso de agrotóxicos na produção de soja do estado do Mato Grosso: um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 78-88, 2012.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989: Dispõe sobre a pesquisa, 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 ea fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Legislação federal de agrotóxicos e afins**: Ministério da Agricultura e do Abastecimento Brasília, 1998.

BRASIL. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**. Secretaria de vigilância em saúde. Ministério da Saúde: Brasília, 2006.

BRASIL. **Portaria nº 2.914**. Ministério da Saúde. Brasília-DF: Diário Oficial da República Federativa do Brasil 2011.

BRASIL. **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Seção 1. Brasília, DF, 18 de março de 2005.

BRASIL. Lei, nº12.651, de 25 de maio de 2012: Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Novo Código Florestal**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2012.

CARNEIRO, F. F. **Dossiê ABRASCO**: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte III: Agrotóxicos, Conhecimento Científico e Popular: construindo a ecologia de saberes. In: (Ed.). São Paulo: Expressão Popular, v.1, p.624. 2015.

CARVALHO, V.; TURA, L. A expansão do monocultivo de soja em Santarém e Belterra: injustiça ambiental e ameaça a segurança alimentar. **Encontro da rede de estudos rurais**, 2006.

CASTRO, A. S. **Avaliação pontual da degradação e transporte do herbicida glifosato no solo da bacia do Arroio Donato - Pejuçara (RS)**. 2005. 82 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

COELHO, R.; BUFFON, I.; GUERRA, T. Influência do uso e ocupação do solo na qualidade da água: um método para avaliar a importância da zona ripária. **Revista Ambiente & Água**, v. 6, n. 1, p. 104-117, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo: Editora Unicamp, 2006.

COLOMBO, S.M; MASINI, J.C. A sequential-injection reversed-phase chromatography method for fluorimetric determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid. **Analytical methods**. v. 6, p. 490-496.

CONAB. **Séries históricas de área plantada, produtividade e produção, relativas às safras 1976/77 à 2014/15 de grãos**. 2014. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos >. Acesso em: 13 de maio de 2015.

COUTINHO, C.F.B; MAZO, L.H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1038, 2005.

COWELL, J.E.; KUNSTMAN, J.L.; NORD, P.J.; STEINMETZ, J.R.; WILSON, G.R. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosphate and metabolite: an interlaboratory study. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 34, p. 955-960. 1986.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F. D.; OLIVEIRA, R. T.; ANDRADE, A. J. M.; DALSENTER, P. R.; LANGELOH, A. Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665-673, 2007.

DELGADO, N. G. O papel do rural no desenvolvimento nacional: da modernização conservadora dos anos 1970 ao Governo Lula. BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Brasil rural em debate**. Brasília: CONDRAF/MDA, p. 28-78, 2010.

EGEIS. **Water Quality and Environmental Consultancy**. SOURCE, 2010.

EPA. **Drinking Water Contaminants**. AGENCY, U. S. E. P. 2009.

FARIA, N. M. X.; ROSA, J. A. R.; FACCHINI, L. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 335-344, 2009.

FERES, Y.; SOUZA, L.; REIS, L.; MILITELI, V. **Relatório anual 2014-2015**. Disponível em: < <http://www.mediagroup.com.br/host/cargill/rao/2014/pt/01.htm> >. Acesso em: 06 de out. 2015.

FERNANDES NETO, M. L. **Norma Brasileira de Potabilidade de Água**: Análise dos parâmetros agrotóxicos numa abordagem de avaliação de risco. 2010. 196 f. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 2010.

FILIZOLA, H.; FERRACINI, V.; ABAKERLI, R.; GOMES, M. A. Monitoramento de agrotóxicos e qualidade das águas em área de agricultura irrigada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 2, p. 245-250, 2005.

FLEXOR, G. G.; VIÉGAS, L. S. A.; LIMA, M. S. A Expansão Da Cadeia Da Soja Na Amazônia: Os Casos Do Pará E Amazonas. 2006, **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)**, 2006.

FRITSCHI, L. MCLAUGHLIN, J.; SERGI, C. M.; CALAF, G. M.; LE CURIEUX, F.; FORASTIERE, F.; KROMHOUT, H.; EGEGHY, P., Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Red**, v. 114, 2015.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: ACADCOM, 2005.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; CHAGNON, M. C.; SÉRALINI, G. E., Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. **Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide**. Springer New York, 2000.

GUANZIROLI, C. E. Agronegócio no Brasil: perspectivas e limitações. **Rio de Janeiro-RJ**, 2006.

HEALTH. **Guidelines for Canadian drinking water quality: summary table**. Canadá, H. 2008.

HESS, D. F. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

IBAMA. **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos 2013**. 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 06 de maio 2015.

IBGE. **Produto Interno Bruto**. 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=46>. Acesso em: 06 de maio 2015.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**. Instituto Nacional de Metrologia. 2003.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**. Instituto Nacional de Metrologia. 2010.

INN. **Agua potable**. NORMALIZACION. Chile 2006.

INOUYE, L. A. FERNANDES, L.M; CARNEIRO, L.F.S.; GERMANO, J.J.; CRISCI, A.R. Avaliação Morfológica do Fígado e do Pulmão Pós Intoxicação por Organofosforado, em Ratos Wistar. **Uniciências**, v. 18, n. 2, 2015.

ISO. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results**. ISO 5725-3:1994 Part 3: Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method 2001.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food—Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

KAGEYAMA, A. Desenvolvimento rural: conceito e medida. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 3, p. 379-408, 2004.

KREMER, R. J.; MEANS, N. E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. **European Journal of Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 153-161, 2009.

LANGIANO, V. C. **Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2006. 62 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas-SP: Editora Átomo, 2009.

LEITE, R. M. V. C.; SOARES, R. M.; OLIVEIRA-JUNIOR, A. **Ata da XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Londrina-PR: Embrapa Soja, 2011. 173.

LIU, C. M.; MCLEAN, P.A; SOOKDEO, C.C.; CANNON, F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1799-1804, 1991.

MAFIOLETI, J. P. **Avaliação da degradação da cafeína em amostras de água usando espectrofotometria após tratamento com processos oxidativos avançados**. 2015.

Disponível em

<<https://www.univates.br/bdu/bitstream/10737/632//1/2014JoseaneParizziMafioleti.pdf>>

Acesso em 22 de agos. 2015.

MALLAT, E.; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography – post – column derivatization with fluorescence detection. **Jornal of chromatography A**. v. 82, n. 1, p. 129-136, 1998.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Embrapa Cerrados, 2008.

MARTINS, E. D. S.; REATTO, A.; FARIAS, M.F.R; SILVA, A.V.; BLOISE, G.L.F.; CARDOSO, E.A; SPERA, S.T.; CARVALHO JÚNIOR, O.A; GUIMARÃES, R.F. **Geomorfologia da margem direita do Córrego Divisa, Bacia do São Bartolomeu-DF**, escala 1: 10.000. 1ª ed. Planaltina-DF, Embrapa Cerrados, 2002.

- MARTINS-JÚNIOR; A., H. **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)**. São Paulo, 2005.
- MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.
- MESQUITA, H. C. D.; RODRIGUES, A. P.; MENDONÇA JÚNIOR, A. F. D. Riscos toxicológicos do herbicida glyphosate. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 2, p. 01-05, 2011.
- MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.
- MONSANTO. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos: Roundup. São José dos Campos - SP, 2008. Disponível em: < <http://www.monsanto.com/global/br/produtos/documents/roundup-na-fispq.pdf> >. Acesso em: 11 de maio.
- MORAES, P. V. D.; ROSSI, P. Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 9, p. 22-35, 2010.
- NHMRC. **Australian drinking water guidelines**. COUNCIL, N. H. A. M. R. 2004.
- OLIVEIRA, H. M. A cidade de Santarém e os grãos: a reestruturação produtiva de uma cidade média da Amazônia Oriental. **Boletim Amazônico de Geografia**, v. 1, n. 02, 2015.
- PARRON, L. M.; COSER, T. R. **Educação Ambiental para Conservação e Manejo de Nascentes e Matas Ciliares na Bacia Hidrográfica do Rio Preto, DF**. 1ª ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.
- PARRON, L. M.; MUNIZ, D. H. FREITAS; PEREIRA, C. M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química da água**. 1ª ed. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2011.
- PASIANI, J. O.; TORRES, P; SILVA, J.R.; DINIZ, B.Z.; CALDAS, E.D. Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. **International journal of environmental research and public health**, v. 9, n. 9, p. 3051-3068, 2012.
- PELÁEZ, V.; SCHMIDT, W. A difusão dos OGM no Brasil: imposição e resistências. **Estudos Sociedade e Agricultura**, 2000.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PETERSEN, J.; HURLE, K. Influence of climatic conditions and plant physiology on glufosinate-ammonium efficacy. **Weed Research**, v. 41, n. 1, p. 31-39, 2001.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. 1 ed. Londrina: Planta, 2001.

PÉREZ, G.L.; TORREMORELL, A.; MUGNI, H.; RODRIGUEZ, P; VERA, M. Solange; NASCIMENTO, do M; ALLENDE, L., BUSTINGORRY, J.; ESCARAY, R.; FERRARO, M.; IZAGUIRRE, I.; PIZARRO, H.; BONETTO, C.; MORRIS, Donald P.; ZAGARESE, H. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. **Ecological Applications**, v. 17, n. 8, p. 2310-2322, 2007.

RAMIREZ, C.E.; BELLMUND, S.; GARDINALI, P.R. A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD+MS/MS. Case study: canals with influence on Biscayne National Park. **Science of the total Environment**, v. 496, p. 389-401, 2014.

REBELO, R. M. **Desenvolvimento de uma plataforma de dados para avaliação de risco ambiental a agrotóxicos no Brasil usando o pesticide root zone model (PRZM)**. 2013. 124 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2013.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Environmental risk assessment of aquatic systems affected by pesticide use. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1199-1208, 2014.

REBOUÇAS, A. D. C. Água no Brasil: abundância, desperdício e escassez. **Bahia análise & dados**, v. 13, p. 341-345, 2003.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H; JARDIM, I.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; DE OLIVEIRA, C. A. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Revista do setor de ciências agrárias e ambientais**. v. 5, p. 359-372, 2009.

SANTANA, V. Acidentes de trabalho devido à intoxicação por agrotóxicos entre trabalhadores da agropecuária 2000-2011. **Boletim epidemiológico dos acidentes do trabalho**, p. 1-6, 2012.

SAUER, S. **Terra e modernidade: a reinvenção do campo brasileiro**. Expressão Popular, 2010.

SCHLESINGER, S. Soja: o grão que segue crescendo. **Grupo de Trabalho sobre Desenvolvimento e Meio Ambiente nas Américas, Documento de Discussão**, v. 21, 2008.

SHEHATA, A. A. et al. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. **Current microbiology**, v. 66, n. 4, p. 350-358, 2012.

SILVA, B. M. **Desenvolvimento de Metodologia simples rápida e sem etapa de clean up para determinação de glifosato**. 2009. 77 f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, F. M.; Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma visão bibliográfica. **Informativo Técnico do Semiárido**, v. 9, n. 1, p. 77-86, 2015.

SILVA, I. P. D. F. **Velocidade de absorção do glufosinate e seus efeitos em plantas daninhas e algodão**. Botucatu: São Paulo: Universidade Estadual Paulista (UNESP) 2012.

SILVA, M. D. D.; PERALBA, M. D. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 19-28, 2003.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. 8 ed. Thomson, São Paulo, 2008.

SKOOG, D. A. H., F. J. NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. Bookman, 2002.

SOBRINHO, R. **Novas territorialidades advindas da expansão da soja no Médio Norte Mato-Grossense—o município de Diamantino/MT**: UFMT 2006.

SOLOMON, K.R.; STEPHENSON, G.R.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. **Praguicidas e o Meio Ambiente**. International Life Sciences Institute do Brasil (ILSI Brasil). São Paulo, 2010.

SOUZA, P. I. D. M.; MOREIRA, C.T.; NETO FARIAS, A. L. F.; SILVA, S.A.S. SILVA, N.S.; ALMEIDA, L.A.; KIHIL, R.A. A conquista do Cerrado pela Soja. In: FALEIRO, F. G. (Ed.). **Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação para o Cerrado**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2007. p.138.

STALIKAS, C. D.; KONIDARI, C. N. Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 907, n. 1, p. 1-19, 2001.

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C., ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Embrapa Meio Ambiente. 2004.

SÉRALINI, G.E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R.; GRESS, S.; DEFARGE, N.; MALATESTA, M.; HENNEQUIN, D.; VENDÔMOIS J.S. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 4221-4231, 2012.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I.N; FONTES, L. O; DIAS, J. R. M.. SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 06-12, 2011.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829-833, 2006.

UMBUZEIRO, G. A. GONÇALVES, C.; KUMMROW, F.; MIRANDA, J.D.; PEDROZO, M.F.M; MATTA, M.E.M; ROQUETTI, M.H.; SILVÉRIO, P.; HANNA, R.A. Guia de potabilidade para substâncias químicas. **São Paulo: ABES**, 2012.

WAICHMAN, A. V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 45-50, 2008.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. 2011.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

WINFIELD, T. W.; BASHE, W. J.; BAKER, T. V. Method 547—Determination of glyphosate in drinking water by direct-aqueous-injection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection. **Methods for the determination of organic compounds in drinking water—Supplement I: US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, EPA/600/4-90/020**, 1990.

9. Como você vê a sua vida, da sua família, para sua comunidade na sua região daqui a 10 anos?

PERCEPÇÃO DE RISCO AMBIENTAL

10. Você trabalha na agricultura?

Sim Não

11. Sobre a propriedade agrícola:

É, própria Grandes fazendas

12. O que você costuma produzir?

A) Propriedade própria:

B) Em grandes fazendas da região:

13. Como costuma produzir?

Orgânico Convencional

Com relação à produção, ela é:

pequena, apenas para subsistência

média, produção para abastecimento do comércio local

grande escala

Outros?

14. Você consome alimentos produzidos na propriedade?

() Sim () Não

15. Você utiliza agrotóxico (veneno)?

() Sim () Não

Quais?

16. Utiliza os Equipamentos de Proteção Individual (EPI)?

Equipamento de uso	sempre	nunca	às vezes	Situação
--------------------	--------	-------	----------	----------

Botas	()	()	()	
-------	-----	-----	-----	--

Luvas	()	()	()	
-------	-----	-----	-----	--

Chapéu	()	()	()	
--------	-----	-----	-----	--

Roupas impermeáveis:	()	()	()	
----------------------	-----	-----	-----	--

Máscara para produtos químicos	()	()	()	
--------------------------------	-----	-----	-----	--

Outros: Quais?: _____	()	()	()	
-----------------------	-----	-----	-----	--

17. Na sua opinião, seu trabalho na agricultura pode trazer algum problema para a sua saúde?

() Sim () Não

18. Em média, você trabalha quantas horas por dia na lavoura?

() Até 4 horas

() Até 8 horas

() > 8 horas

19- Você já se intoxicou com agrotóxico?

() Sim () Não

20. O trabalho com agrotóxico pode trazer problema para a saúde?

() Sim () Não

Quais?

21. Você acha que o agrotóxico (veneno) causa algum tipo de efeito na natureza?

(contaminação das águas, dos peixes, etc.)?

Sim Não

Quais?

22. A água que você consome vem de onde?

Poço comum Encanada sem tratamento Traz de casa

Encanada tratada Mina Rio

Outros

23. Você bebe água dos Igarapés?

Sim Não

24. O que acha da qualidade da água dos Igarapés?

não sei

boa

ruim

25. Você utiliza técnicas de agricultura aprendidas em grandes fazendas na região?
