



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Raquel Santos Ferreira

**BIOMONITORIZAÇÃO DE GLIFOSATO EM URINA
DE CRIANÇAS EM DIVERSAS REGIÕES DE
PORTUGAL CONTINENTAL**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada
pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, coorientada
pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Raquel Santos Ferreira

**BIOMONITORIZAÇÃO DE GLIFOSATO EM URINA
DE CRIANÇAS EM DIVERSAS REGIÕES DE
PORTUGAL CONTINENTAL**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada
pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, coorientada
pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2020

Declaração

Eu, Catarina Raquel Santos Ferreira, estudante do Mestrado em Segurança Alimentar com o nº2018237972 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Projeto.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Dissertação, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, outubro 2020.

Agradecimentos

Queria agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e todos os seus docentes por todo o conhecimento transmitido, essencial para a conclusão desta fase do meu percurso académico.

Primeiramente, agradecer às Professoras Doutoradas Angelina Pena e Sofia Duarte por toda a disponibilidade, ajuda, paciência e partilha de conhecimento, durante a escrita desta dissertação.

Aos meus pais por todo o apoio e compreensão e me ajudarem sempre da melhor maneira que conseguiam. Aos meus amigos por estarem sempre disponíveis para me ouvirem e apoiar.

Ao meu namorado, por toda a paciência, compreensão, companheirismo e auxílio todos os dias, sem interrupção. Sem ele teria sido tudo muito mais difícil de superar. Obrigada.

Finalmente, queria agradecer a todos os que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

Índice

Índice de tabelas	6
Lista de Siglas e Abreviaturas	7
Resumo	9
Palavras Chave.....	10
Abstract.....	11
Key Words	11
I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1. Nota histórica	13
2. Pesticidas.....	14
2.1. Classificação	15
3. Poluentes Orgânicos Persistentes	16
4. Glifosato.....	17
4.1. Características físico-químicas	18
4.2. Formulações comercializadas à base de glifosato.....	19
4.3. Toxicocinética.....	21
4.4. Efeitos tóxicos	23
4.5. Glifosato e Linfoma Não-Hodgkin	28
4.6. Ocorrência e significado atual.....	29
4.7. Avaliação da exposição	35
4.7.1. Ingestão Diária Estimada	35
4.7.2. Exposição em crianças.....	37
4.7.3. Biomonitorização.....	38
4.8. Determinação analítica	40
4.9. Legislação aplicável.....	42
II - PARTE EXPERIMENTAL	46
1. Significado e objetivos do estudo.....	47
2. Materiais e métodos.....	48
2.1. Caracterização das amostras	48
2.2. Procedimento experimental	49
2.3. Avaliação da exposição e análise de risco	50
2.4. Análise estatística	51
3. Resultados e discussão.....	51
3.1. Performance analítica	51
3.2. Ocorrência de glifosato nas amostras de urina	51
3.3. Comparação com outros estudos	55
3.4. Ingestão diária provável (PDI) e avaliação de risco	62
4. Conclusões	62

Bibliografia	65
Anexos.....	80
Termo de Consentimento Informado distribuído aos pais	80
Questionário distribuído aos pais	82

Índice de tabelas

Tabela 1. Classificação dos pesticidas de acordo com o perigo que apresentam (Adaptado de OMS, 2020)	15
Tabela 2. Classificação de pesticidas de acordo com a praga alvo.	16
Tabela 3. Uso de glifosato 1974-2014 (Adaptado de Benbrook, 2016).	18
Tabela 4. Propriedades físicas e químicas do glifosato. Adaptado de (OMS, 1996).....	19
Tabela 5. Estudos que analisam a presença de glifosato em alimentos	30
Tabela 6. Estudos de biomonitorização recentes relativos à exposição humana ao glifosato, em adultos.....	32
Tabela 7. Sumário de NOAEL, Estimativas do Pior Cenário Possível e Margem de Exposição, para o Glifosato, AMPA e POEA (Adaptado de Williams, Kroes e Munro, 2000)	36
Tabela 8. Limites Máximos de Resíduos referentes ao glifosato em diversos alimentos (Comissão Europeia, 2020).....	44
Tabela 9. Dados antropométricos da amostra populacional.....	48
Tabela 10. Variáveis mais significativas na análise estatística	54
Tabela 11. Comparação do presente estudo com outros estudos com a mesma temática, em crianças.....	60
Tabela 12. Cálculo do melhor, médio e pior cenário possível para cada categoria de idades, com base no peso médio de cada categoria	63

Lista de Siglas e Abreviaturas

a.e. – equivalentes de ácido (do inglês, *acid equivalent*)

a.i. – Ingrediente Activo (do inglês, *active ingredient*)

ADI - Ingestão Diária Aceitável (do inglês *Acceptable Daily Intake*)

AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico

AOEL - Nível Aceitável de Exposição do Operador (do inglês *Acceptable Operator Exposure Level*)

ARfD - Dose Aguda de Referência (do inglês *Acute Reference Dose*)

ATP-ase - Atividade Adenosina Trifosfato-ase

BMH - Biomonitorização Humana

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

DP – Desvio Padrão

EFSA - Autoridade Europeia Para a Segurança dos Alimentos (do inglês *European Food Safety Authority*)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPSPS - 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FI – Fator de Incerteza

FMOC-Cl – Ácido Clorofórmico 9H-fluoren-9-ilmetil éster

GC – Cromatografia Gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

HBG - Herbicidas Comerciais À Base de Glifosato

HCH - Hexaclorocicloexano

HMB4EU - *Human Biomonitoring for Europe*

HPLC – Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

IARC - Agência Internacional para a Investigação do Cancro (do inglês *International Agency for Research on Cancer*)

IPA - Isopropilamina

LD50 - Dose Letal Média (do inglês *Lethal Dose 50%*)

LG – Cromatografia Líquida (do inglês *Liquid Chromatography*)

LMR - Limites Máximos de Resíduos

LNH - Linfoma *Não-Hodgkin*

LOD – Limite de Detecção (do Inglês *Limit of detection*)

LOQ – Limite de Quantificação (do Inglês *Limit of quantification*)

Max – Máximo

Min – Mínimo

MS - Espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry*)

NOAEL - Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (do inglês *No Observed Adverse Effect Level*)

NOEL - Nível de Efeito Não Observável (do inglês *No Observed Effect Level*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PC – *Peso Corporal*

PDI - Ingestão Diária Provável (do inglês *Probable Daily Intake*)

POEA - Polioxietilenamina

PONI - Paraoxonase I

POP - Poluentes Orgânicos Persistentes

RASFF - Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (do inglês *The Rapid Alert System for Food and Feed*)

RNA_m - Ácido Ribonucleico Mensageiro (do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*)

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

Resumo

A utilização de glifosato tem vindo a aumentar ao longo dos anos, tornando-o num dos herbicidas mais consumidos do mundo. Os seus efeitos no organismo humano e no meio ambiente têm sido analisados e mostram-se preocupantes, à medida que a exposição ao herbicida aumenta.

O objetivo do presente estudo foi determinar glifosato em urina de crianças de diversas regiões de Portugal, incluindo zonas urbanas e rurais, para identificar níveis de exposição e relacionar com os padrões alimentares.

Das 41 crianças participantes, 46,34 % (n = 19) eram do sexo masculino, com idades entre 2 e 12 anos, e 53,66 % (n = 22) eram do sexo feminino, com idades entre 2 e 13 anos. A recolha das amostras (urina da primeira micção do dia) ocorreu entre julho de 2018 e fevereiro de 2019. Para além do termo de consentimento, foi preenchido um questionário pelos pais das crianças, com características antropométricas, hábitos alimentares, estilo de vida e uso de pesticidas. O glifosato foi analisado, através do método ELISA (LOD= 0,6 µg/L) e foi detetado em 95,12 % das amostras, com valores médios de $1,77 \pm 0,86$ µg/L e valores mínimos e máximos de 0,87 e 4,35 µg/L, respetivamente.

Dos 13 estudos mais recentes que determinaram glifosato em urina, apenas 4 utilizaram amostras de crianças, 3 dos quais apresentaram valores médios superiores aos do presente estudo. No entanto, 2 dos casos apresentaram incidência superior à mencionada neste estudo.

As diferenças entre as concentrações de glifosato na urina de crianças com idades iguais ou inferiores a 3 anos ($1,20 \pm 0,32$ µg/L), comparativamente às concentrações encontradas em crianças entre os 7 e os 9 anos de idade ($2,12 \pm 1,00$ µg/L) estiveram próximas da significância estatística ($p = 0,0631$), o que pode ser justificado pelo aumento da atividade da enzima PON1, a partir dos 7 anos de idade. Verificaram-se teores de contaminação superiores em crianças que residiam próximo de zonas agrícolas (<1 km, $2,0 \pm 0,97$ µg/L), com percentagem superior de consumo de alimentos caseiros (75-100%, $2,72 \pm 0,45$ µg/L) e cujos pais aplicavam herbicidas no quintal ($2,5 \pm 1,17$ µg/L), quando comparado com o jardim ($1,4 \pm 0,43$ µg/L). Além disso, verificaram-se diferenças significativas relativamente ao consumo de alguns alimentos como o gelado, os cereais e as bolachas tipo Maria.

A exposição ao glifosato é preocupante, principalmente tendo em conta as idades dos participantes e a toxicidade do herbicida.

Afigura-se necessário realizar estudos adicionais com maior número de amostras e maior diversidade geográfica.

Palavras Chave

Análise de risco, Crianças, Exposição Glifosato, Pesticidas, Toxicidade, Urina.

Abstract

The use of glyphosate has been increasing over the years, making it one of the most consumed herbicides in the world. Its effects on the human organism and on the environment have been analyzed and are of concern, as exposure to the herbicide increases.

The aim of the present study was to determine glyphosate in the urine of children from different regions of Portugal, including urban and rural areas, to identify levels of exposure and to relate to dietary patterns.

Of the 41 children, 46.34 % ($n = 19$) were male, aged between 2 and 12 years old, and 53.66 % ($n = 22$) were female, aged between 2 and 13 years old. The collection of samples (first urine of the day) occurred between July 2018 and February 2019. In addition to the consent form, a questionnaire was filled by the children's parents, with anthropometric characteristics, eating habits, lifestyle and use of pesticides. Glyphosate was analyzed using the ELISA method ($LOD = 0.6 \mu\text{g/L}$) and was detected in 95.12 % of the samples, with mean values of $1.77 \pm 0.86 \mu\text{g/L}$ and minimum and maximum values of 0.87 and $4.35 \mu\text{g/L}$, respectively.

Of the 13 most recent studies that determined glyphosate in urine, only 4 used samples from children, 3 of which showed higher average values than the present study. However, only 2 reported a higher incidence than that mentioned in this study.

The differences between the glyphosate concentrations in the urine of children aged 3 years or less ($1.20 \pm 0.32 \mu\text{g/L}$), compared to the concentrations found in children between 7 and 9 years ($2.12 \pm 1.00 \mu\text{g/L}$) were close to statistical significance ($p = 0.0631$), and can be justified by the increased activity of the enzyme PON1, at 7 years. Higher levels of contamination were found in children living near agricultural areas ($<1 \text{ km}$, $2.0 \pm 0.97 \mu\text{g/L}$), with a higher percentage of consumption of homemade foods (75-100%, $2.72 \pm 0.45 \mu\text{g/L}$) and whose parents applied herbicides in the yard ($2.5 \pm 1.17 \mu\text{g/L}$), when compared to the garden ($1.4 \pm 0.43 \mu\text{g/L}$). In addition, there were significant differences regarding the consumption of some foods such as ice cream, cereals and Maria-like cookies.

Exposure to glyphosate is worrying, especially considering the ages of the participants and the toxicity of the herbicide.

It appears necessary to carry out additional studies with a larger number of samples and greater geographical diversity.

Key Words

Children, Exposure Glyphosate, Pesticides, Risk analysis, Toxicity, Urine.

I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. Nota histórica

O início do uso de pesticidas remonta ao ano 500 a.C. Acredita-se que o primeiro pesticida conhecido tenha sido o enxofre. Os padrões de uso revelaram que a maioria dos produtos de controlo de pragas eram venenos naturais e básicos, de natureza não seletiva, persistentes e tóxicos para muitas formas de vida (Rakesh, Ramachandran e Mathew, 2015). Os inseticidas incluíam arsénico, chumbo e fluoreto. Os herbicidas incluíam cinzas, sais e iodo de fundição. Os fungicidas incluíam giz, madeira e enxofre (Bhattacharyya, Barik, 2009).

A história dos pesticidas pode ser dividida em três fases (WenJun Zhang, FuBin Jiang e Ou, 2011):

- A **primeira fase** (antes da década de 1870), quando se utilizavam pesticidas naturais, por exemplo, o enxofre, na Grécia antiga.
- A **segunda fase** (período entre 1870-1945), correspondente à era dos pesticidas inorgânicos sintéticos. Em 1939, Paul Müller descobriu a eficácia do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Jarman e Ballschmiter, 2012). O DDT transformou-se rapidamente no pesticida mais usado no mundo.
- A **terceira fase** (desde 1945) corresponde à era dos pesticidas orgânicos sintéticos. Na década de 1960, descobriu-se que o DDT provocava danos à saúde de diversas espécies de aves, prejudicando a sua reprodução e apresentando grandes riscos para biodiversidade (WenJun Zhang, FuBin Jiang e Ou, 2011). Atualmente, o DDT é proibido em pelo menos 86 países. Em Portugal, o DTT não está autorizado desde 1973. No entanto, admite-se o seu uso para controlo de vetores, fundamentalmente, o mosquito transmissor da malária (ASAE, 2020). A partir de 1945, pesticidas sintéticos como o DDT 2,4-D e, mais tarde, o HCH dieldrin, terminaram a era dos pesticidas inorgânicos e naturais. Desde então, a maioria dos pesticidas foi sintetizada por seres humanos, sendo nomeados pesticidas sintéticos.

A figura I ilustra o consumo de herbicidas no mundo (1990-2014) (Hedlund, Longo e York, 2020).

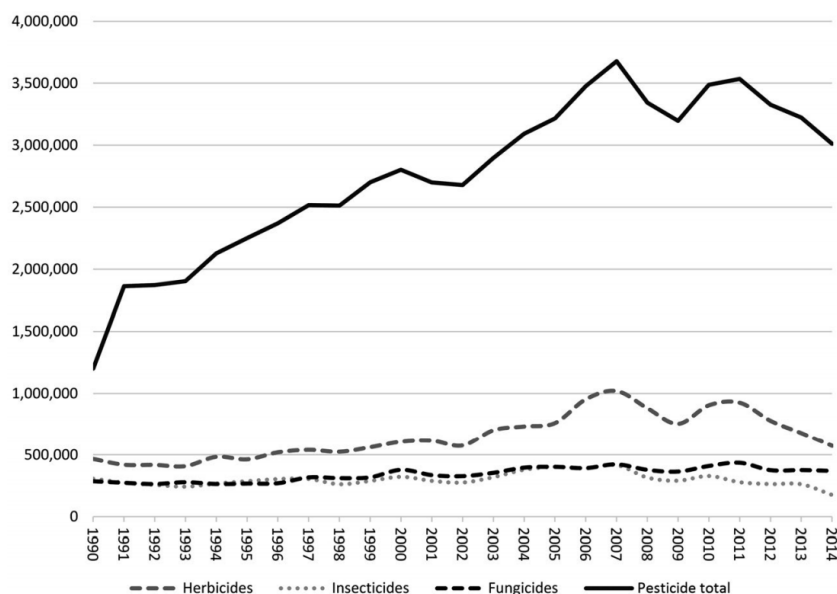


Figura 1. Consumo de herbicidas no mundo (Hedlund, Longo e York, 2020).

2. Pesticidas

Etimologicamente, “pesticida” é uma palavra que deriva do latim “pestis” que significa peste e “cide” que, por sua vez, é originário da palavra “caedere” que significa “o que mata”. Os pesticidas são todas as substâncias ou misturas que têm como objetivo, impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, como por exemplo insetos, ácaros, nematóides, ervas daninhas e ratos (Vagi e Petsas, 2020).

Os pesticidas são potencialmente tóxicos para outros organismos, incluindo seres humanos, por isso, precisam ser usados com segurança e descartados adequadamente (OMS, 2020). Com o aumento da população mundial e as alterações climáticas, a necessidade de controlar as pragas, por parte dos agricultores, é uma preocupação crescente, para poderem responder com o respetivo aumento de produção (Carvalho, 2017). Desta forma, o uso de pesticidas tem vindo a aumentar exponencialmente nas últimas décadas (Figura 2).

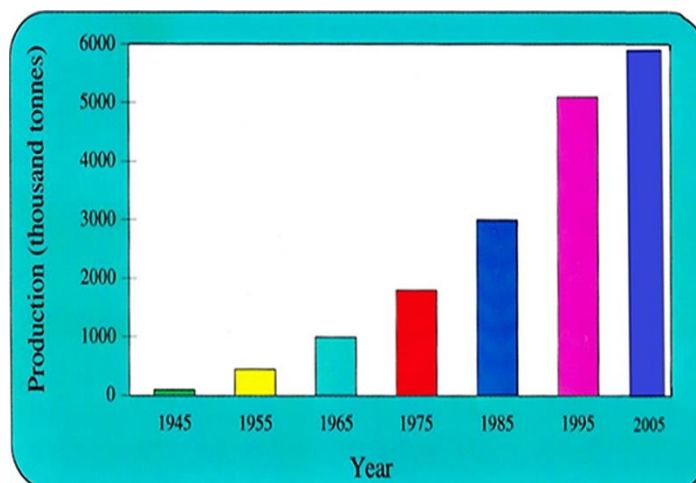


Figura 2. Produção de pesticidas no mundo, entre 1945 e 2005 segundo dados da FAO (adaptado de Carvalho, 2017)

2.1. Classificação

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou, em 2020 que os pesticidas sejam classificados de acordo com o perigo que apresentam (tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos pesticidas de acordo com o perigo que apresentam (Adaptado de OMS, 2020)

Classe	LD50 para ratos (mg/kg de peso)	
	Oral	Dérmico
Extremamente perigoso	<5	<50
Muito perigoso	5-50	50-200
Moderadamente perigoso	50-2000	200-2000
Ligeiramente perigoso	<2000	<2000
Improvável de causar dano	<5000	<5000

(LD50 - Dose Letal Média (do inglês Lethal Dose 50%))

Os pesticidas podem, também, ser classificados de acordo com a praga que atacam, como indica a tabela 2.

Tabela 2. Classificação de pesticidas de acordo com a praga alvo.

Pesticida	Praga
<i>Acaricidas</i>	Ácaros
<i>Bactericidas</i>	Bactérias
<i>Fungicidas</i>	Fungos
<i>Herbicidas</i>	Ervas
<i>Inseticidas</i>	Insetos
<i>Nematicida</i>	Nematoides (vermes)
<i>Rodenticidas</i>	Roedores
<i>Moluscicidas</i>	Molúsculos

Quanto à sua origem, os pesticidas podem ser considerados: 1) orgânicos, como os azotados, clorados, fosforados e os clorofosforados; 2) inorgânicos, à base de arsênio, tálio, bário, azoto, fósforo, cádmio, ferro, selênio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco; 3) ou botânicos, à base de nicotina, piretrina, sabadina ou rotenona.

Os herbicidas podem ainda ser classificados por atividade, uso, modo de ação, grupo químico ou tipo de vegetação controlada. Classificando através da sua atuação, podem ser de contato ou sistêmicos. Podem ser aplicados antes ou depois da praga se ter instalado (pré ou pós-emergentes, respetivamente). Através do mecanismo de ação, podemos classificá-los como: inibidores da acetil-coenzima A-carboxilase; inibidores da acetolacto-sintase; inibidores da enolpiruvil-chiquimato 3-fosfato-sintase; auxina sintética; ou inibidores do fotossistema.

3. Poluentes Orgânicos Persistentes

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) são substâncias químicas de síntese muito tóxicas produzidas para utilização na agricultura e na indústria ou que resultam, como subprodutos, de processos industriais. Estas substâncias resistem à degradação sob condições naturais e, uma vez dispersas no ambiente, propagam-se através dos elementos (vento, chuva e água) ou de vetores animais, a distâncias consideráveis das suas fontes, sendo por isso extremamente estáveis e persistentes (ASAE, 2020).

Os POP, são bioacumuláveis, isto é, uma vez absorvidos pelos seres vivos expostos ao ar, água, solo ou alimentos, têm a capacidade de se acumularem nos seus tecidos gordos, principalmente no leite de amamentação e podem passar através da placenta (ASAE, 2020).

Além disso, provocam um efeito de biomagnificação, ou seja, acumulam-se na cadeia alimentar, fazendo com que os animais dos níveis tróficos superiores cheguem a atingir níveis muito elevados destas substâncias. Desta forma, podem pôr em risco a saúde humana e o meio ambiente (ASAE, 2020).

São conhecidos vários problemas resultantes dos POP no desenvolvimento e reprodução, na supressão do sistema imunitário, e no desenvolvimento de diversos tipos de cancro (Alharbi *et al.*, 2018).

Os POP correspondem a 12 substâncias, 8 das quais são pesticidas, principalmente inseticidas. Desta forma, os pesticidas constituem um problema grave tanto para a saúde humana como para a saúde ambiental (Park *et al.*, 2020). O glifosato apresenta uma toxicidade como neurotoxina e desregulador endócrino que indica o seu potencial para agir de forma semelhante aos POP, tornando especialmente perigoso para a saúde do ecossistema (Kissane e Shephard, 2017).

4. Glifosato

O glifosato é um herbicida não-seletivo, sistémico, pós-emergente (Fogliatto, Ferrero e Vidotto, 2020). É de amplo espectro e é utilizado principalmente no controlo de ervas daninhas na agricultura, no controlo da vegetação em áreas não agrícolas, e na ajuda à colheita como dessecante. O seu uso na agricultura aumentou consideravelmente devido ao desenvolvimento de variedades geneticamente resistentes ao glifosato (Tarazona *et al.*, 2017). O glifosato tem também sido usado para controlar culturas ilegais através de aplicações aéreas (Ware Solomon *et al.*, 2007). Desde 1971, quando foi descrito pela primeira vez como herbicida, têm sido comercializados três tipos de glifosato: glifosato-isopropilamónio, glifosato-sesquisódio, e glifosato-trimesium (Amarante Junior *et al.*, 2002). Destes, apenas o glifosato isopropilamónio está autorizado em Portugal (DGAV, 2020).

O consumo mundial de glifosato tem vindo a aumentar ao longo dos anos, sendo atualmente o herbicida mais utilizado no mundo (Bozzini, 2020; Tarazona *et al.*, 2017). A tabela 3 indica a quantidade de glifosato utilizado na agricultura entre 1994 e 2014 (Benbrook, 2016).

Tabela 3. Uso de glifosato 1974-2014 (Adaptado de Benbrook, 2016).

	Uso total (milhões de kg)	Aumento relativo ao período anterior	Proporção de uso total 1994-2014 (%)
1974	3,2	NA	0,0
1975-1984	130,5	127	1,5
1985-1994	387,3	257	4,5
1995-2004	1909	1522	22,3
2005-2014	6133	4224	71,6
Total	8563		100

Em todo o mundo, entre 2014 e 2015, o glifosato foi aplicado em cerca de 43 % da aplicação geral de herbicidas em culturas de soja, 45 % em culturas de algodão e 26 % em culturas de milho (Fogliatto, Ferrero e Vidotto, 2020). Globalmente, o glifosato é usado principalmente em plantações convencionais, que representam cerca de 55 % do volume total do uso de glifosato em 2015. Entre os utilizadores, verifica-se que os países do Pacífico Asiático utilizam a maior parte do produto (cerca de 31 % do volume total), seguido pela América Latina (cerca de 20 %) e Europa (cerca de 16 %) (Fogliatto, Ferrero e Vidotto, 2020).

4.1. Características físico-químicas

O glifosato tem fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (figura 3) e uma massa molecular de 169,1 g/mol. Na forma de sal de isopropilamónio, apresenta-se acrescido do grupo $(CH_3)_2CHNH^{3+}$, perfazendo uma massa molecular de 228,2 g/mol. O glifosato é um organofosforado pertencente ao grupo dos aminoácidos fosforados e, assim como o seu precursor, a glicina, apresenta comportamento zwitteriónico (Amarante Junior *et al.*, 2002).

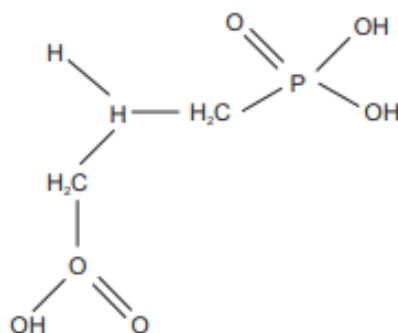


Figura 3. Estrutura química do glifosato (Amarante Junior *et al.*, 2002).

O glifosato é um herbicida que, à temperatura ambiente, se apresenta sob a forma de cristais sólidos, muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C) (Piccolo e Celano, 1994). Por outro lado, são quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, como por exemplo a acetona ou o etanol (Zhang *et al.*, 2019).

Este herbicida tem uma temperatura de fusão de 200 °C. Além disso, é bastante estável na presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C (Amarante Junior *et al.*, 2002).

As propriedades físicas e químicas do glifosato encontram-se resumidas na tabela 4.

Tabela 4. Propriedades físicas e químicas do glifosato. Adaptado de (OMS, 1996)

Propriedade	Valor	Observações
Estado à temperatura ambiente	Pó cristalino	
Cor	Branco	
Odor	Nenhum	
Ponto de fusão	200 °C	(Amarante Junior <i>et al.</i> , 2002)
Densidade	1,704	a 20 °C
Pressão a vapor	< 1 x 10 ⁵ Pascal	a 25 °C
Solubilidade em água	10 100 mg/L	a 20 °C
pK_a	< 2; 2,6; 5,6; 10,6	
pH	2,5	1 % solução

4.2. Formulações comercializadas à base de glifosato

Quando se discute a toxicidade dos herbicidas, o foco é principalmente no composto ativo sendo, no caso concreto do glifosato, o ácido de glifosato ou sais de glifosato (Luis, Solange e Mir, 2011). Os herbicidas comerciais à base de glifosato (HBG) contêm outros componentes, denominados “ingredientes inertes”, nomeadamente, surfactantes, solventes e compostos anti-espuma (Luis, Solange e Mir, 2011). De uma forma geral, os surfactantes são produtos químicos que têm atividade em soluções aquosas, diminuindo a tensão superficial e perturbando a permeabilidade da membrana ou a função de transporte das membranas, incluindo permeabilidade ao glifosato, através de emulsificação. Compostos anti-espuma são

aditivos químicos que reduzem e dificultam a formação de espuma no processo industrial (Oliveira *et al.*, 2018).

Numerosos trabalhos publicados demonstraram que os ingredientes inertes nas formulações à base de glifosato têm toxicidade várias vezes superior ao próprio glifosato, nos organismos não-alvo (Bókony *et al.*, 2017; Bringolof, R.B.; Cope, W.G.; Mosher, S.; Barnhart, M.C.; Shea, 2007; Defarge, Spiroux de Vendômois e Séralini, 2018; Ma *et al.*, 2019; Mesnage, Benbrook e Antoniou, 2019; Prosser *et al.*, 2017). Nesse contexto, esses mesmos ingredientes devem ser sujeitos a estudos de toxicidade de uma forma isolada, bem como em mistura, conforme formulações comercializadas.

A concentração de glifosato, bem como a natureza e a concentração de aditivos inertes, dependem da formulação comercial em específico. No entanto, as informações disponíveis sobre os ingredientes inertes nos produtos à base de glifosato geralmente não estão listadas no rótulo (Oliveira *et al.*, 2018).

A formulação comercial de glifosato Roundup®, é a marca mais popular de herbicidas de glifosato. O Roundup® contém sal Isopropilamina (IPA) de glifosato (35-50 %) e, também, ingredientes inertes (Krause *et al.*, 2020). A concentração do Roundup® é comumente expressa como mg de ingrediente ativo (a.i., do inglês *active ingredient*)/L ou mg de equivalentes de ácido (a.e., do inglês *acid equivalent*)/L de glifosato, enquanto também como mg de Roundup® (produto completo)/L. Considerou-se 1 mg a.i./L, equivalente a 0,75 mg a.e./L (Oliveira *et al.*, 2018).

O surfactante no Roundup®, bem como em alguns outros produtos à base de glifosato, é o composto de sebo-amina polietoxilado altamente tóxico. Este material é referido na literatura como MON0818, ou polioxietilenamina (POEA), presente em cerca de 15 % no Roundup® (Krause *et al.*, 2020). O surfactante POEA é um derivado do tecido adiposo de bovinos ou ovinos (Oliveira *et al.*, 2018).

Os ingredientes encontrados em HBG mais comuns são: POEA com etoxilação média de 15 carbonos (POE-15, CAS 61791-26-2, Emulson AG GPE 3SS®, Lamberti) e POEA formulado (GenaminT200®, Monsanto, 8500170, que contém 70 % de POE -15 na sua formulação); POE-APE, uma mistura de éter fosfatos de alquil (C8-10) polioxietileno (68130-47-2), polioxietileno alquil (50769-39-6), conhecido como Rolfen Bio® (de Lamberti), e alquil poliglucosídeo (APG, 383178-66-3/110615-47-9, Plantapon LGC®, Reino Unido); e compostos de amônio quaternário (QAC, 66455-29-6, Emulson AG CB30®, Lamberti) (Defarge, Spiroux de Vendômois e Séralini, 2018).

Acredita-se, portanto, que o ingrediente inerte POEA seja responsável pela maioria da toxicidade relatada pelos HBG.

4.3. Toxicocinética

O metabolismo do glifosato no homem ainda não se encontra bem compreendido. É reconhecida a formação de dois metabolitos principais, o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e o glioxilato, sendo que o AMPA apresenta maior toxicidade que o glioxilato (Sviridov *et al.*, 2015). Este herbicida é principalmente excretado na urina (Amarante Junior *et al.*, 2002).

A toxicocinética do glifosato em humanos encontra-se esquematizada na figura 4.

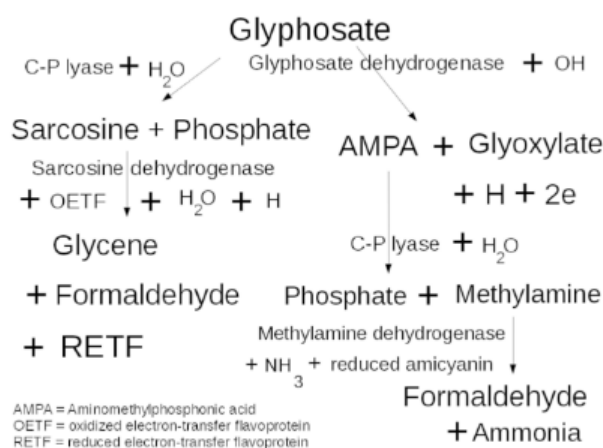


Figura 4. Via metabólica do glifosato. (Swanson, Hoy e Seneff, 2016)

A via metabólica no lado esquerdo da Figura 4 foi identificada como a via primária do glifosato, no caso do microrganismo *Pseudomonas sp.*, uma bactéria que causa infecções pulmonares e está associada ao desencadeamento de autoimunidade neuronal. Estas bactérias proliferam em pH baixo (~ 4,5) e, à medida que a quantidade de glifosato aumenta, alteram o metabolismo de aeróbio para anaeróbico (Lima *et al.*, 2014; McLean *et al.*, 2012). A enzima C-P liase, juntando-se a uma molécula de água, separa a molécula de glifosato, deixando o grupo fosfonato separado da sarcosina. Por sua vez, o excesso de sarcosina pode resultar em sarcosinemia ou hipersarcosinemia, um distúrbio metabólico causado pelo comprometimento da sarcosina desidrogenase (Swanson, Hoy e Seneff, 2016).

O glifosato pode interromper a distribuição das bactérias intestinais, destruindo seletivamente algumas e não afetando outras (Shehata *et al.*, 2013). Algumas das bactérias intestinais são particularmente eficientes a metabolizar o glifosato, portanto, quanto mais glifosato for consumido, mais bactérias Gram-negativas haverá no intestino e mais glifosato será metabolizado (mecanismo de *feedback* positivo) (McLean *et al.*, 2012).

Relativamente à via metabólica do lado direito da figura 4, foi demonstrado que várias espécies bacterianas são capazes de usar o AMPA como fonte de fósforo, incluindo *E. coli*, *Arthrobacter sp.* e *Pseudomonas sp.*. O mecanismo é o mesmo da via metabólica do lado esquerdo da figura (via C-P liase), no entanto, o fosfonato é fracionado a partir do subproduto, AMPA, em vez da molécula primária de glifosato (Hove-Jensen, Zechel e Jochimsen, 2014).

Esta segunda via metabólica foi identificada como a principal via de degradação do glifosato nos solos. As bactérias que produzem a enzima glifosato-desidrogenase são *Geobacillus caldxylosilyticus* T20 (encontrado no solo e na água) e *Flavobacterium sp.*, que são ubiqüitárias, inclusive no corpo humano (Swanson, Hoy e Seneff, 2016).

Este herbicida aumenta os níveis de consumo de oxigénio, da atividade adenosina trifosfato-ase (ATP-ase), interrompe a atividade da enzima aromatase (responsável pela produção de estrógenos), gera alteração dos níveis do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e reduz os níveis hepáticos do citocromo P450. Devido a redução deste último, há uma interferência no metabolismo de alguns fármacos, que pode resultar numa predisposição para porfirias (Swanson, Hoy e Seneff, 2016).

Como apresentado na tabela 4, os níveis de pK_a não são elevados, por isso, tanto o glifosato como o seu principal metabolito são absorvidos no lúmen intestinal (Qiu *et al.*, 2020)

Contudo, apenas 15-36 % da dose oral administrada repetidamente ou unicamente, é absorvida maioritariamente no intestino delgado. Desta maneira, tanto o glifosato como o AMPA são mal absorvidos, mesmo em condições favoráveis (Williams, Kroes e Munro, 2000)

Num estudo em ratos Anadón e col. (2009), demonstraram que quando o glifosato e o APMA são absorvidos, são distribuídos pelo organismo, sendo que o pico da concentração plasmática ocorre duas horas após a administração por via oral.

Já num estudo em 601 humanos expostos a uma toxicidade aguda a herbicidas à base de glifosato, Roberts e col. (2010) verificaram que, na maioria dos indivíduos, a amostra de plasma inicial era a que apresentava a concentração máxima de glifosato, o que sugere uma absorção rápida deste. O tempo de semi-vida aparente do glifosato foi de 3,1 horas (IC 95 % 2,7-3,6 horas).

A reabsorção sistémica do glifosato no intestino é bastante reduzida. Anadón e col. (2009) sugere uma taxa de absorção de cerca de 20 %, o que indica que essa ingestão possa ter sido até cinco vezes maior que a dose interna resultante. Este cálculo pode ser obtido a partir da fórmula:

$$Dose\ Externa\ (\frac{\mu g}{kg}\ x\ massa\ corporal) = \frac{100x\ dose\ interna}{\%absorção\ oral}$$

Equação 1. Cálculo da reabsorção sistémica do glifosato (Anadón *et al.*, 2009)

Desta forma, a partir de uma dose interna de 12 µg, estima-se uma quantidade ingerida total de 60 µg, correspondente (num indivíduo de 60 kg) a uma dose externa de 1 µg/kg. Assim, 0,001 mg/kg de massa corporal representaria 0,2 % da dose diária aceitável (ADI; Niemann *et al.*, 2015). No mesmo estudo Niemann e col. (2015), ao realizar análises de urina de agricultores consumidores com contato direto com o pesticida glifosato, verificaram que alguns dos agricultores apresentaram níveis de exposição até 233 ng/mL, no dia da exposição. Os autores deste estudo verificaram ainda que alguns agricultores não tiveram concentrações de glifosato detetáveis nas amostras de urina. De uma maneira geral, a taxa de valores detetáveis foi de 60 % no dia da aplicação e 27 % até o terceiro dia após a aplicação. Mais recentemente, o estudo de Zoller e col. (2020) demonstrou que a taxa de absorção pode ser ainda mais baixa do que a estudada por Anadón e col. (2009).

Após a absorção, o glifosato é rapidamente eliminado na urina; considerando as variações inter-individuais na excreção, a meia-vida biológica estimada de glifosato na urina humana é entre 3 e 14 horas (Connolly *et al.*, 2019; Zoller *et al.*, 2020).

Um estudo realizado com amostras biológicas de enfermeiras demonstrou que em nenhuma das amostras analisadas foram encontrados níveis detetáveis e quantificáveis de glifosato, para um limite de detecção de 10 ng/mL (Cowell, 1992).

Wester e col. (1991) estudaram uma possível via de exposição do glifosato através da pele. Os autores demonstraram *in vitro* que, sem os cuidados corretos de proteção, a absorção dérmica do glifosato, por parte de animais e humanos poderia acontecer, ainda que numa probabilidade diminuída (<2 %).

O mecanismo de ação do glifosato e suas formulações ainda são pouco conhecidos. Uma das razões deve-se ao facto de que existe uma grande variedade de sais de glifosato (Qiu *et al.*, 2020). Além disso, há uma grande variedade de produtos inertes e concentrações presentes nestes produtos, o que torna ainda mais difícil elucidar seu modo de ação (Richard *et al.*, 2005).

4.4. Efeitos tóxicos

A toxicidade aguda deste pesticida é considerada baixa em humanos. De acordo com a classificação da OMS, o glifosato, com uma dose letal média (LD50) de 4230 mg/kg de peso encontra-se na classe III (pesticidas ligeiramente perigosos), com uma baixa toxicidade aguda (OMS, 2020).

Apesar do glifosato ser considerado pouco tóxico, há evidências de efeitos negativos no ambiente, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de ervas, após o uso prolongado do herbicida (Abreu, De, Matta, Da e Montagner, 2008).

A atividade biocida do glifosato está associada à inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) (Bruggen, Van *et al.*, 2018). Assim, o glifosato interrompe o sexto passo na via do chiquimato (conversão de chiquimato-3-fosfato em EPSPS), necessário para a produção de aminoácidos aromáticos e compostos secundários com funções de defesa em plantas e muitos microrganismos (Funke *et al.*, 2007; Philipp Schledorn, 2014; Schrödl *et al.*, 2014).

Em ambientes aquáticos, a toxicidade do glifosato é acentuada com o aumento da temperatura e do pH (Amarante Junior *et al.*, 2002).

Os efeitos do glifosato e do AMPA em plantas incluem a diminuição da fotossíntese, através do aumento da degradação da clorofila por parte do glifosato e da perturbação da biossíntese da clorofila por parte do AMPA. Estas alterações no metabolismo das plantas resultam no amarelecimento e necrose das folhagens. Além disso, as plantas tratadas com glifosato não produzem substâncias aromáticas secundárias, incluindo fitoalexinas antimicrobianas, que defendem as plantas contra microrganismos patogênicos existentes no solo, resultando na morte das mesmas (Bruggen, Van *et al.*, 2018).

O crescimento das culturas resistentes ao glifosato tem levado os agricultores a aumentarem as doses e a frequência de aplicação deste herbicida, o que pode levar a efeitos secundários posteriores (Skelton *et al.*, 2017).

A toxicidade do glifosato em mamíferos e pássaros é considerada relativamente baixa. A base desta afirmação é a ausência da via do ácido chiquimato (Amarante Junior *et al.*, 2002; Anadón *et al.*, 2009; Bruggen, Van *et al.*, 2018).

No entanto, sendo não seletivo, o largo espectro de atividade do herbicida conduz à destruição de ambientes naturais e de fontes de alimento de alguns pássaros e anfíbios, levando à redução das populações. Um exemplo extremo é uma espécie de sapo da região de Houston, considerada espécie em perigo de extinção devido à destruição do seu habitat pelo glifosato (Amarante Junior *et al.*, 2002).

Apesar da toxicidade relativamente baixa do glifosato, alguns dos componentes dos seus produtos formulados apresentam-na mais elevada, para humanos, que o ingrediente ativo (Bradberry, Proudfoot e J. Allister Vale, 2004). As formulações encontradas no mercado contêm, geralmente, surfactante, cuja finalidade é impedir a formação de gotas e diminuir o alcance do produto, de forma a atingir apenas as folhas pulverizadas. Os tipos mais extensamente usados em formulações do glifosato são as etilaminas. Os compostos deste

grupo de surfactantes são significativamente mais tóxicos do que o glifosato (Bradberry, Proudfoot e J. Allister Vale, 2004).

Foram aplicados dois tipos de abordagens na investigação dos efeitos crónicos: estudos de correlação e estudos experimentais. Foram encontradas correlações entre o aumento do uso de glifosato e numerosas doenças humanas, incluindo várias formas de cancro, lesões nos rins e condições mentais, como autismo, Alzheimer e doença de Parkinson (Fluegge e Fluegge, 2016; Fortes *et al.*, 2016; Jayasumana, Gunatilake e Siribaddana, 2015; Mesnage *et al.*, 2015).

Em humanos, foram relatados problemas respiratórios, dermatológicos e abortos espontâneos após aplicação do glifosato em plantações ilegais de cocaína, na Colômbia (Camacho e Mejía, 2017).

O pior caso de exposição que causou intoxicação aguda em humanos adultos foi relatado como 125 e 5 µg/kg/dia para glifosato e AMPA, respetivamente (Williams, Kroes e Munro, 2000). A morte por exposição a essa ordem de valores ocorreu em 3,2 % dos casos, com tempo médio de óbito de 20 horas, principalmente devido a toxicidade no sistema cardiovascular (Bai e Ogbourne, 2016).

O glifosato apresenta, também, efeitos mutagénicos, visto que causou danos no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*) e nos cromossomas humanos, embora tenha dado resultados negativos nos testes com bactérias (IARC, 2015).

As formulações à base de glifosato demonstraram serem potentes disruptores endócrinos, bem como eficazes na alteração da função das mitocôndrias e no dano na membrana epitelial (Koller *et al.*, 2012; Martini *et al.*, 2016; Richard *et al.*, 2005; Thongprakaisang *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que o glifosato aumenta a probabilidade do corpo humano vir a desenvolver doenças graves como distúrbios gastrointestinais, obesidade, doenças cardíacas, depressão, autismo, diabetes, infertilidade e até cancro (Samsel e Seneff, 2013).

Sob condições experimentais com culturas celulares, o glifosato e os seus produtos de decomposição AMPA aumentaram as espécies reativas de oxigénio (ROS) em culturas de eritrócitos humanos em concentrações moderadamente altas (42 mg/L de glifosato puro ou AMPA) durante 24h (Kwiatkowska, Nowacka-Krukowska e Bukowska, 2014).

Noutros estudos laboratoriais, a exposição de células de sangue periférico humano ao glifosato resultaram em danos no DNA em leucócitos a altas concentrações (85 a 1690 mg/L) e diminuição da metilação do DNA (em 42 mg/L de glifosato *in vitro*) (Kwiatkowska, Nowacka-Krukowska e Bukowska, 2014). As alterações na metilação do DNA podem perturbar o equilíbrio entre a proliferação celular tumoral e a morte celular programada (apoptose)

(Hervouet *et al.*, 2013). Como consequência, as disfunções na metilação do DNA podem levar à ativação de oncogenes, enquanto a hipermetilação pode silenciar os genes supressores de tumor. Assim, o glifosato e o AMPA podem perturbar neurotransmissão normal e perturbar o delicado equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular programada (Bruggen, Van *et al.*, 2018).

Em suínos, os aumentos na infertilidade e as malformações fetais foram correlacionados com concentrações detetáveis de glifosato no fígado e rins e com resíduos na alimentação (Philipp Schledorn, 2014).

Num estudo em ratinhos gestantes, a exposição crónica ao glifosato colocado na água de abeberamento (1 % de HBG, correspondendo a 0,36 % de glifosato, durante 60 dias), levou a stress oxidativo e excitotoxicidade por glutamato, diminuindo a atividade da acetilcolinesterase no cérebro. Adicionalmente, verificaram-se comportamentos depressivos na descendência dos ratinhos expostos ao glifosato durante 60 dias (Cattani *et al.*, 2017).

Num outro estudo de exposição crónica, envolvendo tratamento diário de ratos com dose baixa (56 mg/kg) de herbicida à base de glifosato durante 5 semanas foram demonstrados alterações bioquímicas e anatómicas no fígado (Çağlar e Kolankaya, 2008). Por outro lado, a exposição crónica na água potável, durante 2 anos ao mesmo herbicida com doses de 50 ng/L (equivalente a 4 ng/kg de peso corporal), causou lesões hepáticas, renais e vários tumores em ratos de laboratório (Mesnage *et al.*, 2015; Séralini *et al.*, 2014). No entanto, estas conclusões sobre o possível efeito cancerígeno, foram contestadas por investigadores associados à indústria (Bruggen, Van *et al.*, 2018).

O glifosato juntamente com os surfactantes POEA e MON (75 % POEA) pode ter impactos negativos na saúde de uma variedade de animais da cadeia alimentar aquática, incluindo protozoários, mexilhões, crustáceos, sapos e peixes. (Bringolof, R.B.; Cope, W.G.; Mosher, S.; Barnhart, M.C.; Shea, 2007; Li *et al.*, 2017; Moreno, Sofia e Martinez, 2014; Prosser *et al.*, 2017).

As formulações de glifosato com POEA são geralmente mais tóxicas que as formulações sem esse surfactante (Bringolof, R.B.; Cope, W.G.; Mosher, S.; Barnhart, M.C.; Shea, 2007; Prosser *et al.*, 2017). Por exemplo, formulações com POEA demonstraram maior toxicidade para o microcrustáceo *Artemia salina* e para o peixe-zebra *Danio rerio* comparativamente a formulações sem POEA (Brito Rodrigues, *et al.*, 2017).

Num estudo em mexilhões, por exposição a glifosato puro, demonstrou-se que o herbicida suprimiu a atividade da acetilcolinesterase em baixas concentrações (1–676 mg/L). A supressão desta enzima está associada a problemas neurológicos (Sandrini *et al.*, 2013).

De forma semelhante aos efeitos do glifosato em animais terrestres, a exposição de peixes dourados (*Carassius auratus*) a níveis moderadamente baixos de glifosato (34 mg/L) perturbou o metabolismo em vários tecidos, levou à superprodução de ROS e stress oxidativo. Foi igualmente verificada lesão renal grave (Li et al., 2017).

Concentrações ainda inferiores de um herbicida à base de glifosato (3,6 mg/L por 4h) resultaram em danos no DNA no sangue, brânquias e fígado da enguia europeia (*Anguilla anguilla*) (Guilherme et al., 2009). A exposição da carpa de água doce (*Cyprinus carpio*) a níveis mais altos do mesmo herbicida à base de glifosato induziu alterações nas células hepáticas e nas mitocôndrias (Szarek et al., 2000).

Além dos efeitos diretos em animais aquáticos acima mencionados, o glifosato pode afetar as interações entre os peixes e seus agentes patogênicos, incluindo parasitas. Um estudo em peixes-gato, demonstrou que a exposição a concentrações subletais de glifosato reduziu os níveis de eritrócitos, trombócitos, linfócitos e leucócitos totais no sangue, além da diminuição da fagocitose das células imunitárias e aumento da suscetibilidade ao agente patogênico *Aeromonas hydrophila*, resultando na diminuição na taxa de sobrevivência dos peixes (Kreutz et al., 2011).

Noutro estudo, concentrações ambientalmente relevantes (0,36 mg/L) de glifosato resultaram num aumento da infecção de peixes de água doce *Galaxias anomalus* pelo parasita trematode *Telogaster opisthorchis* (Kelly et al., 2010).

Assim, baixos níveis de glifosato na água de superfície podem perturbar o equilíbrio entre os hospedeiros e agentes patogênicos. Isso pode resultar em mudanças inesperadas nos ecossistemas aquáticos.

Desde a sua descoberta em 1974, todas as investigações científicas caracterizaram o glifosato como um pesticida com uma toxicidade baixa (Tarazona et al., 2017).

No entanto, em Março de 2015, um grupo de 17 cientistas especializados, da Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) concluíram que o glifosato e os HBG se enquadram no grupo 2A, identificando-os como provavelmente cancerígenos para humanos (categoria usada quando não há evidência científica suficiente em humanos, mas há evidência científica que cause cancro em animais experimentais).

Após analisar as descobertas significativas da Agência de Proteção Ambiental Americana (que, em 1991, tinha classificado o glifosato como não carcinogénico para humanos) e alguns estudos mais recentes, a IARC concluiu que havia evidência científica suficiente para definir o glifosato como cancerígeno para animais experimentais (IARC, 2015).

Após revisão da publicação da IARC, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA – *European Food Safety Authority*), em Outubro de 2015, concluiu que não há evidência científica suficiente para considerar o glifosato possivelmente cancerígeno para humanos, contrariando a decisão da IARC (EFSA, 2016).

Por outro lado, em 2016, numa conferência conjunta da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e da OMS sobre Resíduos de Pesticidas, as duas instituições concluíram que o glifosato não é cancerígeno em ratos, mas não podiam excluir a possibilidade de ser cancerígeno em ratos em doses muito altas. Esta informação foi usada na avaliação de risco, concluindo que é improvável que o glifosato represente um risco carcinogénico para seres humanos. (FAO/WHO, 2016; Tarazona *et al.*, 2017).

As divergências científicas descritas podem provir de diferentes conjuntos de evidências, diferentes abordagens e métodos ou interpretações diferentes ao analisar resultados ambíguos (Tarazona *et al.*, 2017).

4.5. Glifosato e Linfoma Não-Hodgkin

O Linfoma de Hodgkin corresponde a células linfoides normais que sofrem alterações neoplásicas nos tecidos linfoides, enquanto no Linfoma Não-Hodgkin (LNH) as alterações geram um processo de malignidade, porém as características iniciais das células são preservadas (Pasqualetto, Soriano e Stuchi, 2018). Este último apresenta-se frequentemente com lesões do tipo extra nodal, afetando pulmão, pele e cavidade oral, embora também possa ser observada a lesão nodal (Jares, Colomer e Campo, 2012).

A ligação entre o glifosato e o LNH está bem estabelecida na literatura, mas as conclusões nem sempre são as mesmas. Como mencionado anteriormente, a IARC, defende haver alguma evidência científica, ainda que limitada, que justifica o risco aumentado de LNH, devido à exposição ao glifosato, classificando-o como provavelmente carcinogénico para humanos e inserindo-o grupo 2A (IARC, 2015). A exposição ao glifosato foi associada ao risco aumentado de desenvolvimento de LNH em dois trabalhos publicados recentemente (Pahwa *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

Contrariamente, a EFSA sugere que o glifosato não é carcinogénico para humanos (EFSA, 2016). Em concordância, três trabalhos recentes (Acquavella *et al.*, 2016; Crump, 2020; Donato *et al.*, 2020) consideram a evidência científica limitada para concluir que o glifosato é responsável pelo risco aumentado de desenvolver LNH.

A evidência científica existente em humanos, à qual a IARC recorreu para declarar a associação positiva entre glifosato e risco de desenvolver LNH, em 2015, foi constituída por

cinco estudos caso-controlo (Eriksson *et al.*, 2008; Hardell, Eriksson e Nordstrom, 2002; McDuffie *et al.*, 2001; Orsi *et al.*, 2009; Roos, De *et al.*, 2003) e dois estudos de coorte (Andreotti *et al.*, 2018; Roos, De *et al.*, 2005). Segundo Crump (2020), os estudos de caso-controlo tiveram viés de memória, prejudicando os resultados e, conseqüentemente, a decisão da IARC.

4.6. Ocorrência e significado atual

Sendo um herbicida sistémico e o mais comumente utilizado no mundo, o glifosato pode ser encontrado um pouco por todo o meio ambiente, em animais, plantas, águas e solos. Por conseguinte, através dos alimentos e água ingeridos, a exposição humana ao glifosato tem vindo a ganhar uma preocupação crescente por parte dos investigadores científicos, nas últimas décadas.

O glifosato pode ser detectado em alimentos como frutos frescos ou congelados ou frutos de casca rija (ex. laranjas, uvas de mesa e uvas para vinho, azeitonas); produtos hortícolas frescos ou congelados (batatas, milho doce, cogumelos silvestres); leguminosas secas (ex: feijões, lentilhas, ervilhas, tremço); sementes e frutos de oleaginosas (ex: sementes de linho, sementes de sésamo, de girassol, colza, soja, mostarda, algodão); cereais (ex: cevada, aveia, arroz, sorgo, trigo; chás, café, infusões de plantas, cacau e alfarrobas; lúpulos; especiarias; plantas açucareiras; produtos de origem animal) (ASAE, 2016). Na tabela 5 encontram-se alguns estudos de determinação de glifosato em diversos alimentos, bem como em água. A incidência reportada, é, no geral, bastante elevada, apesar de com níveis inferiores ao Limite Máximo de Resíduo (LMR).

O cenário mais preocupante é, sem dúvida, o da água, visto que as concentrações de glifosato ultrapassam excessivamente os LMR. Como bem essencial à vida e, uma vez que a exposição humana à água é bastante elevada, estas concentrações detetadas são uma potencial ameaça à saúde pública.

Os estudos em humanos são escassos e é crucial o aumento dos mesmos de forma a compreender melhor a exposição humana ao glifosato e as suas potenciais implicações para a saúde. Na tabela 6, destacam-se os estudos de biomonitorização humana mais recentes relativos à exposição humana de glifosato, em adultos.

Tabela 5. Estudos que analisam a presença de glifosato em alimentos

País (ano)	Matriz alimentar	Nº de amostras positivas/nº de amostras (%)	Intervalo de contaminação Mín-Máx (µg/Kg)	Teor Médio(µg/Kg)	LOD/ LOQ (µg/Kg)	Referência
Suíça (2018)	Cereais de Pequeno almoço	8/10 (80 %)	<1-291	50,8	LOQ: 0,001mg/kg l	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
	Trigo	16/18 (88,9 %)	<1-421	134,9		
	Pão	7/10 (70 %)	<1-45,8	6,9		
	Outros cereais	2/13 (15,4 %)	<1-12,4	1,2		
Itália (2019)	Farinha de trigo	0/4 (0 %)	<30	<30	LOQ: 0,1mg/kg100	(Gotti <i>et al.</i> , 2019)
	Sementes de trigo	1/1 (100 %)	243000	243000		
Canadá (2019)	Mel	197/200 (98,5 %)	1-49,8	4,9	LOQ: 1	(Thompson, Heever, van den e Limanowka, 2019)
EUA (2013-2016)	Mel	24/84 (28,2 %)	15-342	92,4	LOQ: 15ng/mL1,5x10 ⁷	(Berg <i>et al.</i> , 2018)
Suíça (2018)	Sumos de fruta	11/11 (100 %)	0,5-3,5	1,9	LOQ: 0,0005mg/kg	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
França (2017)	Frutas	0/6 (0 %)	<5	<5	LOD: 1,7 LOQ: 10	(Liao <i>et al.</i> , 2018)
Portugal (2017)	Laranja	0/11 (0 %)	<100	<100	N.D.	(DGAV, 2019)
	Pera	0/13 (0 %)	<100	<100		
Suíça (2018)	Leguminosas	21/41 (51,2 %)	<1-2948	173,3	LOQ: 1 0,001mg/kg	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 5. Estudos que analisam a presença de glifosato em alimentos (cont)

País (ano)	Matriz alimentar	Nº de amostras positivas/nº de amostras (%)	Intervalo de contaminação Mín-Máx (µg/Kg)	Teor Médio(µg/Kg)	LOD/ LOQ (µg/Kg)	Referência
França (2018)	Legumes	0/14 (0 %)	<5	<5	LOD: 1,7 LOQ: 10	(Liao <i>et al.</i> , 2018)
Itália (2017)	Legumes	15/83 (18,1 %)	3-300	N.D.	LOQ: 3 0,003mg/kg	(Savini, Bandini e Sannino, 2019)
Suíça (2018)	Leite	0/3 (0 %)	<0,5	<0,5	LOQ: 0,5	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
	Ovo	0/1 (0 %)	<1	<1		
	Carne/ peixe	3/13 (23,1 %)	<1-4,9	0,8		
Suíça (2018)	Alimentos para bebês	0/11 (0 %)	<1	<1	LOQ: 0,5	(Zoller <i>et al.</i> , 2018)
Itália (2017)	Alimentos para bebês	2,15 (13,3 %)	<2	<2	LOD: 1,7 LOQ: 10	(Liao <i>et al.</i> , 2018)
México (2017)	Água subterrânea	26/29 (89,7 %)	<0.05-1,7	0,94	LOD: 50* LOQ: 130*	(Rendón-Von Osten e Dzul-Caamal, 2017)
	Água engarrafada	13/15 (86,7 %)	<0,05-0,78	0,48		
Diversos países europeus (1993-2009)	Água de superfície	4682/50805 (28,9 %)	<0,003-50	N.D.	LOD: 0,2* LOQ: 0,003*	(Horth e Blackmore, 2009)
	Água subterrânea	472/36298 (1,3 %)	<0,01-24	N.D.		
EUA (2014)	Diversos tipos de águas	1470/3732 (39,4 %)	<0,02-476	N.D.	N.D.	(Battaglin <i>et al.</i> , 2014)

(*valores em µg/L; LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação; N.D. = Não Detetado)

Tabela 6. Estudos de biomonitorização recentes relativos à exposição humana ao glifosato, em adultos.

País (ano)	Amostra	Características	Nº de amostras	Positivas (%)	Intervalo de contaminação (µg/L)	Teor Médio ± DP (µg/L)	Técnica Analítica	LOD/ LOQ (µg/L)	Referência
EUA, 2019	Urina	mulheres grávidas	71	93% (66) > LOD	0,5–7,20	3,40	LC- MS/MS	LOD: 0,1	(Parvez et al., 2018)
Irlanda (Setembro 2016 – setembro 2017)	Urina	trabalhadores adultos na área das hortícolas, aplicadores de pesticidas com glifosato	20	75 % acima do LOQ	1,9-7,4	2,5	LC- MS/MS	LOQ: 0,5	(Connolly et al., 2018)
México, 2017	Urina	agricultores adultos, entre os 30 e os 50 anos	81	81 (100 %)	N.D.	Menor Média determinada (região de Francisco J. Mújica): 0,22 Maior Média determinada (região de Campeche): 0,47	ELISA	0,05/ 0,13	(Rendón-Von Osten e Dzul-Caamal, 2017)

(LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação; N.D. = Não Detetado)

Tabela 6. Estudos de biomonitorização recentes relativos à exposição humana ao glifosato, em adultos (cont.)

País (ano)	Amostra	Características	Nº de amostras	de Positivas (%)	Intervalo de contaminação (µg/L)	Teor Médio ± DP (µg/L)	Técnica Analítica	LOD/ LOQ (µg/L)	Referência
Irlanda, 2017	Urina	adultos saudáveis	50	10 (20 %)	0,80–1,35	0,87	LC-MS/MS	LOD 0,5	(Connolly <i>et al.</i> , 2018)
Dinamarca, 2011	Urina	13 mães adultas	13	13 (100 %)	0,49–3,22	1,28	ELISA	0,0751/0,1	(Knudsen <i>et al.</i> , 2017)
Tailândia, 2011	Urina	mulheres grávidas saudáveis, no sétimo mês de gravidez, entre os 19-35 anos	82	82 (100 %)	0,2–189,1	17,5	HPLC	LOD: 0,4	(Kongtip <i>et al.</i> , 2017)
Irlanda, 2015	Urina	trabalhadores na área das hortícolas, aplicadores de pesticidas com glifosato	31	17 > LOD	0,32–7,23	0,64	LC-MS/MS	LOD 0,5	(Connolly <i>et al.</i> , 2017)
Alemanha, 2001-2015	Urina	adultos saudáveis entre os 20 e os 29 anos de idade	399	127 (31,8 %)	<LOQ-2,8	N.D.	GC – MS/MS	LOQ= 0,1	(Conrad <i>et al.</i> , 2017)

(LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação; N.D. = Não Detetado)

Tabela 6. Estudos de biomonitorização recentes relativos à exposição humana ao glifosato, em adultos (cont.)

País (ano)	Amostra	Características	Nº de amostras	Positivas (%)	Intervalo de contaminação (µg/L)	Teor Médio ± DP (µg/L)	Técnica Analítica	LOD/ LOQ (µg/L)	Referência
EUA, Maio 2014 – Março 2015	Urina e leite materno	Mulheres lactentes	41 amostras de leite materno e 40 amostras de urina	Leite: <LOD Urina: 37 (92,5 %), dos quais 29 > LOQ	Urina: LOD-1,93	Leite: <LOD Urina: 0,28 ± 0,38	HLPC	Leite: 1/10 Urina: 0,02/0,10	(Mcguire et al., 2016)
Sri Lanka, 2015	urina	grupo 1: 10 agricultores adultos com doença renal crónica (expostos), grupo 2: 10 adultos saudáveis (expostos), grupo 3: 10 adultos saudáveis (não expostos)	30	30 (100 %)	grupo 1: 28, - >80; grupo 2: 40,2 - >80; grupo 3: 1,2 – 5,5	grupo 1: 56,8; grupo 2: 73,5; grupo 3: 3,3	ELISA	LOD 0,6	(Jayasumana, Gunatilake e Siribaddana, 2015)
França, 2012	Urina	família de agricultores, 5 elementos, dos quais 2 adultos	5	1 (20 %)	N.D.-9,5	4,35, no dia 0; 0,95, no dia 1 e 1,9, no dia 2	HPLC - MS	LOD=1; LOQ=2	(Mesnage et al., 2012)

(LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação; N.D. = Não Detetado)

Em 2019, segundo o relatório anual RASFF (*The Rapid Alert System for Food and Feed*), da Comissão Europeia, foram notificados 253 alertas relativos aos pesticidas. Em Portugal, foram registados 19 alertas. Em anos anteriores, os alertas relativos às micotoxinas eram sempre superiores, comparativamente aos pesticidas. Mas, em 2019, o nosso país registou uma diminuição de notificações relativas às micotoxinas e um aumento nas notificações relativas aos pesticidas. Desta forma, houve 6 alertas para os pesticidas e 6 para as micotoxinas (UE, 2019).

A evolução de alertas relativos aos pesticidas em Portugal sofreu um aumento no último ano. Em 2017 houve 30 alertas no total, nenhum relativo aos pesticidas. Em 2018 houve 23 alertas, 2 relativos aos pesticidas. E em 2019, subiram para 6 os alertas relativos aos pesticidas, num total de 19 (UE, 2019).

4.7. Avaliação da exposição

4.7.1. Ingestão Diária Estimada

De acordo com os estudos consultados, de uma forma geral, a exposição do herbicida à população é baixa e ocorre principalmente através da dieta.

Num estudo recente, no Reino Unido, foram considerados dois grupos de indivíduos que poderiam ser mais expostos ao glifosato durante a sua vida: homens e mulheres com ocupação profissional que envolve aplicação do herbicida em culturas agrícolas e as respectivas famílias (nomeadamente crianças entre primeiro e o sexto ano de vida) (Williams, Kroes e Munro, 2000).

Devido à toxicidade dos metabolitos ser superior à do próprio glifosato, na tabela 7 é incluída a exposição diária estimada (no pior cenário possível), NOAEL e Margem de Exposição do glifosato e de um dos seus metabolitos (AMPA) e do surfactante mais tóxico (POEA), segundo o estudo citado.

Tabela 7. Sumário de NOAEL, Estimativas do Pior Cenário Possível e Margem de Exposição, para o Glifosato, AMPA e POEA (Adaptado de Williams, Kroes e Munro, 2000)

Químico	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Bases do NOAEL	Pior Cenário de Exposição Crónica (mg/kg p.c./dia)		Margem de Exposição (mg/kg p.c./dia)	
			Adultos	Crianças	Adultos	Crianças
Glifosato	175	Toxicidade materna, num estudo de toxicidade de desenvolvimento	0,0323	0,052	5,420	3,370
	209	Estudo de 90 dias em ratinhos			-	4,020
	400	Estudo de 90 dias em ratinhos e estudos de toxicidade de desenvolvimento	0,0048	0,0104	83,300	38,500
<2,8	Baseado no conteúdo de AMPA no glifosato usado para um estudo crónico em ratos	<583			<259	
POEA	15	Toxicidade materna, num estudo de toxicidade de desenvolvimento	0,0325	0,026	461	577
	36	Estudo de 90 dias em ratinhos			-	1380

(AMPA- Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico; POEA- Polioxietilenamina)

Contudo, a real exposição da população ao glifosato, ao AMPA e ao POEA deverá ser apenas uma pequena fração do estimado na tabela 7. De facto estimativas de exposição baseadas em permissas mais realistas que as descritas na tabela 7, produziram valores substancialmente inferiores aos determinados nesta avaliação e, portanto, as estimativas de exposição, no pior caso possível, representam estimativas superiores à realidade (Williams, Kroes e Munro, 2000).

Além disso, estas avaliações extremamente conservadoras mostraram que a exposição na dieta é aceitável em comparação com as dosagens que originaram os estudos toxicológicos experimentais (Williams, Kroes e Munro, 2000).

Calculando as exposições do glifosato e dos seus metabolitos, verificou-se que estas eram muito baixas. Relativamente ao glifosato, calculou-se a exposição aguda e crónica de 0,125 de 0,0323 mg/kg p.c./dia para adultos e de 0,097 e 0,052 mg/kg p.c./dia para crianças, respetivamente. A exposição ao metabolito AMPA variou de 0,0048 a 0,0104 mg/kg p.c./dia. O cálculo da exposição aguda e crónica do POEA foi de 0,026 mg/kg de peso corporal/dia para a exposição crónica em crianças e de 0,0163 mg/kg de peso/dia para exposição aguda em adultos aplicadores de herbicida.

Estimativas através do pior cenário possível requerem o uso dos LMR de glifosato e dos seus metabolitos nos géneros alimentícios, baseado nos valores do Comité de Resíduos de Pesticidas do *Codex Alimentarius* da FAO. Desta forma, se os níveis reais de resíduos medidos forem usados em vez dos valores de LMR e forem considerados outros fatores (por exemplo, percentagem de culturas tratadas, redução de resíduos na lavagem e no processamento), as estimativas de exposição alimentar seriam substancialmente (cerca de 10 a 100 vezes) inferiores (Williams, Kroes e Munro, 2000).

Em Portugal, não foi ainda publicado nenhum estudo semelhante ao mencionado anteriormente, aplicado à população Portuguesa.

4.7.2. Exposição em crianças

Existem poucos estudos que elucidem acerca do impacto dos herbicidas nas crianças. A maior suscetibilidade deve-se, principalmente, à ingestão de comida e bebida, mais elevada por quilograma de peso relativamente aos adultos, às suas atividades no exterior e ao facto dos seus órgãos ainda estarem em desenvolvimento (Trasande *et al.*, 2020).

As investigações indicam que as crianças são menos eficientes na metabolização de certos pesticidas organofosforados, levantando uma importante linha de investigação

relativamente ao glifosato. Estudos demonstraram que a suscetibilidade das crianças aos pesticidas organofosforados e *stress* oxidativo pode ser aumentada, relativamente aos adultos (Karen Huen, 2010). Isto pode ser explicado pela baixa atividade da enzima paraoxonase I (PONI) nos recém-nascidos, cuja função é impedir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e desintoxicar derivados de certos pesticidas organofosforados neurotóxicos, em comparação com adultos (Chen *et al.*, 2003; Huen *et al.*, 2009). Segundo estudos publicados, esta enzima só está presente em concentrações suficientes depois dos 7 anos de idade (Huen *et al.*, 2009). Este aumento da atividade enzimática de PONI dependente da idade é modificado por polimorfismos genéticos. De facto, verificou-se que crianças com alelos PONI 192 R e alelos PONI-108 C experimentaram um aumento mais acentuado na atividade enzimática à medida que envelheciam em comparação com crianças com alelos PONI 192 Q e alelos PONI-108 T. Tais evidências sugerem que a janela de suscetibilidade tanto ao *stress* oxidativo quanto à exposição pesticidas organofosforados neurotóxicos pode ser muito mais prolongada, comparativamente ao descrito anteriormente e as crianças com certos genótipos podem ser particularmente vulneráveis (Huen *et al.*, 2010).

4.7.3. Biomonitorização

A biomonitorização humana (BMH) da exposição é a avaliação sistemática dos níveis de químicos e dos seus metabolitos através análise de amostras biológicas humanas, como sangue, urina, cabelo ou leite materno (Connolly, Coggins e Koch, 2020). A BMH, sendo uma medida de exposição interna real, é considerada uma ferramenta essencial para exposição e avaliações de risco (Sexton, Needham e Pirkle, 2004). A BMH pode ser usada para identificar novas exposições a produtos químicos, informar mudanças temporais e a distribuição da exposição entre os grupos, especialmente os grupos vulneráveis (por exemplo, crianças). Além disso, é um método capaz de vincular a potencial exposição externa (frequentemente descrita ou determinada nos piores cenários) às concentrações internas reais, proporcionando assim uma exposição confiável, com informações (extensão e magnitude) a serem associadas a dados toxicológicos para caracterização de risco (Angerer, Ewers e Wilhelm, 2007; Bahadori *et al.*, 2007).

A BMH desempenha um papel decisivo na prevenção da saúde e gestão de riscos, fornecendo informações para agências reguladoras e formuladores de políticas. A avaliação e gestão de risco sem BMH levam a estimativas de risco erradas e estão na origem de medidas inadequadas (Angerer, Ewers e Wilhelm, 2007).

O glifosato pode ser determinado analiticamente de várias formas. No entanto, a sua molécula apresenta propriedades que dificultam a sua determinação, como o seu carácter anfotérico, a elevada solubilidade em meio aquoso, a baixa solubilidade em solventes orgânicos, a elevada polaridade, a baixa volatilidade e a ausência de grupos cromóforos que absorvam na região do ultravioleta e visível, tornando-o um dos herbicidas mais difíceis de determinar analiticamente (Khrolenko e Wieczorek, 2005; Qiu *et al.*, 2020). O facto de ser o herbicida mais comum no mundo e, simultaneamente, um dos mais difíceis de analisar, originou o conceito “O Paradoxo do Glifosato” (Valle *et al.*, 2019).

A seleção da matriz biológica para analisar pesticidas em humanos (bem como outros produtos químicos) é efectuada de acordo com as propriedades químicas da substância monitorizada e a sua toxicocinética. Até o momento, as matrizes mais utilizadas são o sangue e urina (Yusa *et al.*, 2015). O sangue é uma boa matriz para a grande maioria dos produtos químicos porque o plasma sanguíneo está em contacto com todos os tecidos e órgãos do organismo e é, portanto, utilizado para analisar a exposição interna a pesticidas persistentes, como inseticidas organoclorados que têm meias-vidas biológicas longas (até vários anos) (Barr, 2008). A principal desvantagem do uso de sangue na biomonitorização é o facto de ser uma matriz invasiva, e sua colheita necessitar da participação de pessoal qualificado (Yusa *et al.*, 2015). Por outro lado, para avaliar a exposição a pesticidas não persistentes, como piretróides, inseticidas organofosforados, ou outras classes de herbicidas, que têm um tempo de vida curto no corpo humano e, conseqüentemente, são encontrados em baixas concentrações no sangue, a urina é a matriz de eleição. Desta forma, os metabolitos hidrofílicos dos pesticidas não persistentes e, em alguns casos, o composto original, são determinados na urina. Esta é uma matriz bastante abundante e de fácil recolha. Uma matriz de urina é representativa da exposição recente porque os pesticidas não persistentes são metabolizados e eliminados em poucos dias (Yusa *et al.*, 2015). Em geral, os investigadores concluem que a recolha de amostras de 24h é mais difícil que a recolha das amostras pontuais, portanto, estas últimas são utilizadas com mais frequência. Para compensar o volume variável e as concentrações do composto em amostras pontuais, é efectuada um ajuste do nível de exposição, com base no nível de creatinina (Bossi *et al.*, 1999).

Alguns trabalhos mais recentes de deteção de glifosato em urina de humanos, incluem um trabalho recente, que detetou uma exposição de glifosato em agricultores no México, por uso excessivo do herbicida nas culturas (Rendón-Von Osten e Dzul-Caamal, 2017). Num estudo realizado nos Estados Unidos da América, uma investigação numa família verificou uma grande exposição ao glifosato, principalmente nas crianças (Shaw, 2017). Adicionalmente, na

Alemanha, um estudo igualmente recente (Knudsen *et al.*, 2017) analisou níveis de glifosato na urina de mães e crianças, com as últimas a apresentarem valores mais elevados.

4.8. Determinação analítica

Conforme descrito anteriormente, devido às suas características químicas, a determinação analítica de glifosato é um verdadeiro desafio. Para detetar a sua presença na água, solo e materiais alimentares em níveis residuais, este herbicida deve ser derivatizado com grupos de cromóforo, permitindo assim que os seus quocientes sejam detetados com a ajuda de métodos espectrofotométricos (Gill, Sethi e Mohan, 2017).

A elevada capacidade do herbicida de adsorver a partículas minerais ou orgânicas da argila, bem como a sua elevada afinidade com os catiões metálicos que se interligam com o glifosato, dificultam a deteção sem pré-tratamento das amostras (Valle *et al.*, 2019).

Desta forma, é necessário o uso de um agente de derivatização. O mais usado é o ácido clorofórmico 9H-fluoren-9-ilmetil éster (FMOC-Cl) (Koskinen, Marek e Hall, 2016). A derivatização com FMOC-Cl envolve uma substituição nucleofílica, no segundo grupo amino, realizada em condições alcalinas. O FMOC-Cl tem baixa solubilidade em água e baixa estabilidade, por isso, deve ser preparado em solventes orgânicos que sejam miscíveis em água, como o acetonitrilo (Okada *et al.*, 2019). O FMOC-Cl pode ser rapidamente hidrolisado em FMOC-OH e também pode formar outros aminoácidos, o que reduz o desempenho da reação com glifosato e AMPA e, por essa razão, deve ser adicionado em excesso (Botero-Coy *et al.*, 2013). Após a etapa de derivatização ser concluída (cerca de 3 a 24h depois), é necessário adicionar uma etapa de limpeza para extrair o excesso de FMOC-Cl e quaisquer impurezas orgânicas remanescentes. Estes procedimentos de derivatização são demorados, visto envolverem uma grande quantidade de manipulação de amostra, e apesar de caros, são necessários (Koskinen, Marek e Hall, 2016).

Relativamente aos métodos de análise, a deteção fotométrica e fluorométrica do glifosato e dos seus metabolitos não é viável devido à ausência de grupos cromóforo ou fluoróforo nas suas estruturas (Valle *et al.*, 2019).

Os métodos cromatográficos podem ser utilizados para detetar resíduos de glifosato, como a cromatografia líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) ou líquida de elevada eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e cromatografia de iões (Zelenkova e Vinokurova, 2008). A LC é um método rápido, sensível e repetível, mas necessita de processos de derivatização e requer equipamentos de última geração. No entanto, vários autores optam por usar este

método para determinar glifosato em matrizes biológicas, como urina, sangue ou leite materno (Connolly *et al.*, 2017, 2019; Jensen *et al.*, 2016; Philipp Schledorn, 2014; Soukup *et al.*, 2020; Tsao *et al.*, 2016). A GC normalmente não é utilizada, devido à complexidade dos processos de derivatização necessários (Valle *et al.*, 2019).

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utiliza a identificação por anticorpos que reconhecem o glifosato (antigénio), após a respectiva derivatização. Através de uma reação colorimétrica, a degradação enzimática do substrato permite identificar a presença do herbicida. Por ser um método relativamente rápido, tem vindo a ser amplamente utilizado (Clegg, Stephenson e Hall, 1999; González-Martínez *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2003). Este método oferece algumas vantagens relativamente aos restantes métodos químicos, uma vez que os anticorpos marcados podem ser usados em reações competitivas para detetar herbicidas. É um método seletivo e sensível para determinar o glifosato em amostras biológicas, alimentares e ambientais. Apesar dos limites de deteção serem normalmente superiores aos alcançados em cromatografia líquida associada a espectrofotometria de massa (LC-MS), são inferiores aos obtidos na GC e até mesmo semelhantes aos obtidos por HPLC, na deteção de glifosato em água (Rubio *et al.*, 2003; Valle *et al.*, 2019).

De acordo com a tabela 6, os métodos analíticos mais utilizados para determinar glifosato em matrizes biológicas são LC-MS, HPLC e ELISA.

Foram publicados alguns estudos que descrevem a análise de glifosato em amostras de água, contudo foram muito poucos os estudos de determinação de glifosato em amostras de géneros alimentícios (Khrolenko e Wieczorek, 2005).

Nos estudos em que a amostra analisada é a água, o glifosato é maioritariamente analisado através de LC-MS, sendo utilizado o agente de derivatização mais comum, o FMOC-Cl (Okada *et al.*, 2019; Poiger *et al.*, 2017; Ronco *et al.*, 2016; Skeff, Recknagel e Schulz-Bull, 2016).

Relativamente a amostras de alimentos, dois estudos analisaram a presença de glifosato em campos de milho de campo, forragem de soja e nozes e em sementes de soja (Alferness e Iwata, 1994; Duke *et al.*, 2003). No primeiro, o método utilizado foi GC-MS, tendo verificado que as amostras de milho, soja e nozes apresentaram uma concentração de 0,050, 0,40, e 2,0 mg/kg, respetivamente.

Duke e col. (2003) determinaram analiticamente glifosato presente em sementes de soja através de cromatografia gasosa associada a espectrofotometria de massa (GC-MS) e o valor mais elevado encontrado foi de 3,08 µg/g.

Zoller e col. (2018) determinaram glifosato em algumas amostras alimentares de um supermercado através de LC-MS. Utilizando o mesmo método analítico, Liao e col. (2018) determinaram glifosato em alimentos à base de leite para bebês.

Através do método ELISA, dois estudos analisaram glifosato em alimentos (Selvi, Sreenivasa e Manonmani, 2011) e em água (Mörtl *et al.*, 2013).

Mais recentemente, em 2020, foram publicados dois estudos com novos métodos de detecção de glifosato em amostras alimentares. O primeiro, realiza a determinação do herbicida em amostras de ervilhas e tremoços, recorrendo ao uso de uma nova sonda fluorescente de nanopartículas de prata com pontos quânticos de grafeno (Jiménez-López *et al.*, 2020). O segundo utiliza uma sonda dupla de lantanídeos baseada em redes de polímeros de coordenação com o objetivo de detectar glifosato em amostras de arroz, milho, soja, leite, água da torneira e água da nascente (Qu, Wang e You, 2020).

4.9. Legislação aplicável

Segundo a EFSA (2016), a Ingestão Diária Aceitável (ADI) de glifosato é de 0,5 mg/kg de peso corporal por dia, com base no Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (NOAEL, do inglês *No Observed Adverse Effect Level*) de 50 mg/kg p.c./dia do estudo de toxicidade de desenvolvimento em coelhos e com a aplicação de um Factor de Incerteza (FI) de 100.

A avaliação anterior da UE, em 1991, havia estabelecido uma ADI de 0,3 mg/kg de peso corporal por dia, com base nos quatro estudos de toxicidade de longo prazo em ratos disponíveis à data (UE, 1991). De acordo com a prática regulatória anterior, foram usados os níveis sem efeitos observáveis (NOELs, do inglês *No Observed Effect Levels*), em vez de NOAELs. Foi, inicialmente, estabelecido um NOEL geral de 30 mg/kg peso corporal por dia. Mas, devido às baixas doses testadas (o NOEL é a dose mais alta testada neste estudo e na avaliação atual, um NOAEL geral de longo prazo é 100 mg/kg), o estudo ficou desatualizado (EFSA, 2016).

O peso corporal é baseado em seis estudos válidos de carcinogenicidade a longo prazo em ratos. A Dose Aguda de Referência (ARfD) é de 0,5 mg/kg p.c./dia, com base no mesmo valor de NOAEL de 50 mg/kg p.c./dia que determinou a atual ADI (da toxicidade de desenvolvimento em coelhos) devido à ocorrência de toxicidade grave, incluindo mortalidade observada em gestantes e o aumento da incidência de perdas pós-implantação observada em dois dos sete estudos de toxicidade do desenvolvimento em coelhos, aplicando um FI de 100. Na avaliação anterior da UE, não tinha sido definido um ARfD (UE, 1991).

O nível aceitável de exposição do operador (AOEL, do inglês *Acceptable Operator Exposure Level*) é 0,1 mg/kg p.c./dia na mesma base do ADI e ARfD, aplicando um fator de correção para contabilizar a absorção oral limitada de 20 %. A avaliação anterior da UE estabeleceu um AOEL de 0,2 mg/kg p.c./dia com base em um NOEL materno (assumido como sendo um NOAEL) de 75 mg/kg p.c./dia de um estudo de desenvolvimento em coelhos, com um FI de 100 e 30 % absorção oral.

Os LMR são valores definidos legalmente (que servem de base à avaliação de risco e considerados aceitáveis) a partir dos quais o alimento em questão já passará a apresentar concentrações de um determinado contaminante superiores ao permitido por lei e, por isso, potencialmente perigosos para a saúde pública (DGAV, 2020). Os LMR referentes ao glifosato em alimentos estão apresentados na tabela 8.

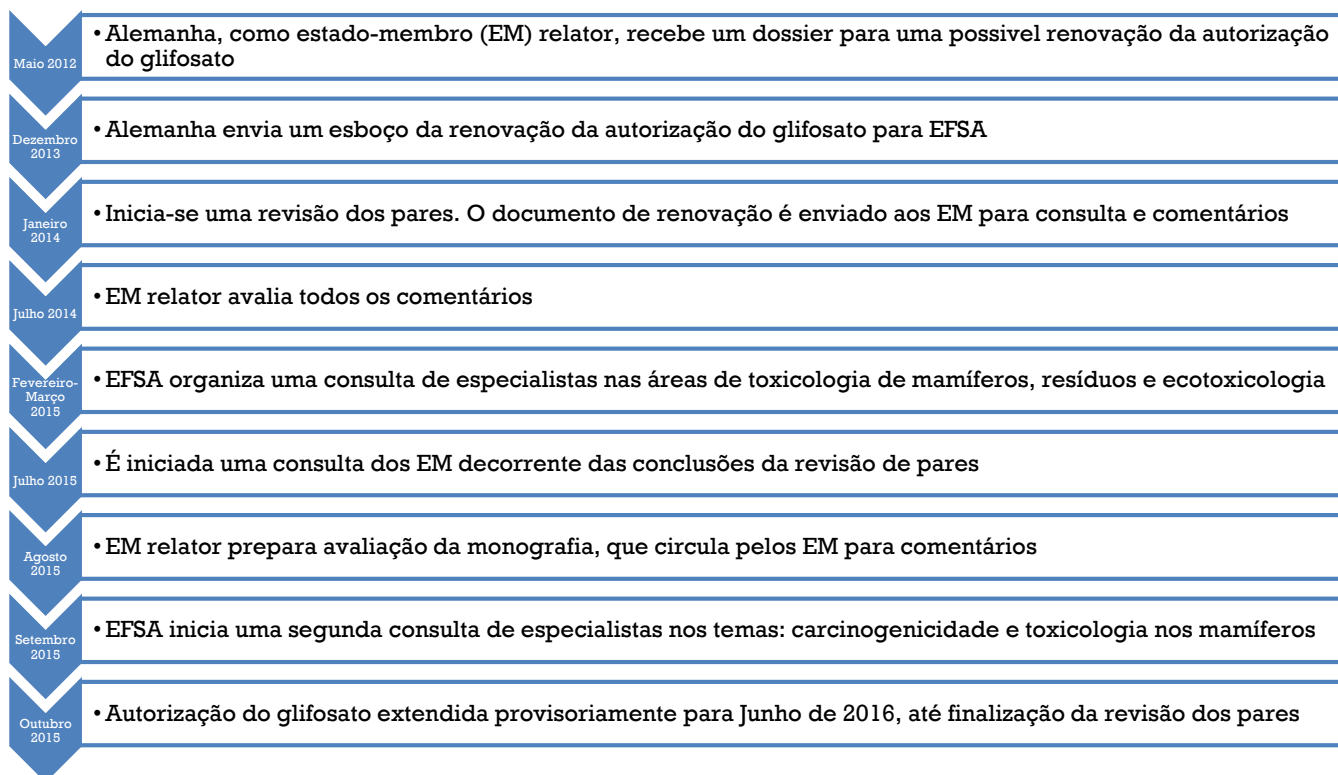
Relativamente à autorização do glifosato, a EFSA, a 12 de Novembro de 2015 divulgou uma linha cronológica (esquema 1) relativa à avaliação de risco do glifosato (EFSA, 2016). Mais recentemente, em 2020, a EFSA emitiu, no seu site oficial, a cronologia dos eventos mais recentes (esquema 2).

Actualmente, o glifosato está banido em 18 países da Europa, incluindo Portugal. No entanto, é permitida a utilização, com algumas excepções autorizadas pela DGAV, de herbicidas que contenham glifosato (DGAV, 2020).

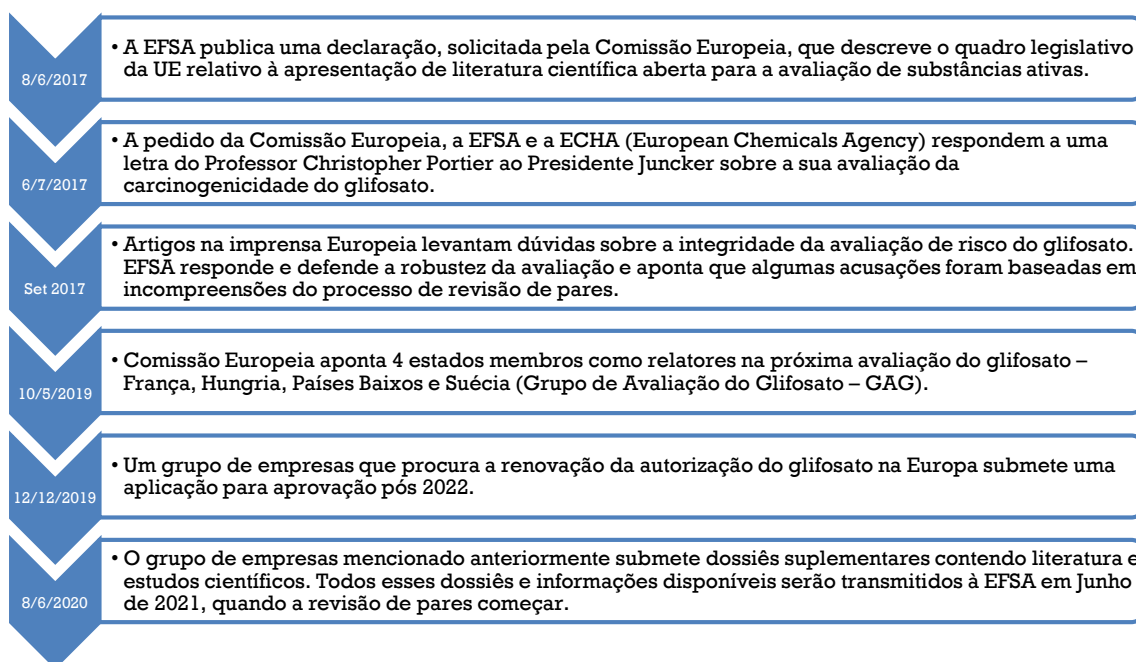
Tabela 8. Limites Máximos de Resíduos referentes ao glifosato em diversos alimentos (Comissão Europeia, 2020).

Grupo alimentar	Alimento	LMR glifosato (µg/kg)
Frutas	Laranjas e tangerinas	500
	Uvas	500
	Azeitonas	1000
	Oleaginosas	100
	Outras frutas	100
Legumes/ Vegetais	Batatas	500
	Milho doce	3000
	Outros legumes/vegetais	100
Leguminosas	Feijão	2000
	Lentilhas	10000
	Ervilhas	10000
	Tremoços	10000
	Outras leguminosas	100
Cereais	Centeio	20000
	Trigo sarraceno	100
	Milho	1000
	Millet	100
	Aveia	20000
	Arroz	100
	Centeio	10000
	Sorgo	20000
	Trigo	10000
	Outros cereais	100
Produtos de origem animal	Ovos	50
	Carne	50
	Peixe	50
	Leite	50
	Mel	50
Outros	Pão	10
	Óleo	100
	Azeite	100
	Água	0,1*
	Alimento para bebés	10

(*água: µg/L)



Esquema 1. Cronologia da avaliação da autorização do Glifosato na Europa (Adaptado de EFSA, 2016)



Esquema 2. Cronologia da avaliação da autorização do Glifosato na Europa (Adaptado de EFSA, 2020).

II - PARTE EXPERIMENTAL

I. Significado e objetivos do estudo

O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo e, como tal, toda a população estará transversalmente e potencialmente exposta a este pesticida. O glifosato é facilmente adsorvido no solo e é altamente solúvel em água, o que pode causar a contaminação das águas superficiais e subterrâneas por escoamento e erosão do solo, especialmente após chuvas fortes. O impacto de longo prazo no meio ambiente e na saúde humana são preocupações crescentes, principalmente nas faixas etárias mais vulneráveis (Connolly, Coggins e Koch, 2020).

As crianças são consideradas uma das faixas etárias mais vulneráveis aos efeitos do glifosato, porquanto os seus sistemas e órgãos ainda estão em desenvolvimento. As alterações provocadas nesta idade são ainda mais graves no futuro, pelo que os limites máximos dos contaminantes nos produtos que servem de base ou fazem parte dos alimentos que os bebés consomem devem ser os mais restritos possível (Trasande *et al.*, 2020).

No âmbito da iniciativa europeia denominada HMB4EU (*Human Biomonitoring for Europe*), é encorajada a avaliação da exposição dos cidadãos europeus a determinados contaminantes, sendo os pesticidas considerados substâncias prioritárias. Neste projeto de cinco anos (2017-2021), do qual fazem parte vários estados membros da UE, são incentivadas políticas de segurança alimentar. Esta ponte entre a política e a investigação trará inúmeros benefícios à sociedade, de diversas faixas etárias, no que diz respeito à segurança alimentar e visará diminuir a exposição futura aos contaminantes mais perigosos do mundo.

Devido à ausência de consenso entre as avaliações dos efeitos tóxicos do glifosato entre a IARC e da EFSA, este herbicida gera, atualmente, muita polémica, dividindo os países, organizações e a sociedade civil em opiniões diversas. Acredita-se que ainda leve algum tempo para as organizações encontrarem perspectivas mais consensuais. Desta forma, é importante salientar a incerteza relativamente ao perigo e biomonitorizar as suas concentrações numa das faixas etárias mais sensíveis aos seus potenciais efeitos toxicológicos.

O presente estudo pretendeu avaliar o grau de exposição de crianças portuguesas, residentes em diferentes regiões de Portugal continental, ao glifosato através da análise de amostras de urina, juntamente com o preenchimento de um inquérito socioeconómico e alimentar, que visou identificar potenciais fatores de risco neste grupo populacional de grande vulnerabilidade.

Este tipo de estudos é muito escasso, principalmente em crianças, e é de extrema importância para minimizar futuros problemas de segurança alimentar e de saúde pública.

2. Materiais e métodos

2.1. Caracterização das amostras

As 41 amostras de urina foram obtidas em crianças, saudáveis, residentes em diversas regiões de Portugal. Dos 41 participantes envolvidos, 46,34 % (n = 19) eram do sexo masculino, com idade entre 2 e 12 anos, e 53,66 % (n = 22) eram do sexo feminino, com idade entre 2 e 13 anos (tabela 9). A colheita das amostras (de conveniência) ocorreu entre julho de 2018 e fevereiro de 2019. Os participantes receberam recipientes de plástico esterilizados, com tampa de rosca, para colheita de urina na primeira micção da manhã. As amostras, refrigeradas, foram devolvidas ao laboratório, no próprio dia, onde foram distribuídas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até à extração.

Todos os pais das crianças participantes foram informados sobre o âmbito e objetivos deste estudo. Um consentimento informado e por escrito foi obtido de todos pais dos participantes que também preencheram um questionário fornecendo informações sobre 1) Dados antropométricos e Saúde (género, idade, peso, altura, medicação e exposição a fumo de tabaco); 2) Dados Sociodemográficos (nível educacional dos pais, residência, distância da residência à zona industrial, campo agrícola, autoestrada/via rápida mais próximos; utilização de agroquímicos); 3) Dados da Alimentação relativos aos 7 dias anteriores ao momento da recolha (Origem dos alimentos consumidos, local de consumo e um questionário de frequência alimentar (QFA) de laticínios, pão e cereais, ovos, carne, peixe, vegetais, doces e frutos secos). As amostras e QFAs foram codificados em números para garantir o anonimato dos participantes.

Os princípios de autonomia e confidencialidade encontram-se assim salvaguardados ao longo do projeto de investigação e de acordo com o disposto na regulamentação aplicável, nomeadamente a Lei n.º 58/2019, de 8 de agosto, e a Declaração de Helsínquia de 2013 da *World Medical Association*. O projeto mereceu, assim, a aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da EUVG (Decisão n.º 01/2019).

Tabela 9. Dados antropométricos da amostra populacional

	Idade (anos)			Altura (cm)		Peso (kg)	
	Nº	Min-Max	Média±DP	Min-Max	Média±DP	Min-Max	Média±DP
<i>Meninos</i>	19	2-12	7,42±2,64	91-161	126,83±19,71	14-54	28,64±10,69
<i>Meninas</i>	22	2-13	6,45±3,13	90-150	119,66±16,10	12-43	23,25±8,58
<i>Total</i>	41	2-13	6,90±2,95	90-161	123,58±18,50	12-54	25,85±10,00

(Min: mínimo; Max: máximo; DP: desvio padrão)

2.2. Procedimento experimental

A determinação analítica foi efectuada com recurso ao kit comercial de determinação de glifosato (*Abaxis Glyphosate ELISA Plate Kit*[®], ABRAXIS, EUA), dentro do prazo de validade. Foram utilizados apenas os reagentes incluídos no kit, de acordo com as instruções e nota de aplicação em urina fornecidas pelo fabricante.

Para a análise de glifosato em amostras de urina humana, a etapa realizada inicialmente foi a filtração das amostras.

Foram colocados filtros *Millipore Amicon Ultra* em tubos de 2 mL, devidamente rotulados. Foram pipetados 500 µL da amostra de urina para os tubos. De seguida, foram centrifugados a 8000 g, durante 15 minutos. Após a centrifugação (*Sigma 3-16K*, *Sigma Laborzentrifugen GmbH*, Alemanha), foram colocados 300 µL do filtrado para um novo tubo, devidamente rotulado, e adicionou-se 200 µL de acetato de etilo a esse tubo. De seguida, foi colocado no vórtex durante 30 segundos e novamente centrifugado a 8000 g, desta vez apenas por 3 minutos.

Para finalizar a primeira etapa do procedimento experimental, 50 µL da solução anterior foram diluídos em 350 µL de Diluente de Amostra.

A etapa seguinte correspondeu à derivatização. Para diluir o reagente de derivatização, foram adicionados 3,5 mL do diluente ao reagente de derivatização, sendo, posteriormente, centrifugado, a 5444 g a 4 °C por 15 minutos.

Depois, adicionou-se 250 µL de cada padrão, controlo e amostra aos respetivos tubos rotulados e, de seguida, 1 mL de tampão. Os tubos foram centrifugados por 2 segundos, aproximadamente.

Foram adicionados 100 µL do reagente de derivatização diluído, preparado anteriormente, em cada tubo rotulado (padrão, controlo e amostra), usando uma micropipeta. Cada tubo foi centrifugado durante 15-30 segundos. De seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Para iniciar a análise por ELISA, foram adicionados, primeiramente, 50 µL de cada concentração padrão (0, 0,075, 0,2, 0,5, 1 e 4 ng/mL), controlo ($0,75 \pm 0,2$ ng/mL) e amostras derivatizados aos respetivos poços da placa, conforme distribuição definida. Em seguida foi adicionado, a todos os poços, 50 µL do anticorpo anti-glifosato. Os tubos foram cobertos com papel de alumínio e homogeneizados através de rápidos movimentos circulares, por 30 segundos. De seguida, foram incubados à temperatura ambiente, por 30 minutos, protegidos da luz solar direta.

Posteriormente, foram colocados 50 µL de conjugado enzimático em todos os poços individuais, usando uma pipeta de precisão. A microplaca foi novamente coberta, agitada e incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.

Seguidamente, foram adicionados 150 µL de substrato. A microplaca foi novamente coberta, agitada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.

Finalmente, foram adicionados 100 µL de solução stop e foi efetuada leitura da absorbância a 450nm, através de um leitor de microplaca ELISA. De acordo com o fabricante, o limite de detecção do kit corresponde a 0,6 µg/L.

2.3. Avaliação da exposição e análise de risco

Com base na excreção urinária, foi possível estimar a dose interna de glifosato (sistemicamente disponível), para a comparação da exposição estimada pela via alimentar com a ingestão diária aceitável (ADI; Niemann *et al.*, 2015).

A ingestão de glifosato foi calculada assumindo que cerca de 20 % de o glifosato ingerido é absorvido e que a absorção ocorre rapidamente, sendo posteriormente eliminado pela urina, não apresentando potencial para bioacumulação (Anadón *et al.*, 2009; EFSA, 2016). Desta forma, os dados de excreção urinária de glifosato foram multiplicados por 5, e o valor obtido multiplicado pelo volume médio de urina excretada por dia (considerado como 1,5 L por dia; Zoller *et al.* (2018)). O resultado foi dividido pela média dos pesos corporais em cada categoria de idade considerada, para calcular dose interna através da dose diária provável (PDI, do inglês *Probable Daily Intake*), através da equação 2 (Niemann *et al.*, 2015).

$$Dose\ Interna\ (\mu g/kg\ pc) = \frac{C_{urina} \times 5 \times V_{urina}}{pc}$$

C_{urina} = concentração de glifosato na urina (µg/L)

V_{urina} = volume médio de urina excretada por dia (1,5 L/dia) (Zoller *et al.*, 2018)

pc = peso corporal médio (kg)

Equação 2. Cálculo da dose diária provável (PDI)

Considerando a dieta como a mais provável via de exposição ao glifosato e tendo em conta a absorção oral de 20 % referida anteriormente, a dose externa de glifosato foi calculada através da equação 3 (Niemann *et al.*, 2015).

$$Dose\ Externa\ (\mu g/kg\ pc) = \frac{100 \times Dose\ Interna}{\% \text{ Absorção Oral}}$$

Equação 3. Cálculo da Dose Externa

2.4. Análise estatística

Os dados foram editados e categorizados em *Microsoft® Excel* (Versão *Microsoft Office Professional Plus 2016*) e realizada a análise descritiva preliminar. Posteriormente foi realizada a análise estatística através do Programa *GraphPad Prism 8®*. No caso dos dados com distribuição não-normal, foram aplicados testes não-paramétricos para comparação entre amostras independentes (teste de *Kruskal-Wallis* e teste de *Mann-Whitney*). No caso dos dados com distribuição normal foi aplicado o teste *Wilcoxon signed-rank*. Foi considerado o valor de prova de $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Performance analítica

Para o cálculo da concentração de glifosato nas amostras foi aplicada a folha de cálculo em excel, fornecida pelo fabricante. O coeficiente de correlação (r^2) foi 0,9976, apresentando, por isso, uma tendência linear. Calculou-se uma concentração de 0,8 ng/mL na solução controlo incluída no kit ($0,75 \pm 0,2$ ng/mL).

3.2. Ocorrência de glifosato nas amostras de urina

O presente estudo representa o primeiro relato de exposição de glifosato na urina de crianças portuguesas. Os participantes estiveram expostos a uma quantidade elevada de glifosato. Foram detetados níveis de glifosato em 39 amostras (95,12 %), de um total de 41 ($1,77 \pm 0,86$ µg/L). Estes valores vão de encontro aos poucos estudos existentes em crianças, nos quais a incidência é bastante elevada (Knudsen *et al.*, 2017; Mesnage *et al.*, 2012; Sierra-Diaz *et al.*, 2019), exceptuando o estudo mais recente realizado na Eslovénia, no qual a percentagem de positivos foi inferior (Stajniko *et al.*, 2020)

Os valores mínimos e máximos encontrados nas amostras positivas foram 0,87 e 4,35 µg/L, respetivamente. Os valores mínimos encontrados em crianças do sexo feminino e do sexo masculino, foram 0,87 e 0,95 µg/L, respetivamente. Relativamente aos valores máximos encontrados, foram 4,35 µg/L nas meninas e 3,18 µg/L nos meninos. Nos outros quatro estudos realizados em crianças, dois não especificavam as concentrações de glifosato relativamente ao género das crianças (Knudsen *et al.*, 2017; Mesnage *et al.*, 2012) e outros dois descreveram concentrações de glifosato superiores em meninos (Sierra-Diaz *et al.*, 2019; Stajniko *et al.*, 2020), ao contrário do que foi determinado no presente estudo. Estes valores podem ser explicados através da exposição alimentar, visto que peso médio das meninas

(23,25 kg \pm 8,58) é inferior ao dos meninos (28,64 kg \pm 10,69). Desta forma, podemos inferir que a quantidade de alimentos consumidos pelas meninas seja inferior à dos meninos, resultando numa menor exposição.

Conforme ilustrado na tabela 10, o teor médio de glifosato aumentou com a idade. Comparando as duas últimas categorias de idades (crianças mais velhas), detetou-se uma diferença estatisticamente significativa, com um valor p de 0,0631. Esta diferença pode ser explicada pelo aumento da atividade enzimática de PON1, a partir dos 7 anos de idade, que, consequentemente, aumenta a metabolização do glifosato. Estes valores vão de acordo com o estudo realizado na Eslovénia, que detetou glifosato em concentrações superiores na categoria de crianças com idades entre os 7 e os 10 anos, comparativamente à categoria de crianças com idades entre os 12 e os 15 anos.

Outro aspecto a considerar é relativo aos alimentos consumidos. A média de glifosato encontrado em urina de crianças que nunca comem gelado (1,48 \pm 0,49 $\mu\text{g/L}$) é significativamente inferior ($p=0,0156$) à média de crianças que comem gelados 1-3 vezes por semana (2,24 \pm 0,90 $\mu\text{g/L}$). No entanto, o valor mais elevado de glifosato detetado no presente estudo encontra-se na categoria de crianças que consumiam gelado 1-3 vezes por semana. Considerando que o número de crianças nesta categoria é idêntico ao da categoria de crianças que nunca comem gelado, pode-se inferir que o valor de 4,35 $\mu\text{g/L}$ tenha aumentado o valor médio da categoria de crianças que consomem gelado 1-3 vezes por semana. No que diz respeito ao consumo de bolachas do tipo Maria, verificou-se que o teor médio de glifosato encontrado em urina de crianças que nunca consomem este alimento (2,84 \pm 0,92 $\mu\text{g/L}$) é estatisticamente superior à média de glifosato encontrado em urina de crianças que consomem 1 a 3 vezes por semana (1,69 \pm 0,73 $\mu\text{g/L}$; $p= 0,0396$) e todos os dias (1,48 \pm 0,42 $\mu\text{g/L}$; $p=0,0188$). Relativamente aos cereais, a média de glifosato encontrado em urina de crianças que nunca consomem este alimento (2,30 \pm 1,00 $\mu\text{g/L}$) é inferior à média de crianças que comem 1-3 vezes por semana (1,35 \pm 0,51 $\mu\text{g/L}$), com um valor p de 0,0747, muito próximo da significância estatística ($p =0,05$). No estudo semelhante realizado na Eslovénia, as diferenças estatisticamente significativas encontraram-se em alimentos como o arroz integral e as nozes, o que não se verificou no presente estudo (Stajnko *et al.*, 2020). Os restantes estudos em crianças não discriminam a relação das concentrações de glifosato na urina com o padrão alimentar. Estes valores podem ser explicados pelo facto de o gelado, as bolachas do tipo Maria e os cereais serem alimentos mais processados, característicos de uma alimentação com menos alimentos caseiros, nos quais não existe controlo da aplicação de herbicidas, como o glifosato. Esta justificação pode servir igualmente para o resultado verificado no aumento nas concentrações médias de glifosato, à medida que a percentagem de consumo de alimentos

caseiros também aumenta. Nenhum dos restantes estudos anteriores em crianças mencionou a origem dos alimentos consumidos.

Todas as crianças participantes no presente estudo residiam em autarquias que subscreveram a campanha “Autarquias sem Glifosato”, uma iniciativa com o objetivo de diminuir a utilização de glifosato nas vias públicas. De forma mais detalhada, 82 % (32) dos participantes residiam em Coimbra, região onde foi encontrado o valor máximo (4,35 µg/L) do presente estudo. Este valor pode ser explicado através proveniência das amostras ser de áreas geográficas onde o glifosato é aplicado nas culturas de milho e arroz, predominantes no vale do Mondego. O valor mais baixo quantificado no presente estudo (0,87 µg/L) e, também, dois resultados inferiores ao LOD, corresponderam a amostras de urina de crianças residentes em Aveiro. O valor mais elevado encontrado em Aveiro foi 1,54 µg/L. A única amostra analisada do Porto correspondeu a um valor de 1,25 µg/L. E finalmente, em Lisboa, região de onde provieram duas amostras, os valores encontrados foram 1,24 e 1,87 µg/L.

Relativamente à distância aos campos agrícolas, mais de metade dos participantes tinham residência no campo. Das 39 amostras positivas, 56 % (22) das crianças residiam a 1 km ou menos de zonas agrícolas, 31 % (12) a 5 km e apenas 10 % (4) a 10 km. Conforme apresentado na tabela 10, verificou-se um aumento do teor de glifosato na urina de crianças que residiam a 1 km ou menos de zonas agrícolas, resultados coerentes com o estudo realizado na Eslovénia (Stajniko *et al.*, 2020), no México (Sierra-Diaz *et al.*, 2019) e na Dinamarca (Knudsen *et al.*, 2017).

Analisando o nível de escolaridade, 5 % (2) dos pais tinham escolaridade igual ou superior a mestrado, 46 % (18) obtiveram o grau de licenciados e 41 % (16) completaram o 12º ano ou inferior. Por outro lado, 46 % (18) das mães possuíam habilitações literárias iguais ou superiores a mestrado, 38 % (15) completaram licenciatura e 15 % (6) possuem o 12º ano ou inferior. Verificou-se que à medida que o nível de escolaridade dos pais vai aumentando, as concentrações de glifosato na urina das crianças vão diminuindo, o que pode ser explicado através do facto de o local de residência mais comum de pessoas com maiores habilitações literárias ser mais distanciado das zonas agrícolas. Nenhum dos estudos anteriores realizados em crianças discriminou o nível de escolaridade dos pais.

Finalmente, 64 % (25) dos pais mencionaram utilizar agroquímicos. Destes, 24 % (6) utilizavam herbicidas e outros pesticidas. Houve apenas 1 caso no qual os pais declararam o uso apenas de herbicidas. Além disso, obtiveram-se concentrações de glifosato superiores na urina das crianças cujos pais mencionaram utilizar agroquímicos no quintal ($2,5 \pm 1,17$ µg/L), comparativamente ao jardim ($1,4 \pm 0,43$ µg/L), o que pode ser explicado através do facto de os alimentos para consumo serem normalmente plantados no quintal, nomeadamente nas

hortas e pomares. Contrariamente ao expectável, foram encontrados valores superiores de glifosato na urina de crianças cujos pais declararam não utilizar agroquímicos ($2,09 \pm 1,05 \mu\text{g/L}$), comparativamente com os pais que declararam a utilização de pesticidas $1,75 \pm 0,71 \mu\text{g/L}$. No entanto, dos 25 casos de utilização de agroquímicos, 6 dos pais declararam utilizar fertilizantes, herbicidas e agroquímicos biológicos, não especificando a percentagem de uso de cada um. Acresce que, conforme descrito na tabela 10, apenas 1 caso reportou o uso exclusivo de herbicidas (cujo valor foi o mais elevado reportado no estudo, $4,35 \mu\text{g/L}$). Tal facto pode explicar os resultados, com base no óbvio erro de preenchimento do questionário por parte dos pais da criança com o nível mais elevado de glifosato detetado no presente estudo uma vez que assinalaram que não utilizam agroquímicos, mas especificam o uso de herbicidas.

Tabela 10. Variáveis mais significativas na análise estatística

Variável	Nº de amostras	Média \pm DP ($\mu\text{g/L}$)	[min-max] ($\mu\text{g/L}$)
Idade			
<3 anos	6	$1,20 \pm 0,32$	[0,87 - 1,72]
4-6 anos	12	$1,99 \pm 0,90$	[0,88 - 3,81]
7-9 anos	11	$2,12 \pm 1,00$	[0,95 - 4,35]
10-13 anos	10	$1,74 \pm 0,54$	[1,21 - 3,04]
Distância ao campo			
<1 km	22	$2,0 \pm 0,97$	[0,87 - 4,35]
2-6 km	12	$1,58 \pm 0,51$	[0,88 - 2,58]
7-14 km	4	$1,57 \pm 0,55$	[1,10 - 2,32]
Utiliza Agroquímicos ?			
Sim	25	$1,75 \pm 0,71$	[0,87 - 3,81]
Não	12	$2,09 \pm 1,05$	[1,03 - 4,35]
Se utiliza Agroquímicos, quais ?			
Fertilizantes	2	$1,60 \pm 0,40$	[1,32 - 1,89]
Herbicidas	1	4,35	4,35
Biológicos	2	$2,72 \pm 0,45$	[2,10 - 3,04]
Fertilizantes, herbicidas e outros pesticidas	6	$1,84 \pm 0,88$	[1,18 - 3,56]
Se utiliza Agroquímicos, onde ?			
Quintal	7	$2,5 \pm 1,17$	[1,18 - 4,35]
Jardim	3	$1,4 \pm 0,43$	[1,03 - 1,89]
% de consumo de alimentos caseiros			
<25%	4	$1,83 \pm 0,72$	[0,88 - 2,58]
26-49	2	$1,78 \pm 1,16$	[0,95 - 4,35]
50-74	3	$1,76 \pm 0,41$	[1,33 - 2,15]
75-100	2	$2,72 \pm 0,45$	[2,40 - 3,04]

Quantidade de vezes por semana: consumo de gelado			
<Nunca/1 vez por semana	17	1,48 ± 0,49	[0,87 – 2,58]
1-3 vezes por semana	16	2,24 ± 0,90	[1,21 – 4,35]
4-6 vezes por semana	5	1,97 ± 0,98	[1,25 – 3,56]
Quantidade de vezes por semana: consumo de cereais			
<Nunca/1 vez por semana	12	2,30 ± 1,00	[1,18 – 4,35]
1-3 vezes por semana	7	1,35 ± 0,51	[0,87 – 2,25]
4-6 vezes por semana	11	1,83 ± 0,82	[0,95 – 3,56]
Todos os dias	8	1,57 ± 0,44	[0,88 – 2,16]

Tabela 10. Variáveis mais significativas na análise estatística (cont.)

Quantidade de vezes por semana: consumo de bolachas do tipo Maria			
<Nunca/1 vez por semana	5	2,84 ± 0,92	[2,15 – 4,35]
1-3 vezes por semana	18	1,69 ± 0,73	[0,88 – 3,56]
4-6 vezes por semana	6	2,03 ± 0,93	[1,30 – 3,81]
Todos os dias	10	1,48 ± 0,42	[0,87 – 1,99]

3.3. Comparação com outros estudos

No presente trabalho foi detetado glifosato na urina de todas as crianças que participaram, nas diferentes regiões de Portugal, com valores entre 0,87 e 4,35 µg/L (1,77 ± 0,86 µg/L), conforme resumido na tabela 11.

Além do presente trabalho, existem muito poucos estudos com a mesma temática realizados em crianças. Na tabela 11, encontram-se quatro estudos mais recentes. Nomeadamente, o estudo realizado na Eslovénia, entre 2016 a 2019, no México em 2019, na França em 2012 e na Dinamarca em 2011 (Knudsen *et al.*, 2017; Mesnage *et al.*, 2012; Sierra-Diaz *et al.*, 2019; Stajniko *et al.*, 2020).

No estudo realizado na Eslovénia (Stajniko *et al.*, 2020), que analisou glifosato em urina de crianças saudáveis entre 2016 e 2019, foi determinado um valor médio de 0,10 µg/L, portanto muito inferior ao determinado no presente estudo. O método utilizado foi diferente relativamente ao presente estudo, visto que os autores determinaram glifosato nas amostras de urina através GS-MS (LOD e LOQ de 0,1 µg/L). O estudo realizado na Eslovénia teve 246 participantes residentes em zonas agrícolas do país, divididos em dois grupos: crianças dos 7-10 anos de idade e adolescentes dos 12 aos 15 anos de idade. As amostras foram recolhidas em dois períodos diferentes do ano: janeiro a março (altura de baixo uso de pesticidas) e maio a junho (altura de alto uso de pesticidas). Foram distribuídos questionários de avaliação do padrão alimentar dos participantes. Apesar de ter mais participantes, este estudo revelou

valores bastante inferiores aos do presente estudo, o que é preocupante quando analisadas as idades das crianças nos dois estudos. O presente estudo detetou níveis de glifosato superiores em crianças mais novas (2 aos 13 anos). Além disso, 72 % dos participantes do estudo realizado na Eslovénia viviam em zonas agrícolas, (onde se encontravam a maior percentagem de concentrações de glifosato acima do LOQ, tornando o estilo de vida mais homogéneo, ao contrário do presente estudo que analisa glifosato em urina de crianças que vivem em diversas zonas de Portugal (rurais e urbanas).

De uma forma geral, os valores apresentados no estudo realizado no México (Sierra-Diaz *et al.*, 2019) em 281 crianças, são muito superiores aos apurados no presente estudo, com valores mínimos e máximos de 6,51 e 2630 µg/L, respetivamente. As regiões de Ahuacapán e Agua Caliente apresentaram médias de 606 e 363 µg/L, respetivamente. Contudo apenas na região de Ahuacapán foi determinado glifosato em todas as crianças envolvidas no estudo. O método utilizado para análise de glifosato na urina de crianças no México foi HPLC-MS. No entanto, importa realçar que, apesar da população ter sido semelhante em idades e do estudo ter analisado a mesma matriz biológica, foram trabalhos realizados em países e regiões diferentes, com alterações ao nível da legislação aplicada, da exposição da população ao glifosato, bem como alterações ao nível do recurso às práticas agrícolas. No México, as regiões estudadas foram regiões agrícolas, cuja população em causa depende maioritariamente da agricultura para subsistir, o que significa uma maior exposição comparativamente às regiões estudadas no presente trabalho, mais urbanas. Inclusive, a região de Agua Caliente situa-se no Jalisco, um dos três estados mexicanos com o maior índice de intoxicações por aplicação de pesticidas. Por outro lado, a legislação aplicada no México é bastante diferente da legislação em vigor na Europa, visto que não existe regulamentação adequada sobre a comercialização de agrotóxicos, nem formações direcionadas a produtores e trabalhadores, com a finalidade de os informar acerca do risco de exposição aos pesticidas para eles e para a sua família. Recentemente, foi divulgado pelo governo mexicano que o glifosato iria ser gradualmente retirado dos mercados, com o objetivo de ser erradicado até 2024, juntando o México à lista de países que opta por banir o glifosato (Sierra-Diaz *et al.*, 2019).

Outro ponto importante a realçar no presente estudo é a distribuição do questionário de frequência alimentar, que ajuda a relacionar a alimentação da população em estudo com as concentrações de glifosato analisadas na urina dos participantes. No estudo realizado no México (Sierra-Diaz *et al.*, 2019) essa associação não foi efectuada, visto que o grande objetivo era relacionar com a mudança dos padrões de agricultura. Deste modo, apesar do número de participantes no estudo ser superior, bem como as concentrações de glifosato encontradas na urina, não há forma de relacionar as mesmas com o padrão alimentar das crianças,

mencionando apenas a exposição direta ao herbicida, sem oportunidade de analisar a exposição indireta, através do padrão alimentar.

O estudo realizado na Dinamarca (Knudsen *et al.*, 2017) foi, na generalidade, conduzido de uma forma mais semelhante ao presente estudo, na medida em que o teste utilizado foi o ELISA (LOD de 0,075 µg/L) e, além disso, também foram distribuídos questionários para averiguar o estilo de vida e dieta dos participantes, apesar de não terem encontrado diferenças significativas entre as zonas rurais e urbanas. Neste estudo realizado em 2011, dos vinte e sete participantes, catorze eram crianças. As concentrações de glifosato encontradas na urina das crianças, tiveram uma média de 1,96 µg/L, um valor mínimo de 0,85 µg/L e um valor máximo de 3,31 µg/L. Em Portugal, apesar da média ser ligeiramente inferior, o número de amostras é bastante superior e foram encontrados valores máximos cerca de duas vezes mais elevados, relativamente aos encontrados no estudo realizado na Dinamarca.

Noutro estudo realizado na França (Mesnage *et al.*, 2012), foram analisadas concentrações de glifosato na urina de uma família particularmente exposta ao herbicida, visto que o agricultor estava encarregue de pulverizar as colheitas com HBG e, no fim do dia, voltava para casa, situada a 1,5 km dos campos pulverizados, e convivia com a sua mulher e os seus três filhos. Foram encontradas concentrações de glifosato na urina do pai e numa das crianças, com valores máximos de 9,5 e 2 µg/L, respetivamente (LOQ de 2 µg/L). Setenta e duas horas depois ainda foram detetados, através de HPLC-MS, níveis de glifosato na urina dos participantes. A grande limitação deste estudo é o facto de retratar apenas a situação de uma família. O presente estudo tem a vantagem de analisar glifosato em urina de 41 crianças de diferentes regiões de Portugal, relacionando-as com os padrões alimentares.

Há muito poucos estudos em crianças que, sendo uma das faixas etárias mais vulneráveis, é muito importante que seja estudada para prevenir potenciais ameaças à saúde pública. De facto, dos estudos apresentados na tabela 6, realizados em adultos, quatro foram realizados na Europa, dois nos EUA, um na Tailândia, um no México e um no Sri Lanka. Destes estudos realizados em adultos, quatro apresentaram valores médios inferiores aos apresentados tanto nos três estudos realizados em crianças (no México, Dinamarca e França), como no presente trabalho, o que é bastante preocupante, tendo em conta as características físicas e metabólicas das crianças.

De uma forma geral, os valores determinados em estudos realizados na Europa são inferiores aos estudos realizados fora desse continente, o que, naturalmente, vai de encontro à importância da legislação mais restritiva aplicada na Europa.

O valor médio mais baixo reportado, é de $0,28 \pm 0,38$ µg/L, num estudo realizado nos EUA (Parvez *et al.*, 2018) em 40 mulheres lactentes. As regiões de estudo foram a cidade de

Moscow, no estado Idaho, e a cidade de Pullman, no estado Washington. O valor máximo detetado neste estudo foi de apenas 1,93 µg/L. O método utilizado foi HPLC (LOD e LOQ de 0,02 e 0,10 µg/L, respetivamente). Os autores distribuíram às participantes um questionário, de forma a tentar avaliarem a exposição ao glifosato, quer através do meio ambiente, quer através da dieta. Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto de a população em estudo ser bastante homogénea (no que diz respeito aos dados antropométricos, habilitações literárias, ao estilo de vida e padrão alimentar), bem como o facto de o estudo internacional no qual tiveram origem as amostras analisadas, não ter sido projetado para detetar pequenas diferenças de glifosato na urina, baseadas nas escolhas alimentares, localização de residência (urbana ou rural), ou exposição ao glifosato das participantes.

O valor médio mais alto reportado foi verificado num estudo realizado no Sri Lanka (Jayasumana, Gunatilake e Siribaddana, 2015). O estudo determinou glifosato na urina de 30 participantes, divididos em 3 grupos: 10 participantes eram adultos com doença renal crónica e estavam expostos ao glifosato, numa zona de nefropatia agrícola (endémica), 10 participantes eram adultos saudáveis, expostos ao glifosato na zona endémica e 10 eram adultos saudáveis, fora da zona endémica, com valores de 127,6, 82,6 e 2,4 µg/L, respetivamente. O método utilizado foi ELISA (LOD de 0,6 µg/L). É natural que este estudo represente o valor médio mais alto, visto que foi realizado numa zona específica do Sri Lanka, onde foi identificada uma nova doença renal crónica, entre os produtores de arroz. A Nefropatia Agrícola do Sri Lanka também é conhecida como doença renal crónica de etiologia desconhecida ou doença renal crónica por causas não tradicionais. Além disso, 10 dos participantes não eram saudáveis.

O valor mínimo mais baixo (>LOD) foi determinado num estudo realizado na Alemanha (Conrad *et al.*, 2017), no qual os autores determinaram a exposição crónica ao glifosato durante quinze anos (2001-2015), de 399 adultos saudáveis, com idades entre os 20 e os 29 anos. Apesar de ser um estudo com uma recolha de amostras bastante prolongada no tempo, o valor máximo detetado foi apenas 2,8 µg/L, no ano de 2013. O método utilizado foi GC-MS (LOQ de 0,1 µg/L).

Apesar das concentrações de glifosato encontradas no estudo realizado no México serem superiores, em comparação com os outros nove trabalhos em adultos, a concentração média de glifosato encontrado na urina dos participantes é, em quatro estudos, inferior à encontrada no presente trabalho em crianças. Esta comparação, do ponto de vista da saúde pública, é preocupante visto que as crianças são muito mais vulneráveis aos efeitos do glifosato no organismo.

Em Portugal, este é o único estudo publicado, do conhecimento da autora, que analisa a presença de glifosato em amostras de urina de crianças.

Tabela 11. Comparação do presente estudo com outros estudos com a mesma temática, em crianças.

País (ano)	Amostra	Características	Nº de amostras	Positivas (%)	Intervalo de contaminação (µg/L)	Teor Médio ± DP (µg/L)	Técnica Analítica	LOD/ LOQ (µg/L)	Referência
Portugal, 2018-2019	Urina	Crianças saudáveis entre os 2 e os 13 anos	41	95,12 % (39)	0,87-4,35	1,77±0,86	ELISA	LOD: 0,6	Estudo presente
Eslovénia, 2016-2019	Urina	Crianças saudáveis: Grupo 1: 7-10 anos; Grupo 2: 12-15 anos; retiradas em dois períodos do ano: 1º de Janeiro a Março e 2º de Maio a Junho	246 grupo 1: 149; grupo 2: 97	1º: grupo 1- 27 % (40); grupo 2- 50 % (48); 2º: grupo 1 - 22 % (33) e grupo 2 - 56 % (54)	<LOQ - 0,39	0,1	GC-MS/MS	LOQ: 0,1 LOD: 0,1	(Stajniko et al., 2020)
México, 2019	Urina	crianças saudáveis entre os 5 os 15 anos	281	Ahuacapán: 100 % (89); Agua Caliente: 73 % (140)	2- 2630	Ahuacapán: 606; Agua Caliente: 363	HPLC-MS/MS	N.D.	(Sierra-Diaz et al., 2019)

(LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação; N.D. = Não Detetado)

Tabela 11. Comparação do presente estudo com outros estudos com a mesma temática, em crianças (cont.)

País (ano)	Amostra	Características	Nº de amostras	Positivas (%)	Intervalo de contaminação (µg/L)	Teor Médio ± DP (µg/L)	Técnica Analítica	LOD/LOQ (µg/L)	Referência
Dinamarca, 2011	Urina	13 de mães e 14 de crianças	27	27 (100 %)	mães: 0,49–3,22; crianças: 0,85–3,31	mães: 1,28; crianças: 1,96	ELISA	0,0751/0,1	(Knudsen et al., 2017)
França, 2012	Urina	família de agricultores, 5 elementos, dos quais 3 crianças (a 1.5km da fonte de glifosato)	3	1 (20 %)	N.D.-2,0	N.D.	HPLC - MS	LOD=1; LOQ=2	(Mesnage et al., 2012)

(LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação; N.D. = Não Detetado)

3.4. Ingestão diária provável (PDI) e avaliação de risco

Foram determinados os melhores, médios e piores cenários, considerando os teores mínimos, médios e máximos de glifosato detectados na urina, utilizando os pesos médios das crianças participantes de acordo com cada categoria de idades, como indica a tabela 12.

Dos restantes 4 estudos em crianças, apenas num se obtiveram valores inferiores aos reportados no presente estudo: 0,1 µg/L (<LOQ - 0,39 µg/L) (Stajanko *et al.*, 2020).

As concentrações encontradas no presente estudo, quando comparados com a ADI, são relativamente baixos. No pior cenário possível, na categoria de idades entre os 4 e os 6 anos verificou-se a PDI mais elevada, com um valor de 0,001393 mg/kg, o que corresponde a cerca de 0.28 % da ADI estabelecida.

4. Conclusões

O presente estudo detetou valores elevados de glifosato em urina de crianças em diversas regiões de Portugal continental, principalmente tendo em conta as idades dos participantes. Este estudo demonstrou resultados muitas vezes superiores quando comparados com valores encontrados em estudos similares em adultos.

O glifosato foi analisado, através do método ELISA (LOD= 0,6 µg/L) e foi detetado em 95,12 % das amostras, com valores médios de $1,77 \pm 0,86$ µg/L. e valores mínimos e máximos de 0,87 e 4,35 µg/L, respetivamente.

Dos 13 estudos mais recentes que determinaram glifosato em urina, apenas 4 utilizaram amostras de crianças, 3 dos quais apresentaram valores médios superiores aos do presente estudo. No entanto, 2 dos casos apresentaram incidência superior à mencionada neste estudo.

As diferenças entre as concentrações de glifosato na urina de crianças com idades iguais ou inferiores a 3 anos ($1,20 \pm 0,32$ µg/L), comparativamente às concentrações encontradas em crianças entre os 7 e os 9 anos de idade ($2,12 \pm 1,00$ µg/L) estiveram próximas da significância estatística ($p = 0,0631$), e pode ser justificado pelo aumento da atividade da enzima PON1, a partir dos 7 anos de idade. Verificaram-se teores de contaminação superiores em crianças que residiam próximo de zonas agrícolas (<1 km, $2,0 \pm 0,97$ µg/L), com percentagem superior de consumo de alimentos caseiros (75-100%, $2,72 \pm 0,45$ µg/L) e cujos pais aplicavam herbicidas no quintal ($2,5 \pm 1,17$ µg/L), quando comparado com o jardim. Além disso, verificaram-se diferenças significativas relativamente ao consumo de alguns alimentos como o gelado, os cereais e as bolachas tipo Maria.

Tabela 12. Cálculo do melhor, médio e pior cenário possível para cada categoria de idades, com base no peso médio de cada categoria

Idade	Melhor cenário possível			Cenário médio			Pior cenário possível		
	Concentração mínima de glifosato na urina (µg/L)	PDI (mg/kg pc/dia)	% ADI	Concentração média de glifosato na urina (µg/L)	PDI (mg/kg pc/dia)	% ADI	Concentração máxima de glifosato na urina (µg/L)	PDI (mg/kg pc/dia)	% ADI
<3 anos (14,4 kg)	0,87	0,000453	0,09	1,20	0,000625	0,12	1,72	0,000895	0,18
4-6 anos (20,5 kg)	0,88	0,000321	0,06	2,04	0,000746	0,14	3,81	0,001393	0,28
7-9 anos (29,3 kg)	0,95	0,000323	0,06	2,10	0,000537	0,1	4,35	0,001113	0,22
10-13 anos (38,3 kg)	1,21	0,000243	0,04	1,60	0,000313	0,06	1,99	0,000389	0,08

Estas implicações serão consideradas, no âmbito da iniciativa europeia HMB4EU.

A exposição ao glifosato é preocupante, principalmente tendo em conta as idades dos participantes e a toxicidade do herbicida. Afigura-se necessário realizar estudos adicionais com maior número de amostras e maior diversidade geográfica.

Bibliografia

- ABREU, Adley Bergson Gonçalves DE; MATTA, Marcia Helena De Rizzo DA; MONTAGNER, Émerson - Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**. 31:1 (2008) 5–9. ISSN 01004042.
- ACQUAVELLA, John *et al.* - Glyphosate epidemiology expert panel review: a weight of evidence systematic review of the relationship between glyphosate exposure and non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. **Critical Reviews in Toxicology**. 46:2016) 28–43. ISSN 15476898.
- ALFERNES, Philip L.; IWATA, Yutaka - Determination of Glyphosate and (Aminomethyl)phosphonic Acid in Soil, Plant and Animal Matrices, and Water by Capillary Gas Chromatography with Mass-Selective Detection. **J. Agric. Food Chem.** 42:1994) 2751–2759.
- ALHARBI, Omar M. L. *et al.* - Health and environmental effects of persistent organic pollutants. **Journal of Molecular Liquids**. 263:2018) 442–453. ISSN 01677322.
- AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio De *et al.* - Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**. 25:4 (2002) 589–593. ISSN 0100-4042.
- ANADÓN, A. *et al.* - Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. **Toxicology Letters**. 190:1 (2009) 91–95. ISSN 03784274.
- ANDREOTTI, Gabriella *et al.* - Glyphosate Use and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study. **Journal of the National Cancer Institute**. 110:5 (2018) 509–516. ISSN 14602105.
- ANGERER, Jürgen; EWERS, Ulrich; WILHELM, Michael - Human biomonitoring: State of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 210:3–4 (2007) 201–228. ISSN 1618131X.
- ASAE - **Sabe o que é o Glifosato?** [Em linha], atual. mai. 2016. [Consult. 22 out. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Fjm_7lx-7bwj:https://www.asae.gov.pt/ficheiros-externos-2016/sabe-o-que-e-o-glifosato-maio-pdf.aspx+&cd=1&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt>.
- ASAE - **Poluentes Orgânicos Persistentes** [Em linha], atual. 2020. [Consult. 15 jul. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-

quimicos/pops.aspx>.

BAHADORI, Tina *et al.* - Making sense of human biomonitoring data: Findings and recommendations of a workshop. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**. 17:4 (2007) 308–313. ISSN 15590631.

BAI, Shahla Hosseini; OGBOURNE, Steven M. - Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**. 23:19 (2016) 18988–19001. ISSN 16147499.

BARR, Dana B. - Biomonitoring of exposure to pesticides. **Journal of Chemical Health and Safety**. 15:6 (2008) 20–29. ISSN 18715532.

BATTAGLIN, W. A. *et al.* - Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. **Journal of the American Water Resources Association**. 50:2 (2014) 275–290. ISSN 17521688.

BENBROOK, Charles M. - Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**. 28:1 (2016) 1–15. ISSN 21904715.

BERG, Carl J. *et al.* - Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. **PLoS ONE**. 13:7 (2018) 1–18. ISSN 19326203.

BHATTACHARYYA, Anjan; BARIK, Suhrid Ranjan; GANGULY, Pritam - The evolution of scientific procedures for evaluating the impact of pesticides on users and the environment along with. **The Journal of Plant Protection Sciences**. [Em linha] 1:1 (2009) 9–15.
Disponível em WWW:<URL:<http://oregonstate.edu/>>.

BÓKONY, Veronika *et al.* - Chronic exposure to a glyphosate-based herbicide makes toad larvae more toxic. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 284:1858 (2017) 1–7. ISSN 14712954.

BOSSI, Rossana *et al.* - Analysis of metsulfuron-methyl in soil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Application to a field dissipation study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47:10 (1999) 4462–4468. ISSN 00218561.

BOTERO-COY, A. M. *et al.* - Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean. **Journal of Chromatography A**. 1313:2013) 157–165. ISSN 00219673.

BOZZINI, Emanuela - Contrasting norms on the use of evidence in risk assessment: the controversy surrounding the carcinogenicity of glyphosate. **Health, Risk and Society**. [Em

linha] 00:00 (2020) 1–17. Disponível em

WWW:<URL:https://doi.org/10.1080/13698575.2020.1777946>. ISSN 14698331.

BRADBERRY, Sally M.; PROUDFOOT, Alex T.; J. ALLISTER VALE - Glyphosate poisoning. **Toxicological Reviews**. 23:3 (2004) 159–167.

BRINGOLOF, R.B.; COPE, W.G.; MOSHER, S.; BARNHART, M.C.; SHEA, D. - Contaminant Sensitivity Of Freshwater Mussels Acute and Chronic Toxicity of Glyphosate Compounds to Glochidia And Juveniles of *Lampsilis Siliquoidea* (Unionidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**. 26:10 (2007) 2094–2100.

BRITO RODRIGUES, Laís DE *et al.* - Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 36:7 (2017) 1755–1763. ISSN 15528618.

BRUGGEN, A. H. C. VAN *et al.* - Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**. 616–617:2018) 255–268. ISSN 18791026.

ÇAĞLAR, Sinan; KOLANKAYA, Dürdane - The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 25:1 (2008) 57–62. ISSN 13826689.

CAMACHO, Adriana; MEJÍA, Daniel - The health consequences of aerial spraying illicit crops: The case of Colombia. **Journal of Health Economics**. 54:2017) 147–160. ISSN 18791646.

CARVALHO, Fernando P. - Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**. 6:2 (2017) 48–60. ISSN 20483694.

CATTANI, Daiane *et al.* - Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**. 387:2017) 67–80. ISSN 18793185.

CHEN, Jia *et al.* - Increased influence of genetic variation on PONI activity in neonates. **Environmental Health Perspectives**. 111:11 (2003) 1403–1409. ISSN 00916765.

CLEGG, B. Stephen; STEPHENSON, Gerald R.; HALL, J. Christopher - Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47:12 (1999) 5031–5037. ISSN 00218561.

COMISSÃO EUROPEIA - **EU pesticides data base - current MRL glyphosate** [Em linha], atual. 2020. [Consult. 24 set. 2020]. Disponível em
WWW:<URL:https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-

database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN&pestResidueId=120>.

CONNOLLY, Alison *et al.* - Exposure assessment using human biomonitoring for glyphosate and fluroxypyr users in amenity horticulture. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 220:6 (2017) 1064–1073. ISSN 1618131X.

CONNOLLY, Alison *et al.* - Characterising glyphosate exposures among amenity horticulturists using multiple spot urine samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 221:7 (2018) 1012–1022. ISSN 1618131X.

CONNOLLY, Alison *et al.* - Glyphosate in Irish adults - A pilot study in 2017. **Environmental Research**. 165:2018) 235–236. ISSN 10960953.

CONNOLLY, Alison *et al.* - Exploring the half-life of glyphosate in human urine samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 222:2 (2019) 205–210. ISSN 1618131X.

CONNOLLY, Alison; COGGINS, Marie A.; KOCH, Holger M. - Human biomonitoring of glyphosate exposures: State-of-the-art and future research challenges. **Toxics**. 8:3 (2020) 60. ISSN 23056304.

CONRAD, André *et al.* - Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 220:1 (2017) 8–16. ISSN 1618131X.

COWELL, J. E. - Conifer Seedling Nursery Worker Exposure to Glyphosate. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 22:1992) 6–13.

CRUMP, Kenny - The Potential Effects of Recall Bias and Selection Bias on the Epidemiological Evidence for the Carcinogenicity of Glyphosate. **Risk Analysis**. 40:4 (2020) 696–704. ISSN 15396924.

DEFARGE, N.; SPIROUX DE VENDÔMOIS, J.; SÉRALINI, G. E. - Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. **Toxicology Reports**. [Em linha] 5:December 2017 (2018) 156–163. Disponível em WWW:<URL:https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>. ISSN 22147500.

DGAV - Controlo nacional de resíduos de pesticidas em produtos de origem vegetal no ano de 2017. 2019) 281.

DGAV - **Produtos Fitofarmacêuticos** [Em linha], atual. 2020. [Consult. 19 ago. 2020]. Disponível em WWW:<URL:http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3666217&generico=3666233&c

boui=3666233>.

DGAV - **Limites Máximos de Resíduos** [Em linha], atual. 2020. [Consult. 24 set. 2020]. Disponível em WWW:<URL:http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?generico=3666582&cboui=3666582>.

DONATO, Francesca *et al.* - Exposure to glyphosate and risk of non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma: an updated meta-analysis. **Med Lav.** 111:1 (2020) 63–73.

DUKE, Stephen O. *et al.* - Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 51:1 (2003) 340–344. ISSN 00218561.

EFSA - Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. **EFSA Journal.** . ISSN 18314732. 13:11 (2016). doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302.

EFSA - EFSA explains risk assessment - Glyphosate. **EFSA Journal.** Parma. 2016).

EFSA - **Glyphosate** [Em linha], atual. 2020. [Consult. 5 jul. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/glyphosate>.

ERIKSSON, Mikael *et al.* - Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. **International Journal of Cancer.** 123:7 (2008) 1657–1663. ISSN 00207136.

FAO/WHO - Pesticide residues in food 2016 REPORT. **Special Session of the Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues.** Rome. 2016).

FLUEGGE, Keith; FLUEGGE, Kyle - Glyphosate use predicts healthcare utilization for ADHD in the healthcare cost and utilization project net (HCUPnet): A two-way fixed-effects analysis. **Polish Journal of Environmental Studies.** 25:4 (2016) 1489–1503. ISSN 12301485.

FOGLIATTO, Silvia; FERRERO, Aldo; VIDOTTO, Francesco - Current and future scenarios of glyphosate use in Europe: Are there alternatives? **Advances in Agronomy.** 163:2020) 219–278. ISSN 00652113.

FORTES, Cristina *et al.* - Occupational Exposure to Pesticides with Occupational Sun Exposure Increases the Risk for Cutaneous Melanoma. **Journal of Occupational and Environmental Medicine.** 58:4 (2016) 370–375. ISSN 15365948.

FUNKE, Todd *et al.* - Differential inhibition of class I and class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases by tetrahedral reaction intermediate analogues. **Biochemistry.** 46:46

(2007) 13344–13351. ISSN 00062960.

GILL, Jatinder Pal Kaur; SETHI, Nidhi; MOHAN, Anand - Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. **Environmental Chemistry Letters**. 15:1 (2017) 85–100. ISSN 16103661.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Miguel Ángel *et al.* - Glyphosate immunosensor. Application for water and soil analysis. **Analytical Chemistry**. 77:13 (2005) 4219–4227. ISSN 00032700.

GOTTI, Roberto *et al.* - Field-amplified sample injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography in analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in wheat. **Journal of Chromatography A**. 1601:2019) 357–364. ISSN 18733778.

GUILHERME, Sofia *et al.* - Tissue specific DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla*) following a short-term exposure to a glyphosate-based herbicide. **Toxicology Letters**. 189:2009) S212. ISSN 03784274.

HARDELL, Lennart; ERIKSSON, Mikael; NORDSTROM, Marie - Exposure to pesticides as risk factor for non-Hodgkin's lymphoma and hairy cell leukemia: pooled analysis of two Swedish case-control studies. **Leuk Lymphoma**. 43:5 (2002) 1043–1049.

HEDLUND, John; LONGO, Stefano B.; YORK, Richard - Agriculture, Pesticide Use, and Economic Development: A Global Examination (1990–2014). **Rural Sociology**. 85:2 (2020) 519–544. ISSN 00360112.

HERVOUET, Eric *et al.* - DNA Methylation and Apoptosis Resistance in Cancer Cells. **Cells**. 2:3 (2013) 545–573. ISSN 2073-4409.

HORTH, Helene; BLACKMORE, Karen - Survey of Glyphosate and AMPA in Groundwaters and Surface Waters in Europe. **Monsanto**. November (2009).

HOVE-JENSEN, B.; ZECHEL, D. L.; JOCHIMSEN, B. - Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 78:1 (2014) 176–197. ISSN 1092-2172.

HUEN, Karen *et al.* - Developmental changes in PON1 enzyme activity in young children and effects of PON1 polymorphisms. **Environmental Health Perspectives**. 117:10 (2009) 1632–1638. ISSN 00916765.

HUEN, Karen *et al.* - Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican-American mothers and children with different genotypes and haplotypes. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 244:2 (2010) 181–189. ISSN 0041008X.

IARC - Glyphosate Evaluation. **IARC Monographs**. 112:2015) 321–412.

JARES, Pedro; COLOMER, Dolors; CAMPO, Elias - Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. **Journal of Clinical Investigation**. 122:10 (2012) 3416–3423. ISSN 00219738.

JARMAN, Walter M.; BALLSCHMITER, Karlheinz - From coal to DDT: The history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. **Endeavour**. 36:4 (2012) 131–142. ISSN 01609327.

JAYASUMANA, Channa; GUNATILAKE, Sarath; SIRIBADDANA, Sisira - Simultaneous exposure to multiple heavy metals and glyphosate may contribute to Sri Lankan agricultural nephropathy. **BMC Nephrology**. 16:1 (2015). ISSN 14712369.

JENSEN, Pamela K. *et al.* - Validation of reliable and selective methods for direct determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in milk and urine using LC-MS/MS. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. 51:4 (2016) 254–259. ISSN 15324109.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. *et al.* - Graphene quantum dots-silver nanoparticles as a novel sensitive and selective luminescence probe for the detection of glyphosate in food samples. **Talanta**. 207:2020). ISSN 00399140.

KELLY, David W. *et al.* - Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. **Journal of Applied Ecology**. 47:2 (2010) 498–504. ISSN 00218901.

KHROLENKO, Maxim V.; WIECZOREK, Piotr P. - Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chl. **Journal of Chromatography A**. 1093:1–2 (2005) 111–117. ISSN 00219673.

KISSANE, Zoe; SHEPHARD, Jill M. - The rise of glyphosate and new opportunities for biosentinel early-warning studies. **Conservation Biology**. 31:6 (2017) 1293–1300. ISSN 15231739.

KNUDSEN, Lisbeth E. *et al.* - Biomonitoring of Danish school children and mothers including biomarkers of PBDE and glyphosate. **Reviews on Environmental Health**. 32:3 (2017) 279–290. ISSN 00487554.

KOLLER, Verena J. *et al.* - Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. **Archives of Toxicology**. 86:5 (2012) 805–813. ISSN 03405761.

- KONGTIP, Pornpimol *et al.* - Glyphosate and Paraquat in Maternal and Fetal Serums in Thai Women. **Journal of Agromedicine**. 22:3 (2017) 282–289. ISSN 15450813.
- KOSKINEN, William C.; MAREK, Leetta J.; HALL, Kathleen E. - Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. **Pest Management Science**. 72:3 (2016) 423–432. ISSN 15264998.
- KRAUSE, Jannike L. *et al.* - The glyphosate formulation Roundup® LB plus influences the global metabolome of pig gut microbiota in vitro. **Science of the Total Environment**. 745:2020) 140932. ISSN 18791026.
- KREUTZ, Luiz Carlos *et al.* - Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. **Fish and Shellfish Immunology**. 30:1 (2011) 51–57. ISSN 10959947.
- KWIATKOWSKA, Marta; NOWACKA-KRUKOWSKA, Hanna; BUKOWSKA, Bozena - The effect of glyphosate, its metabolites and impurities on erythrocyte acetylcholinesterase activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 37:3 (2014) 1101–1108. ISSN 18727077.
- LEE, E. A. *et al.* - Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate. **Analytical Chemistry**. 74:19 (2002) 4937–4943. ISSN 00032700.
- LI, Ming Hui *et al.* - Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. **Aquatic Toxicology**. 188:2017) 159–169. ISSN 18791514.
- LIAO, Yang *et al.* - Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1549:2018) 31–38. ISSN 18733778.
- LIMA, Ilana Schneider *et al.* - Influence of glyphosate in planktonic and biofilm growth of *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 45:3 (2014) 971–975. ISSN 16784405.
- LUIS, Gonzalo; SOLANGE, Mara; MIR, Leandro - Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. **Herbicides and Environment**. January 2011 (2011).
- MA, Junguo *et al.* - Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. **Environmental Pollution**. 252:2019) 1288–1300. ISSN 18736424.

MARTINI, Claudia N. *et al.* - Glyphosate-based herbicides with different adjuvants are more potent inhibitors of 3T3-L1 fibroblast proliferation and differentiation to adipocytes than glyphosate alone. **Comparative Clinical Pathology**. 25:3 (2016) 607–613. ISSN 1618565X.

MCDUFFIE, Helen H. *et al.* - Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: Cross-Canada study of pesticides and health. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. 10:11 (2001) 1155–1163. ISSN 10559965.

MCGUIRE, Michelle K. *et al.* - Glyphosate and aminomethylphosphonic acid are not detectable in human milk. **American Journal of Clinical Nutrition**. 103:5 (2016) 1285–1290. ISSN 19383207.

MCLEAN, Jeffrey S. *et al.* - Identifying low pH active and lactate-utilizing taxa within oral microbiome communities from healthy children using stable isotope probing techniques. **PLoS ONE**. 7:3 (2012). ISSN 19326203.

MESNAGE, R. *et al.* - Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**. 84:2015) 133–153. ISSN 18736351.

MESNAGE, Robin *et al.* - Glyphosate Exposure in a Farmer's Family. **Journal of Environmental Protection**. 03:09 (2012) 1001–1003. ISSN 2152-2197.

MESNAGE, Robin; BENBROOK, Charles; ANTONIOU, Michael N. - Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. **Food and Chemical Toxicology**. 128:April (2019) 137–145. ISSN 18736351.

MORENO, Natália Cestari; SOFIA, Silvia Helena; MARTINEZ, Claudia B. R. - Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 37:1 (2014) 448–454. ISSN 13826689.

MÖRTL, Mária *et al.* - Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. **Microchemical Journal**. 107:2013) 143–151. ISSN 0026265X.

NIEMANN, Lars *et al.* - A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**. 10:1 (2015) 3–12. ISSN 16615751.

OKADA, Elena *et al.* - A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical**

Chemistry. 411:3 (2019) 715–724. ISSN 16182650.

OLIVEIRA, Elisa Maria De *et al.* - Surfactantes De Origem Microbiana Para Aplicações Industriais. **Tópicos Especiais em Biotecnologia e Biodiversidade Volume 2.** 2018) 130.

OMS - Environmental Health Criteria Series. **Environmental Science and Pollution Research.** 3:3 (1996) 179. ISSN 09441344.

OMS - **Pesticides** [Em linha], atual. 2020. [Consult. 14 jul. 2020]. Disponível em WWW:<URL:https://www.who.int/topics/pesticides/en/>.

OMS - The WHO recommended classification of pesticides by hazard. **World Health Organization.** 2020) 78. ISSN 16841042.

ORSI, L. *et al.* - Occupational exposure to pesticides and lymphoid neoplasms among men: results of a french casecontrol study. **Occupational and Environmental Medicine.** 66:5 (2009) 291–298. ISSN 13510711.

PAHWA, Manisha *et al.* - Glyphosate use and associations with non-hodgkin lymphoma major histological sub-types: Findings from the North American pooled project.

Scandinavian Journal of Work, Environment and Health. 45:6 (2019) 600–609. ISSN 1795990X.

PARK, Eun Young *et al.* - Impact of environmental exposure to persistent organic pollutants on lung cancer risk. **Environment International.** 143:June (2020) 105925. ISSN 18736750.

PARVEZ, S. *et al.* - Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: A prospective Indiana birth cohort study. **Environmental Health: A Global Access Science Source.** 17:1 (2018). ISSN 1476069X.

PASQUALETTO, Francieli Carolini; SORIANO, Lidiane Regi De Mattos; STUCHI, Nathália Maciel Maniezzo - Novas condutas terapêuticas para o Linfoma não Hodgkin. **Revista Eletrônica Acervo Saúde.** 11:2 (2018) e187. ISSN 2178-2091.

PHILIPP SCHLEDORN, Monika Krüger - Detection of Glyphosate Residues in Animals and Humans. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology.** 04:02 (2014).

PICCOLO A.; CELANO G. - Hydrogen- bonding Interations Between the Herbicide. **Environmental Toxicology and Chemistry.** 13:11 (1994) 1737–1741.

POIGER, Thomas *et al.* - Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research.** 24:2 (2017) 1588–1596. ISSN

16147499.

PROSSER, Ryan S. *et al.* - Effects of the herbicide surfactant MON 0818 on oviposition and viability of eggs of the ramshorn snail (*Planorbella pilsbryi*). **Environmental Toxicology and Chemistry**. 36:2 (2017) 522–531. ISSN 15528618.

QIU, Shengnan *et al.* - Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. [Em linha] 187:October 2019 (2020) 109846. Disponível em WWW:<URL:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109846>. ISSN 10902414.

QU, Fei; WANG, Han; YOU, Jinmao - Dual lanthanide-probe based on coordination polymer networks for ratiometric detection of glyphosate in food samples. **Food Chemistry**. 323:2020). ISSN 18737072.

RAKESH, PS; RAMACHANDRAN, Rakesh; MATHEW, Gigil - Pesticide poisoning. **The National Medical Journal of India**. 20:4 (2015).

RENDÓN-VON OSTEN, Jaime; DZUL-CAAMAL, Ricardo - Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: A survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 14:6 (2017). ISSN 16604601.

RICHARD, Sophie *et al.* - Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**. 113:6 (2005) 716–720. ISSN 00916765.

ROBERTS, Darren M. *et al.* - A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. **Clinical Toxicology**. 48:2 (2010) 129–136. ISSN 15563650.

RONCO, A. E. *et al.* - Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. **Environmental Monitoring and Assessment**. . ISSN 15732959. 188:8 (2016). doi: 10.1007/s10661-016-5467-0.

ROOS, A. J. DE *et al.* - Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. **Occupational and environmental medicine**. 60:9 (2003). ISSN 13510711.

ROOS, Anneclaire J. DE *et al.* - Glyphosate Results Revisited: De Roos *et al.* Respond. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 0091-6765. 113:6 (2005) A366–A367. doi: 10.1289/ehp.113-a366.

RUBIO, Fernando *et al.* - Comparison of a direct ELISA and an HPLC method for glyphosate determinations in water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:3 (2003) 691–696. ISSN 00218561.

SAMSEL, Anthony; SENEFF, Stephanie - Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. **Entropy**. 15:12 (2013) 1416–1463. ISSN 1099-4300.

SANDRINI, Juliana Zomer *et al.* - Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. **Aquatic Toxicology**. 130–131:2013) 171–173. ISSN 0166445X.

SAVINI, Sara; BANDINI, Mirella; SANNINO, Anna - An Improved, Rapid, and Sensitive Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry Analysis for the Determination of Highly Polar Pesticides and Contaminants in Processed Fruits and Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 67:9 (2019) 2716–2722. ISSN 15205118.

SCHRÖDL, Wieland *et al.* - Possible Effects of Glyphosate on Mucorales Abundance in the Rumen of Dairy Cows in Germany. **Current Microbiology**. 69:6 (2014) 817–823. ISSN 14320991.

SELVI, A. Arul; SREENIVASA, M. A.; MANONMANI, H. K. - Enzyme-linked immunoassay for the detection of glyphosate in food samples using avian antibodies. **Food and Agricultural Immunology**. 22:3 (2011) 217–228. ISSN 09540105.

SÉRALINI, Gilles Eric *et al.* - Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environmental Sciences Europe**. 26:1 (2014) 1–17. ISSN 21904715.

SEXTON, Ken; NEEDHAM, Larry; PIRKLE, James - Human Biomonitoring of Environmental Chemicals. **American Scientist**. [Em linha] 92:1 (2004) 38. Disponível em WWW:<URL:www.americanscientist.org>. ISSN 0003-0996.

SHAW, William - Elevated urinary glyphosate and clostridia metabolites with altered dopamine metabolism in triplets with autistic spectrum disorder or suspected seizure disorder A case study. **Integrative Medicine (Boulder)**. 16:1 (2017) 50–57. ISSN 1546993X.

SHEHATA, Awad A. *et al.* - The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. **Current Microbiology**. 66:4 (2013) 350–358.

ISSN 03438651.

SIERRA-DIAZ, Erick *et al.* - Urinary pesticide levels in children and adolescents residing in two agricultural communities in Mexico. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 16:4 (2019). ISSN 16604601.

SKEFF, Wael; RECKNAGEL, Constantin; SCHULZ-BULL, Detlef E. - The influence of salt matrices on the reversed-phase liquid chromatography behavior and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in water. **Journal of Chromatography A**. 1475:2016) 64–73. ISSN 18733778.

SKELTON, Joshua J. *et al.* - Comparative analysis of 2,4-d uptake, translocation, and metabolism in non-Aad-I transformed and 2,4-d-resistant corn. **Weed Science**. 65:5 (2017) 567–578. ISSN 15502759.

SOUKUP, Sebastian T. *et al.* - Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany. **Archives of Toxicology**. 94:5 (2020) 1575–1584. ISSN 14320738.

STAJNKO, Anja *et al.* - Seasonal glyphosate and AMPA levels in urine of children and adolescents living in rural regions of Northeastern Slovenia. **Environment International**. 143:June (2020) 105985. ISSN 18736750.

SVIRIDOV, A. V. *et al.* - Microbial degradation of glyphosate herbicides (review). **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya**. 51:2 (2015) 183–190. ISSN 05551099.

SWANSON, Nancy L.; HOY, Judy; SENEFF, Stephanie - Evidence that glyphosate is a causative agent in chronic sub-clinical metabolic acidosis and mitochondrial dysfunction. **International Journal of Human Nutrition and Functional Medicine**. [Em linha]2016). Disponível em WWW:<URL:<http://intjhumnutrfuncmed.org/>>.

SZAREK, J. *et al.* - Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**. 50:2000) 263–266.

TARAZONA, Jose V. *et al.* - Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Archives of Toxicology**. 91:8 (2017) 2723–2743. ISSN 14320738.

THOMPSON, Thomas S.; HEEVER, Johan P. VAN DEN; LIMANOWKA, Renata E. - Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase

extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. [Em linha] 36:3 (2019) 434–446. Disponível em WWW:<URL:<https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1577993>>. ISSN 19440057.

THONGPRAKAISANG, Siriporn *et al.* - Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**. 59:2013) 129–136. ISSN 02786915.

TRASANDE, Leonardo *et al.* - Glyphosate exposures and kidney injury biomarkers in infants and young children. **Environmental Pollution**. 256:2020). ISSN 18736424.

TSAO, Yun Chen *et al.* - Simultaneous determination and quantitation of paraquat, diquat, glufosinate and glyphosate in postmortem blood and urine by LC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**. 40:6 (2016) 427–436. ISSN 19452403.

UE - Directiva do Conselho de 15 de Julho de 1991 relativa à colocação de produtos fitofarmacêuticos no mercado (91/414/EEC). **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 230:1991) 40–52.

UE - **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2019** [Em linha], atual. 2019. Disponível em WWW:<URL:https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en>.

VAGI, Maria C.; PETSAS, Andreas S. - Recent advances on the removal of priority organochlorine and organophosphorus biorecalcitrant pesticides defined by Directive 2013/39/EU from environmental matrices by using advanced oxidation processes: An overview (2007-2018). **Journal of Environmental Chemical Engineering**. [Em linha] 8:1 (2020) 102940. Disponível em WWW:<URL:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102940>>. ISSN 22133437.

VALLE, A. L. *et al.* - Glyphosate detection: methods, needs and challenges. **Environmental Chemistry Letters**. 17:1 (2019) 291–317. ISSN 16103661.

WARE SOLOMON, W. KR *et al.* - Coca and Poppy Eradication in Colombia: Environmental and Human Health Assessment of Aerially Applied Glyphosate. **Rev Environ Contam Toxicol**. 2007) 43–125.

WENJUN ZHANG; FUBIN JIANG; OU, Jianfeng - Global pesticide consumption and pollution. **International Academy of Ecology and Environmental Sciences**. [Em linha] 1:2 (2011) 125–144. Disponível em WWW:<URL:www.iaees.org/Article>.

WESTER, Ronald C. *et al.* - Glyphosate Skin Binding, Absorption, Residual Tissue Distribution, and Skin Decontamination. **FUNDAMENTAL AND APPLIED TOXICOLOGY**. [Em linha] 16:1991) 725–732. Disponível em WWW:<URL:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1884912/>.

WILLIAMS, Gary M.; KROES, Robert; MUNRO, Ian C. - Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 31:21 (2000) 117–165. ISSN 02732300.

YUSA, Vicent *et al.* - Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. **Analytica Chimica Acta**. 891:2015) 15–31. ISSN 18734324.

ZELENKOVA, N. F.; VINOKUROVA, N. G. - Determination of glyphosate and its biodegradation products by chromatographic methods. **Journal of Analytical Chemistry**. 63:9 (2008) 871–874. ISSN 10619348.

ZHANG, Luoping *et al.* - Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and supporting evidence. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**. 781:2019) 186–206. ISSN 13882139.

ZHANG, Weidong *et al.* - A method for determining glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid by gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**. 1589:2019) 116–121. ISSN 18733778.

ZOLLER, Otmar *et al.* - Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**. 11:2 (2018) 83–91. ISSN 19393229.

ZOLLER, Otmar *et al.* - Urine glyphosate level as a quantitative biomarker of oral exposure. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. 228:2020). ISSN 1618131X.



CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO INTITULADO

“BIOMONITORIZAÇÃO DE AGROQUÍMICOS E MICOTOXINAS EM CRIANÇAS”

DE ACORDO COM A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE¹, A DECLARAÇÃO DE HELSÍNQUIA² E A CONVENÇÃO DE OVIEDO³

Investigador Principal: Professora Doutora Angelina Pena

Organização do I.P.: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

NOTA PRÉVIA: Leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claramente explicado, solicite mais informações ao investigador presente. Antes de decidir, poderá falar com qualquer pessoa com a qual se sinta confortável. Se concordar com a proposta que lhe é apresentada, valide o presente documento assinando o Termo de Consentimento.

PARTE I: PÁGINA DAS INFORMAÇÕES

Introdução

O presente estudo é conduzido pelo LAQV-REQUIMTE, Laboratório de Bromatologia e Farmacognosia, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e pelo Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG)/Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), no âmbito da investigação na biomonitorização de pesticidas, bisfenóis, poluentes, micotoxinas e outros contaminantes nas populações. O grau de exposição a alguns contaminantes, de origem natural (como as micotoxinas) ou artificial (como os agroquímicos) de um grupo da população vulnerável como as crianças não é atualmente conhecido, não sendo por isso possível relacioná-los com outros fatores de saúde ou doença.

Objetivo

O objetivo do presente projeto é analisar amostras de urina de criança e quantificar a eventual presença de contaminantes de origem natural e artificial, que refletem a exposição a estes contaminantes por parte de crianças.

Tipo de intervenção

Recolha de urina por micção não invasiva e voluntária da criança, de modo autónomo ou com assistência do tutor, e preenchimento de questionário pelo tutor.

Seleção de participantes

Os participantes incluídos no estudo devem cumprir os seguintes critérios: serem saudáveis; com idade inferior a 12 anos (inclusive).

Procedimento

A recolha da urina é realizada por micção voluntária da criança, de modo autónomo ou com assistência do tutor, conforme o procedimento descrito pelo Profissional de Saúde ou membro da Equipa de Investigação. Deve ser recolhida a primeira urina da manhã, após descartar o primeiro jacto. Após a recolha, a amostra é refrigerada e entregue pelo tutor do participante até 24 horas após a colheita, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e na Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG). No dia de recolha da amostra de urina é também preenchido pelo tutor o questionário, sobre a criança, composto por 3 partes: I. Dados antropométricos e características

individuais; II. Dados sociodemográficos e III. Dados relativos à alimentação. O questionário demora cerca de 3 minutos a preencher.

Condições de Participação

A participação no presente estudo é voluntária e facultativa. A qualquer momento o participante poderá abandonar o estudo, sem qualquer prejuízo.

Benefícios

Não existirá nenhum benefício imediato e direto para o participante, sob a forma de pagamento ou de outras contrapartidas.

Confidencialidade e partilha dos resultados de investigação

A confidencialidade dos participantes é garantida ao abrigo da Lei 58/2019, de 8 de agosto, relativo à proteção das pessoas singulares:

- O questionário e a amostra serão identificadas por um código, com um número correspondente, que não será do conhecimento de ninguém, para além da equipa de investigação.

- Será garantida a confidencialidade e anonimato no tratamento dos dados, assegurando que nunca será tornada pública a identificação dos participantes em nenhum momento da investigação ou em nenhuma publicação que eventualmente se venha a produzir.

Os dados e amostras recolhidos servirão para a elaboração deste trabalho científico, sem prejuízo de poderem vir a ser incluídos em estudos retrospectivos e prospetivos relacionados com o tema. No final dos estudos, serão partilhados os resultados com os participantes (informação individual) e a comunidade científica (informação coletiva, sem identificação dos participantes).

Quem contactar

Em caso de alguma questão adicional, em qualquer momento do desenvolvimento do estudo, deverá ser contactada a Prof. Dr.^a Angelina Pena, através do e-mail apena@ci.uc.pt ou telefone 239 488 400.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Escola Universitária Vasco da Gama (CEBEAEUVG), em 29 de Novembro de 2019

¹ http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/
 Declaração de Helsínquia <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
 Convenção de Oviedo <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/235127/details/maximized>

PARTE II: Termo de consentimento

Declaro que:

Fui questionado sobre a possibilidade de participação do meu filho/ minha filha no estudo de biomonitorização de agroquímicos e micotoxinas em crianças.

Li a informação anterior ou a informação anterior foi-me lida.

Tive a oportunidade de colocar questões e, se eventualmente coloquei questões, foram respondidas satisfatoriamente. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências.

Recebi o material necessário para a recolha da amostra de urina: frasco estéril de 100mL com tampa estanque e etiqueta de identificação.

Tomei conhecimento do(s) procedimento(s) a adotar antes, durante e após a recolha de urina, bem como do local onde devo entregar a amostra de urina.

Assim, consinto voluntariamente que o meu filho/ minha filha participe neste estudo e permito a utilização dos dados e amostras que, de forma voluntária, forneço, confiando que apenas serão utilizados para os fins indicados e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pela equipa de investigação.

Nome (legível) do tutor legal da criança: _____

Assinatura do tutor legal da criança: _____

Data: ____/ ____/20__

Se tutor legal iletrado:

(será assinado por uma testemunha, letrada, selecionada pelo participante e sem relação com a equipa de investigação)

Eu testemunhei a leitura exata do formulário de consentimento ao pai/representante legal do potencial participante, o qual teve oportunidade de colocar questões. Eu confirmo que o mesmo concedeu o consentimento livremente.

Nome (legível) da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Data: ____/ ____/20__

Declaração do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento

Eu li de forma exata a página de informações ao potencial participante ou seu tutor legal, e que todas as questões colocadas foram respondidas corretamente. Eu confirmo que o consentimento foi cedido livre e voluntariamente.

Uma cópia deste Formulário de Consentimento foi disponibilizada ao participante ou seu tutor legal.

Nome (legível) do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento: _____

Assinatura do investigador/ colaborador da investigação: _____

Data: ____/ ____/20__

A preencher conforme questionário correspondente:

Nome (próprio) da criança: _____
Código interno: _____



Questionário para pais das crianças participantes no estudo intitulado

“BIOMONITORIZAÇÃO DE AGROQUÍMICOS E MICOTOXINAS EM CRIANÇAS”

Nome (próprio) da criança: _____	Recolha de urina: Data: ____/____/20__
Código interno: _____	Hora: ____h____

Nota prévia: perguntas relativas à criança participante no estudo

DADOS ANTROPOMÉTRICOS E SAÚDE

Sexo: Feminino Masculino

Idade: _____ anos

Peso: ____ Kg

Altura: ____ cm

Medicação na última semana: Não Sim: qual: _____

Exposição a fumo de tabaco: Não Sim

DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

NÍVEL EDUCACIONAL DOS PAIS:

Pai: Ensino primário ≤12ºano Licenciatura Mestrado/ Doutoramento

Mãe: Ensino primário ≤12ºano Licenciatura Mestrado/ Doutoramento

RESIDÊNCIA: Localidade: _____ Concelho: _____ Distrito: _____

Distância da residência à **indústria/ zona industrial** mais próxima:

≤100m 500m ≥1km

Distância da residência ao **campo agrícola (cultivado)** mais próximo:

≤100m 500m ≥1km

Distância da residência à **autoestrada/via rápida** mais próxima:

≤100m

500m

≥1km

Utilização de **agroquímicos** (*quando aplicável*):

Não

Sim

Se sim, no: Jardim Quintal/ horta

Se sim, os seguintes agroquímicos:

Pesticidas Fungicidas Herbicidas

Outros, quais: _____

DADOS ALIMENTAÇÃO

Responder com base na alimentação da criança nos **últimos sete (7) dias**:

ORIGEM dos alimentos consumidos:

<25% 50% 75% 100% Caseiro/ Produtores locais

<25% 50% 75% 100% Superfícies comerciais/ Supermercado

LOCAL:

Casa: _____ número/ semana

Restauração/ Cantinas escolares: _____ número/ semana

QUESTIONÁRIO ALIMENTAR:

Este questionário tem como objectivo avaliar uma potencial correlação entre o consumo de determinados alimentos e os níveis de agroquímicos e micotoxinas presentes na urina da criança.

Procure responder às questões de uma forma sincera, indicando aquilo que realmente a criança comeu e não o que pensa que seria correcto comer.

O questionário pretende identificar o consumo de alimentos da última semana, i.e. dos últimos sete dias previamente à recolha de urina. Assim para cada alimento, deve assinalar, preenchendo com um X a respectiva opção, quantas vezes por semana, a criança comeu em média, cada um dos alimentos referidos nesta lista, ao longo da última semana (sete dias). Não se esqueça de assinalar na opção respectiva os alimentos que a criança nunca come, ou come menos de 1 vez por semana.

Não se esqueça de ter em conta as vezes que o alimento é consumido sozinho e aquelas em que é adicionado a outros alimentos ou pratos (exemplo: os ovos das omeletas, etc.).

Nos **últimos sete (7) dias** qual foi a **frequência** e a **quantidade** consumida de (assinale com X):

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
LACTICÍNIOS	LEITE (1 chávena = 250 ml)								
	IOGURTE (Um = 125 g)								
	QUEIJO (Uma fatia=30g)								
	GELADO (Um ou 2 bolas)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
PÃO E CEREAIS	PÃO BRANCO OU TOSTAS (1-2 UNIDADES)								
	PÃO (OU TOSTAS) INTEGRAL OU OUTROS (1-2 UNIDADES)								
	BROA (1 fatia = 80 g)								
	FLOCOS DE CEREAIS (1 chávena sem leite)								
	ARROZ e MASSAS (½ prato)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
OVOS, CARNES E PEIXE	OVOS (1 UNIDADE)								
	AVES (FRANGO E PERÚ) (2 peças ou ¼ frango)								
	VACA (1 porção = 120g)								
	PORCO (1 porção = 120g)								
	OUTRAS CARNES (1 porção = 120g)								
	ENCHIDOS E FUMADOS (e.g. FIAMBRE, CHOURIÇO, SALPICÃO, PRESUNTO, SALSICHAS, TOUCINHO, BACON) (2 fatias ou 3 rodelas)								
	PEIXE ((1 porção = 120g)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
VEGETAIS	SOPA (1 prato)								
	LEGUMES/ SALADAS (1 porção)								
	FRUTA (4 peças)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
DOCES	BOLACHAS (3 unidades)								
	CHOCOLATE E DERIVADOS (3 quadrados; 1 colher de sobremesa)								

Grupo	Porção média (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
FRUTOS SECOS	½ chávena (descascados)								

(v.6.Out.2019) (Adaptado de http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/)