

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e  
Análises Toxicológicas

**Avaliação do risco da presença de resíduos de Glifosato e ácido  
aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo**

**Daniele Santos Ferreira**

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo

2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e  
Análises Toxicológicas

**Avaliação do risco da presença de resíduos de Glifosato e ácido  
aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo**

**Daniele Santos Ferreira**

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento

São Paulo

2013

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F383a Ferreira, Daniele Santos  
Avaliação do risco da presença de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo / Daniele Santos Ferreira. -- São Paulo, 2013.  
89p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Nascimento, Elizabeth de Souza

1. Toxicologia ambiental 2. Química : Toxicologia I. T. II. Nascimento, Elizabeth de Souza, orientador.

615.9 CDD

Daniele Santos Ferreira

**Avaliação do risco da presença de resíduos de Glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo**

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Professora Dra. Elizabeth de Souza Nascimento –  
Orientadora/Presidente

---

1.º examinador

---

2. examinador

São Paulo, dezembro de 2013.

*“Tudo na vida é administração de risco,  
não sua eliminação.”*  
(Walter Wiston, ex-presidente do Citicorp)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela sabedoria e pela força concedida nos momentos mais difíceis onde pensei em desistir.

A professora Dra. Elizabeth de Souza Nascimento pela confiança, pelo conhecimento transmitido e pelo apoio em todos os momentos.

Aos funcionários e colegas da empresa Monsanto do Brasil: Geraldo U. Berger, Luis Roberto G. Favoretto, Cristina S. Sato por todo auxílio e atenção fornecida.

Agradeço também a minha amada família pelas orações, pelo apoio, compreensão e incentivo, em especial aos meus pais e meu marido Murillo Lopes da Silva pela paciência e pelo carinho nos momentos em que estive ausente.

## RESUMO

Daniele Santos Ferreira. **Avaliação do risco da presença de resíduos de Glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo.** 2013. 89f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Apesar de todas as inovações, a sociedade visa produzir alimentos saudáveis sem degradar ou poluir o meio ambiente. Diante disso, todos os alimentos destinados ao consumo humano ou animal ficam sujeitos a um limite máximo de resíduo (LMR) legalmente permitido ou reconhecido como aceitável. Sendo assim, a alta eficiência no controle das plantas daninhas, aliada às características positivas quanto a aspectos toxicológicos, ecotoxicológicos, aumento de produtividade, dentre outras, tornaram o Glifosato o principal herbicida para uso em vários ambientes agrícolas e não agrícolas ao redor do mundo ao longo de mais de 30 anos, e a cultura agrícola brasileira da soja é a que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. Diante disso, neste estudo avaliou-se o risco da presença de resíduos de Glifosato e do seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo, verificando o comportamento do produto em determinadas áreas de aplicação e se há diferença no comportamento ambiental quando comparada a aplicação em culturas convencionais e as geneticamente modificadas. Foram escolhidas cinco das áreas definidas por regiões representativas do plantio da soja no Brasil, levando em consideração as diversas características de cada região. O procedimento analítico baseou-se na extração dos dois compostos com solução aquosa básica e purificação dos extratos em resina de troca catiônica. As amostras de grãos de soja e de solo foram quantificadas por um cromatógrafo líquido equipado com um sistema de reação pós-coluna com o-ftaldeído e detector de fluorescência. Os resultados mostraram que as áreas com temperaturas mais elevadas resultaram em concentrações de Glifosato e AMPA maiores que as demais áreas, contudo, as amostras de solo e grãos de soja apresentam baixos níveis de glifosato e AMPA, não ocasionando riscos ao meio ambiente e à saúde dos indivíduos, mesmo nos casos das concentrações de AMPA encontradas serem mais altas que as concentrações de Glifosato.

**Palavras-chave:** glifosato, aminometilfosfônico, soja, solo, resíduo e degradação.

## ABSTRACT

Ferreira, Daniele Santos. Risk assessment of the presence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in soybean grains and soil samples. 2013. 89f. Dissertation (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

Despite of all innovations, our society aims to produce healthy food without degrading or polluting the environment. Therefore, all foods intended for human or animal consumption are subject to a maximum residue limit (MRL) legally permitted or recognized as acceptable. Thus, the high efficiency in controlling the weeds, combined with the positive characteristics related to toxicological and ecotoxicological aspects, increased productivity, among others, made glyphosate the main herbicide for use in various agricultural and non-agricultural environments all over the world for the last 30 years, and the Brazilian soybean crop is the fastest growing in the last three decades and corresponds to 49% of the cultivated grain area in the country. Therefore, this study evaluated the risk of the presence of glyphosate residue and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in soybean grains and soil samples, checking the performance of the product in certain application areas and if it presented any environmental changes when compared to the application in conventional and genetically modified crops. It was chosen five specific areas defined by representative regions of soybean crop in Brazil. It also took in consideration the many characteristics of each region. The analytical procedure was based in the extraction of the two components as basic aqueous solution and purification of extracts with cation exchange resin. The samples of soybean grains and soil were analyzed by liquid chromatography equipped with a system of post-column reaction with o- phthaldehyde and fluorescence detection. The results showed that areas with higher temperatures resulted in higher concentrations of glyphosate and AMPA than other areas, however, soil samples and soybeans grains presented low levels of glyphosate and AMPA, causing no risks to the environment or to consumers health, even with the concentrations of AMPA found to be higher than the concentrations of glyphosate.

**Keys word:** Glyphosate, aminomethylphosphonic, soybean, soil, resisdue e degradation.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>2.1 Identidade Química do Ingrediente Ativo .....</b>                                   | <b>22</b> |
| <b>2.2 Propriedades físico-químicas .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.3 Toxicocinética e Toxicodinâmica .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.4 Efeitos Tóxicos ao homem .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>2.5 Comportamento ambiental .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.6 Modo de ação do Glifosato na planta .....</b>                                       | <b>32</b> |
| <b>2.7 Diversidade Microbiana associada ao solo e de Degradação do<br/>Glifosato .....</b> | <b>35</b> |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.1 Geral .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.2 Específicos .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>4.1 Áreas de estudo .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>4.2 Caracterização das áreas .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>4.3 Coletas e amostragens .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>4.4 Número de amostras .....</b>  | <b>44</b> |
| 4.4.1 Número de amostras de solo .....   | 44        |
| 4.4.2 Número de amostras de grãos .....  | 45        |
| <b>4.5 Acondicionamento e Transporte das amostras .....</b>                                | <b>47</b> |
| <b>4.6 Equipamentos e materiais .....</b>  | <b>48</b> |
| 4.6.1 Reativos e reagentes .....   | 49        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.7 Procedimentos Analíticos .....</b>  | <b>53</b> |
| 4.7.1 Preparo e extração das amostras de solo .....  | 53        |
| 4.7.2 Preparo e extração das amostras de soja .....  | 54        |
| 4.7.2.1 Determinação de Glifosato e AMPA por HPLC e Reação Pós-<br>coluna com OPA-MERC ..... | 57        |
| 4.7.2. 2 Quantificação do glifosato e AMPA .....   | 57        |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>  | <b>60</b> |
| <b>5.1 Resultados da validação do método para solo e grãos de soja .....</b>                 | <b>60</b> |
| <b>5.2 Resíduo de Glifosato e AMPA em amostras de solo .....</b>                             | <b>61</b> |
| <b>5.3 Resíduo de Glifosato e AMPA em grãos de soja .....</b>                                | <b>68</b> |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>71</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>76</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural do Glifosato .....  | <b>22</b> |
| <b>Figura 2.</b> Vias metabólicas para a degradação do Glifosato.....   | <b>25</b> |
| <b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação do Glifosato .....   | <b>34</b> |
| <b>Figura 4:</b> Representação gráfica de uma área de experimentos delineados com seis parcelas (SRR/HCV; SRR/HRR e SCV/HCV) .....  | <b>39</b> |
| <b>Figura 5:</b> Representação gráfica de uma área de experimentos delineados com nove parcelas (SRR/HCV; SRR/HRR e SCV/HCV) .....  | <b>40</b> |
| <b>Figura 6.</b> Resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da 1ª coleta de dados ..... | <b>63</b> |
| <b>Figura 7.</b> Resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da 2ª coleta de dados ..... | <b>65</b> |
| <b>Figura 8.</b> Resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo na profundidade de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da 3ª coleta de dados ..... | <b>66</b> |
| <b>Figura 9.</b> Resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja da 1ª coleta de dados .....  | <b>69</b> |
| <b>Figura 10.</b> Resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja da 2ª coleta de dados .....   | <b>70</b> |
| <b>Figura 11.</b> Resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja da 3ª coleta de dados .....   | <b>70</b> |

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Áreas de monitoramento de acordo com os estados e regiões do Brasil .....   | <b>38</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Temperaturas máximas, mínimas e médias, insolação e precipitação anual para as cidades monitoradas .....                            | <b>41</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Dados referentes a longitude, latitude e altitude das cidades monitoradas .....   | <b>41</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Recuperação média de Glifosato e AMPA .....   | <b>61</b> |
| <b>Tabela 5.</b> Aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV da 1ª coleta de dados ..... | <b>64</b> |
| <b>Tabela 6.</b> Aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV da 2ª coleta de dados ..... | <b>66</b> |
| <b>Tabela 7.</b> Aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV da 3ª coleta de dados ..... | <b>67</b> |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AMPA = Ácido aminometilfosfônico;
- ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
- BAR = Barreiras/BA;
- DAC = Dias antes da coleta - Período entre a última aplicação de Glifosato em pré-plantio ou em pós-emergência e a coleta de amostras entre a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas após o plantio da soja;
- DL<sub>50</sub> = Dose letal para 50% da população analisada;
- CL<sub>50</sub> = Concentração letal para 50% da população analisada;
- EPSPS = Enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase;
- IDA = Ingestão diária aceitável;
- LMR = Limite máximo de resíduo;
- LD = Limite de detecção;
- LON = Londrina/PR;
- LQ = Limite de quantificação;
- ND = Não detectado;
- NOEL = Nível de efeito não observado;
- PEP = Fosfoenolpiruvilchiquimato;
- Rf = Mobilidade relativa ou fator de retenção;
- RON = Rondonópolis/MT;
- SHG = Santa Helena de Goiás/GO;
- SLG = São Luiz Gonzaga/RS;
- Soja RR = Soja Roundup Ready, Soja geneticamente modificada tolerante ao Glifosato;
- SRR/HRR = Soja Roundup Ready e herbicida Roundup Ready;
- SRR/HCV = Soja Roundup Ready e herbicida convencional;
- SCV/HCV = Soja convencional e herbicida convencional.

## 1. INTRODUÇÃO

No passado, o homem cultivava o que consumia, usava técnicas rudimentares ou sofisticadas, e como estava em contato permanente com a terra, sabia quais eram as dificuldades encontradas para produzir o seu alimento e o quão importante era a atividade agrícola para a sua sobrevivência (LOPES, 2007).

Na sociedade moderna, o homem precisou desenvolver novas tecnologias para aumentar a produção de alimentos, dentre elas, o uso de praguicidas na agricultura, já que um dos maiores desafios da humanidade é atender a demanda da produção de alimentos devido ao crescimento populacional.

Os produtos químicos usados na agricultura são em sua maioria substâncias sintetizadas e desenvolvidas para serem utilizadas como uma ferramenta à disposição do agricultor para minimizar o prejuízo causado pela ação danosa de insetos, fungos, plantas invasoras, dentre outros. Assim, essas substâncias devem ser bem estudadas para que seus riscos potenciais possam ser muito bem definidos e, medidas para atenuar prováveis impactos sejam mais bem estabelecidas através de ações regulatórias e técnicas (STUTZER & GUIMARÃES, 2003).

Além da necessidade de informações referentes à toxicidade desses produtos, existe a preocupação relativa ao seu destino final na natureza. Na maior parte das vezes e para a maioria dos produtos químicos produzidos e utilizados pelo homem o destino final é a água e o solo. Três quartos da superfície da Terra são cobertos por água, o restante, não sendo pedra, concreto ou asfalto, é solo. Apesar da água, solo e ar serem considerados didaticamente como sistemas ecológicos separados, é praticamente impossível isolá-los, pois cada um deles possui interfaces íntimas com os outros, se sobrepondo também,

a outro compartimento muito importante, o dos organismos vivos (BRASIL, 2002).

A contaminação por praguicidas sempre foi uma fonte de preocupação do ponto de vista toxicológico, daí a necessidade de se desenvolver produtos com menor persistência no meio ambiente, comparados com os produtos já existentes no mercado (REMIÃO, 2007).

Nesta nova geração de praguicidas surgiu o Glifosato, o herbicida de maior uso em todo o mundo, devido a sua baixa toxicidade para organismos não alvos em relação a outros ingredientes ativos e com rápida dissipação no ambiente.

A molécula do Glifosato foi descoberta na década de 1950 e, no início da década de 1970 teve sua propriedade como herbicida estabelecida por pesquisadores da Monsanto Company, iniciando a sua comercialização em 1974, quando este foi aprovado nos Estados Unidos (GALLI & MONTEZUMA, 2005).

A alta eficiência no controle das plantas daninhas, aliada às características positivas quanto a aspectos toxicológicos, ecotoxicológicos, facilidade de manuseio, custo, aumento de produtividade, dentre outras, tornaram o Glifosato o principal herbicida para uso em vários ambientes agrícolas e não agrícolas ao redor do mundo ao longo de mais de 30 anos.

Esse ingrediente ativo é um herbicida pós-emergente, do grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não seletivo, exceto em plantas geneticamente modificadas e de ação sistêmica. É um composto absorvido pelas folhas, menos de 1% do glifosato é absorvido pelas raízes, podendo ser considerado de baixa preocupação ao solo nesse quesito. Apresenta amplo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle das plantas daninhas anuais e perenes, tanto de folhas largas quanto de estreitas (VELINI *et al.*, 2009).

Nas plantas, o Glifosato atua como um potente inibidor da atividade da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP5), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano; influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indolacético (IAA) (COLE, 1985; RODRIGUES, 1994).

Com a inibição desta enzima, a planta não produz os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas (PADGETTE *et al.*, 1995) e alguns metabólitos secundários, como o chiquimato, podem se acumular (VIDAL, 1997). Este composto intermediário pode ocasionar um colapso no metabolismo intermediário dos tecidos vegetais (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Assim, sempre que aplicado de forma inadequada e em contato com a cultura, o produto também expressará sua atividade e causará danos, guardadas as proporções de dose e suscetibilidade da cultura (GALLI & MONTEZUMA, 2005).

A degradação do Glifosato no solo é muito rápida e efetuada por grande variedade de microrganismos que usam o produto como fonte de energia e fósforo, por meio de duas vias catabólicas, produzindo o AMPA como o principal metabólito, e a sarcosina como metabólito intermediário na via alternativa (DICK & QUINN, 1995).

A degradação de AMPA é geralmente mais lenta do que aquela atribuída ao Glifosato, possivelmente porque o AMPA pode adsorver mais facilmente às partículas de solo. De acordo com Cox (1998) o AMPA é mais persistente no solo em relação ao Glifosato. Não se sabe qual a porcentagem de AMPA é formado a partir da degradação do glifosato, pois ela ocorre em função do tempo, condições ambientais favoráveis, como matriz e temperatura, dentre outras características. Sendo assim, a degradação do glifosato em solo e soja não são idênticas.

Hoje, no Brasil, o Glifosato encontra-se registrado para uso nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pêra, pêssego, pinus, seringueira, soja, trigo, uva, pastagens, nas forrageiras azevém e aveia preta (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). Enfim, é utilizado em mais de 130 países e no Brasil há 78 produtos registrados a base desse ingrediente ativo.

A cultura agrícola brasileira da soja é a que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49% da área plantada em grãos do país. A indústria nacional transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja em 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo protéico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013).

Outra revolução para a agricultura mundial e brasileira proporcionada por essa molécula está relacionada às culturas geneticamente modificadas tolerantes ao Glifosato.

De acordo com VELINI *et al.* (2009), a introdução da soja Roundup<sup>®</sup> Ready no Brasil acarretou mudanças expressivas no manejo de plantas daninhas nessa cultura. Permitiu que a aplicação do herbicida Glifosato fosse realizada na pós-emergência da soja e das plantas daninhas, controlando com eficiência as gramíneas e as folhas largas, trazendo benefícios claramente percebidos pelos sojicultores brasileiros, com destaque para o melhor controle de plantas daninhas, e maior produtividade, dentre outras vantagens.

A Soja Roundup<sup>®</sup> Ready, também conhecida como Soja RR, soja resistente ao Glifosato ou soja geneticamente modificada, é diferente da soja convencional. Ela foi desenvolvida pela empresa Monsanto Company na década de 1980 (MONSANTO DO BRASIL, 2013), pela inserção de um gene da

bactéria *Agrobacterium spp* no genoma da planta de soja, tornando-a tolerante ao herbicida Glifosato (JENNINGS *et al.*, 2003), ou melhor, um gene que confere às plantas a tolerância à aplicação, em pós-emergência, de herbicidas à base da molécula de Glifosato como o herbicida Roundup Ready®, este desenvolvido e registrado pela Monsanto Company nos Estados Unidos, durante os anos 1990 e mais recentemente, no Brasil (PIONEER SEMENTES, 2003).

Porém, apesar de todas as inovações, a sociedade necessita produzir alimentos saudáveis sem degradar ou poluir o meio ambiente. Sendo assim, além de outras atividades, a ANVISA controla e fiscaliza a quantidade de resíduos encontrada nos alimentos, ou seja, a quantidade de determinada substâncias que pode permanecer nos alimentos ou no meio ambiente, decorrentes do uso dos praguicidas.

Um relatório emitido por fiscais da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SEAB) do estado do Paraná informou que de 150 amostras de soja referentes à safra 2006 no Paraná, foram detectados resíduos de Glifosato em mais de 70% delas. E destacou que cerca de 5% das amostras de grãos de soja transgênica estavam com resíduos acima do permitido pela ANVISA.

Diante disso, todos os alimentos destinados ao consumo humano ou animal ficam sujeitos a um limite máximo de resíduo (LMR) legalmente permitido ou reconhecido como aceitável. Consultando a monografia do Glifosato, apresentada pela ANVISA, pode-se observar que em meados de 2003 o limite máximo permitido de Glifosato nos grãos de soja era 0,2 mg/Kg, porém, atualmente, indiferente da soja convencional ou geneticamente modificada, este limite é de 10 mg/Kg (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013), onde tal mudança pode ser resultado do surgimento oficial da soja geneticamente modificada no país. Por outro lado, desde 2006, de acordo com o Codex alimentarius, o LMR de Glifosato para soja é de 20 mg/kg.

Um outro ponto importante a ser levado em consideração quando o assunto é praguicidas, é que além do risco de resíduos em alimentos para a saúde, também é preciso atentar-se para a possibilidade de encontrar resíduos no solo, causando algum dano ao meio ambiente, sendo necessário avaliar as quantidades encontradas, o tipo de solo, as características do produto, modo de ação, entre outros aspectos de relevância. Diante disso, como não encontramos limites máximos permitidos para o solo estabelecidos pelas agências regulamentadoras, apenas alguns dados do INCHEM que variam entre 0,07 a 40 mg/kg para o Glifosato e de 0,14 a 9 mg/kg para o AMPA de acordo com os autores descritos, foram considerados como parâmetro de segurança o Limite Máximo de Resíduo de Glifosato para soja, uma vez que são escassas as informações a respeito de concentrações permitidas em solo, nos tornando ainda mais conservadores uma vez que utilizamos os limites para um alimento, neste caso, para a soja.

As principais vias de dissipação do Glifosato no solo estão relacionadas à formação de grande fração de resíduos e à sua rápida taxa de biodegradação. Após atingir o solo, o Glifosato tende a ser sorvido rápida e fortemente à fração coloidal do solo (VELINI *et al.*, 2009). Portanto, não podem ser lixiviadas e desta forma é mais provável que o Glifosato e o AMPA sejam detectados próximos à superfície do solo.

Galli & Montezuma (2005) afirmaram que, tendo em vista a amplitude do uso dessa molécula, as propriedades que determinam o comportamento do Glifosato o caracterizam como sendo de reduzido impacto ambiental, pois liga-se fortemente ao solo e não atinge os aquíferos. De qualquer forma, é importante avaliar as concentrações de resíduos permitidos para evitar possíveis contaminações ao meio ambiente e a população. Porém, outras publicações afirmam que o uso generalizado do Glifosato pode contaminar a água e o solo e impactar componentes bióticos do ecossistema, pois do total aplicado desse

herbicida apenas uma parte atinge o alvo específico (FAY & SILVA, 2004; MATOS, 2001). Estudos de mobilidade demonstraram pouca lixiviação do glifosato em poucos centímetros abaixo do perfil superior do solo. O metabólito principal, AMPA, também é retido nas camadas superiores do solo (WHO/EHC, 1994).

Estudos realizados em oito estados norte-americanos concluíram que o AMPA é mais persistente que o Glifosato, podendo permanecer no solo entre 119 e 958 dias (COX, 1998).

A toxicidade é inerente ao produto, enquanto o risco é a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos, como resultado da toxicidade e da exposição. A avaliação do risco estabelece como e quando usar os praguicidas, determina a magnitude, os graus e as probabilidades da ocorrência de efeitos adversos que podem resultar do uso dessas substâncias (ILSI, 1999). Sendo assim, o produto terá o seu uso autorizado somente quando os benefícios dessa utilização forem bem maiores que os eventuais riscos à saúde e ao meio ambiente.

Diante disso, devido à larga utilização desse ingrediente ativo, casos de intoxicação, solicitação de revisão da Ingestão Diária Aceitável (IDA) por parte de empresas registrantes, necessidade de controle de limite máximo de impurezas presentes no produto técnico e possíveis efeitos toxicológicos adversos, foi publicada em 25/02/2008 a RDC nº 10, onde a ANVISA e outros órgãos registrantes decidiram reavaliar alguns ingredientes ativos quanto a sua segurança, dentre eles o Glifosato.

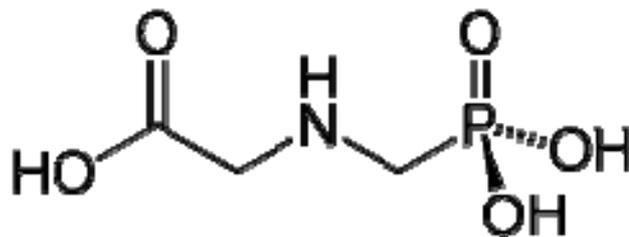
Neste contexto, este trabalho visa avaliar a presença e as implicações das concentrações de resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA em grãos de soja com o intuito de preservar a saúde humana e concentrações de resíduos em amostras de solo, verificando o comportamento do produto em determinadas áreas de aplicação e verificando se há diferença no comportamento ambiental quando comparada sua aplicação em culturas convencionais e as geneticamente

modificadas. Porém, primeiramente serão apresentados os níveis de resíduos de Glifosato e AMPA em amostras de solo e em grãos de soja nas áreas monitoradas, analisando também, os dados encontrados na literatura, e por fim, a avaliação do risco será concretizada.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Identidade Química do Ingrediente Ativo

O herbicida Glifosato é sintetizado a partir de um hidrogênio amínico do aminoácido glicina, por um radical de éster fosfônico, o N-(fosfometil) glicina. A molécula (Figura 1) foi originalmente sintetizada em 1964 como potencial agente quelante industrial, e o seu uso como herbicida foi inicialmente descrito em 1971. O termo “Glifosato” é geralmente utilizado para indicar tanto o ácido quanto seus sais, pois são reconhecidos como biologicamente equivalentes (WHO/EHC,1994; VELINI *et al.*, 2009).



**Figura 1:** Fórmula estrutural do Glifosato

### 2.2. Propriedades físico-químicas

O nome químico do glifosato é N-(fosfometil) glicina, a fórmula molecular : C 3 H 8 NO 5 P, massa molecular : 169,1 g/mol. É bastante estável na presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (WHO/EHC, 1994).

Segundo Schuette (1998), o Glifosato é muito pouco solúvel em solventes orgânicos comuns, e bastante solúvel em água. Este herbicida tem um

coeficiente elevado de adsorção no solo ( $K_d=61 \text{ g/cm}^3$ ) e um coeficiente de partição octanol/água muito baixo ( $K_{ow}=0,00033$ ), o que indica baixa tendência para bioacumulação. Estes números sugerem que o Glifosato tem mobilidade baixa, com pouca tendência para lixiviação no solo (Linders *et al.*, 1994), ou seja, pouca tendência de levar ao deslocamento dos minerais do solo para camadas mais profundas. A mobilidade do glifosato depende da capacidade de adsorção do solo, bem como da presença de matéria orgânica, óxidos de Fe e Al nela presentes. Solo com elevada capacidade de adsorção torna os herbicidas pouco móveis e, como consequência, a sua permanência também pode ser influenciada pelos processos de degradação física, química ou biológica da substância (QUEIROZ *et al.*, 2011).

O Glifosato apresenta pouca volatilidade, baixa pressão de vapor a  $45^\circ\text{C}$  comparada à sua solubilidade em água ( $775 \times 10^{-8} \text{ mmHg}$ ) e ponto de fusão de  $189,9^\circ\text{C}$ . A constante de Henry para o Glifosato ( $<1,44 \times 10^{-2} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mole}$ ) indica que, na partição do herbicida entre a água e o ar, a maior concentração do composto estará presente na água (VELINI *et al.*, 2009, WHO/EHC,1994).

Este herbicida pertence ao grupo das glicinas substituídas e como a sua base conjugada é instável e altamente energética, logo, o ácido que deu origem ao Glifosato, é caracterizado como um ácido fraco e estável.

A via preliminar de decomposição do Glifosato no ambiente é a degradação microbiana no solo (Franz *et al.*, 1997 e Schuette, 1998). A taxa de decomposição é inicialmente rápida, seguida por prolongada e lenta decomposição (MOSHIER & PENNER, 1978). O herbicida é inativado e biodegradado por microrganismos do solo, sendo que as taxas de degradação são relacionadas à atividade microbiana ali presente e aos fatores que afetam esta atividade (VELINI *et al.*, 2009). Torstensson & Aamissepp (1977) consideram que quando o produto entra em contato com a microbiota do solo, este é rapidamente inativado. E de acordo com Forlani, *et al.* (1999), o produto

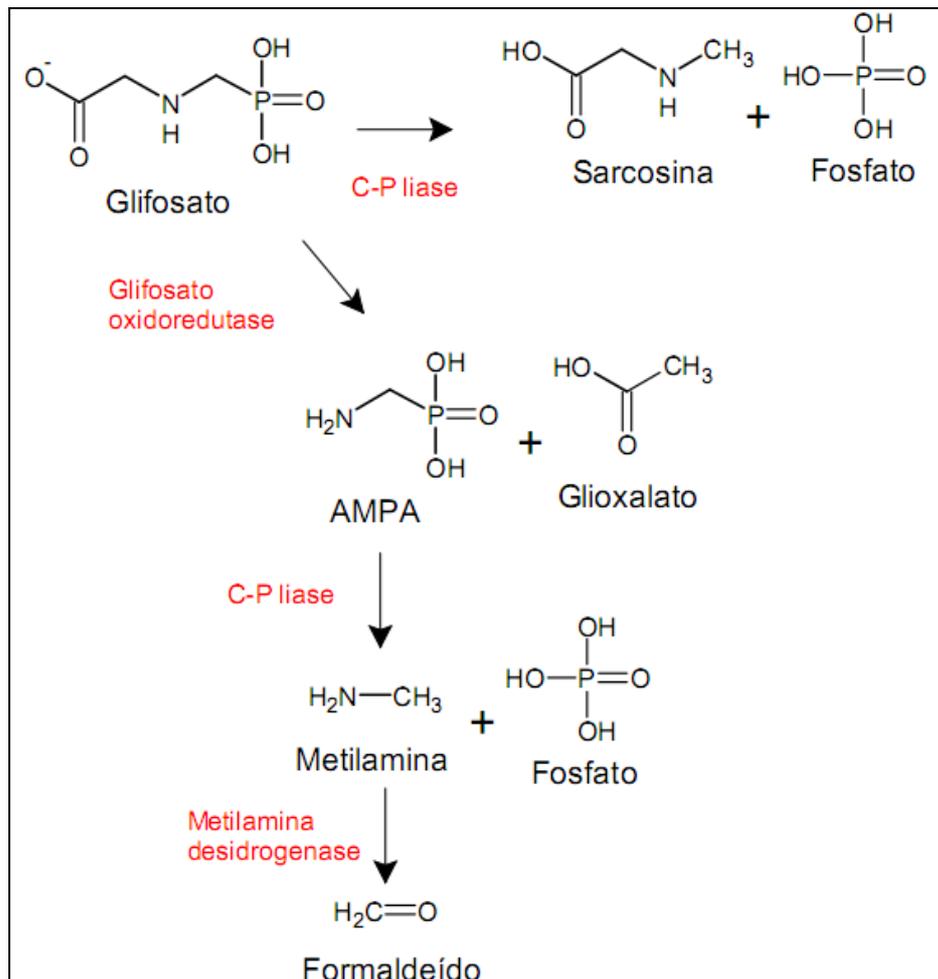
pode ainda ser mineralizado, processo onde a substância orgânica é convertida em substância inorgânica, produzindo água, dióxido de carbono e fosfato.

A degradação do Glifosato no solo é muito rápida e realizada por grande variedade de microrganismos, que usam o produto como fonte de energia e fósforo, através de duas vias catabólicas: produzindo o AMPA como principal metabólito, e sarcosina (Figura 2) como metabólito intermediário na via alternativa (DICK & QUINN, 1995).

Uma característica importante deste composto é a sua capacidade de ser adsorvido pelas partículas de solo e permanecer inativo até a sua completa degradação. O produto é degradado por microrganismos tanto no solo, como na água; no solo é fortemente retido na forma de resíduo-ligado; na água é altamente solúvel, sendo a volatilidade e evaporação insignificantes (GALLI & MONTEZUMA, 2005).

A primeira via consiste na transformação do Glifosato em sarcosina por ação das bactérias *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase); a sarcosina entra no metabolismo destes e de outros microrganismos, degradando-se. Esta via é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda via consiste na transformação do Glifosato em AMPA (AMARANTES JUNIOR *et al.*, 2002).

As propriedades que determinam o comportamento do Glifosato caracterizam o produto como sendo de reduzido impacto ambiental, tendo em vista a amplitude de uso dessa molécula.



**Figura 2:** Vias metabólicas para a degradação do glifosato.  
 Fonte: LIU *et al.*, 1991.

### 2.3 Toxicocinética e Toxicodinâmica

A toxicocinética estuda a relação entre a quantidade de um xenobiótico que atua sobre o organismo e a concentração dele no plasma, relacionando os processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação pelo organismo, em função do tempo. Já a toxicodinâmica estuda a interação entre as moléculas do xenobiótico e, os sítios de ação dos órgãos e consequentemente o aparecimento de desequilíbrio homeostático.

A avaliação do risco visa identificar, caracterizar e quantificar o risco envolvido na utilização dos agentes químicos. É necessário identificar o perigo ou a toxicidade do composto, estabelecer a relação dose/resposta, avaliar a exposição, caracterizar o risco, e posteriormente, gerenciar este risco (NASCIMENTO, E.S., 2004)

A exposição ao Glifosato pode ocorrer pelo manuseio, alimento, ar ou por meio da água contaminada.

Um estudo, realizado em colaboração com a Universidade de Arkansas, nos Estados Unidos (LAVY *et al.*, 1992), constatou que nenhuma das amostras de urina coletadas de indivíduos que trabalhavam com o Glifosato, continha níveis quantificáveis do mesmo (o limite de detecção foi de  $1 \times 10^{-9}$ ). Embora provavelmente tenha ocorrido alguma exposição dérmica, a ausência de níveis detectáveis na urina foi atribuída à capacidade limitada de absorção do Glifosato pela pele (ACQUAVELLA *et al.*, 2001).

Diversos estudos indicam que o Glifosato é pouco absorvido pelo organismo e mesmo se ocorrer absorção através da pele, por exemplo, o organismo não o metaboliza. Isso significa que este composto não é biologicamente transformado em um produto químico diferente ou biotransformado em diferentes produtos químicos que podem apresentar diferentes perfis de toxicidade em relação ao composto inicial (SILVEIRA, 2013). Ao contrário, é eliminado na forma inalterada, principalmente pela urina (WHO/EHC, 1994).

A absorção do Glifosato no trato gastrointestinal, após a ingestão oral em várias espécies, ou seja, ratos, coelhos, galinhas, dentre outras, está limitada a 30-36% da dose ou menos. Estudos indicam que, após uma dose oral única de Glifosato, este foi eliminado em cerca de 62-69% nas fezes. Sendo que do Glifosato absorvido 14-29% foi excretado na urina e 0,2% ou menos no ar expirado. A excreção biliar, após a administração intravenosa, foi de apenas 5 a

8%. A eliminação de 99% de uma dose oral, ocorre em aproximadamente 168 horas após a absorção (WHO/EHC,1994).

Analisados conjuntamente, os resultados de estudos de exposição em humanos e estudos de toxicidade em animais de experimentação demonstram que o Glifosato, em condições normais de uso, não causa riscos à saúde (WILLIAMS *et al.*, 2000).

A IDA é definida como a quantidade de uma substância, expressa em mg/kg de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente na alimentação, mesmo por toda a vida, sem dano à saúde humana, com base em informações toxicológicas disponíveis. A IDA do Glifosato no Brasil é de 0,042 mg/Kg p.c (ANVISA, 2013), enquanto que a FAO/OMS (JMPR) estabeleceu a IDA do glifosato igual a 1,0 em 2004; a EFSA/SANCO (Europa) estabeleceu um valor igual a 0,3 em 2002 e a US EPA (EUA) igual a 1,75 (2010), ou seja, no Brasil a IDA para o glifosato é bem mais restritiva que os demais países citados, o que favorece condições ainda mais seguras para a população (AMARAL, L.M.S. 2013).

Não há muitas informações a respeito do mecanismo de ação do glifosato em organismos, apenas em plantas. Porém, Olorunsaga et al, 1979 (apud WHO/EHC, 1994), observaram taxas de controle respiratório reduzidas relacionadas com a dose e aumento da atividade da fosfatase em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos 5 horas após as doses intraperitoneais individuais que variam de 15 a 120 mg/kg de peso corpóreo. Os autores sugerem que em doses agudas a letalidade pode ocorrer como resultado de desacoplamento da fosforilação oxidativa.

#### **2.4. Efeitos Tóxicos ao homem**

Os praguicidas precisam ser avaliados quanto aos seus efeitos agudos, sub-crônicos e crônicos.

Testes de toxicidade aguda são ensaios de curta duração que proporcionam rápidas respostas quanto os efeitos tóxicos das substâncias. O seu principal objetivo é determinar as concentrações letais médias em tempo reduzido de exposição, que geralmente varia entre 24 a 96 horas (LOMBARDI, 2013).

Os testes de toxicidade sub-crônica referem-se às exposições que ocorrem em até 90 dias. São usadas 3 doses experimentais, sendo que a dose máxima não deve ter letalidade acima de 10%, determinando assim, a dose na qual não é observado nenhum efeito e provendo dados para estudos de toxicidade crônica (LEITE & AMORIM, 2006). Já a intoxicação crônica caracteriza-se por surgimento tardio, após meses ou anos, por exposição pequena ou moderada a produtos tóxicos ou a múltiplos produtos, acarretando danos na maioria das vezes irreversíveis, como paralisias e neoplasias (EPA, 2013).

A biossíntese de aminoácidos aromáticos não é observada em animais, o que pode explicar a sua atividade seletiva em plantas, o que proporciona uma baixa toxicidade em mamíferos. O Glifosato apresenta valores de  $DL_{50}$  oral e dérmica para ratos maiores que 5.000 mg/kg (FAO, 2013). A toxicidade aguda inalatória,  $CL_{50}$  (4 h), é maior que 4,98 mg/L de ar. O Glifosato e os seus sais não são irritantes à pele, porém podem ser levemente irritante aos olhos (FAO/WHO; EPA, 2013). De acordo com a EPA o glifosato não apresenta propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas ou que causem algum problema reprodutivo.

O Glifosato foi examinado quanto ao potencial mutagênico em uma ampla gama de sistemas teste abrangendo todos os parâmetros pertinentes *in vitro*, bem como *in vivo*. A partir deste grande banco de dados, pode-se concluir que o ingrediente ativo não apresenta um risco de efeitos mutagênicos nos seres humanos (FAO, 2013).

Estudos de reprodução em animais não indicaram um risco específico de Glifosato para a reprodução. O NOAEL para efeitos de desenvolvimento foi de 1.000 mg /kg de peso corporal/dia em ratos e 175 mg/kg de peso corporal /dia em coelhos (FAO, 2013).

Baseados em resultados de estudos de toxicidade em exposição durante o desenvolvimento em ratos e em coelhos, pode-se concluir que o Glifosato não produz danos ao desenvolvimento embrionário e fetal. O comprometimento de fetos ocorre apenas quando as doses são suficientemente altas para induzir toxicidade materna. Sendo assim, esses resultados demonstram que o Glifosato apresenta uma toxicidade aguda muito baixa (autor apud VELINI *et al.*, 2009; WHO/INCHEM, 2012 ).

Quanto à neurotoxicidade, de acordo com o relatório de 2002 da *European Commission*, o Glifosato não apresenta efeitos adversos relevantes. O impacto do Glifosato sobre o sistema nervoso não tem sido especificamente avaliado em estudos de neurotoxicidade, porém não houve evidências associadas a este efeito tanto na exposição aguda, sub-crônica, crônica ou reprodutiva. Ou seja, não há preocupações com a neurotoxicidade relacionada ao potencial de desenvolvimento (FEDERAL REGISTER, 2004).

O mais extenso estudo de biomonitoramento conduzido com o Glifosato foi desenvolvido por pesquisadores da Universidade de Minnesota nos Estados Unidos, conhecido como “Farm Exposure Study”. Foram monitoradas 48 famílias de fazendeiro, onde amostras de urina foram coletadas um dia antes da aplicação de Glifosato; no dia da aplicação e três dias após a aplicação do produto. Dentre as amostras dos fazendeiros coletadas no dia da aplicação, foi detectado a presença de Glifosato em 60% delas, sendo que nas esposas e filhos, esse percentual foi bem mais baixo, de 4% e 12% respectivamente. De qualquer forma, nenhuma dose foi maior que a IDA do Glifosato estabelecida nos Estados Unidos, 2,0 mg/kg/dia. Diante disso, pode-se constatar que, se os

usuários aplicarem o produto de acordo com a recomendação do fabricante e com os equipamentos de proteção individual recomendados, não é esperado o aparecimento de efeitos adversos quando do uso por praguicidas a base de Glifosato (ACQUAVELLA *et al.*, 2004).

## **2.5 Comportamento ambiental**

O solo é um sistema bastante complexo, constituído por material mineral, matéria orgânica, microrganismo, água e ar. Populações complexas e diversificadas de microrganismos estão presentes no solo e podem ser facilmente influenciadas por inúmeros fatores, como propriedades físico-químicas, matéria orgânica, umidade, temperatura, pH, sistema de manejo, entre outras (ALEXANDER, 1961; BUCKLEY & SCHMIDT, 2001). Portanto, variações em populações específicas de microrganismos são esperadas sempre que for introduzida alguma prática agrícola que altere significativamente os fatores citados.

Os parâmetros físicos do solo são divididos em três grupos auxiliando a identificação dos principais processos que ali ocorrem. No grupo mecânico leva-se em consideração a textura, a estrutura, a distribuição de tamanho de poros e a profundidade, os quais podem alterar a estrutura do solo como, compactação, infiltração de água, dentre outros. O grupo hidrológico refere-se à retenção e transmissão de água, podendo interferir na lixiviação. E por fim, o grupo térmico, que consiste na capacidade de aquecimento e na condutividade térmica (LAL *et al.*, 1994; BETTIOL *et al.*, 2006).

O Glifosato é o isômero principal do N-(fosfonometil) glicina. O produto é um sólido (pó branco) apresentando-se com grau de pureza de 75% quando úmido, e até 95% quando seco. Sua solubilidade é de aproximadamente 12.000 mg/L (EXTOXNET, 2013). Sua volatilidade é de  $2,08 \times 10^{-12}$  atm x mol<sup>-1</sup>,

indicando a dificuldade do produto atingir as vias aéreas superiores. Devido à baixa pressão de vapor, o produto dificilmente é inalável (CENTENO, 2007).

O Glifosato é um composto orgânico dipolar e, por isso, apresenta rápida e alta taxa de adsorção aos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e à matéria orgânica, como evidenciado em solos brasileiros (PRATA *et al.*, 2000). Ele apresenta uma mobilidade baixa devido à alta adsorção e esta mobilidade é medida em teste de placa cromatográfica, cujo Rf, mobilidade relativa ou fator de retenção, varia de 0 a cerca de 0,5 (CENTENO, 2007).

A biodegradação é sua principal via de desaparecimento do solo, sendo que a sua meia-vida varia de 1 a 174 dias (EXTOXNET, 2013). O transporte de um produto na matriz solo é definido pela sua mobilidade que assume diferentes valores em diferentes tipos de solo e que depende, fundamentalmente, de sua solubilidade hidrolítica e adsorção/dessorção nos componentes do solo. Uma questão pertinente em relação a sua presença em diferentes tipos de solo é se o Glifosato, por carreamento poderá representar algum perigo para as águas superficiais e contaminar os peixes, porém, vale lembrar que o Glifosato adsorvido as partículas de solo tenderá a sedimentação, diminuindo assim sua disponibilidade aos organismos vivos presentes nestas águas.

A persistência de uma substância química usada como praguicida está sujeita a três vias de degradação no meio ambiente: hidrólise, fotólise e biodegradação.

O Glifosato tem uma fotólise muito lenta, sua meia vida fotolítica é superior a 100 dias, sendo considerado como fotoliticamente e hidroliticamente estável. Já a biodegradação é a principal via de dissipação do produto, sendo que sua meia vida gira em média 47 dias (EXTOXNET, 2013); segundo Giesy *et al.* (2000) este parâmetro medido em campos agrícolas é de 32 dias; e, segundo Araújo *et al.* (2003), em solos brasileiros é ainda menor.

Os peixes e invertebrados podem acumular os praguicidas em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, pois estes compostos podem se ligar ao material particulado em suspensão e serem ingeridos pelos organismos aquáticos (NIMMO,1985). Diante disso, avalia-se a bioconcentração do Glifosato levando em consideração o seu coeficiente de partição óleo/água (THE ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 1993), o que representa a tendência de se acumular na água, ao invés de nos tecidos vivos.

O Glifosato tende a ser sorvido rapidamente, ligando-se a fração coloidal do solo, e desta forma, observa-se a troca de ligantes, principalmente com a fração oxídica do solo e a formação de complexos metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) com a fração orgânica do mesmo, considerando-os como principais mecanismos envolvidos na sorção do Glifosato às partículas do solo (WHO/EHC, 1994). A lixiviação das moléculas não voláteis e solúveis em água é a principal forma de transporte neste meio (ENFIELD & YATES, 1990; AYENI *et al.*, 1998). Sendo assim, moléculas altamente sorvidas aos colóides do solo, como o Glifosato, tendem a ser pouco lixiviadas (CHEAH *et al.*, 1997). Logo, o Glifosato apresenta um perfil de pouca relevância na questão de comportamento ambiental quanto comparado com outras moléculas.

## **2.6 Modo de ação do Glifosato na planta**

O Glifosato age na inibição enzimática das plantas, bloqueando a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), que é responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina, tirosina e triptofano, para o desenvolvimento da planta (TONI *et al.*, 2006), impedindo as plantas de produzirem quantidades suficientes desses aminoácidos, os quais são necessários para a manutenção do seu crescimento.

Quando essa enzima é bloqueada, a via metabólica é interrompida e, pela falta de aminoácidos, a planta morre. No caso da cp4-epsps, o Glifosato não consegue bloqueá-la e, assim, a via metabólica não é interrompida e as plantas se desenvolvem normalmente (WHO/EHC,159).

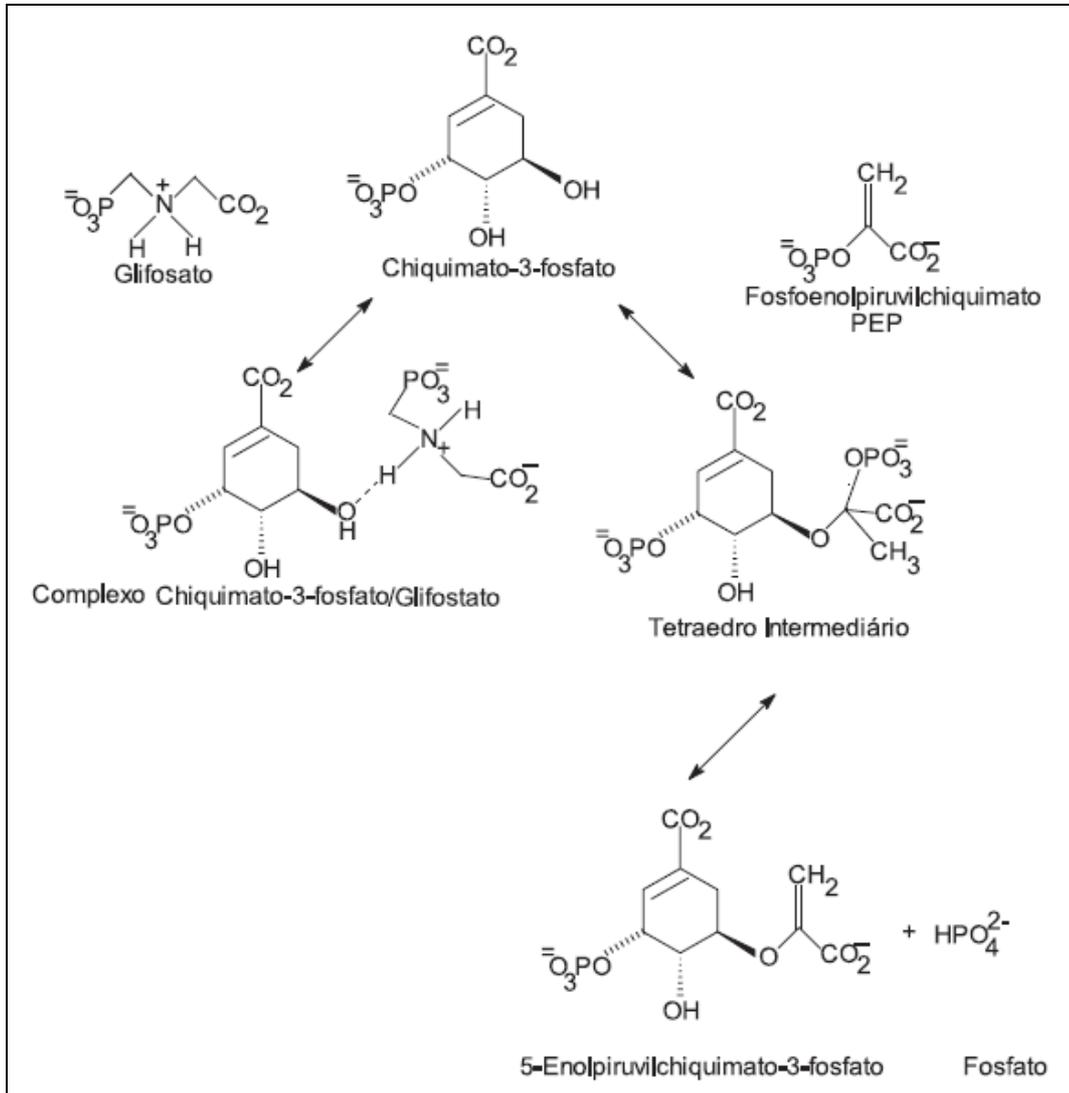
Inicialmente, a enzima EPSPs liga-se ao chiquimato-3-fosfato (S3P), formando o complexo EPSPs-S3P, na sequência o fosfoenolpiruvilchiquimato (PEP) é acoplado a este complexo, produzindo 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) (Figura 3). Em plantas suscetíveis tratadas com Glifosato, a molécula do herbicida não se liga à enzima livre, mas ao complexo EPSPs-S3P, impedindo a ligação do PEP, formando o complexo inativo EPSPs-S3P-Glifosato (TREZZI *et al.*, 2001; MONQUERO, 2003).

O ponto final da via de transformação do chiquimato é a formação do corismato, a partir do qual muitos metabólitos secundários são formados. Entre estes, o tetraidrofolato, ubiquinona e vitamina K, que são essenciais para a vida da planta. A fenilalanina, além de participar da biossíntese de proteínas, é também substrato para a via do fenilpropanóide que produz numerosos produtos secundários de plantas, tais como antocianinas, lignina, promotores e inibidores de crescimento e compostos fenólicos. O triptofano é precursor do ácido indolilacético (IAA), hormônio vegetal necessário para expansão celular, manutenção da dominância apical e muitos outros processos regulatórios (DEVINE *et al.*, 1993; GRUYS & SIKORSKI, 1999).

A figura 3 ilustra o mecanismo de ação do Glifosato.

Quanto mais Glifosato a planta recebe, mais ácido chiquímico ela acumula, causando a sua morte. No entanto, já se sabe que esta via do chiquimato é completamente ausente em mamíferos, peixes, aves, répteis e insetos. Essas formas de vida não dependem desta via porque retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam. Já as plantas, são obrigadas a produzir estes

aminoácidos essenciais para sobreviverem e se multiplicarem (GRUYS & SIKORSKI, 1999).



**Figura 3:** Mecanismo de ação do Glifosato. O lado direito da figura ilustra a formação do tetraedro intermediário (reação entre chiquimato-3-fosfato e PEP) para a posterior formação do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato. O lado esquerdo da figura indica como esta reação pode ser inibida pelo Glifosato. Fonte: (TONI *et al.*, 2006).

## **2.7 Diversidade Microbiana associada ao solo e de Degradação do Glifosato**

Spadotto *et al.* (2004) destacaram que os praguicidas podem alterar não só a diversidade de espécies microbianas do solo, como também sua biomassa. Como os microrganismos têm atuação fundamental na transformação da matéria orgânica e liberação de nutrientes para as plantas, efeitos sobre a população microbiana podem afetar a disponibilidade de nutrientes e, assim, a fertilidade do solo pode ficar comprometida (SPADOTTO *et al.*, 2004; PERES, 2000; ZILLI *et al.*, 2003). Porém, Grossbard & Harris (1985) enfatizou que não há risco de a fertilidade do solo ser comprometida pelo uso de glifosato.

A diversidade microbiana associada ao solo vem atualmente sendo estudada através de métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA, notadamente o gene 16S rDNA, em bactérias, e 18S rDNA para fungos, que é amplificado por PCR, e posteriormente, caracterizado através da clonagem e sequenciamento ou então analisado por eletroforese, obtendo um perfil da comunidade microbiana (RANJARD *et al.*, 2000; KOZDRÓJ & VAN ELSAS, 2001; ZILLI, *et al.*, 2003).

Já para estudos das comunidades microbianas cultiváveis e não cultiváveis têm sido utilizadas técnicas moleculares baseadas nos genes ribossômicos – rRNA (AMANN *et al.*, 1995; GURTNER *et al.*, 2001), associadas a técnicas de cultivo como o isolamento em meio de cultura.

Quando o Glifosato é aplicado, parte do produto é diretamente absorvida, ficando nas plantas daninhas, e parte é depositada no solo. A parte do produto que é retida nos tecidos vegetais contribui para reduzir sua disponibilidade no ambiente, e este produto somente irá atingir o solo quando a matéria seca dessas plantas daninhas for decomposta pelos organismos heterotróficos do solo e na maior parte das vezes não mais como Glifosato (MONSANTO, 2013).

Grossbard & Harris (1979) observaram que concentrações de Glifosato capazes de inibir microrganismos em culturas puras estão geralmente muito acima daquelas que poderiam estar disponíveis nos solos após as aplicações de campo. Segundo Roslycky (1982), o Glifosato aplicado ao solo não tem efeito adverso nas populações microbianas.

Os estudos realizados, inclusive em áreas agrícolas que receberam aplicação de Glifosato por dezenove anos, não apresentaram qualquer efeito adverso significativo sobre a microbiologia do solo (Hart & Brookes, 1996) e não foi observado impacto sobre a biomassa microbiológica, bem como sobre a mineralização de carbono e nitrogênio nas doses recomendadas de uso (BIEDERBECK *et al.*, 1997). Trabalhos mais recentes realizados por Haney *et al.*, (2000, 2002) também confirmam a degradação do produto sem impacto negativo sobre a comunidade microbiana do solo. Da mesma forma, Giesy *et al.* (2000) concluíram em seu relatório de avaliação do risco ecotoxicológico para a molécula de Glifosato que, nas doses recomendadas, não há qualquer evidência de que o produto possa causar danos à microbiologia do solo (MONSANTO DO BRASIL, 2013).

No ambiente agrícola, o Glifosato não causa impacto significativo sobre as populações microbianas em função da grande diversidade dos microrganismos, da composição físico-química dos solos e da dose efetiva para exercer alguma ação sobre eles.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a presença de resíduos de Glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo e suas implicações para a saúde e ao meio ambiente, verificando assim o comportamento do produto em determinadas áreas de aplicação e se há diferença no comportamento ambiental quando comparada a aplicação em culturas de soja convencional e geneticamente modificada.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar os resíduos de Glifosato e AMPA em grãos de soja e em amostras de solo, após aplicação, em tempos previamente definidos.
- Avaliar as implicações dos resultados da presença de Glifosato e AMPA em soja e compará-las com os LMR estabelecidos em legislações pelos órgão governamentais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Áreas de estudo

Considerando a larga distribuição geográfica desta cultura, foram escolhidas cinco das áreas definidas por regiões representativas do plantio da soja no Brasil, levando em consideração as diversas características de cada região.

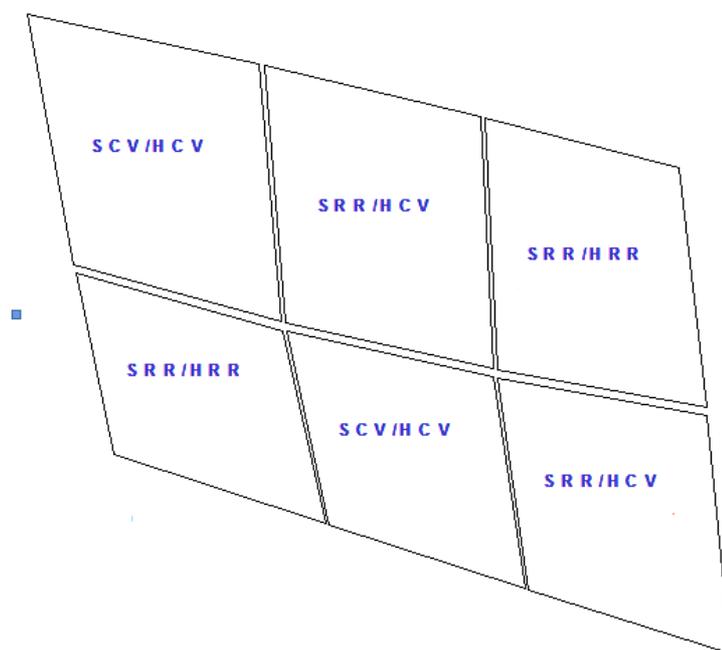
A metodologia utilizada neste trabalho foi a de pesquisa bibliográfica e avaliação dos dados obtidos nas análises efetuadas em esclarecimento as demandas contidas no Comunicado nº54 da CTNBio pela empresa Monsanto do Brasil, o qual determina o monitoramento comparativo de plantios comerciais dos cultivares de soja e do sistema convencional em diferentes regiões do Brasil, porém, tendo como foco, apenas os resultados das análises dos níveis de resíduos em solo e em grãos de soja.

O presente estudo se propõem a avaliar a presença de resíduos em solo e em grãos de soja em cinco áreas de monitoramento, sendo elas: São Luiz Gonzaga/RS, Londrina/PR, Rondonópolis/MT, Santa Helena de Goiás/GO e Barreiras/BA, representando parte da área de soja plantada no Brasil (Tabela 1).

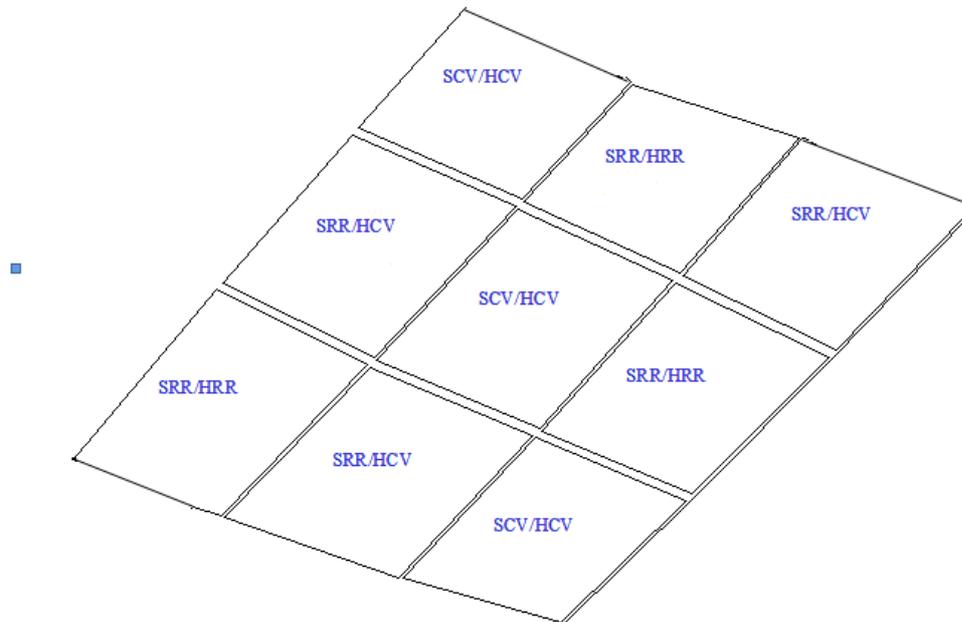
**Tabela 1:** Áreas de monitoramento de acordo com os estados e regiões do Brasil

| <b>Estados</b>    | <b>Regiões</b>        |
|-------------------|-----------------------|
| Rio Grande do Sul | São Luis Gonzaga      |
| Paraná            | Londrina              |
| Mato Grosso       | Rondonópolis          |
| Goiás             | Santa Helena de Goiás |
| Bahia             | Barreiras             |

Nas regiões de São Luiz Gonzaga, Londrina e Santa Helena do Goiás foram avaliadas 6 parcelas (Figura 4) e as regiões de Rondonópolis e Barreiras, 9 parcelas para o estudo da presença de glifosato em solo e em grãos de soja (Figura 5).



**Figura 4:** Representação gráfica de uma área de experimentos delineados com seis parcelas. Soja Roundup<sup>®</sup> Ready e herbicida convencional (SRR/HCV); Soja Roundup<sup>®</sup> Ready e herbicida Roundup<sup>®</sup> Ready (SRR/HRR) e soja convencional e herbicida convencional (SCV/HCV).



**Figura 5:** Representação gráfica de uma área de experimentos delineados com nove parcelas. Soja Roundup<sup>®</sup> Ready e herbicida convencional (SRR/HCV); Soja Roundup<sup>®</sup> Ready e herbicida Roundup<sup>®</sup> Ready (SRR/HRR) e soja convencional e herbicida convencional (SCV/HCV).

#### 4.2 Caracterização das áreas

A região de São Luiz Gonzaga, no Rio Grande do Sul, e de Londrina, no Paraná, encontram-se em áreas ocupadas por floresta; as região de Rondonópolis, no Mato Grosso e Santa Helena de Goiás, no estado de Goiás, encontram-se em áreas com vegetação variando entre cerrado e cerradão (uma formação florestal do bioma cerrado com características esclerófilas) e a região de Barreiras, na Bahia, tem vegetação de cerrado, mas encontra-se no início da transição com a zona das caatingas. Nas regiões de São Luiz Gonzaga, Londrina e Santa Helena de Goiás predomina o solo do tipo latossolo vermelho; em Barreiras latossolo amarelo e em Rondonópolis Podzólico Vermelho Amarelo (IBGE, 2013).

Há certa similaridade climática entre as regiões decorrente das próprias condições exigidas para o cultivo da soja. Porém, algumas diferenças são observadas, como, por exemplo, as regiões de Rondonópolis - MT e Barreiras - BA que apresentam similaridades nas temperaturas máximas, médias e mínimas, mas são diferentes nas variações da insolação, na precipitação anual e altitude, conforme apresentadas nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2:** Temperaturas máximas, mínimas e médias, insolação e precipitação anual para as cidades monitoradas.

| Regiões do Monitoramento | Temperatura (°C) |       |       | Insolação Anual (h) | Precipitação Anual (mm) |
|--------------------------|------------------|-------|-------|---------------------|-------------------------|
|                          | Máx.             | Mín.  | Média |                     |                         |
| São Luiz Gonzaga-RS      | 24-27            | 12-15 | 18-21 | 2100-2400           | 1500-1800               |
| Londrina-PR              | 25-27            | 12-15 | 18-21 | 1800-2100           | 1200-1500               |
| Rondonópolis-MT          | 30-33            | 18-21 | 24-27 | 2100-2400           | 1500-1800               |
| Santa Helena de Goiás-GO | 27-30            | 18-21 | 21-24 | 2100-2400           | 1500-1800               |
| Barreiras-BA             | 30-33            | 18-21 | 24-27 | 2400-2700           | 1200-1500               |

**Fonte:** INMET, 2013.

**Tabela 3:** Dados referentes a longitude, latitude e altitude das cidades monitoradas.

| Regiões do Monitoramento | Coordenadas |             | Altitude (m) |
|--------------------------|-------------|-------------|--------------|
|                          | Longitude   | Latitude    |              |
| São Luiz Gonzaga-RS      | -54°57'39'' | -28°24'30'' | 231          |
| Londrina-PR              | -51°09'46'' | -23°18'37'' | 585          |
| Rondonópolis-MT          | -54°38'08'' | -16°28'15'' | 227          |
| Santa Helena de Goiás-GO | -50°35'49'' | -17°48'49'' | 562          |
| Barreiras-BA             | -44°59'24'' | -12°09'10'' | 452          |

**Fonte:** Apolo11.com, 2013.

### 4.3 Coletas e amostragens

Previamente a aplicação do herbicida, foram coletadas amostras de solo para verificar os atributos físicos para cada região.

As coletas de amostras de solo foram realizadas em duas épocas, sendo a primeira antes da aplicação do herbicida de manejo e a segunda entre a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas após o plantio, ou seja, após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja.

Foram amostradas as parcelas com os tratamentos SRR/HRR (Soja Roundup<sup>®</sup> Ready e herbicida Roundup<sup>®</sup> Ready), SRR/HCV (Soja Roundup<sup>®</sup> Ready e herbicida convencional) e SCV/HCV (soja convencional e herbicida convencional). Vale lembrar que, o Herbicida Roundup<sup>®</sup> Ready está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o uso em soja geneticamente modificada (MAPA, 2013).

Uma amostra de solo consiste em uma pequena porção de terra capaz de representá-lo em uma análise química e física e como esta porção é pequena em relação à quantidade de solo que irá representar, deve-se tomar todo cuidado na retirada dessa amostra. Sendo assim, para que se consiga fazer uma boa amostragem do solo, primeiro é necessário coletar amostras simples, misturá-las até que fiquem bem homogeneizadas, e assim, formar uma amostra composta (SQUIBA *et al.*, 2002).

Foram realizadas coletas de sub-amostras nas três parcelas de tratamentos, apresentando diferenças nos procedimentos de obtenção das amostras compostas. Nos experimentos com tratamento SRR/HRR cada parcela forneceu uma amostra composta. Já nos outros dois experimentos, SRR/HCV e SCV/HCV, primeiramente foram coletadas uma amostra composta por tratamento, e depois uma amostra composta dos dois tratamentos concomitantemente, uma vez que em ambos os tratamentos usou-se herbicida convencional, tendo assim, um perfil semelhante quanto ao resíduo do glifosato.

Foram coletada sub-amostras observando-se um raio de 20 metros de cada um dos cinco pontos demarcados. Cada sub-amostra foi coletada em três profundidades, de 0,0-10,0 cm, 10,0-20,0 cm e 20,0-30,0 cm. De cada profundidade após a devida homogeneização, na parcela com o tratamento SRR/HRR, foi separado 1,0 Kg do solo homogeneizado que constituiu em uma amostra composta por parcela. Já na parcela com os tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV, as sub-amostras coletadas foram todas homogeneizadas e forneceram uma amostra composta por profundidade. Destas foram separados 1,0 quilo do solo homogêneo que foi armazenado como segurança. Em sequência realizou-se uma segunda homogeneização das amostras compostas, obtidas em cada tratamento, para fornecer 1,0 quilo de uma amostra composta única, por profundidade, representativa de ambos os tratamentos. Em todos os tratamento, uma alíquota de 0,5 quilo foi guardada como segurança e outra analisada para a quantificação dos resíduos de Glifosato e AMPA.

As amostras de grãos, foram obtidas de todas as parcelas com os tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV, no mês de fevereiro, quando os grãos se apresentavam em estágio propício à colheita

Em cada parcela do tratamento SRR/HRR foram coletadas 40 plantas aleatoriamente, observando-se um raio de 20 metros de cada um dos 5 (cinco) pontos demarcados. Essas sub-amostras foram trilhadas, homogeneizadas e a massa total de grãos foi reduzida a uma amostra composta de 2,0 quilos, por parcela, seguindo o procedimento de redução por quarteio, ou seja, fazendo dois cortes perpendiculares com uma faca de aço. Uma alíquota de 1,0 quilo foi guardada como segurança e a outra foi analisada visando quantificar os resíduos de Glifosato e AMPA.

Nas parcelas com os tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV foram coletadas também 40 plantas aleatoriamente, observando-se um raio de 20 metros de cada um dos 5 (cinco) pontos demarcados. Da mesma forma, separou-se uma única

amostra composta de 2,0 Kg, para ambos os tratamentos, seguindo o procedimento de redução por quarteio. Uma alíquota de 1,0 Kg foi guardada como segurança e outra analisada.

Para segurança, em cada um dos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV foi coletada uma amostra composta de 1,0 quilo, a qual foi armazenada para ser submetida para análise caso fosse detectado resíduo na amostra composta coletada segundo orientação descrita no parágrafo anterior. E visando evitar contaminação das amostras, para cada amostra coletada foi utilizado um novo material, descartando-se o anterior.

#### **4.4 Número de amostras**

##### 4.4.1 Número de amostras de solo:

###### Parcelas SRR/HRR:

Nos experimentos delineados com seis parcelas, cujo tratamento SRR/HRR utilizou duas parcelas, o número total de amostras coletadas foi de 36, ou seja, duas épocas de coleta, três profundidades por parcela, duas parcelas, totalizando 12 amostras, e nas três regiões, o total de 36 amostras.

Nos experimentos delineados com nove parcelas, cujo tratamento SRR/HRR utilizou três parcelas, o número total de amostras coletadas foi de 36, ou seja, duas épocas de coleta, três profundidades por parcela, três parcelas, totalizando 18 amostras, e nas duas regiões, o total de 36 amostras.

###### Parcelas SRR/HCV e SCV/HCV:

Nos experimentos delineados com seis parcelas, cujos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV utilizou duas parcelas cada, o número total de amostras coletadas foi de 18, resultantes da segunda homogeneização, ou seja, duas épocas de coleta, três profundidades por tratamento, três regiões, totalizando 18 amostras. Neste caso, as amostras provenientes dos dois tratamentos foram

homogeneizadas, resultando em uma amostra composta para ambos os tratamentos, por profundidade.

Nos experimentos delineados com nove parcelas, cujos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV utilizam três parcelas cada, o número total de amostras coletadas foi de 12, resultantes da segunda homogeneização, ou seja, duas épocas de coleta, três profundidades por tratamento, duas regiões, totalizando 12 amostras. Neste caso, as amostras provenientes dos dois tratamentos foram homogeneizadas, resultando em uma amostra composta para ambos os tratamentos, por profundidade. Conforme dados disponíveis na literatura, o Glifosato e o AMPA não são passíveis de lixiviação, logo, primeiramente foram analisadas as amostras coletadas na profundidade de 0,0-10,0 cm. As análises das profundidades de 10-20 e 20-30 só seriam realizadas se fossem encontrados resíduos significativos de Glifosato ou AMPA nas primeiras amostras analisadas. Devido a maior preocupação referente aos resíduos presentes na soja geneticamente modificada, neste caso, independente da quantidade de resíduo encontrado na profundidade de 0,0-10,0 cm, a análise das amostras na profundidade de 10-20 seriam realizadas.

#### 4.4.2 Número de amostras de grãos:

##### Parcelas SRR/HRR:

Nos experimentos delineados com 6 (seis) parcelas, cujo tratamento SRR/HRR utiliza 2 (duas) parcelas, o número total de amostras analisadas foi de 6 (seis), ou seja, 1 (uma) época de coleta, 1 (uma) amostra por parcela, 2 (duas) parcelas, 3 (três) regiões, totalizando 6 (seis) amostras.

Nos experimentos delineados com 9 (nove) parcelas, cujo tratamento SRR/HRR utiliza 3 (três) parcelas, o número total de amostras analisadas foi de 6 (seis), ou seja, 1 (uma) época de coleta, 1 (uma) amostra por parcela, 3 (três) parcelas, 2 (duas) regiões, totalizando 6 (seis) amostras.

#### Parcelas SRR/HCV e SCV/HCV:

Nos experimentos delineados com 6 (seis) parcelas, cujos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV utilizam 2 (duas) parcelas cada, o número total de amostras analisadas foi de 3 (três), ou seja, 1 (uma) época de coleta, 1 (uma) amostra para ambos os tratamentos, 3 (três) regiões, totalizando 3 (três) amostras.

Nos experimentos delineados com 9 (nove) parcelas, cujos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV utilizam 3 (três) parcelas cada, o número total de amostras analisadas foi de 2 (dois), ou seja, 1 (uma) época de coleta, 1 (uma) amostra para ambos os tratamentos, 2 (duas) regiões, totalizando 2 (duas) amostras.

#### Parcelas SRR/HCV e SCV/HCV (Amostras de Segurança):

Nos experimentos delineados com 6 (seis) parcelas, cujos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV utilizam 2 (duas) parcelas cada, foi coletada uma amostra composta de 1,0 quilo, para cada tratamento, a qual foi armazenada, com o total de 6 (seis) amostras, ou seja, 1 (uma) época de coleta, 1 (uma) amostra composta para cada tratamento, 2 (dois) tratamentos, 3 (três) regiões, totalizando 6 (seis) amostras.

Nos experimentos delineados com 9 (nove) parcelas, cujos tratamentos SRR/HCV e SCV/HCV utilizam 3 (três) parcelas cada, foi coletada uma amostra composta de 1,0 quilo, para cada tratamento, a qual foi armazenada, com o total de 4 (quatro) amostras, ou seja, 1 (uma) época de coleta, 1 (uma) amostra composta para cada tratamento, 2 (duas) regiões, 2 (dois) tratamentos, totalizando 4 (quatro) amostras.

No total foram coletadas 17 (dezesete) amostras que foram analisadas e 10 (dez) amostras de segurança que foram coletadas e armazenadas, cuja análise dependia dos resultados das amostras anteriores.

#### **4.5 Acondicionamento e Transporte das Amostras:**

##### Acondicionamento da Amostra Unitária de grãos de soja:

As operações de colheita, trilhagem e quarteio foram realizadas de forma rápida evitando a exposição dos grãos a temperatura ambiente. As plantas abrangidas pela amostragem foram arrancadas manualmente, determinando-se o número de plantas e posteriormente encaminhadas para o processo de trilhagem. As amostras coletadas foram embaladas em sacos plásticos duplos, lacrados, com identificação interna e externa. Logo após a amostragem, as amostras foram colocadas em caixas de isopor com gelo seco.

##### Acondicionamento das Amostras Unitárias de solo:

As operações de coleta foram realizadas de forma rápida evitando-se a exposição das amostras de solo à temperatura ambiente. As amostras compostas foram embaladas em sacos plásticos duplos, lacrados e identificadas interna e externamente. Logo após a amostragem, as amostras foram colocadas em caixas de isopor com gelo seco. Cada alíquota de 0,5 quilo foi embalada separadamente para análise e segurança.

##### Acondicionamento das Amostras para Transporte:

As amostras foram retiradas do gelo seco, acondicionadas em caixas de isopor, com gelo comum, evitando-se qualquer contato da água do gelo e foram entregues no laboratório em um período máximo de 24 horas. Durante todo o transporte as condições foram monitoradas visando manter as amostras congeladas. Todas as coletas e transporte das amostras foram efetuadas conforme os Padrões de Procedimentos Internos pré estabelecidos.

Estudos de estabilidade congelada para o glifosato e AMPA realizado em amostras de milho, soja, palha, tomate, batata e sementes de alfafa demonstraram que os resíduos de glifosato não foram afetados pelo congelamento no período de 2 a 5 anos (MUETH, 2013).

Essas amostras foram analisadas pela Divisão de Análises de Resíduos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, em Campinas, SP, de acordo com as normas estabelecidas. As amostras foram mantidas congeladas a  $-19^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  até a análise para a manutenção da sua integridade.

#### **4.6. Equipamentos e materiais**

- Agitador magnético, Tecnal TE089;
- Balança analítica, Ainsworth;
- Balança semi-analítica, Micronal B6000;
- Balão de fundo redondo de 500 mL;
- Bomba de alto vácuo, Alcatel;
- Centrífuga de alta velocidade, refrigerada, Sorval (Super T21);
- Colunas de vidro com placa sinterizada para cromatografia: 25cm de comprimento X 2.0cm e 32cm de comprimento X 1.0 cm;
- Colunas para HPLC, de troca catiônica em poliestirenodivinilbenzeno Aminex A-9, forma potássica, de 300 mm x 4,6 mm d.i. e 150 mm x 4,6 mm d.i., Bio Rad Laboratories;
- Deionizador, Barnstead;
- Estufa com circulação forçada de ar, Tecnal;
- Evaporadores rotatórios, Buchi;
- Filtros descartáveis para amostras aquosas de 13 mm diam. com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore;

- Funil Analítico;
- Lã de vidro;
- Liquidificador à prova de explosão, Waring;
- Membranas de filtração de 47 mm de diâmetro, 0,45um em nylon ou éster de celulose;
- Moinho de facas, Fanem;
- Peneira com malha de 2 mm;
- pH-metro, Micronal B374;
- Pipeta Pasteur;
- Proveta volumétrica de 10 mL;
- Proveta volumétrica de 100 mL;
- Seringas descartáveis de 3mL, Plastipak;
- Sistema de cromatografia líquida marca Shimadzu com amostrador automático, SIL-10A, Shimadzu; bomba para HPLC, LC-10AD, Shimadzu; forno para coluna cromatográfica, CTO-10A; bombas para reação pós-coluna, Eldex; tubos de aço em espirais para reação: solução oxidante 3.0 m de comprimento X 0.02” d.i. x 1/16” d.e.; solução de O-ftaldialdeído, 3.0 m comprimento X 0.02”d.i. x 1/16”d.e., forno para reação pós-coluna, Shimadzu; detector de fluorescência, RF-535, Shimadzu; processador de dados, Class-LC10, Shimadzu; válvula de 6 vias desviadora de fluxo, Valco.
- Tubos de centrifuga de 250 ml em polipropileno;
- Ultra –som, Branson 2200.

#### 4.6.1. Reativos e reagentes

- Padrão analítico de Glifosato e AMPA da empresa Monsanto, pureza 99,9%;
- Resina de Complexação, Chelex®-100, 100-200 Mesh forma sódica, grau analítico, Bio Rad Laboratories;

- Resina de troca iônica AG1 - X8, 200-400 Mesh, forma cloreto, grau analítico, Bio Rad Laboratories;
- Resina de troca catiônica AG50 - W, 100-200 Mesh, forma hidrogênio, grau analítico, Bio Rad Laboratories;
- Água deionizada;
- Cloreto férrico hexahidratado, grau reagente, 0,1 N, Aldrich;
- Ácido clorídrico concentrado, grau analítico, Carlo Erba e soluções 6N, 0,2N, 0,1N e 0,02N;
- Clorofórmio, para análise de resíduos, Merck;
- Dihidrogênio fosfato de potássio 99,99%, grau HPLC, 0,005 M, Aldrich;
- Dihidrogênio fosfato de potássio, grau analítico, 0,1 M;
- Metanol, grau HPLC, Mallinckrodt;
- Ácido fosfórico 85%, grau analítico, Merck;
- Hipoclorito de cálcio, 65% de cloro disponível, Synth;
- Cloreto de sódio, grau analítico, Carlo Erba;
- 2-Mercaptoetanol, grau reagente, Merck;
- Hidróxido de amônio 25%, grau analítico, Merck;
- Hidróxido de potássio, grau analítico, Mallinckrodt;
- Hidróxido de sódio, grau analítico, 0,04%, VWR Scientific;
- 1,2- dicarboxaldeído ftálico, grau analítico, Acros;
- Ácido bórico, grau analítico, 0,4 M, Merck.

O Glifosato e o AMPA são isolados das demais matrizes com solução aquosa e os extratos são limpos por complexação em resina quelante na forma férrica, seguida de eluição dos compostos com ácido clorídrico e eliminação do ferro em resina de troca aniônica.

### **1) Preparo da resina AG1 - X8**

Lavou-se 500g da resina AG1-X8 três vezes com 1L de água deionizada e armazenou-se em frasco com tampa, em água deionizada, até ser utilizada.

### **2) Preparo da resina complexante na forma férrica**

Preparou-se 1 L de uma solução Cloreto Férrico 0,1 N / HCl 6 N em água deionizada. Após hidratação da resina Chelex-100 com 1 L de água deionizada, sob agitação magnética, foram acrescentados 25 mL de HCl 6 N e 500 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,1 N, respectivamente.

Manteve-se a agitação por 10 minutos até a sedimentação da resina. Após a sedimentação, a fase aquosa foi decantada, a resina foi lavada com 1 L de água deionizada, e decantada a água de lavagem.

Adicionou-se mais duas vezes 250 mL da solução 0,1N de FeCl<sub>3</sub> e 1 L de água deionizada. Após agitação de 10 minutos, a fase aquosa foi decantada, a resina foi lavada com água deionizada novamente e transferida para uma coluna cromatográfica de vidro de 10 cm de diâmetro. Esta foi lavada com 2 L de HCl 0,02 N. Ao final, a resina foi transferida para um frasco âmbar e armazenada em água deionizada até ser utilizada.

### **3) Soluções de NH<sub>4</sub>OH 0,25 M / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M em água deionizada**

Uma quantia de 13,6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foi pesado e solubilizado em água deionizada, transferida para um balão volumétrico de 1 L, acrescentada de 18,7 mL de NH<sub>4</sub>OH e completado o volume com água deionizada.

#### **4) Soluções padrão de Glifosato e ácido aminometilfosfônico para HPLC e fortificações.**

Foram preparadas soluções padrões de AMPA e glifosato na concentração de 1mg/mL em água deionizada. A partir desta solução, diluições seriadas foram realizadas para fortificar amostras posteriormente e para fazer a curva de calibração.

#### **5) Fase móvel para HPLC**

A fase móvel utilizada foi diidrogênio fosfato de potássio 0,005 M / Metanol 4%. O pH da solução foi ajustado para 2,1 com ácido fosfórico concentrado. Esta solução foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e desgaseificada sob vácuo.

#### **6) Solução oxidante de hipoclorito de cálcio**

Esta solução oxidante foi composta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,136%, NaCl 1,16%, NaOH 0,04% e  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  0,002% diluídos em água deionizada e filtrada em membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **7) Solução de Ácido Bórico 0,4 M**

Dissolveu-se 25 g de ácido bórico em 950 mL de água deionizada em um becker de 1 L usando agitação magnética. O pH foi ajustado para  $10,40 \pm 0,02$  usando solução de hidróxido de potássio 45%. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, completado o volume com água deionizada, e filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de nylon ou éster de celulose.

## 8) Solução de o-ftaldialdeído (OPA)

Em um balão volumétrico de 1 L colocou-se cerca de 700 mL da solução de ácido bórico preparada no item anterior. Foi adicionado 10 mL de solução de OPA preparada dissolvendo-se 800 mg de 1,2-dicarboxaldeído ftálico (o-ftaldialdeído) em metanol, em um balão volumétrico âmbar de 10 mL, agitando lentamente em temperatura ambiente. Foi ainda adicionado 2 mL de 2-mercaptoetanol, completando o volume do balão com ácido bórico 0,4 M, e submetendo a solução a leve agitação. A solução foi transferida para um frasco âmbar com tampa. Foi aplicada uma corrente de N<sub>2</sub> nos frascos com a solução e no frasco de 2-mercaptoetanol, e estes foram imediatamente bem vedados.

### 4.7. Procedimentos Analíticos

#### 4.7.1. Preparo e extração das amostras de solo:

O solo amostrado foi colocado em bandejas de aço inox e secado em estufa com ar forçado a 40°C por 48 h. Após a secagem, a amostra foi homogeneizada num almofariz e peneirada em peneira de 2 mm.

Foram pesados 20g de solo homogêneo diretamente em tubos de centrífuga de 250 mL com tampa rosqueável, onde foi acrescentado 80 mL de uma solução NH<sub>4</sub>OH 0,25 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M. Os frascos foram agitados horizontalmente, em agitador durante 90 min. Os pesos dos tubos foram centrifugados por 20 min a 2.800 G. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga. Foi realizada uma segunda extração do resíduo sólido com 80 mL da solução de NH<sub>4</sub>OH 0,25 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M.

O pH do sobrenadante foi ajustado para 2 com ácido clorídrico 6 N, os frascos foram centrifugados por 10 min a 700 G. O sobrenadante foi diretamente transferido para um balão de fundo redondo de 500 mL, com o auxílio de um funil analítico contendo lã de vidro.

O sobrenadante da 2ª extração foi transferido para outro tubo de centrífuga, seguindo o procedimento acima descrito. Ambos os extratos podem ser combinados caso a quantidade de cátions extraídos não saturarem a resina, que pode ser previamente verificada com um padrão de Glifosato e AMPA adicionados a um extrato de solo. Caso contrário, devem ser tratados separadamente.

O extrato de solo foi reduzido para um volume inferior a 5 mL sob vácuo e temperatura a 60°C. Nos casos de formação intensa de espuma, que dificulta o processo de evaporação, foram adicionadas algumas gotas (3 gotas) de antiespumante.

O extrato reduzido foi transferido com a ajuda de uma pipeta Pasteur, lavando bem o balão com HCl 0,01M, mas sem exceder muito o volume, para um tubo de centrífuga de 50 mL. Nesta etapa, o volume de 10 mL não foi ultrapassado.

#### 4.7.2. Preparo e extração das amostras de soja:

As amostras foram homogeneizadas em um moinho, com gelo seco, na proporção de 2:1, e foram posteriormente armazenadas em câmara fria em recipiente aberto para eliminação do dióxido de carbono. Os frascos foram lacrados e mantidos a temperatura de -20°C até a análise.

Alíquotas de 20g da amostra foram adicionadas em um liquidificador de 1 L de capacidade, seguidos de 50 ml de clorofórmio e 150 ml de HCl 0,1 N e homogeneizadas por um minuto.

O conteúdo do liquidificador foi transferido para frascos de centrífuga de 250 mL. Os pesos dos frascos da centrífuga foram equilibrados com clorofórmio e centrifugados a 7.150 G por 20 minutos. Foram decantados 120 mL da fase aquosa. O pH do sobrenadante foi ajustado para 4,0 com solução de

hidróxido de sódio 0,04%, e os extratos foram novamente centrifugados nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi transferido quantitativamente para um becker de 600 mL e o volume completado para 400 mL com água deionizada. As amostras assim tratadas foram aplicadas em colunas contendo Chelex®-Fe(III).

### **Cromatografia em resina AG 50-W (solo)**

Foram colocados 0,5 – 1 cm de lã de vidro sobre a placa sinterizada de uma coluna de  $2,0 \pm 0,1$  cm de diâmetro e 30 cm de comprimento. Foram pesados 50,0 g de resina AG-50W em becker e adicionados HCl 0,01 M para formar uma pasta. Sem deixar secar, esta resina foi introduzida na coluna e condicionada com mais 200 mL de solução de HCl 0,01 M a um fluxo de  $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . 5 mL do extrato de solo foram transferidos para a coluna AG 50-W.

Visando evitar perdas do Glifosato por saturação da coluna, nesta etapa foi aplicada uma alíquota de 5 mL do extrato. O fluxo utilizado em todas as etapas foi de  $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A coluna foi lavada com 9 porções de 5 mL de HCl 0,01 M (total 45 ml) desprezando o eluato. A amostra eluída foi recolhida num balão de fundo redondo de 500 mL com 5 porções de 55 mL de HCl 0,01 M (total 275 mL).

O eluato foi evaporado até a secura em evaporador rotatório a vácuo com banho mantido a  $60^\circ\text{C}$ . O resíduo de Glifosato e AMPA foram ressuspensos em fase móvel, e transferido para um balão volumétrico de 5 mL. A solução foi filtrada em filtro de  $0,45 \mu\text{m}$  e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência com reação pós-coluna em detector de fluorescência (HPLC/PCR Fluorescência).

### **Cromatografia em resina Chelex® (soja)**

Em uma proveta foram medidas 15 mL de resina Chelex - Fe(III) que posteriormente foram transferidas para as colunas de vidro com placas sinterizadas de 2 cm diâmetro x 25 cm de comprimento, previamente preenchidas com água deionizada. As amostras foram transferidas para as colunas e eluídas a uma velocidade de 6 mL min<sup>-1</sup>. As colunas foram condicionadas com 100 mL de HCl 0,2 N, sendo descartados todos os volumes até então eluídos. O Glifosato e o AMPA foram eluídos com alíquotas de 3 mL de HCl 6 N e 4 mL de HCl 6 N, respectivamente, descartando-se esses volumes de eluição. Em provetas de 50 mL, foram coletados os eluatos com 5 porções de 5 mL de HCl 6 N e adicionados de 10 mL de HCl concentrado.

### **Cromatografia em resina de troca iônica AG1-X8 (soja)**

As colunas foram vedadas com lã de vidro, com placas sinterizadas de 1,0 cm x 32 cm de comprimento. Adicionou-se 8 mL de água deionizada e 8 cm de resina AG1-X8.

As resinas foram lavadas com três porções de 5 mL de HCl 6 N e as amostras foram ali aplicadas, sendo que os eluatos foram coletados em balões de 125 mL, mantendo as torneiras totalmente abertas. As provetas das amostras foram lavadas com 2 mL de HCl 6 N e aplicadas nas colunas. Foram adicionados 8 mL de HCl 6 N.

As amostras foram concentradas até a secura sob vácuo em evaporador rotatório, à temperatura de 60 °C. O resíduo foi ressuspensão em 2,0 mL de fase móvel, filtrado em membrana de 0,45 µm, e analisado por HPLC com reação pós coluna em detector de fluorescência (ABARKELY & FAY, 2003; ARAÚJO *et. al.*, 2001).

#### 4.7.2.1 Determinação de Glifosato e AMPA por HPLC e Reação Pós-coluna com OPA-MERC.

O Glifosato e AMPA podem ser separados por cromatografia de troca iônica e quantificados por fluorescência após reação com o-ftalaldeído e mercaptoetanol. Condições Cromatográficas:

- Temperatura das colunas: 50 °C;
- Temperatura da espiral de reação com oxidante: 38 °C;
- Fluxo da fase móvel: 0,7 mL min<sup>-1</sup>;
- Fluxo da solução oxidante: 0,2 mL min<sup>-1</sup>;
- Fluxo da solução de OPA: 0,4 mL min<sup>-1</sup>;
- Volume injetado: 100 µL;
- Detector: comprimento de onda excitação: 350 nm  
comprimento de onda emissão: 440 nm

Nessas condições cromatográficas o tempo de retenção dos compostos é de cerca de 20 minutos para o Glifosato e de 40 minutos para o AMPA.

#### 4.7.2.2 Quantificação do glifosato e AMPA

Os dados de resíduos foram calculados por regressão linear de curvas de calibração obtidas com soluções de padrão de Glifosato e AMPA versus a resposta em altura de pico obtida no cromatógrafo. Para o intervalo de concentrações (0,01; 0,10; 0,30; 1,00 e 10,00 µg/mL) a resposta do equipamento é linear obedecendo a equação  $y = b + mx$ .

Esta regressão linear é a integral da curva, ou seja, uma reta. A equação da curva vem da integral, a área abaixo da reta (entre a reta e o eixo x), assim, com essa equação é possível estabelecer os valores para um determinado ponto descrito para as concentrações indicadas.

As constantes **b** (interseção) e **m** (coeficiente de regressão) podem ser encontradas através da regressão linear no intervalo observado.

O **x** é a concentração em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do composto injetado em parâmetros constantes do HPLC e **y** é a resposta do cromatógrafo.

As curvas foram construídas com pelo menos cinco pontos, sendo o **x** a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  e **y** o eixo referente à altura do pico na unidade.

A quantidade, em  $\text{mg kg}^{-1}$ , do Glifosato e AMPA nas amostras foi então calculada da seguinte forma:

$$\text{mg kg}^{-1} \text{ encontrado} = \frac{(\underline{x}) \cdot (\underline{\text{vol.f}})}{(\text{f.a.})}$$

$$\text{onde: } x = \frac{y - b}{M}$$

vol.f. = volume final no qual foram dissolvidas as amostras antes da análise cromatográfica (mL).

f.a. = fator da amostra, refere-se à massa de matriz correspondente à alíquota de extrato utilizado para a análise.

$$\text{f.a.} = \frac{(\underline{\text{volume da alíquota de extrato, mL}}) \cdot (\text{p.a.})}{(\text{volume do extrato, mL})}$$

p.a. = massa da amostra de matriz utilizada para análise, em grama.

O desempenho de um método de análise de resíduos é normalmente caracterizado entre outros parâmetros, pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) (CURRIE, 1995). O LD é definido como a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser confiavelmente distinguida com um grau de significância pré-estabelecido (normalmente 95%) do sinal ruído num sistema de detecção. Já o LQ é definido como a menor concentração ou quantidade de um analito numa amostra que pode ser quantitativamente

determinada com um grau de certeza aceitável quando se aplica um determinado procedimento analítico. Assim, concentrações de um analito inferiores a esse valor carecem de precisão e exatidão aceitáveis (AMARANTES *et al.*, 2003).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados da validação do método para solo e grãos de soja

O método descrito, previamente validado por Cowell, *et al.*, 1986, foi revalidado com amostras de soja fortificadas e de solo de acordo com o procedimento descrito no *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis* (THOMPSON *et al.*, 2002).

Resumidamente, o procedimento analítico para determinação de resíduos de Glifosato e AMPA no solo baseou-se na extração dos dois compostos com solução aquosa básica e limpeza de extratos em resina de troca catiônica. Após concentração a vácuo dos extratos obtidos, as amostras foram analisadas por cromatografia de troca catiônica e um cromatógrafo líquido equipado com um sistema de reação pós-coluna com o-ftaldialdeído e detector de fluorescência.

Dentro desse contexto, foram estabelecidos para o sistema analítico, os limites de detecção, a linearidade de resposta para a faixa de concentração de interesse, como também foram estabelecidos os limites de quantificação para soja, as recuperações analíticas e os resultados. Esses resultados indicam que o método preenche os critérios de aceitação para a determinação de resíduos de Glifosato e AMPA em solo e soja.

As recuperações analíticas para soja foram efetuadas para concentrações na faixa de 0,05 a 20 mg kg<sup>-1</sup>. O método para solo foi validado para o intervalo de concentração de 0,05 - 1 mg kg<sup>-1</sup>. O desvio padrão observado foi em decorrência das pequenas variações nos parâmetros do cromatógrafo (Tabela 4). O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (AMARANTES *et al.*, 2003).

Tanto o Glifosato quanto o AMPA podem ser detectados em concentrações de 0,010  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . A resposta do HPLC foi linear na faixa de concentração de 0,01-10,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  com um coeficiente de correlação de 0,9999.

O limite de quantificação do método para tanto para o solo quanto para o grão de soja é de 0,05  $\text{mg kg}^{-1}$ .

**Tabela 4 - Recuperação média de Glifosato e AMPA**

| Matriz       | Nível de fortificação*<br>( $\text{mg kg}^{-1}$ ) | Recuperação**<br>Média(%) |         |
|--------------|---|---------------------------|---------|
|              |   | Glifosato                 | AMPA    |
| Solo         | 0,05  | 65 ± 6                    | 68 ± 5  |
|              | 0,10  | 83 ± 11                   | 104 ± 2 |
|              | 1,0   | 80 ± 6                    | 84 ± 5  |
| Grão de Soja | 0,05  | 84±7                      | -       |
|              | 0,2   | 91±7                      | 90±9    |
|              | 0,5   | 89±4                      | 93±10   |
|              | 1,0   | 83±2                      | 132±2   |
|              | 2,0   | 89±1                      | 85±4    |
|              | 5,0   | 77±5                      | 91±15   |
|              | 10,0  | 78±4                      | 84±1    |
|              | 20,0  | 76±5                      | 78±8    |

\*Concentração em que o analito é adicionado na amostra controle.

\*\* n = 2 a 6 determinações

## 5.2 Resíduo de Glifosato e AMPA em amostras de solo

Os resultados das coletas de amostras realizadas entre a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas após o plantio, após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja, são apresentados, a seguir.

O desempenho do método foi avaliado com o teste de recuperação do Glifosato e AMPA concomitantemente com cada grupo de análises efetuadas. Para essa análise foi utilizado o solo coletado na profundidade de 10 a 20 cm e fortificado com 1,0 mg/kg de Glifosato e AMPA. Foi obtida uma recuperação média de  $86 \pm 8\%$  para o Glifosato e  $84 \pm 8$  para o AMPA. O limite de quantificação (LQ) do método analítico para o solo foi de 0,05 mg/kg

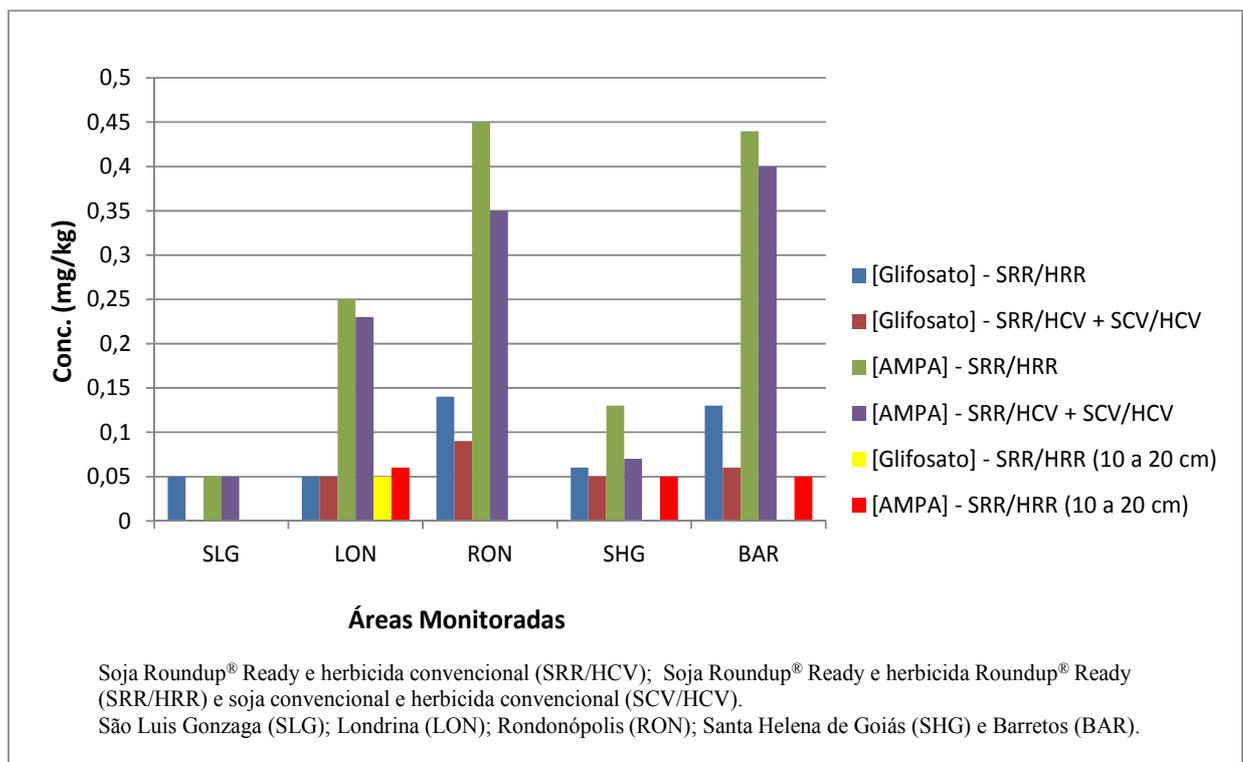
As concentrações de Glifosato e de AMPA foram calculadas por interpolação da resposta, em altura de pico, obtidas no cromatograma nas curvas de calibração construídas com soluções padrões de Glifosato e AMPA, com pureza de 99,8 e 99,5% respectivamente.

A figura 6 ilustra os resultados obtidos dos resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg), no solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da primeira coleta de dados. Na profundidade de 0 a 10 cm, as concentrações mais elevadas de Glifosato e AMPA foram encontradas nas áreas de Barreiras e Rondonópolis, comparando com as demais localidades, sendo que as concentrações de AMPA foram maiores que a de Glifosato em todos os tratamentos, com exceção da área de São Luis Gonzaga. Tais variações podem estar associadas às condições ambientais das diversas áreas, como por exemplo, a temperatura, uma vez que as áreas de Rondonópolis e Barreiras apresentaram as temperaturas máximas mais elevadas que as demais.

A tabela 5 apresenta as aplicações de Glifosato nestas áreas da primeira coleta de dados, mostrando que mesmo nos locais com duas aplicações ou até mesmo com o dobro da dose, o uso deste praguicida ainda assim é seguro, comprovado pelos baixos níveis de resíduos encontrados. As concentrações de Glifosato e AMPA no tratamento SRR/HRR na profundidade de 10 a 20 cm, na maioria dos casos encontravam-se abaixo do LQ, sendo que a concentração de Glifosato em Londrina e de AMPA nas áreas de Santa Helena de Goiás e

Barreiras estavam abaixo do limite de quantificação (0,05 mg/Kg), detectando com veracidade apenas a concentração de 0,06 mg/kg de AMPA na região de Londrina. A dificuldade na detecção e quantificação pode ter ocorrido por ter menos resíduo do produto no solo na profundidade de 10 a 20 cm.

Esses dados demonstram a baixa exposição ao produto, ou seja, mesmo com a interferência de diferentes temperaturas, altitude e precipitação entre as cinco regiões, as concentrações permanecem baixas.



**Figura 6** . Resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da 1ª coleta da dados.

**Tabela 5.** Aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV da 1ª coleta de dados.

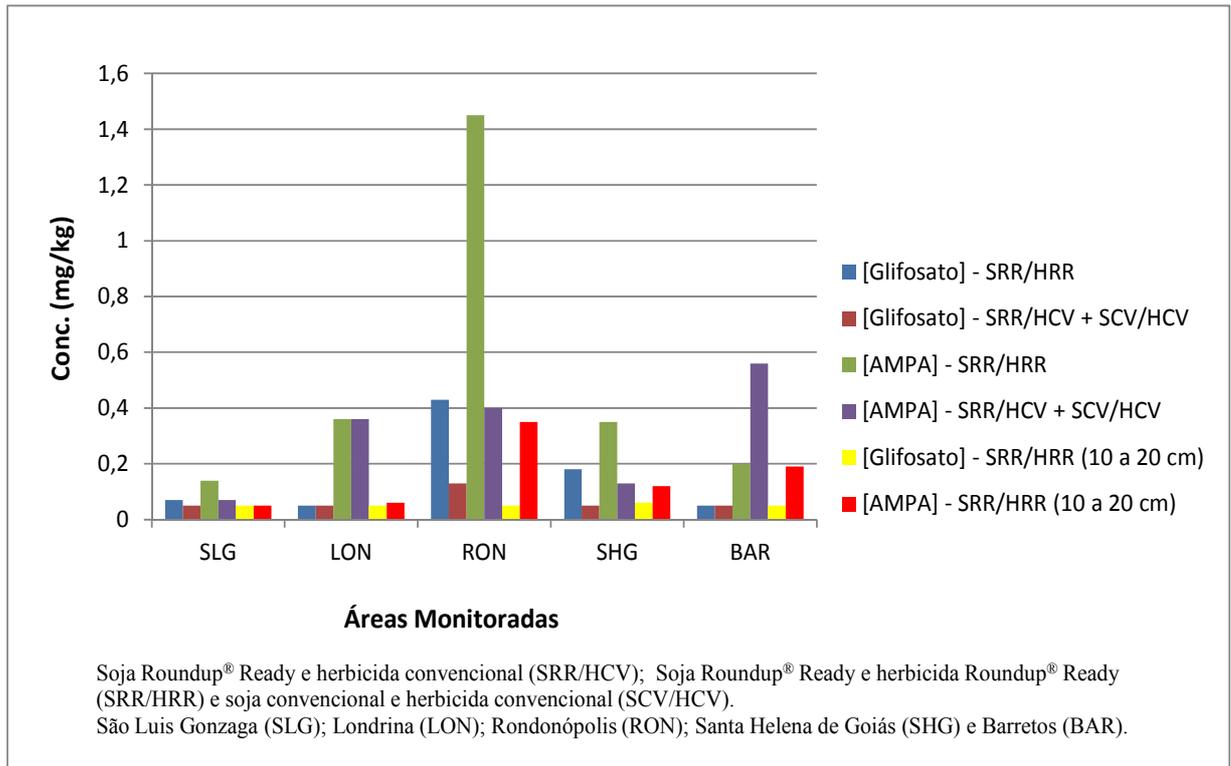
| Áreas Monitoradas | Aplicações em pré-plantio<br>Tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV |                                |                       |     | Aplicações em pós-emergência da soja<br>Exclusivo do Tratamento SRR/HRR |                                |                                      |     |
|-------------------|---|--------------------------------|-----------------------|-----|---|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
|                   | Nº de aplicações  | Dose (g e.a ha <sup>-1</sup> ) | Cobertura do mato (%) | DAC | Nº de aplicações  | Dose (g e.a ha <sup>-1</sup> ) | Idade da soja (dias após emergência) | DAC |
| SLG               | 1   | 864                            | 3                     | 87  | 1   | 1.200                          | 31                                   | 42  |
| LON               | 1   | 1.440                          | 40                    | 90  | 1   | 1.200                          | 24                                   | 55  |
| RON               | 1   | 936                            | 20 a 40               | 75  | 1   | 960                            | 27                                   | 39  |
| SHG               | 1   | 750                            | 90                    | 75  | 2   | 720 e 720                      | 17 e 38                              | 31  |
| BAR               | 1   | 1.102                          | 5 a 10                | 87  | 1   | 960                            | 20                                   | 59  |

DAC=Dias antes da coleta = Período entre a última aplicação de Glifosato em pré-plantio ou em pós-emergência e a coleta de amostras entre a 10ª e 12ª semanas após o plantio da soja.

A figura 7 ilustra os resultados de resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da segunda coleta de dados. Os resultados na profundidade de 0 a 10 cm indicam que a concentração de AMPA no tratamento SRR/HRR na região de Rondonópolis está mais alta que nas demais áreas e que os resultados anteriormente citados.

As concentrações encontradas de AMPA foram maiores que as do Glifosato em todas as áreas monitoradas, mantendo-se elevadas nas regiões de Rondonópolis e Barreiras, mesmo na profundidade de 10 a 20 cm, indicando que o AMPA é mais persistente que o Glifosato e que mesmo em profundidades maiores e quem sabe pelo contínuo uso dos produtos, pode-se encontrar resíduos do metabólito, de qualquer forma, ainda assim, abaixo do limite estabelecido para o Glifosato.

A tabela 6 apresenta as aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV desta coleta de dados.

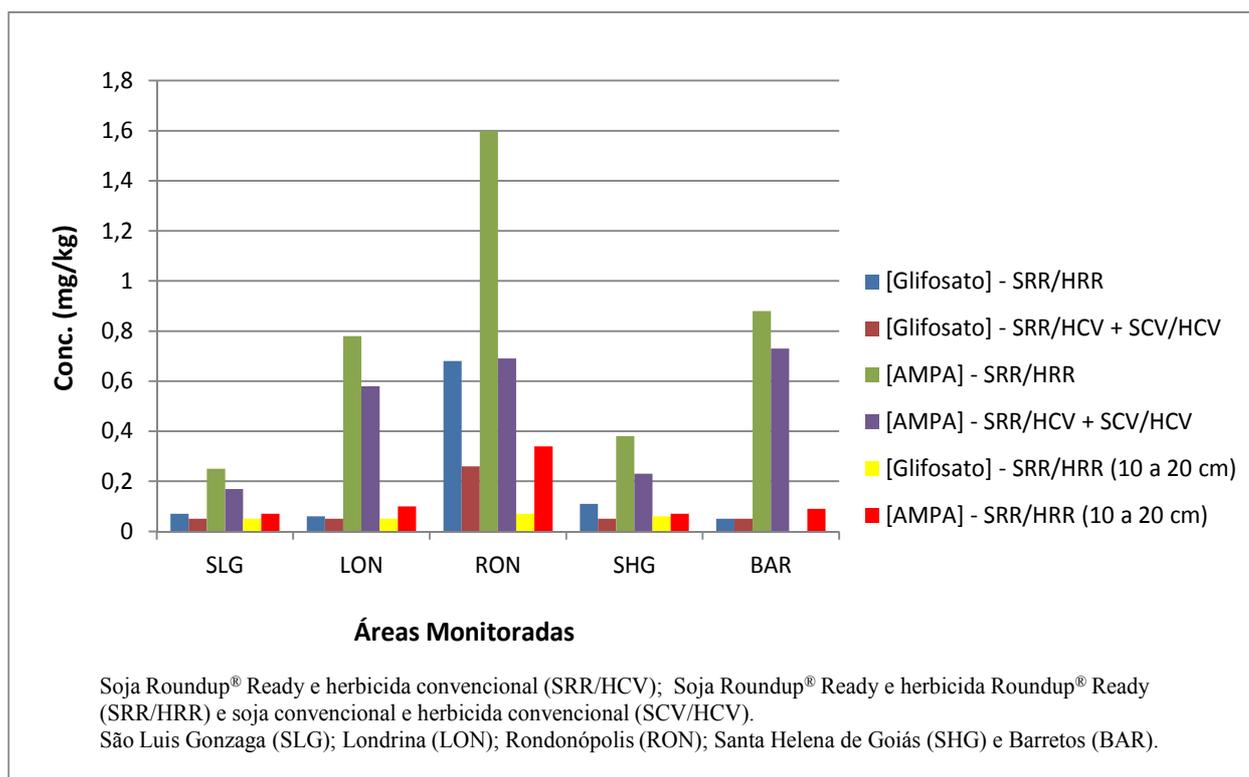


**Figura 7.** Resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da 2ª coleta de dados.

A figura 8 ilustra os resultados obtidos dos resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da terceira coleta de dados. A Tabela 7 apresenta as aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV de tal coleta.

**Tabela 6.** Aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV da 2ª coleta de dados.

| Áreas | Aplicações em pré-plantio<br>Tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e<br>SCV/HCV |                                |                       |     | Aplicações em pós-emergência da soja<br>Exclusivo do Tratamento SRR/HRR |                                |                                      |     |
|-------|--|--------------------------------|-----------------------|-----|---|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
|       | Nº de aplicações   | Dose (g e.a ha <sup>-1</sup> ) | Cobertura do mato (%) | DAC | Nº de aplicações  | Dose (g e.a ha <sup>-1</sup> ) | Idade da soja (dias após emergência) | DAC |
| SLG   | 1  | 650                            | 10                    | 82  | 2   | 576 e 576                      | 17 e 36                              | 25  |
| LON   | 1  | 1195                           | 20                    | 102 | 1   | 1.200                          | 42                                   | 44  |
| RON   | 1  | 849                            | 85                    | 75  | 1   | 975                            | 25                                   | 39  |
| SHG   | 1  | 975                            | 1                     | 77  | 1   | 975                            | 27                                   | 43  |
| BAR   | 1  | 1440                           | 90                    | 107 | 1   | 1300                           | 28                                   | 67  |



**Figura 8.** Resíduos de Glifosato e seu metabólito AMPA (mg/kg) no solo nas profundidades de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja nas áreas de monitoramento da 3ª coleta de dados.

Na figura 8 podemos observar que a região de Rondonópolis apresentou concentrações de Glifosato no tratamento SRR/HRR maiores que os demais tratamentos e áreas, mantendo concentrações de AMPA maiores em todos os casos quando comparados com as concentrações de Glifosato, tanto na profundidade de 0-10 cm quanto 10-20 cm.

Nas profundidade de 0-10 cm, as concentrações encontradas de Glifosato no tratamento com soja RR e herbicida RR foram maiores que os demais tratamentos, em todas as análises. Quanto ao AMPA, apresentou concentrações maiores em todas as amostras de solo quando comparadas com as concentrações de Glifosato.

**Tabela 7.** Aplicações de Glifosato nas áreas de monitoramento em função dos tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e SCV/HCV da 3ª coleta de dados.

| Áreas | Aplicações em pré-plantio<br>Tratamentos SRR/HRR, SRR/HCV e<br>SCV/HCV |                                |                       |     | Aplicações em pós-emergência da soja<br>Exclusivo do Tratamento SRR/HRR |                                |                                      |     |
|-------|--|--------------------------------|-----------------------|-----|---|--------------------------------|--------------------------------------|-----|
|       | Nº de aplicações   | Dose (g e.a ha <sup>-1</sup> ) | Cobertura do mato (%) | DAC | Nº de aplicações  | Dose (g e.a ha <sup>-1</sup> ) | Idade da soja (dias após emergência) | DAC |
| SLG   | 1  | 650                            | 2                     | 83  | 1   | 1625                           | NI                                   | 48  |
| LON   | 2  | 1188 e<br>594                  | 30                    | 95  | 1   | 1200                           | 32                                   | 56  |
| RON   | 1  | 1080                           | NI                    | 81  | 1   | 975                            | 51                                   | 51  |
| SHG   | 1  | 1440                           | 10                    | 96  | 1   | 1300                           | 52                                   | 52  |
| BAR   | 1  | 1440                           | 90                    | 90  | 1   | 845                            | 54                                   | 54  |

Nos resultados obtidos na profundidade de 10-20 cm após a aplicação de herbicidas em pré-plantio e em pós-emergência da soja, ainda é possível encontrar resíduos de Glifosato em algumas áreas e de AMPA em praticamente todas as áreas monitoradas, tendo concentrações maiores com o passar do tempo. De qualquer forma, todos os resultados encontram-se abaixo do limite máximo de resíduo permitido.

Enfim, os resultados asseguram uma rápida dissipação do Glifosato, e a quantidade restante provavelmente permanece adsorvida no solo. O processo de transformação do Glifosato em AMPA é um fator importante de contribuição para a dissipação do herbicida Glifosato, motivo pelo qual as concentrações de AMPA são maiores que de Glifosato.

### **5.3 Resíduo de Glifosato e AMPA em grãos de soja**

O desempenho do método foi avaliado com teste de recuperação de Glifosato e AMPA concomitantemente com cada grupo de análises efetuadas. Para esse acompanhamento foram utilizados grãos de soja de um dos tratamentos (soja RR/herbicida convencional + soja convencional/herbicida convencional), que foram fortificados com 1,0 mg/kg de Glifosato e AMPA. O limite de quantificação do método analítico para grãos de soja foi de 0,05 mg/Kg. As concentrações de Glifosato e de AMPA foram calculadas interpolando as respostas, em altura de pico, obtidas nos cromatogramas dos extratos das amostras em curvas de calibração obtidas com soluções dos padrões de Glifosato e AMPA, com pureza de 99,8 e 99,5 %, respectivamente.

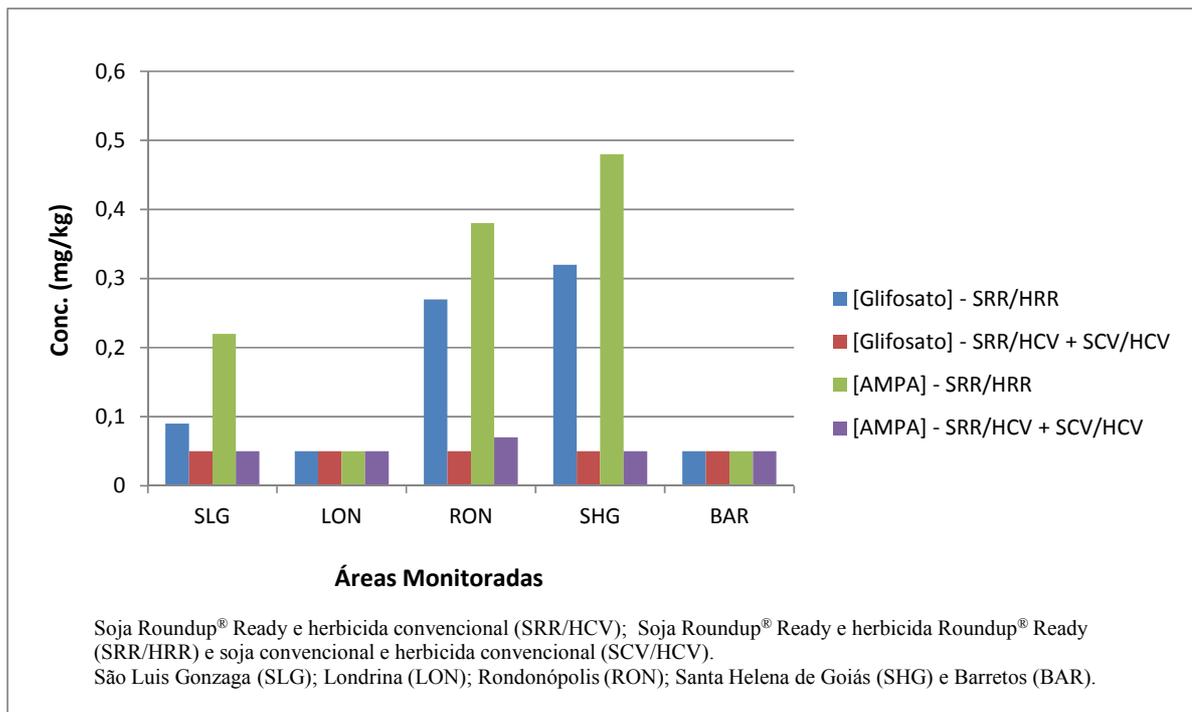
Os LMRs são estabelecidos com base em dados sobre os níveis dos resíduos que resultam do uso de praguicidas de acordo com as Boas Práticas Agrícolas e de informações sobre a sua natureza. Esses resíduos dependem de dois fatores: da deposição inicial do praguicida e da velocidade de desaparecimento do mesmo e de seus metabólitos.

As coletas de amostras das áreas de monitoramento usadas para avaliar os resíduos de Glifosato e AMPA em grãos de soja foram realizadas entre fevereiro e abril de cada ano, quando os grãos se apresentavam em estágio propício à colheita.

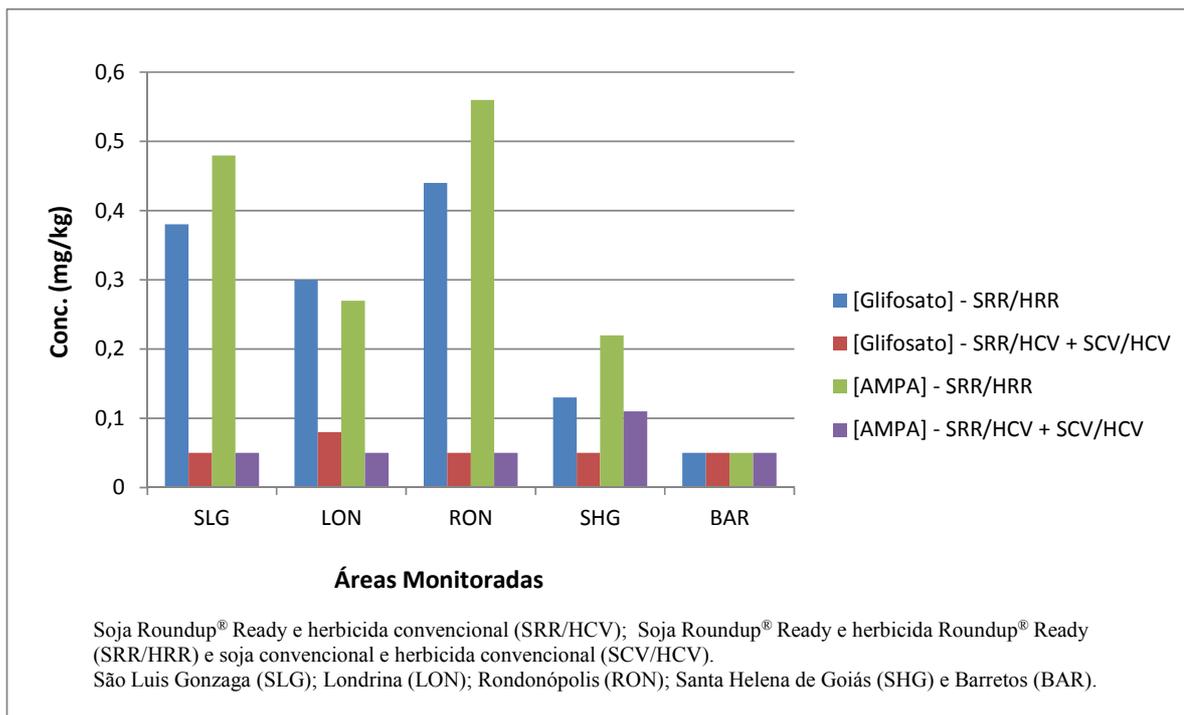
As figuras 9, 10 e 11 ilustram, respectivamente, os resultados obtidos nas

análises de resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja nas três coletas.

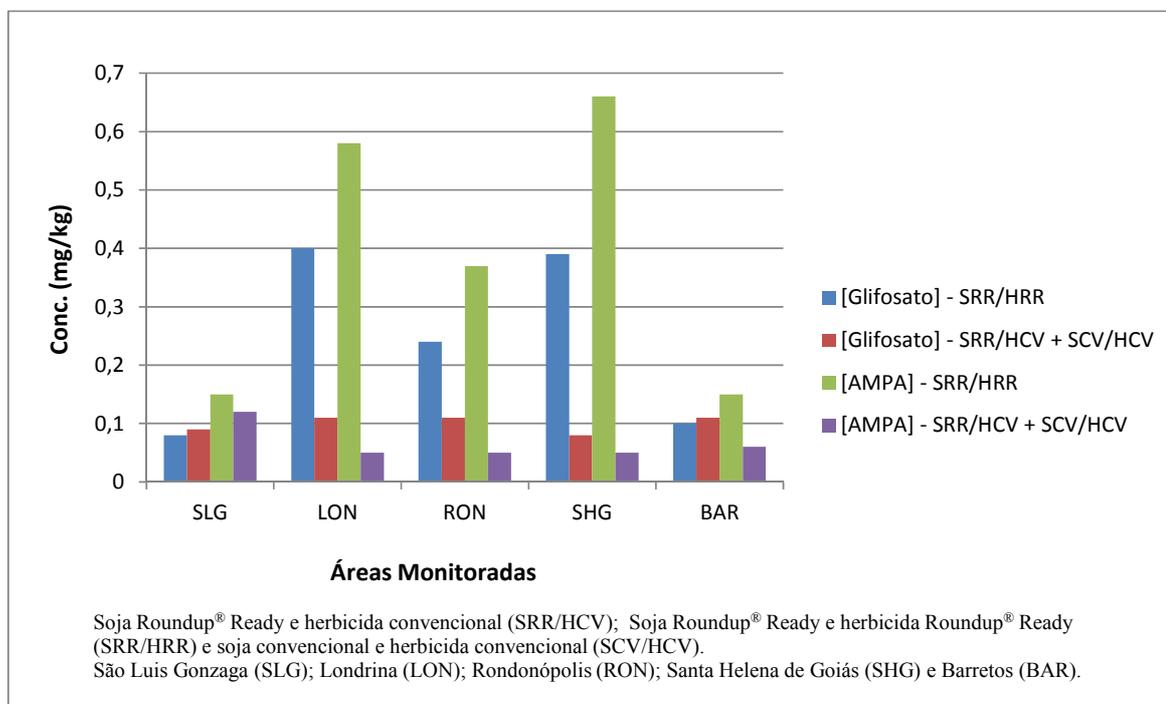
Em todas as coletas tanto as concentrações de Glifosato quanto de AMPA foram maiores no tratamento com soja RR e Herbicida RR, sobressaindo-se dos demais resultados. De qualquer forma, os resultados indicam que os resíduos detectados, tanto para o Glifosato quanto ao AMPA encontram-se em concentrações inferiores as preconizadas como Limite Máximo de Resíduo (LMR) legalmente permitido ou reconhecido como aceitável para a soja, 10,0 mg/Kg.



**Figura 9.** Resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja da 1ª coleta da dados.



**Figura 10.** Resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja da 2ª coleta da dados.



**Figura 11.** Resíduos de Glifosato e do seu metabólito AMPA (mg/kg) em grãos de soja da 3ª coleta da dados.

## 6. DISCUSSÃO

O Glifosato apresenta baixa toxicidade para a saúde humana e ao meio ambiente quando comparado com outros praguicidas. De acordo com os princípios elaborados por Paracelso, pai da Toxicologia, se não houver exposição à substância, mesmo tóxica, não constituirá risco, apesar do seu potencial de periculosidade inerente. Um indivíduo em contato diário está mais exposto do que indivíduos de ambientes urbanos, estando assim, mais propício ao risco de eventual intoxicação, dependendo é claro, dos equipamentos de proteção individual utilizados, modo de aplicação, frequência de exposição a uma mesma substância, cuidados básicos necessários para preservar a integridade da saúde e a interação da dose e substância com o organismo.

É possível encontrar na literatura os valores de ingestão diária aceitável permitida e limite máximo permitido para diversos praguicidas, porém, quanto ao limite máximo de resíduo deste praguicida no solo, não encontramos nada estabelecido pelas agências regulamentadoras, apenas os dados anteriormente citados pelo INCHEM. Além do mais, na monografia brasileira do ingrediente ativo não consta os limites máximos de resíduos para o AMPA, o principal metabólito do Glifosato. Sendo assim, no presente trabalho, foram usados como referência, os limites de Glifosato permitidos para a cultura da soja, cultura escolhida para avaliação devido à sua produção em grande escala no Brasil, para assim, usarmos como parâmetro para avaliar o comportamento do AMPA tanto em solo como nos grãos de soja.

Até o momento não foi identificado se seria necessário estabelecer limites para o AMPA, uma vez que a literatura destaca a semelhança de suas características com o Glifosato. Por outro lado, existem controvérsias de que o AMPA seja mais persistente que o Glifosato e que tenha sido encontrado em níveis mais elevados tanto nas amostras de solo como nos grãos. De qualquer

forma, vale lembrar que todas as concentrações estão dentro dos limites permitidos para a cultura analisada.

De acordo com o relatório da FAO, “*Pesticides residues in food*” (1997), o AMPA possui uma estrutura química muito semelhante a do glifosato e não tem uso comercial. Apesar de no passado o AMPA ter sido omitido da definição de resíduo quanto à recomendação para o LMR, após o aparecimento das culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, este metabólito mostrou ser o principal resíduo encontrado em concentrações superiores as do glifosato. Diante disso, o AMPA foi avaliado quanto a sua toxicidade e determinou-se uma  $DL_{50}$  de 8300 mg/kg, NOAEL de 400 mg/kg de peso corporal por dia e ingestão diária aceitável para os seres humanos considerando a soma de glifosato e AMPA entre 0-0,3 mg/kg. Uma vez que o AMPA não induz irritação dérmica ou ocular em coelhos e apresenta baixa toxicidade, sendo considerado toxicologicamente semelhante ao glifosato, foi descartada a necessidade de se criar uma base de dados completa e exclusiva para o AMPA.

Sendo assim, pode-se entender que se o produto for utilizado de acordo com as recomendações da bula, com os equipamentos individuais de proteção requeridos, com as doses aprovadas pelos órgãos registrantes e respeitando a rotação de cultura e/ou ingrediente ativo, dificilmente o produto acarretará algum dano ambiental ou a saúde humana. Até mesmo porque, com base no LMR da soja, podemos ser mais restritivos usando como base de comparação as amostras analisadas também para o solo, ou seja, não causam riscos ao meio ambiente e a saúde humana, visto que todas se encontram em níveis inferiores a 10 mg/Kg.

As maiores concentrações de AMPA e/ou Glifosato foram observadas nas áreas com temperaturas mais elevadas, em especial no tratamento com soja RR/herbicida RR. Assim, recomenda-se que seja avaliada em profundidade a

interferência da temperatura de determinadas regiões de plantio no acúmulo do herbicida no solo e nos grãos da soja.

A avaliação do risco é um processo sistemático através do qual o perigo da substância, a exposição e o risco são identificados e quantificados. Neste presente trabalho, levantamos o perigo da substância de acordo e o seu respectivo risco, de acordo com a sua disposição no solo e em grãos de soja, porém, não correlacionamos com a exposição seja a saúde como ao meio ambiente. De qualquer forma, diversas publicações afirmam que se o glifosato for utilizado de forma adequado, não haverá risco, ou melhor, não haverá efeitos adversos significativos.

## **7. CONCLUSÃO:**

Com base nos dados obtidos, referentes à avaliação da presença de resíduos de Glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em grãos de soja e em amostras de solo, pode-se concluir que:

- a) As amostras dos tratamentos de soja Roundup Ready/herbicida Roundup Ready apresentaram concentrações de Glifosato e AMPA superiores às amostras dos outros tratamentos, talvez pelo fato de ter duas aplicações, sendo a pré e pós-emergente;
- b) As concentrações de AMPA prevaleceram mais altas que as concentrações de Glifosato em todas as amostras de solo, conforme já esperado pelo fato do metabólito ser mais persistente;
- c) Apesar das diferentes concentrações de Glifosato e AMPA entre os tratamentos, todas as amostras tanto de solo quanto grãos de soja, apresentaram concentrações de Glifosato e AMPA muito baixas;
- d) As áreas com temperaturas mais elevadas resultaram em concentrações de Glifosato e AMPA maiores que as demais áreas;
- e) A área de Rondonópolis apresentou as maiores concentrações de glifosato tanto no solo quanto nos grãos de soja quando comparado com as outras áreas analisadas;
- f) Com base nos resultados obtidos, as amostras analisadas oriundas do tratamento de glifosato em soja são passíveis de baixo risco a saúde humana,

visto que todas se encontram abaixo de 10 mg/Kg.

g) Se utilizado de maneira correta, seguindo as instruções da bula, o Glifosato não atingirá o Limite Máximo Permitido.

## 8. REFERÊNCIAS:

ABAKERLI, R.B.; FAY, E.F. **Método para extração de Glifosato e AMPA de solo e sedimentos.** In: Congresso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios, 2., 2003. *Libro de Comunicaciones*. Castilla y León: Instituto Tecnológico Agrário de Castilla y León, 2003. p.221-227.

ABAKERLI, R.B.; FAY, E.F. **Validação de Método para Análise de Glifosato e AMPA por HPLC e Detecção por Fluorescência, em Culturas.** In: Segundo Congresso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. 2003.

ACQUAVELLA, J.F; COWELL, J.R.; CULLEN, M.R; FARMER, D.R.; PASTIDES, H. **Implications of Glyphosate Technology and Human Biomonitoring Data for Epidemiological Research.** *Journal of Agromedicine* 7(4): 7-27. 2001

ACQUAVELLA, J.F.; ALEXANDER, B.H.; MANDEL, J. S.; GUSTIN, C.; BAKER,B., CHAPMAN, P.; BLEEKE,M.; **Glyphosate Biomonitoring for Farmer and their Families: Results from the Farm Family Exposure Study.** *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, number 31 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxicos e Toxicologia. Monografias G01 Glifosato.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e400500474594899c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. Nova York: John Wiley and Sons, 1961. 472 p.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation**. *Microbiological Reviews*, v. 59, p. 143-169, 1995.

AMARAL, L.M.S. **Análise crítica dos valores de Ingestão Diária Aceitável estabelecidos para praguicidas no Brasil, em relação as agências internacionais e a Agência de Proteção Ambiental Americana, e suas implicações na avaliação do risco**. 2013.

AMARANTES JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. **Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação**, p. 589-593. 2002.

AMARANTES JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. **Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação**. 2003.

APOLO11. **Latitude e longitude das cidades brasileiras**. Disponível em: <<http://www.apolo11.com/latlon.php>>. Acesso em 04 de junho de 2013.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABAKERLI, R. B.; SOUZA, L. S. **Biodegradação de Glifosato em dois solos brasileiros**. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba. v. 13, p. 123-129, jan/dez. 2003.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABAKERLI, R.B.; SILVESTRE, L.S. **Avaliação de métodos de extração de glifosato do solo.** In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, PR, Brasil. 2001.

AYENI, A.O.; MAJEK, B.A.; HAMMERSTEDT, J. **Rainfall influence on imazethapyr bioactivity in New Jersey soils.** Weed Science, v., p. 46:581-586, 1998.

BETTIOL, W.; FERNANDES, S. A. P.; CERRI, C. C. **Efeito do lodo de esgoto na atividade microbiana do solo.** In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. (Ed.) Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 207-226.

BIEDERBECK, V. O.; CAMPBELL, C. A.; HUNTER, H. J. **Tillage effects on soil microbial and biochemical characteristics in a fallow-wheat rotation in a dark brown soil.** Can. J. Soil Sci., Guelph, v. 77, pp. 309-16, 1997.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Textos de Epidemiologia para Vigilância Ambiental em Saúde. Toxicologia Ambiental.** 2002, Disponível em [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/textos\\_vig\\_ambiental.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/textos_vig_ambiental.pdf). Acesso em 29 de setembro de 2013.

BUCKLEY, D. H.; SCHIMIDT, T. M. **The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation.** Microb. Ecol., Nova York, v. 42, pp. 11-21, 2001.

CENTENO, A.J. **Glifosato: comportamento ambiental**. 2007. Disponível em: <[http://www.monsanto.com.br/monsanto/brasil/newsletter/agricultores/18\\_2007\\_Novembro/01meioAmbiente.asp](http://www.monsanto.com.br/monsanto/brasil/newsletter/agricultores/18_2007_Novembro/01meioAmbiente.asp)>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

CHEAH, U.B.; KIRKWOOD, R.C.; LUM, K.Y. **Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils**. *Pesticide Science*, v. 50, p.53-63, 1997.

CODEX ALIMENTARIUS. **Maximum Residue Limits for Glyphosate**. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/details.html?d-16497-o=2&d-16497-s=3&id=158&print=true>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

COLE, D. J. **Mode of action of glyphosate – A literature analysis**. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). *The herbicide glyphosate*, pp. 49-54. Londres: Butterworths, 1985.

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

COX, C. **Glyphosate (Roundup up)**. *Journal of Pesticides Reform/Fall*, vol 18, nº 3. Northeast Coalition for Alternatives to Pesticides. 1998.

CURRIE, L.A. **Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities**. *Pure Appl. Chem.*, v.67, p. 1699-1723, 1995.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action.** New Jersey: P T R Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1993. 441 p.

DICK, R.E.; QUINN, J.P. **Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation.** Applied Microbiology Biotechnology, v.43,n.3 p.545-550, 1995.

ENFIELD, C.G.; YATES, S.R. **Organic Chemical transport to groundwater.** In: CHENG, H.H. ed. Pesticides in the soil environment: Processes, impacts, and modeling. 2 ed. Madison, Soil Science Society of America, 1990. P. 271-302 ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY (EPA). **Glyphosate.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0057.htm>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY (EPA). **Índices de sinais e sintomas.** Disponível em <<http://www.epa.gov/pesticides/safety/spanish/healthcare/handbook/spindex-1.pdf>>. Acesso em 29 de setembro de 2012.

EUROPEAN COMMISSION. Health & Consumer Protection Directorate-General. **Review report for the active substance glyphosate.** 2002. Disponível em<[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1\\_glyphosate\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf)>. Acesso em 02 de junho de 2012.

EXTOXNET. **Glyphosate.** Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

FAO - Specification and evaluations for plant protection products. **Glyphosate** <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/glypho01.pdf>.

Acesso em 29 de setembro de 2013.

FAY, E. F.; SILVA, C. M. S. **Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água**. In: SILVA, C. M. S.; FAY, E. F. Agrotóxicos e ambiente. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa meio Ambiente, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1.ed. Brasília. DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 108-143.

FEDERAL REGISTER. **Glyphosate**; Pesticide Tolerance. 2004. Disponível em: <<https://www.federalregister.gov/articles/2004/11/10/04-25098/glyphosate-pesticide-tolerance>>. Acesso em 02 de junho de 2012.

FIGUEIREDO, L.A.; BOARETTO, A.E.; RIBEIRINHO, V.S.; SILVA, D.H. **Estado nutricional de soja transgênia e convencional tratadas com Glifosato em solução nutritiva**. Rev. bras. ol. fibras., Campina Grande, v.13, n.1, p.19-27, jan./abr. 2009.

FORLANI, G.; MANGIACALLI, A.; NIELSEN, E. **Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism**. Soil Biology and Biochemistry, v. 31, n.7, p. 991-997, 1999.

FRANZ, J.E; MAO, M.K; SIKORSKI, J.A. **Glyphosate: a unique global herbicide**. Washington: American Chemical Society, 1997. 653 p.

GALLI, A.J.B., MONTEZUMA, M.C. **Glifosato: Alguns aspectos da utilização do herbicida Glifosato na agricultura**. Ed. ACADCOM Gráfica e Editora Ltda., pp 44-53, 2005.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. **Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide**. Rev. Environ. Contam. Toxicol., Nova York, v. 167, pp. 35-120, 2000.

GROSSBARD, E.; HARRIS, D. **Effects of herbicides on the decay of straw**. p. 167-176, 1979. In GROSSBARD, E (ed.) Straw decay and its effect on disposal and utilization. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. **Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides**. In: SINGH, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

GURTNER, C.S.; PINAR, G.; LUBITZ, W.; ROLLEKE, S. **An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects**. *Journal of Microbiological*, v. 45, p. 77-87, 2001.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M.; ZUBERER, D. A. **Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass**. Weed Sci., Champaign, v. 48, pp. 89-93, 2000.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M. **Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils**. J. Environ. Qual., Madison, v. 31, n. 3, pp. 730-5, 2002.

HART, M. R.; BROOKES, P. C. **Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides**. Soil Biol. Biochem., Exeter, v. 28, pp. 1641-9, 1996.

IBGE. **Geociência**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/climatologia>>. Acesso em 04 de junho de 2013.

INMET. **Climatologia**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias>>. Acesso em 04 de junho de 2013.

ILSI – INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE. **Avaliação do Risco de Agrotóxicos: Diretrizes e Conceitos Básicos**. p.9-10 1999.

JENNINGS, J.C.; KOLWYCK, D.C.; KAYS, S.B.; WHETSELL, A.J.; SURBER, J.B.; CROMWELL, G.L.; LIRETTE, R.P.; GLENN, K.C. **Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal**. *Journal of Animal Science*, vol. 81, pp. 1447-1455, 2003. Disponível em <[http://www.cib.org.br/trabalho\\_05.php](http://www.cib.org.br/trabalho_05.php)>. Acesso em 06 de abril de 2012.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. **Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches**. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 197-212, 2001.

LAL, R. **Methods and guidelines for assessing sustainable use of soil and water resources in the tropics**. Columbus, OH: The Ohio State University; Washington: SMSS, 1994.78 p. (SMSS Technical Monograph, n. 21).

LAVY, T.; COWELL, J.R; STEINMETZ, J.R, MASSEY, J.H. (1992). **Conifer seedling nursery exposure to glyphosate**. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 22: 6-13.

LEITE, E.M.A.; AMORIM, L.C.A. **Toxicologia geral**. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Apostila%20Toxicologia%20Geral%20.doc>>. Acesso em 20 de abril de 2012.

LINDERS, J.; JANSMA, J.; MENSINK, B.; OTERMANN, K. **Pesticides: Benefaction or pandora's box? A synopsis of the environmental aspects of 243 pesticides**. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Netherlands, 1994, 203p.

LIU,C.M.; McLean,P.A.; SOOKDEO,C.C. **Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiacea**. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore,v.57,n.6,p.1799-1805,1991.

LOMBARDI, J.V. **Fundamentos de Toxicologia Aquática**. Disponível em: <[http://www.aquicultura.br/conceitos\\_fundamentais.htm](http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm)>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

LOPES, A.S. **A agricultura é fundamental para a sobrevivência da humanidade**. *DBO Agrotecnologia*. Ano 4, No 12, Julho/Agosto 2007 (Boletim técnico).

MATOS, A.T. **Contaminação de mananciais de água com resíduos de atividades agropecuárias**. In: Encontro de Preservação de Mananciais da Zona da Mata Mineira, Viçosa, 2001. Anais. Viçosa: UFV, 2001. v. 1, p. 66-69.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Vegetal. **Cultura. Soja.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja/saiba-mais>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

MONQUERO, P.A. **Dinâmica populacional e mecanismos de tolerância de espécies de plantas daninhas ao herbicida glyphosate.** 2003.

MONSANTO DO BRASIL. **Soja Roundup Ready.** Disponível em: <[http://www.monsanto.com.br/produtos/sementes/soja\\_roundup\\_ready/soja\\_roundup\\_ready.asp](http://www.monsanto.com.br/produtos/sementes/soja_roundup_ready/soja_roundup_ready.asp)>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

MONSANTO DO BRASIL. **Comportamento do Glifosato no solo e na água.** Disponível em: <<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/glifosato/capitulo6/capitulo6.asp>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

MOSHIER, L.J.; PENNER, D. **Factors influencing microbial degradation of  $^{14}\text{C}$ -glyphosate to  $^{14}\text{CO}_2$  in soil.** Weed Science, v.26, n6, p. 686-691, 1978.

MUETH, M.G. **Storage stability of glyphosate residues in crop commodities.** Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0439e/a0439e20.pdf>>. Acesso em 30 de outubro de 2013.

NASCIMENTO, E.S. **Avaliação da Segurança de resíduos de drogas veterinárias.** III Simpósio Internacional de Inocuidade de Alimentos. VIII Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos, 2004.

NIMMO, D.R. **Pesticides.** Pp 335-373. In: G.M. Rand & S.R.Petrocelli, (eds). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Hemisphere, New York. 85 p.1985

OLORUNSAGA, O.O.; BABABUNMI, E.A.; BASSIR, O. **Effect of glyphosate on rat liver mitochondria in vivo**. *Bull Environ Contam Toxicol*, 22: 257-364.

PADGETTE, S. R.; KOLACZ, K. H.; DELANNAY, X.; RE, D. B.; VALLEE, B. J.; TINIUS, C. N.; RHODES, W. K.; OTERO, Y. I.; BARRY, G. F.; EICHHOLTZ, D. A.; PESCHKE, V. M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N. B.; KISHORE, G. M. **Development, identification, and characterization of a glyphosate tolerant soybean line**. *Crop Science*, v. 35, n. 5, p. 1451-1461, 1995.

PERES, T. B. **Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do <sup>14</sup>C-paration metílico**. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. 75f.

PIONEER SEMENTES. **O gene Roundup Ready**. Disponível em <<http://www.pioneersementes.com.br/ProdutosBiotecnologiaSojaRR.aspx>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. **Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do Glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos**. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, Viçosa, v. 24, pp. 947-51, 2000.

QUEIROZ, G.M.P.; SILVA, M.R.; BIANCO, R.J.F.; PINHEIRO, A.; KAUFMANN, V. **Transporte de glifosato pelo escoamento superficial e por lixiviação em um solo agrícola**. Universidade Regional de Blumenau, 2011.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. **Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment.** *Research in Microbiology*, Paris, v. 51, n. 3, p. 167–177, 2000.

REMIÃO, 2007. **Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Biotoxicologia no ano lectivo 2006/07.** Disponível em <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/Glifosato/frame1.html>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

RODRIGUES, J. D. **Absorção, translocação e modo de ação de defensivos (Glifosato e alachlor).** Botucatu: Unesp, 1994. 10 p. Apostila.

ROSLYCKY, E. B. **Glyphosate and the response of the soil microbiota.** *Soil Biol. Biochem.*, v. 14, pp. 87-92, 1982.

SCHUETTE, J. **Environmental fate of glyphosate.** *Environmental Monitoring & Pest Management*, California, v. 1, p. 1-13, 1998.

SILVEIRA, V.I. **Soja Transgênica.** Disponível em: <<http://brazil.indymedia.org/content/2007/07/388774.shtml>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações.** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, v. 42, 29 p., dez. 2004.

SQUIBA, L.M.; MONTE SERRAT, B.; LIMA, M.R. **Como coletar corretamente amostras de solos para análises.** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Projeto de Extensão Universitária Solo Planta, 2002. (Folder).

STUTZER, G.; GUIMARÃES, G. **Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários**. In: ZAMBOLIM, L. O que os engenheiros agrônômicos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa. UFV, 2003. P. 69-84.

The Royal Society of Chemistry. 1993. **The Agrochemicals Handbook**. 3rd ed. p. A- 222-223. Thomas Graham House, Cambridge, England.

THOMPSON, M.; ELLISON, L.R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis**. IUPAC Technical Report. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, . 5, p. 835-855, 2002.

TONI, L. R. M.; DIMAS, H. S.; ZAIA, A. M. **Adsorção de Glifosato sobre solos e minerais**. *Química Nova*, v. 29 n. 4, 2006.

TORSTENSSON, N.T.L.; AAMISEPP, A. **Detoxification of glyphosate in soil**. *Weed Research*, v.17, n.2, p.209-212, 1977.

TREZZI, M. M.; KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A. **Inibidores de EPSPS**. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO JUNIOR, A. (Ed.). *Herbicidologia*. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p. 37-45.

VELINI, E.D., MESCHEDE, D.K., CARBONARI, C.A., TRINDADE, M.L.B. **Glyphosate**. p. 17-21; 113-115; 153. Ed. Fepaf, 2009.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Ribas Vidal, 1997. 165 p.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. **Diversidade microbiana como indicador de qualidade de solo.** *Caderno de Ciência e Tecnologia*, Brasília, v. 20, n .3, p. 391-411, set./dez. 2003.

WHO. Environmental Health Criteria 159: **Glyphosate**. World Health Organization. The International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva, 1994. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm#SectionNumber:1.2>>. Acesso em 29 de setembro de 2013.

WILLIAMS, A.L., WATSON, R.E., DESESSO, J.M. **Developmental and reproductive outcomes in Humans and Animals after glyphosate exposure: A critical analysis.** 2012.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO, I. C. **Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup® and its active ingredient, glyphosate, for humans.** *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Orlando, v. 31, pp. 117-65, 2000.