

Síntese do glifosato marcado com nitrogênio-15

CLAUDINÉIA RAQUEL DE OLIVEIRA TAVARES
Licenciada em Ciências – Habilitada em Química

Orientador: Prof. Dr. José Albertino Bendassolli

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

PIRACICABA
Estado de São Paulo- Brasil
Novembro – 2005

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Tavares, Claudinéia Raquel de Oliveira

Síntese do glifosato marcado com nitrogênio-15 / Claudinéia Raquel de Oliveira Tavares; orientador José Albertino Bendassolli.
- - Piracicaba, 2005.
74 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências.
Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) –
Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Herbicidas 2. Espectrometria de massas 3. Isótopos estáveis
I. Título

CDU 632.954:621.039.85

A DEUS, minha eterna luz, sem ele nada seria.

À minha mãe, minha grande amiga, a pessoa que me ensinou a arte de resistir, persistir e superar as barreiras existentes nesta caminhada.

Aos meus irmãos Érika e Esdras companheiros de todas horas sempre presentes.

Ao meu esposo pela harmonia, companheirismo, carinho, paciência e valiosas correções sugeridas ao meu trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade oferecida.

À Comissão de Pós-graduação do curso de Energia Nuclear na Agricultura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao meu mestre e orientador Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, doutor não só na academia das ciências, mas doutor na academia de ensino da vida. Ele, que me ensinou o valor da busca pelo saber, o valor do conhecimento adquirido nem sempre por caminhos planos, mas vencidos com persistência e humildade.

À Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro pela inspiração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho pela acolhida na Unicamp e por dispensar atenção ao meu trabalho com suas valiosas sugestões.

Aos pesquisadores do Laboratório de Isótopos Estáveis pelo apoio e estímulo.

À doutoranda Alexssandra Luiza Rodriguez Molina Rossete por participar do início ao fim do meu trabalho com suas críticas construtivas, correções dos meus trabalhos, e por ser uma pessoa especial, ser humano ímpar, amiga para sempre.

Ao mestrando Carlos Roberto Sant`Ana pela colaboração e amizade.

Aos técnicos: Bento Moçambique de Moraes Neto, Clélber Vieira Prestes e o estagiário Rômulo Barbieri pelo apoio técnico no desenvolvimento da pesquisa.

À secretária do Laboratório de Isótopos Estáveis Magda de Mello Gesualdo Bartolamei pelo apoio administrativo, competência, amizade e confiança despendido a minha pessoa.

Aos pós-graduandos do laboratório de Isótopos Estáveis pelo respeito e amizade.

Às funcionárias da biblioteca, e em especial a Marília, Raquel e Celsinho, pela amizade.

À empresa Agritec pelo fornecimento do padrão formulado e pelo apoio a este trabalho

Ao Laboratório de Entomologia da Esalq pelas análises de HPLC

À todos que passaram por essa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Agrotóxicos.....	7
2.2 Herbicidas.....	12
2.3 Glifosato.....	15
2.4 Métodos de obtenção do glifosato.....	19
2.5 Isótopos Estáveis como traçadores isotópicos (^{15}N).....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Equipamentos e acessórios.....	23
3.1.2 Reagentes.....	23
3.1.3 Padrões de glifosato.....	24
3.1.4 Sistema de colunas.....	24
3.1.4.1 Obtenção do $^{15}\text{NH}_4$	24
3.1.4.2 Purificação do ácido clorometilfosfônico.....	25
3.1.5 Resinas de troca iônica.....	26
3.1.5.1 Resina catiônica DOWEX 50WX8.....	26
3.1.5.2 Resina aniônica DOWEX 2X8.....	26
3.2 Métodos.....	27

3.2.1 Produção de compostos marcados	27
3.2.1.1 Obtenção do NH_4^+	28
3.2.1.2. Produção de $^{15}\text{NH}_3$ aquosa.....	29
3.2.1.3 Síntese da glicina.....	30
3.1.2.4 Produção do ácido clorometilfosfônico a partir de dicloreto clorometilfosfônico.....	33
3.1.2.5 Síntese do glifosato a partir do ácido clorometilfosfônico (patente nº 3,799,758 1974).....	34
3.2.1.6 Síntese do glifosato a partir do diaquil fosfito e glicina (patente nº 4,237,065- 1980).....	35
3.2.1.7 Produção do glifosato formulado.....	37
3.2.2 Métodos Analíticos.....	40
3.2.2.1 Espectrometria de infravermelho médio.....	40
3.2.2.2 Determinação isotópica de ^{15}N (% em átomos) e teor de N (%) em amostras de glifosato por espectrometria de massas.....	41
3.2.2.3 Determinação do glifosato formulado por HPLC.....	43
3.2.2.4 Teste de fusão.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Obtenção do $^{15}\text{NH}_4^+$	45
4.2 Produção de $^{15}\text{NH}_3$ aquosa.....	45
4.3 Síntese de glicina.....	46
4.4 Produção do ácido clorometilfosfônico.....	47
4.5 Produção do glifosato a partir do ácido clorometilfosfônico (Patente nº. 3,799,758)..	49
4.6 Produção do glifosato a partir do diaquil fosfito e glicina (Patente no 4,237,065).....	51
4.7 Produção do glifosato formulado.....	54
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

1. Rotas de degradação do glifosato no solo (Liu et al., 1991).....	17
2. Sistema de colunas preenchidas com resina catiônica utilizada para produção do íon NH_4^+ com elevado enriquecimento no isótopo ^{15}N	25
3. Coluna utilizada na purificação do clorometilfosfônico.....	26
4. Fluxograma referente á produção de compostos enriquecidos em ^{15}N no LIE/CENA/USP (em destaque, as etapas produtivas relacionadas a síntese do glifosato).....	27
5. Coluna de cromatografia utilizada no enriquecimento de ^{15}N ; em destaque (A), a traseira de uma banda do íon NH_4^+	28
6. Linha de produção de amônia anidra e aquosa, sendo E1 – entrada do gás de arraste; E2 – entrada de soluções; R1 – reator de aquamônia em aço inoxidável; R2 – massa de água desionizada; e C1 – trap contendo H_2SO_4	30
7. Sistema em micro escala utilizado na rota de síntese do glifosato.....	35
8. Rota de reação para obtenção do glifosato ácido a partir do dietil fosfito.....	36
9. Fluxograma para obtenção do glifosato formulado.....	39
10. Espectrômetro de massas.....	42
11. TLC revelada com ninidrina das amostras de glicina sintetizada.....	47
12. Massa de Cl^- e OH^- (mmol) em função do volume eluente.....	49
13. Teste de fusão (230°C) nas amostras (T1, T2 e T3) e padrão sigma.....	50
14. Espectro infravermelho para amostra sintetizada.....	50
15. Espectro do infravermelho do padrão sigma do glifosato.....	51
16. Teste de fusão (230°C).....	52
17. Espectro Infravermelho para glifosato sintetizada a partir da glicina.....	53

18. Glifosato obtido a partir da glicina sintetizada no Laboratório.....	54
19. Padrão glifosato formulado Agritec 480g.L ⁻¹	55
20. Amostra do glifosato formulado sintetizado com abundância isotópica natural.....	55
21. Amostra do glifosato sintetizado marcado com ¹⁵ N.....	56
22. Espectro relativo ao padrão formulado Agritec	57
23. Espectro relativo a amostra sintetizada com abundância isotópica natural.....	57
24. Espectro relativo a amostra sintetizada marcada com o isótopo ¹⁵ N	58

LISTA DE TABELAS

1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo DL50.....	9
2. Recuperação do nitrogênio em excesso na reação e produção de glicina (n=3).....	46
3. Massa de hidroxila (OH-) e pH da solução eluída da coluna de resina aniônica.....	48
4. Porcentagem de N (m/m) e abundância isotópica (% átomos de ¹⁵ N) em amostras de glifosato.....	52
5. Massa e Rendimento da reação de síntese de glifosato a partir da glicina e diaquil fosfito.....	54
6. Dados isotópicos e de fração de N no produto final (glifosato formulado).....	59

Síntese do glifosato marcado com o nitrogênio-15

Autor: CLAUDINÉIA RAQUEL DE OLIVEIRA TAVRAES

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ALBERTINO BENDASSOLLI

RESUMO

Dentre os herbicidas atualmente comercializados, o glifosato é um dos mais utilizados no Brasil. A eficácia do glifosato, bem como de outros herbicidas, no combate às ervas daninhas, esbarra nos problemas que esses compostos acabam proporcionando ao meio ambiente. Embora estudos venham sendo realizados para elucidar melhor o comportamento de herbicidas no meio ambiente, a complexidade do comportamento desses compostos abre caminho para realização de um número significativo de trabalhos de pesquisa. Nesses estudos, é rotineiro o uso de compostos radiomarcados (traçadores radioativos) para avaliar a biodisponibilidade no solo. Todavia, o emprego, manipulação e estocagem de compostos radiomarcados exigem cuidados sob o ponto de vista da segurança, razão pelo qual o uso de isótopos não radioativos é uma tendência internacional, especialmente em pesquisas de campo. Dentre desse contexto, o trabalho descreve um método para a síntese do glifosato enriquecido no isótopo estável do nitrogênio (^{15}N). A síntese do herbicida- ^{15}N foi realizada utilizando-se da reação de fosfometilação com diaquil fosfito e glicina- ^{15}N . Os testes foram realizados em microescala e em quantidades equimolares. Nas condições estabelecidas, foi possível alcançar um rendimento de reação de aproximadamente 25%. A otimização das condições de síntese, empregando a técnica isotópica, deverá disponibilizar uma importante ferramenta a ser utilizado em estudos referentes ao comportamento do glifosato no sistema solo-planta

Synthesis of glyphosate labeled with nitrogen -15

Author: CLAUDINÉIA RAQUEL DE OLIVEIRA TAVARES

Adviser: Prof. Dr. JOSÉ ALBERTINO BENDASSOLLI

SUMMARY

Among the actual commercialized herbicides, the glyphosate is one of the most used in Brazil. Its efficiency, as well as the others herbicides, on weeds control is attached to problems that this composts cause to the environment. Although studies about the herbicides behavior in the environment have been done, the complexity of this composts behavior leads to the accomplishment of an expressive number of research works. In these works, it's common the use of radio labeled compounds (radioactive tracers) to evaluate its bio-availability in the soil. However, the use of this radio labeled composts, its manipulation and storage demands a careful handling in the chemical security point of views. This is the reason the use of non radioactive isotopes is an international tendency, especially for field researches. According to this context, the present work describes a method for the synthesis of enriched glyphosate for the nitrogen stable isotope (^{15}N). The tests were undertaken in micro-scale and in equimolar quantities. Under these established conditions, the reaction reached the yield of approximately 25%. The optimization of the synthesis conditions with the use of isotopic techniques shall offer an important tool to be used in studies that are referred to glyphosate behavior in soil- plant system.

1- INTRODUÇÃO

O crescimento populacional traz como consequência a disputa por alimentos, bem como alterações na qualidade de vida e ambiente no qual estamos inseridos. No século XVIII, o sociólogo e economista Thomas Malthus foi o primeiro a teorizar sobre o desequilíbrio ambiental, estabelecendo uma relação entre o crescimento populacional e a produção de alimentos, atestando que a população crescia em razão geométrica e a quantidade de alimentos em progressão aritmética. Tendo como base essa relação, emergiu, décadas mais tarde, o discurso sobre a necessidade do uso de agrotóxicos. No entanto, mesmo com a criação dos mais diferentes insumos, ainda não “existiram” colheitas para alimentar todo o povo brasileiro (Pinheiro et al., 1998).

Os agrotóxicos foram pioneiramente sintetizados na Alemanha, no final da década de 30 do século passado, com a finalidade de utilização como arma química de guerra. Após a II Guerra Mundial, sobretudo a partir dos anos 50, eles passaram a ser utilizado no combate de pragas nas lavouras.

É importante salientar que, o processo de modernização tecnológico, iniciado nessa época, com a chamada “Revolução verde”, tinha como objetivos o aumento da produtividade das lavouras e do lucro.

Cerveira (2003) ressalta, que, para atingir tais objetivos, foi necessária a criação de um “pacote tecnológico” com técnicas agrícolas programadas e homogêneas para servir a todas as propriedades agrícolas no mundo. Nesse pacote, dentre outras práticas, destaca-se o cultivo intenso do solo, aplicação de fertilizantes, controle químico de pragas e doenças agrícolas etc. Não havia, contudo, um estudo detalhado dos impactos ao ambiente agrícola, bem como as consequências em longo prazo que a utilização dessas técnicas poderiam apresentar à população mundial (Bonilha, 1992). Nesse cenário, as atividades agrícolas foram profundamente

modificadas. Essa transformação acarretou em mudanças ambientais, nas cargas de trabalho e nos seus efeitos sobre a saúde, deixando principalmente os trabalhadores rurais expostos a riscos muito diversificados. Por volta de 1970, as casas em alguns estados brasileiros recebiam até três borrifações por ano de BHC ou HCH (hexaclorociclohexano) e DDT (diclorodifeniltricloroetano), para o controle da malária, febre amarela, doença de chagas e dengue. No cultivo da cana-de-açúcar (época do Proálcool), os trabalhadores manuseavam-na dentro de tonéis com soluções mercuriais (Pinheiro et al, 1998).

Como consequência, o modelo proposto pela revolução verde passou a apresentar os sinais de esgotamento, evidenciados na forma de problemas ambientais (salinização, erosão do solo, etc.), econômicos (declínio da produtividade marginal) e sociais (exclusão de pequenos produtores) (Nascimento, 2003).

A Organização Pan-Americana de Saúde- Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS, - 1996:3) atesta que, em 1975, o Plano Nacional de Desenvolvimento (PND) abriu o mercado brasileiro ao comércio de agrotóxicos condicionando o agricultor *"a comprar veneno com recursos do crédito rural, ao instituir a inclusão de uma cota definida de agrotóxico para cada financiamento requerido"*

Apenas em 1980 os fungicidas organo-mercuriais foram banidos da agricultura brasileira, seguidos, poucos anos depois, dos organoclorados através da portaria 329 de 02/09/85 do Ministério da Agricultura. A proibição dos organoclorados (DDT) em escala mundial ocorreu devido a seus efeitos carcinogênicos e bioacumulativos (Pinheiro, et al., 1998).

Durante a reunião da UNEP (United Nations Environment Programme), ocorrida em maio de 2001, em Estocolmo, na Suécia, representantes de 90 países, incluindo o Brasil, assinaram a Convenção sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, que visa proibir a produção e o uso de 12 substâncias orgânicas tóxicas. Os 12 poluentes, conhecidos também como "duzia suja", são: Aldrin, Clordano, Mirex, Dieldrin, DDT, Dioxinas, Furanos, Endrin, Heptacloro, BHC e Toxafeno e Fungicidas a base de mercúrio (Nass & Francisco, 2002).

Chama a atenção o tempo de desativação de alguns desses compostos no ambiente, como, por exemplo, o DDT (4 a 30 anos), o Aldrin (1 a 6 anos), o Heptacloro (3 a 5 anos), o Lindano (3 a 10 anos) e o Clordano (3 a 5 anos).

A consequência principal da proibição desses compostos foi à utilização intensa dos organofosforados e dos carbamatos a partir de então (Levigard, 2001). O crescimento do emprego

de insumos químicos nessa época traz como principal seqüela a exposição do agricultor rural, devidamente relatada nos estudos reportados por Furtado (1998) e Pickett et al. (1998). O primeiro autor descreve a possível relação entre a exposição a agrotóxicos e o alto número de suicídios entre fumicultores de Venâncio Aires, no Rio Grande do Sul, cidade que detém um dos maiores índices mundiais de suicídio. Segundo ele, em 1995, ano em que houve intensa utilização de agrotóxico para combater o aumento de pragas nas plantações de fumo, ocorreu um recorde de suicídios na região. Preocupação semelhante com relação à exposição ocupacional a agrotóxicos e o alto número de suicídios entre agricultores canadenses é expressa no estudo de Pickett (1998) assim como no relatório de Conger (NIMH, 1999), que destaca o elevado índice de suicídios no ano de 1998 entre agricultores de IOWA, nos Estados Unidos.

No Brasil, existe um vasto mercado de agrotóxico, que compreende aproximadamente trezentos princípios ativos aplicados, em duas mil fórmulas diferentes. Desse total, somente 10% das substâncias químicas foram efetivamente submetidas a uma avaliação completa de riscos e 38% jamais sofreram qualquer avaliação (Meirelles, 1995). Dados do Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Agrícolas (SINDAG) baseados no ano de 2001, atestam que entre os países que mais consomem agrotóxicos (o que representaria 70% do mercado mundial), o Brasil seria o 7º no *ranking*, destacando-se os estados de São Paulo, Paraná e Minas Gerais com aproximadamente 50% do montante utilizado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2002).

Essas informações preocupantes explicitam a urgência de ações no controle dos riscos à saúde, não apenas do trabalhador, mas da qualidade do meio ambiente como um todo.

Lopes (2002) ressalta o perigo do uso abusivo de agrotóxicos na contaminação ambiental das águas superficiais e subterrâneas, a exemplo de áreas vulneráveis do Aquífero Guarani, no Estado de São Paulo, que segundo estudos da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna- SP, está com alto risco de contaminação por agrotóxicos, com níveis próximos ao limite considerado perigoso à saúde humana, num dos trechos paulistas do aquífero.

Dentro desse contexto, houve a necessidade de se repensar acerca de um novo modelo tecnológico, ecológico e economicamente sustentável, diferente daquele baseado no uso intensivo de insumos químicos.

A biotecnologia surge nesse cenário se apresentando como um possível instrumento capaz de, através da viabilização das sementes geneticamente modificadas, diminuir o uso de

agroquímicos e, ao mesmo tempo, superar as fronteiras de crescimento das indústrias de insumos agroquímicos. Nesse possível novo modelo, o problema a ser solucionado seria a criação de uma agricultura sustentável, a partir dos avanços no campo da engenharia genética que viabilizaram as sementes geneticamente modificadas como instrumentos de solução do problema (Nascimento, 2003).

No entanto, com o advento de plantas geneticamente alteradas, muitos conceitos relacionados ao sistema solo-planta devem ser repensados, para que erros futuros não sejam cometidos. Atualmente, um dos maiores exemplos dessa tecnologia talvez seja o das variedades de soja (*Glycine max L*) resistentes ao herbicida glifosato (Amarante et al., 2002).

James (2002) ressalta que, na medida em que as variedades tolerantes a herbicida representam cerca de 63% das lavouras transgênicas, a trajetória que se observa é a de continuidade do uso de insumos químicos, o que é coerente com a estratégia de valorização dos ativos das empresas do segmento químico. Com isso, o mercado mundial de produtos fitossanitários se aproxima de 40 bilhões de dólares (Foloni, 2000), representados principalmente por herbicidas (Conceição, 2000). No Brasil, as vendas desses produtos giram em torno de 2,5 bilhões de dólares anuais, segundo dados da FINEP (2005).

No cenário supracitado, destaca-se o glifosato [n-(fosfonometil)glicina]. De modo geral, apenas plantas geneticamente alteradas, com resistência induzida, apresentam seletividade ao glifosato, que é um dos herbicidas mais comercializado no mundo (Mendelson, 1998).

Considerando que o glifosato apresenta baixo custo relativo e excelente eficiência agrônômica, a introdução de variedades resistentes, provavelmente resultará no aumento das taxas de aplicação desta molécula numa mesma área. Assim, os cuidados relacionados à possibilidade de contaminação do ambiente com esta molécula devem ser estudados cautelosamente, considerando principalmente a elevação do LMR (Limite Máximo de Resíduo) de glifosato de 0,2 para 10 miligramas por quilo, quando aplicado em plantação de soja transgênica, ou seja, 50 vezes mais, autorizado pela Anvisa em 2003.

É importante salientar que, quando a molécula de um determinado pesticida é aplicada no ambiente, independente da forma de aplicação, o seu destino final, na maioria dos casos, será o solo.

Os estudos de degradação desses produtos no solo podem ser realizados empregando técnicas radiométricas ou cromatográficas, ambas acompanhadas pela formação de CO₂ e

metabólitos (Araújo, 2002). O acompanhamento da formação dos metabólitos, no caso do glifosato, é fundamental, uma vez que ele não é metabolizado pelas plantas (Robert et al., 1998) e grande parte do que é aplicado em determinada cultura chega ao solo na sua forma original (Prata, 2002). Nesse caso, uma remobilização das moléculas de glifosato, as quais encontram-se na forma de resíduo ligado, pode ocasionar fitotoxicidade e influenciar a qualidade do solo, principalmente quando a aplicação é intensa. Essa característica permite obter uma recuperação normalmente baixa, dificultando, portanto, sua extração e posterior análise de resíduos em amostras de compartimentos ambientais. As extrações do glifosato e metabólitos vêm sendo cada vez mais estudadas, objetivando determinar uma metodologia mais adequada e que tenha boa recuperação do herbicida aplicado.

Além dos traçadores radiomarcados, outro traçador de grande interesse em pesquisa é o isótopo estável. Dentre os traçadores isotópicos, destacam-se os compostos nitrogenados, que apresentam dois isótopos estáveis, o ^{14}N e o ^{15}N , com abundâncias isotópicas de 99,634 e 0,366 % em átomos, respectivamente.

O emprego da técnica isotópica em trabalhos de pesquisa utilizando o ^{15}N , isótopo estável mais pesado do nitrogênio, como traçador, tem proporcionado vastas aplicações, permitindo a elucidação de muitos dos aspectos envolvidos no ciclo do nitrogênio, nas áreas agrônômica, no sistema solo – planta – atmosfera (Trivelin et al., 1996), biomédica (Warterloow et al., 1978; Young, 1981; Nissim et al., 1996), biológica (Stack et al., 1989; Marchini, 1993; Dichi, 1996;), enzimológica (Xu & Koward, 1997), bioquímica (Singh et al., 1996) e microbiológica (Goux et al., 1995; Bateman et al., 1995).

Sendo assim, considerando a necessidade do emprego de traçadores em estudos do comportamento do glifosato no meio ambiente, o presente trabalho teve como principal objetivo a síntese do glifosato marcado no isótopo ^{15}N .

A pesquisa realizada nesta tese de doutoramento buscou oferecer uma ferramenta que poderá contribuir com os estudos do glifosato no meio ambiente, atendendo aos interesses de pesquisadores da própria instituição e a muitos outros que desenvolvem trabalhos de pesquisa com o herbicida. Objetiva-se, também, contribuir com estudos que possam elucidar o percurso do herbicida em uma cultura transgênica, e se justifica pela importância na aquisição de um composto não disponível no Brasil. Nesta área da ciência, a disponibilidade do composto marcado, a custo reduzido, deve proporcionar a realização de diversos e detalhados estudos.

Ressalta-se, ainda, que a urgência em conduzir mais pesquisas, justifica-se, não com o propósito de eliminar o uso de herbicidas na agricultura, mas de procurar combater, por meio da informação, a maneira errônea de seu uso em nosso país.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Agrotóxicos*

Os primeiros defensivos agrícolas, usados no século XIX, eram sais inorgânicos, produzidos em laboratórios, como os dos elementos químicos Arsênio, Selênio, Tálcio, Cobre e Enxofre (sais tóxicos retirados da natureza). Esses compostos, solúveis em água, se precipitavam com substâncias alcalinas e orgânicas, o que motivava a recomendação às pessoas envenenadas que tomassem leite, para que o composto precipitasse no estômago. Outra prescrição era a de dar clara de ovo com a mesma finalidade (Pinheiro, 1999).

Ressalta-se que, antes de 1940, a piretrina, a rotenona e a nicotina, todos derivados de plantas, tinham uso limitados a jardins domésticos. Somente após a Segunda Guerra Mundial surgiram os inseticidas à base de hidrocarbonetos clorados e herbicidas (Estorer, 1998).

No entanto, nessa época, como os defensivos utilizados pelos militares eram sintéticos, a ação se dava em pequeníssimas doses que penetravam também pela pele (lipossolúveis). Não havia informações a respeito dos efeitos tóxicos que essas moléculas causavam no ambiente e no homem. Os estudos eram realizados com o objetivo de caracterizar a dose ideal para matar os insetos, fungos e, principalmente, as ervas daninhas (Pinheiro, 1999).

O uso indiscriminado de agrotóxicos e a intensificação das ocorrências de intoxicação fez com que a discussão relativa a uma legislação específica sobre o assunto se consolidasse no Congresso Nacional, tendo sido apresentado, em 1984, um projeto de lei pelo então ministro da agricultura. Mas, devido a um lento processo de tramitação, a lei somente foi aprovada pelo Congresso Nacional e sancionada sem vetos pelo presidente da República em julho de 1989. A lei nº 7.802, de 11/07/89 - Lei dos Agrotóxicos - regulamentada pelo decreto nº 98.816, no artigo 2, inciso I, de 11/01/90, dispõe sobre a pesquisa, experimentação, produção, embalagem e rotulagem, transporte, armazenamento, comercialização, propaganda comercial, utilização,

importação, exportação, destino final dos resíduos e embalagens, registro, classificação, controle, inspeção e fiscalização de agrotóxicos em nosso País e define o termo “ agrotóxico” da seguinte forma: Os produtos e seus componentes físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento. Essa definição exclui fertilizantes e químicos administrados a animais para estimular crescimento ou modificar comportamento reprodutivo (Jungstedt, 1999).

Segundo o Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (OPAS/OMS, 1996), os agrotóxicos podem ser classificados da seguinte forma:

- Quanto ao organismo que controlam: inseticidas (insetos), herbicidas (ervas daninhas), fungicidas (fungos), raticidas (roedores), bactericidas (bactérias), nematicidas (vermes), larvicidas (larvas), cupinicidas (cupins), formicidas (formigas), pulguicidas (pulgas), piolhicidas (piolhos), carrapaticidas (carrapatos), acaricidas (ácaros), molusquicidas (moluscos), avicidas (aves) e columbicidas (pombos).
- Quanto à toxicidade: esta classificação é feita para permitir a distinção do potencial de risco dos agrotóxicos. Ela é baseada na dose letal 50 (DL 50), que é um valor estatístico que determina a quantidade de veneno mg/Kg de peso corporal necessária para matar 50% da amostra populacional em estudo por intoxicações agudas. Os valores são determinados em cobaias e extrapolados para humanos a partir do peso.

Existem quatro classes, a saber:

Classe I (rótulo vermelho)- extremamente tóxicas

Classe II (rótulo amarelo) – altamente tóxicas

Classe III (rótulo azul) – moderadamente tóxicas

Classe IV (rótulo verde) – pouco tóxicas

A Tabela 1 relaciona as classes toxicológicas com a "Dose Letal 50" (DL50), comparando-a com a quantidade suficiente para matar uma pessoa adulta. É importante ressaltar que, dentre as substâncias da Classe I, encontram-se aquelas altamente tóxicas para a saúde

humana como o herbicida 2,4 e o acaricida aldicarb (Moraes, 1999). No entanto, a maioria dos estudos sobre o tema utiliza dados secundários, sobre o usuário de algum serviço, ou compara a população rural à população urbana sob vários aspectos. Portanto, existe a escassez de estudos epidemiológicos de base populacional enfocando os problemas de saúde do trabalhador rural (Faria et al., 2000).

No Brasil, o termo agrotóxico, ao invés de defensivo agrícola, passou a ser utilizado para denominar os venenos agrícolas, após grande mobilização da sociedade civil organizada. Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos ao meio ambiente e à saúde humana. São ainda genericamente denominados *praguicidas* ou *pesticidas*.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo DL50

Cor da faixa	Grupo	DL50	Dose capaz de matar uma pessoa adulta
Vermelha	Extremamente tóxicos	até 5	1 pitada - algumas gotas
Amarela	Altamente tóxicos	5-50	algumas gotas -1 colher de chá
Azul	Medianamente tóxicos	50-500	1 colher de chá - 2 colheres de sopa
Verde	Pouco tóxicos	500-5000	2 colheres de sopa- 1 copo
Verde	Muito pouco tóxicos	5000 ou +	1 copo – litro

Fonte: TRAPÉ (1994).

Segundo Larini (1998) e Yones, (2000), pesticidas são compostos orgânicos de origem antrópica intensamente empregados em atividades agrícolas, possuem alta toxicidade e geralmente são apontados como causadores de muitos danos à saúde humana, à flora e à fauna.

No entanto, para a Environmental Protection Agency (EPA), um pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias com capacidade de prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer peste. Além da classificação dos pesticidas de acordo com o tipo de peste que combatem, há também substâncias desfolhantes, dessecantes ou reguladoras do crescimento de insetos e plantas.

Bull (1986) salienta que aproximadamente 305 milhões de quilos de pesticidas entram anualmente nos países do Terceiro Mundo, contaminando o meio ambiente, pois são aplicados em excesso, ou de maneira esbanjadora.

Paralelo aos inseticidas, os herbicidas começaram ser aplicados em grande escala pouco depois da II Guerra Mundial. Inicialmente, foram utilizados para limpar as faixas de proteção às linhas de transporte de energia elétrica; porém, utilizações subseqüentes incluíram as servidões das linhas de ferro e auto-estradas, o controle de infestantes em agricultura e silvicultura e, infelizmente, o uso como agentes de guerra na destruição de culturas e no desfolhamento da floresta (Odum, 1971).

De acordo com Charbonneau (1979), a produção americana passou de 45.000 toneladas, em 1946, a 515.000 toneladas, em 1971. Mais de 2,6 milhões de DDT (dimetil-difenil-tricloroetano) foram espalhados na biosfera desde que este inseticida foi descoberto.

A agroindústria, devido ao uso desordenado e indiscriminado de agrotóxico, é considerada o segundo maior poluidor dos recursos hídricos, perdendo apenas para as cidades, onde os esgotos são lançados sem tratamentos prévios (Grippi, 2001).

Segundo Charbonneau (1979), a respeito da inserção dos agrotóxicos na rede trófica, o homem será o mais prejudicado, uma vez que nossa espécie está situada no topo da pirâmide trófica, o ser humano está especialmente exposto ao efeito acumulativo dos pesticidas.

Alves (1996) ressalta que, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil se apresenta como um dos países que mais exageram na aplicação de pesticidas nas lavouras, principalmente a horticultura, onde se utilizam até 10 mil litros de calda (mistura de agrotóxico e água) por hectare.

Caíres & Castro (2002) relatam que, com relação aos agrotóxicos proibidos ou submetidos a severas restrições em diversos países, no Brasil, em sua grande maioria, são amplamente permitidos. De acordo com Santiago (1986), isso ocorre porque o governo concede facilmente registro de produtos dessa natureza e também porque, quando existem portarias, as mesmas são descumpridas, considerando que a liberdade existente na legislação brasileira sobre agrotóxico tornou possível a produção e comercialização de produtos banidos em outros países.

No entanto, Caldas & Souza (2000) relatam que, nos Estados Unidos, um país onde a fiscalização, controle e a aplicação das leis são, sabidamente, mais presentes, devido a uma série de fatores (inclusive financeiros), estima-se que 35% de todo o câncer na população da região

norte tenha origem na dieta, sendo os pesticidas presentes nos alimentos os maiores responsáveis. No Brasil, os autores avaliaram o risco crônico de ingestão de agrotóxicos pela dieta em compostos registrados para uso agrícola até 1999, em 11 regiões metropolitanas (Belém, Fortaleza, Recife, Salvador, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo, Curitiba, Porto Alegre, Goiânia e Distrito Federal). Foi calculada a Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) para cada pesticida, utilizando os limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira, e as doses aceitáveis ou Ingestão Diária Aceitável (IDA) de vários países e do *Codex Alimentarius*, com dados de consumo fornecidos pelo IBGE. A IDMT ultrapassou a IDA ($\% IDA > 100$) em pelo menos uma região metropolitana para 23 pesticidas. O arroz, o feijão, as frutas cítricas e o tomate foram os alimentos que mais contribuíram para este quadro.

A OMS estimou que, a cada ano, são registrados 3.000.000 de casos de intoxicações agudas (220.000 deles resultando em mortes), sendo que a maioria deles ocorre nos países em desenvolvimento, como a África, Ásia e as Américas Central e do Sul (Jaga & Dharmani, 2003). Delgado & Paumgartten (2004) estimam que a incidência de intoxicação nos países menos desenvolvidos seja até 13 vezes maior do que aquela registrada em países industrializados. Neste mesmo trabalho, são relatados menos de vinte casos anuais de intoxicações agudas ocupacionais ocasionadas por organofosforados no Reino Unido, enquanto que no Sri Lanka este número chega a cem mil internações hospitalares e mil mortes anuais em decorrência de uso indevido de pesticidas.

No Brasil, foram notificados no ano de 2001, 7.901 casos de intoxicação por agrotóxicos, sendo 5.384 causados por produtos na agropecuária e 2.517 casos causados por produtos de uso doméstico (pesticidas domésticos), respondendo por aproximadamente 10% de todos os casos de intoxicação registrados no país (Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica - SINITOX, 2001). Estes valores são considerados altos e ainda não expressam a realidade completa, pois a sub-notificação no país constitui um fato comum, especialmente em áreas rurais.

Embora o uso de pesticidas, sem dúvida, tenha contribuído para o aumento da produtividade, criou também vários problemas ao meio ambiente.

Frighetto (1997) ressalta que o impacto ambiental nem sempre é óbvio, no entanto, provoca efeitos muito mais sérios do que se aparenta, tais como mudança adversa na qualidade ambiental, que pode reduzir o potencial produtivo, ao invés de uma aparente toxicidade.

2.2 Herbicidas

Maroulli (2003) salienta que a descoberta do poder de algumas substâncias sintéticas na época da Revolução Verde, utilizadas para o controle de agentes indesejáveis ou nocivos como insetos, fungos, plantas daninhas, etc., proporcionou a expansão das áreas cultivadas e o aumento da produção mundial de alimentos. Entre 1950 e 1985, a produção mundial de cereais passou de 700 milhões para 1,8 bilhão de toneladas, uma taxa de crescimento anual de 2,7%. Nesse período, a produção alimentar dobrou e a disponibilidade de alimento por habitante aumentou em 40%, parecendo que o problema da fome no mundo seria superado pelas novas descobertas.

Por outro lado, mesmo causando efeitos nocivos ao homem e ao ambiente, a utilização dessas substâncias tem aumentado intensamente nos últimos 50 anos. Nesse cenário, destaca-se a classe dos herbicidas, utilizados no combate a ervas daninhas, o que mais tem sido produzido (Cabral et al, 2003).

Embora não há dados consensuais sobre o tamanho global do mercado dessas substâncias, pode-se considerar para o ano de 2001, um mercado aproximadamente de US\$ 25,7 bilhões, dos quais os herbicidas correspondem à cerca de 51% do mercado total, seguido pelos inseticidas com 25,9% e fungicidas com 19,4 % (FINEP, 2005).

Os herbicidas substituíram os métodos mecânicos e manuais nos países e locais onde a agricultura mecanizada era praticada. Juntamente com os fertilizantes e as variedades melhoradas, contribuíram para o aumento da produtividade agrícola e para diminuição dos custos, bem como para combater a falta de mão-de-obra. Os efeitos das plantas daninhas sobre a cultura muitas vezes não são perceptíveis ou não são amplamente considerados. Ao se aplicar o herbicida, uma porção deste atinge a cultura presente na área ou em áreas próximas, interagindo com essas plantas e causando efeitos secundários. Existem relatos de diferentes efeitos fisiológicos secundários induzidos por herbicidas (Lyndon & Duke, 1989; Devine et al., 1993). Esses efeitos incluem alterações tanto no metabolismo do nitrogênio e nos níveis hormonais quanto no metabolismo secundário da planta.

Para facilitar o conhecimento das características gerais dos diversos tipos de herbicidas, foi necessário classificá-los levando-se em consideração a época de aplicação, seletividade e modo de ação de grupo químico (Gelmini, 1988).

Considerando que existem várias épocas de aplicação de herbicidas, ressalta-se que as indicações devem ser necessariamente acompanhadas de informações detalhadas sobre o desenvolvimento da cultura e das plantas daninhas. De modo geral, os herbicidas podem ser classificados em herbicidas de pré-plantio ou pré-sementeira, quando um herbicida é aplicado antes do plantio dos cultivares. Quando aplicado após o plantio, é classificado como pré-emergência, e durante a fase em que as plântulas emergem do solo, de pós-emergência.

O herbicida pode ser diferenciado através de sua ação fitotóxica sobre diversas plantas quando aplicado na mesma dose e nas mesmas condições ecológicas, caracterizando sua seletividade. Nota-se que a polaridade, solubilidade, volatilidade e dissociação são propriedades dos herbicidas que exercem influência na seletividade. Nesse contexto, os herbicidas podem ser classificados em seletivos, que são aqueles que, quando aplicados em determinadas quantidades sobre uma população vegetal, apresentam ação fitotóxica à determinadas plantas, porém sem causar danos às outras, e não seletivos ou de ação total, que quando aplicados em determinadas quantidades, conseguem exercer ação fitotóxica em qualquer planta.

Os principais herbicidas de uso não seletivo aplicados em pré ou pós-emergência são: Paraquat (Disseka 200, Gramoxone, Paraquat Colombina, Paraquat Herbitecnica); Glyphosate (Glifosato Nortox, Roundup, Trop); MSMA (Daconate, Dessecan); Diquat (Reglone); Amonium glufosinato (Basta); Paraquat + Diuron (Gramocil, Para-Col F); Diuron (Cention 800, Cention SC, Diuron 500 SC Defesa, Diuron Nortox); Krabutilate (Tandex).

Com relação ao modo de ação dos herbicidas na planta, pode-se dizer que varia conforme as suas propriedades bioquímicas e com os tipos e locais de atividade metabólica em que atuam, provocando reações sintomáticas diversas e características.

Assim, há herbicidas que têm propriedades auxínicas que atuam sobre o crescimento, provocando reações epináticas. Outros interferem no metabolismo das proteínas, na fotossíntese, na respiração ou em outros processos enzimáticos, resultando em inibição da síntese protéica, paralisação da fotossíntese, seja pela não formação de clorofila, seja pela inibição da fotólise da água. Há herbicidas que são desidratantes violentos ou fortes inibidores das reações enzimáticas. As características de absorção e translocação dos herbicidas influem no seu modo de ação. Uns têm ação local, outros se translocam para pontos distantes de aplicação, onde vão atuar.

Quanto ao modo de ação, são classificados como:

Herbicidas de contato: Também conhecidos como cáusticos, provocam necrose rápida nas plantas. São os mais indicados para plantas anuais. Ex: DNOC, DNBP

Herbicidas sistêmicos: Também conhecidos como herbicidas de translocação ou teletóxicos, são absorvidos pelas raízes ou pelas as partes aéreas das plantas. Exercem sua função após a penetração e difusão no interior da planta. Ex: 2,4 D e glifosato.

Herbicida residual: Esses herbicidas são aplicados diretamente no solo e se mostram eficazes para todos os tipos de plantas, impedindo a germinação ou o desenvolvimento de plântulas. Sua ação se prolonga após aplicação. Ex: triazinas, uréias substituídas e nitrilos.

Quimicamente, para Marcondes & Chehata (1984), os herbicidas se classificam em dois grandes grupos: Inorgânicos e Orgânicos. Os herbicidas inorgânicos tiveram seu aparecimento no período entre 1900 e 1940, e são, em sua grande maioria, sais minerais, alguns desses contendo carbono e também ácido sulfúrico. São compostos que, em concentração relativamente elevadas, são altamente tóxicos às plantas e também ao homem. Em concentrações baixas, muitos deles têm efeitos contrários, podendo ser usados como fertilizantes. Os herbicidas inorgânicos mais comumente empregados são os produtos: sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de amônio, cloreto de sódio, bórax, nitrato de sódio, arsenito de sódio, ácido sulfúrico, cianato de sódio, cianato amônio, etc. Atualmente, os herbicidas inorgânicos são pouco usados, em virtude da sua alta toxicidade, que torna dificultosa a sua aplicação.

Ressalta-se que a aplicação de herbicida usado como controle químico vem sendo cada vez mais difundida, em razão de seus resultados serem mais rápidos e eficientes. Por outro lado, como desvantagem do uso dessa prática, menciona-se a necessidade de mão-de-obra especializada e responsável, juntamente a adequada orientação técnica. Além disso, geralmente o grau de controle apresentado se torna variável em função de fatores relacionados com o solo e distribuição de chuvas, podendo-se, ainda, deixar resíduos no solo que venham prejudicar o sistema de rotação de culturas e favorecer a infestação de novas plantas daninhas, devido à quebra do equilíbrio biológico, ou ainda a desenvolver a resistência das ervas daninhas (Gelmini, 1988). Esse fato pode é evidenciado no Brasil com a existência de nove espécies resistentes aos herbicidas: leiteira ou amendoim-bravo (*Euphorbia Heterophylla*), picão preto (*Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*), papuã ou capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*), sagitária (*Sagittaria montevidensis*), capim-arroz (*Echinochloa colonum*), junquinho (*Cyperus ferax*), capim-colchão (*Digitaria horizontalis*) e cuminho (*Fimbristylis miliacea*). Dessas, as mais preocupantes são *E.*

Heterophylla e *Bidens spp*, devido ao impacto econômico causado na agricultura nacional, principalmente na região Brasil-Paraguai, refletindo diretamente na redução de 80 % de culturas de soja no Rio Grande do Sul (Kriszmann & Groth, 1992, Bianchi, 1996, Winkler et al., 2002).

2.3 Glifosato

Segundo Kertesz et al. (1994), o glifosato, também conhecido como [n,(fosfometil)glicina], pertence ao grupo da glicina, possui fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m = 169,1 g/mol) e faz parte da classe de compostos conhecidos como ácidos fosfônicos, que contém uma ligação direta de carbono-fósforo (C-P). Embora essa ligação seja quimicamente estável, os microorganismos possuem habilidade enzimática de clivá-la, liberando o fosfato inorgânico (Araújo, 2002). De um modo geral, trata-se de um herbicida não seletivo, sistêmico e pós-emergente, classe toxicológica IV, isto é, pouco tóxico (Andrei, 1999).

Desde 1971, quando a ação herbicida do glifosato foi pela primeira vez relatada, as composições comerciais do produto se apresentam na forma de sal solúvel em água, uma vez que a sua forma ácida apresenta baixa solubilidade em água, da ordem de $1,2 \text{ g L}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Franz, 1985). Essas fórmulas encontram-se na forma de concentrados aquosos, a fim de facilitar a aplicação e incluem o sal de amônio, sais de alquilamina (como o de isopropilamina), sais alcalinos (como os de sódio e potássio) e o sal de trimetilsulfônio. Os principais produtos comerciais são o Roundup, patenteado pela Monsanto, e o Glifosato Nortox, patenteado pela Nortox. A Monsanto também detém a patente do Command, que é uma mistura entre o glifosato (120g/L) e o 2,4 D (160 g/L), utilizada em operações de manejo.

No Brasil, o glifosato tem sido amplamente utilizado, principalmente como dessecante em cultivos sob plantio direto, nas entrelinhas de culturas e na eliminação de plantas daninhas de ambientes aquáticos, sendo mais comumente comercializado na concentração de 48% (m/v) (Rodrigues & Almeida, 1995).

Quando aplicado, é absorvido pelas folhas das plantas, atuando sobre a atividade enzimática, inibindo a enzima 5-enolpiruvishikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS), e, conseqüentemente, interferindo na biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (Robert et al., 1998) e de compostos secundários como alcalóides e flavonóides

(Anderson & Johnson, 1990). Na maioria dos casos, esse herbicida não é metabolizado pela planta, o que se explica pela seletividade. Entretanto, as plantas geneticamente alteradas, com resistência induzida, apresentam seletividade ao glifosato.

Sob a maioria das circunstâncias de aplicação, a eficiência do glifosato pode ser significativamente aumentada incluindo um ou mais surfactantes na composição a ser aplicada. Acredita-se que os surfactantes facilitem a penetração do herbicida, um composto que é normalmente hidrofílico, através da cutícula hidrofóbica que recobre normalmente as superfícies externas de plantas mais elevadas (Kirby et al, 2005).

Wyrill e Burnside (1977) conduziram um estudo avaliando diferentes classes de surfactantes como agentes para aumentar a atividade herbicida do glifosato, aplicada como sal de isopropilamina, e verificaram que, dentre os surfactantes avaliados, os mais eficazes foram as aminas terciárias e quartenárias etoxiladas EO (óxido de etileno).

A utilização do sistema de aplicação pós-emergência é normalmente feita em plantas anuais e perenes, sendo que, o volume aplicado varia entre 1 e 3 L.ha⁻¹ em culturas anuais e entre 4 e 6 L.ha⁻¹ em culturas perenes (Almeida & Rodrigues 1985). Os sintomas da aplicação na planta tratada desenvolvem-se lentamente, podendo se manifestar em até 10 dias sob condições de clima quente e úmido, ou em até 30 dias em condições de clima frio ou seco (Vidal, 2002).

Apesar do glifosato não ser persistente no meio ambiente, o conhecimento detalhado sobre sua biodegradação em solos brasileiros, bem como sobre os grupos de microorganismos capazes de degradar este composto, é relativamente pequeno (Araújo, 2002). Monteiro (2001) descreve os microorganismos, entre os quais, bactérias e fungos, como os principais degradadores de pesticidas, disponibilizando nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo), em processo conhecido como mineralização.

Quando no ambiente, o glifosato tende a ser inativo em contato com o solo, desde que seja adsorvido por este. Mesmo com este mecanismo não sendo totalmente compreendido, supõem-se a ocorrência de ligações similares às do fosfato inorgânico. Segundo Liu et al. (1991), a degradação do glifosato no solo pode seguir duas rotas. A primeira consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA). O AMPA é degradado via transaminação formando formil fosfonato, o qual se decompõe em formaldeído e fosfato inorgânico. O formaldeído pode então ser incorporado diretamente a metabólitos decompondo-se a CO₂ que subsequente pode ser fixado através da fotossíntese (Coupland, 1985). A segunda rota,

pouco citada na literatura, consiste na transformação do glifosato em sarcosina, por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase), onde a sarcosina adentra no metabolismo desses microorganismos, degradando-se. Essas rotas são demonstradas na Figura 1. Convém esclarecer, ainda, que aproximadamente 50% da molécula original é metabolizada em 28 dias, chegando a 90% em 90 dias (Almeida & Rodrigues, 1985).

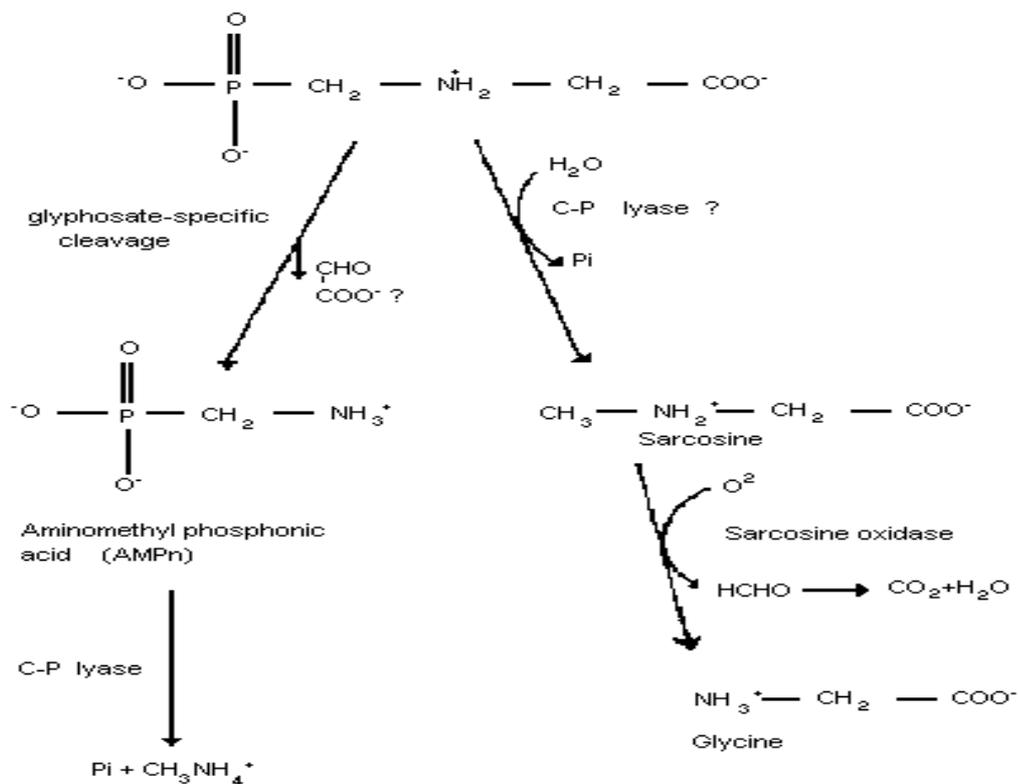


Figura 1. Rotas de degradação do glifosato no solo (Liu et al., 1991).

Devido a sua adsorção no solo, o glifosato não é facilmente lixiviado, sendo pouco provável a contaminação de águas subterrâneas. Em raras ocasiões, o pesticida tem sido detectado em amostras de água. No entanto, isso pode ocorrer, devido à dificuldade de separação do composto (Amarante et al, 2002).

Com relação a modalidade química de ação, esse herbicida acaba sendo considerado de baixa toxicidade, uma vez que o composto age mediante caminho metabólico nas plantas, similar ao existente em alguns microorganismos mais complexos, mas inexistente em animais. Ressalta-se, ainda, que alta solubilidade do glifosato formulado em água e baixa solubilidade em lipídios sugerem que ele não deveria bioacumular. No entanto, estudos desenvolvidos por Richard et al. (2005) evidenciaram a bioacumulação do Roundup, ocasionando problemas em células de placenta humanas.

Para a realização de estudos do comportamento de glifosato (e vários outros herbicidas) no solo, lança-se mão do uso de radioisótopos (traçadores radioativos). Por se tratar de uma molécula orgânica, o elemento químico radioativo de destaque é o ^{14}C , que possui meia-vida extremamente elevada. No entanto, o uso de moléculas radiomarcadas tem sido desencorajado, principalmente devido à geração de resíduos perigosos contendo substâncias radiomarcadas, que não podem ser incinerados.

A eficiência do glifosato, bem como de outros herbicidas, no combate às ervas daninhas, esbarra nos problemas que esses compostos acabam proporcionando ao meio ambiente. Embora estudos venham sendo realizados para elucidar o comportamento de herbicidas no meio ambiente (Souza, 1994; Fornali et al., 1999; Prata et al., 2000; Pinto & Jardim, 2000; Azevedo et al. 2000; entre outros), a complexidade do comportamento desses compostos abre caminho para realização de um número significativo de trabalhos de pesquisa.

Considerando que o glifosato apresenta baixo custo relativo e excelente eficiência agrônômica, a introdução de variedades resistentes, provavelmente, resultará no aumento das taxas de aplicação desta molécula numa mesma área. Assim, os cuidados relacionados à possibilidade de contaminação do ambiente com esta molécula devem ser avaliados cautelosamente (Prata, 2002). Dentro desse contexto, torna-se necessária a realização de estudos do glifosato relacionado a suas propriedades físico-químicas, interações na água e no solo, bem como o desenvolvimento de ferramentas analíticas que possibilitem a sua detecção e quantificação em amostras naturais.

2.4 Métodos de obtenção do glifosato

O glifosato pode ser obtido através de vários métodos patenteados, entre os quais, destacam-se:

- Hershman (U.S.Pat. N° 3,969,398) descreve um processo de preparação do glifosato empregando ácido iminodiacético, formoldeído e ácido fosforoso. O produto formado, N-fosfonometiliminodiacético, é oxidado com oxigênio molecular, na presença de um catalisador (carbono ativo), dando origem ao glifosato.

- De acordo com o processo desenvolvido por Gaertner (US Pat. N° 4,094,928), através da reação entre os ácidos glioxílico éster e aminometilfosfônico, produz-se inicialmente o carbonilaldiminometanofosfato, que será reduzido e hidrolizado ou oxidado a n-fosfonometilglicina (rendimento de aproximadamente 45%).

- Franz (U.S. Pat. N° 3,799,758) descreve a preparação do glifosato através da reação entre o etil glicinato ou glicina, formoldeído e dietil fosfito. Um processo alternativo descrito pelo mesmo autor envolve a fosfonometilação da glicina com o ácido clorometilfosfônico, na presença de hidróxido de sódio.

- O processo proposto por Ehrat (U.S. Pat N° 4,237,065) envolve a utilização de glicina formoldeído e uma base terciária em solução alcoólica. Após completar a reação, adiciona-se dietil fosfito e promove-se a alcalinização do meio com solução de NaOH. O produto da reação é hidrolizado e acidificado com ácido clorídrico.

- Moser (U.S. Pat. No 4,369,142) descreve o método de obtenção do N-fosfonometilglicina através da reação entre o ácido aminometilfosfônico, em meio aquoso, com glioxal, na presença de dióxido de enxofre (rendimento de 48%).

- Rogers (U.S. Pat. No 4,568,432) obteve o N-fosfonometilglicina condensando a glicina com ácido formilfosfônico. O produto foi reduzido através da hidrogenação catalítica, dando origem ao n-fosfonometilglicina.

2.5 Isótopos Estáveis como traçadores isotópicos (^{15}N)

O uso dos isótopos como traçadores é uma das técnicas nucleares mais difundidas, em todo mundo, em pesquisa na área agrônômica.

Os isótopos são elementos químicos que apresentam mesmo número atômico, mas número de massa diferente e que se encontram dispostos na natureza em proporções diferentes. O estudo da diferença de concentração desses elementos em meios distintos permite que se avalie o destino de cada um deles, razão pela qual eles são denominados traçadores.

Entre os isótopos, existem aqueles que emitem radiação (alfa, beta e gama), e são chamados de radioativos ou radioisótopos, e aqueles que não emitem, que são denominados de estáveis. Os isótopos estáveis são considerados traçadores naturais, e são mais fáceis de serem usados porque não requerem cuidados especiais no manuseio.

Naturalmente, ocorrem dois isótopos estáveis de nitrogênio (^{14}N e ^{15}N). Estes isótopos apresentam abundância isotópica natural de 99,63 e 0,37 % em átomos para o ^{14}N e ^{15}N respectivamente (Lide, 1997). A existência do isótopo pesado do nitrogênio ^{15}N possibilita a produção de compostos marcados ou enriquecidos neste isótopo, caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. Essa vantagem destaca o ^{15}N como um dos isótopos estáveis mais utilizados como ferramenta de pesquisa.

O nitrogênio é um dos mais importantes nutrientes das plantas, sendo o elemento que mais limita a produção agrícola. Em seu desenvolvimento, algumas plantas podem utilizar o nitrogênio do ar com o auxílio de alguns tipos de bactérias existentes no solo ou na própria planta (fixação biológica de nitrogênio). O uso do isótopo ^{15}N permite estabelecer a proporção do nitrogênio contido na planta proveniente do solo, da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e também dos adubos. O conhecimento do potencial da FBN em suprir nitrogênio para as plantas permite reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados nos sistemas de produção, contribuindo para a economia na produção agrícola e para a redução dos riscos de poluição pelo uso de produtos químicos (Teixeira, 2002). Sendo assim, é enfatizada a importância do uso de traçadores estáveis na elucidação de aspectos relacionados à utilização desse nutriente pelas plantas cultivadas (Trivelin et al., 1996).

Considerando que o nitrogênio também integra a composição química da maioria das proteínas presentes no organismo humano e animal (Leninger, 1980), torna-se possível a

realização de estudos de metabolismos bioquímicos em humanos empregando moléculas apirogênicas.

Dichi et al. (1996) utilizaram o isótopo estável marcado com ^{15}N na forma do aminoácido glicina para avaliar o ritmo do “turnover” protéico in vivo. Esse estudo permitiu a obtenção em curto período de tempo (9 h), de informações sobre o fluxo nitrogenado (^{15}N -amônia da urina), administrado através de dose única, por via oral, de glicina ^{15}N .

Manetta & Benedito-Cecilio (2003) salientam a importância dos isótopos estáveis de ^{15}N e ^{13}C na conservação de animais aquáticos, considerando que os impactos antrópicos ameaçam áreas específicas de alimentação, reprodução e crescimento de espécies em ambientes naturais. Esses autores utilizaram os isótopos estáveis para obter a taxa de “turnover” em animais aquáticos, considerando que esse consiste na síntese do novo tecido e na substituição dos tecidos velhos, utilizando a composição da dieta atual do animal.

Com relação aos radioisótopos do nitrogênio destaca-se o ^{13}N , que apresenta meia-vida de 9,7 min, inviabilizando o seu emprego na maioria dos estudos. Trabalhos empregando moléculas radiomarcadas no ^{13}N são de difícil condução, incorrendo em resultados algumas vezes equivocados (Knoules & Blackburn, 1993).

Dentro desse contexto, apesar do ^{13}N apresentar vantagens relacionadas ao menor custo (Hauck & Bremner, 1976) o uso de isótopos estáveis tem sido preconizado sempre que possível, sobretudo em experimentação de campo e com seres vivos.

Com relação aos herbicidas orgânicos, a maioria dos estudos é conduzida com emprego de compostos radiomarcados no ^{14}C , incluindo a molécula do glifosato. Essa aplicabilidade deriva, em grande parte, de ser factível a realização de estudos de degradação de um produto orgânico no solo.

Por outro lado, a utilização do isótopo estável ^{15}N , requer a disponibilidade de compostos enriquecidos no isótopo e de espectrômetro de massas para a determinação isotópica. A utilização de isótopos estáveis demanda custos superiores, quando comparado com experimentos em que se utilizam compostos radiomarcados, empregando a técnica de cintilação líquida para detecção. No entanto, apesar de o fator custo representar uma desvantagem, esta é superada pelo aspecto de segurança, ausência de resíduos radioativos (cintilação) e principalmente em trabalhos de campo. Cabe ressaltar que há uma tendência internacional voltada para o uso dos isótopos estáveis em trabalhos de campo, sempre que possível, restringindo, desta forma, o uso de compostos

radiomarcados em experimentos dessa natureza (Zhao et al., 2001; Trivelin, 2002). Jacob et al. (1988), objetivando avaliar o metabolismo do glifosato em *pseudomonas* sp, utilizaram-se do glifosato duplamente marcado no ^{13}C e ^{15}N . Gard et al. (1997), utilizaram a Triple Resonance Isotope Edited NMR Spectroscopy (TRIED) em estudos do metabolismo do glifosato através de microorganismos do solo, utilizando também o glifosato duplamente marcado no ^{13}C e ^{15}N .

Diante do exposto, o desenvolvimento de métodos para a produção de compostos marcados em seus isótopos estáveis tem sido estimulado por possibilitar a obtenção de informações refinadas sobre o ciclo de seus elementos constituintes. Neste sentido, a síntese do herbicida glifosato marcado em ^{15}N é de potencial interesse em pesquisas agrônomicas, uma vez que poucos estudos são citados na literatura brasileira envolvendo o uso de glifosato marcado com ^{15}N , em virtude da falta de disponibilidade desse composto no mercado e devido ao custo de produção. O glifosato marcado no ^{15}N , cuja obtenção foi o objetivo do trabalho, constitui-se numa importante alternativa para avaliações da dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta. A princípio, a produção do composto marcado foi encorajada pelo potencial de utilização na compreensão do ciclo do N. Outros fatores determinantes estão relacionados ao domínio pelo Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (LIE-CENA/USP) da tecnologia de separação e produção de compostos enriquecidos no isótopo de ^{15}N no Brasil, o que notadamente restringe-se a países desenvolvidos, e à possibilidade de disponibilizar uma ferramenta que evitará a geração de resíduos radiomarcados, sendo essa (evitar a geração) a mais importante prática a ser adotada dentro de uma hierarquia de gestão de resíduos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Material*

3.1.1 *Equipamentos e Acessórios*

Dentre os equipamentos utilizados, pode-se citar um espectrômetro de massas do tipo ANCA – SL 20/20 da Europa Scientific, empregado nas análises isotópicas de amostras sólidas e líquidas. O espectrômetro de massas de fluxo contínuo (CF-IRMS) foi empregado para a determinação do teor de N e abundância isotópica (% átomos de ^{15}N) nas amostras sintetizadas de glicina e do glifosato.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos num espectrofotômetro de IV Nicolet, modelo IR 200, que opera na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} e utiliza pastilhas de KBr. O TLC e o HPLC também foram utilizados na caracterização das amostras comparadas ao padrão (sigma).

O sistema de refluxo utilizado na síntese do herbicida foi constituído de um balão de fundo chato acoplado a um condensador de bolas, e demais acessórios.

3.1.2 *Reagentes*

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo: hidróxido de sódio, ácido cloroacético, dietil fosfito, ácido clorometilfosfônico, trietilamina, metanol, paraformaldeído, n-fosfonometilglicina (glifosato) padrão, glicina enriquecida a 6,7 e a 0,9% átomos de ^{15}N e com abundância isotópica natural.

3.1.3 Padrões de glifosato

Para os estudos comparativos realizados através das análises de HPLC, infravermelho e IRMS, foi utilizado o glifosato ácido padrão sigma e Agritec, e glifosato formulado Agritec (fornecido por uma empresa privada).

3.1.4 Sistemas de Colunas

3.1.4.1 Obtenção de $^{15}\text{NH}_4^+$

O LIE possui três sistemas de colunas (Sistema 1:7 colunas de resina com diâmetro de 14,5 cm e comprimento de 200 cm; Sistema 2:7 colunas de resina com diâmetro de 9,5 cm e comprimento de 200 cm; e Sistema 3:7 colunas de resina com diâmetro de 5,0 cm e comprimento de 200 cm), preenchidas com resina catiônica DOWEX 50W X8, objetivando a produção de $^{15}\text{NH}_4^+$ com elevado enriquecimento isotópico (Máximo et al., 2000).

O sulfato de amônio com elevado enriquecimento, obtido pela técnica de cromatografia de troca iônica em sistema cascata, pode ser utilizado para obtenção de amônia aquosa- ^{15}N , glicina- ^{15}N e posteriormente glifosato- ^{15}N . O glifosato altamente enriquecido (pequena massa) pode ser empregado para obtenção de maior quantidade do herbicida com menor enriquecimento, utilizando-se do método de diluição isotópica. Na Figura 2 são ilustrados os três sistemas de resina catiônica utilizados para produção de amônio- ^{15}N com elevado enriquecimento no isótopo ^{15}N .



Figura 2. Sistema de colunas preenchidas com resina catiônica utilizada para produção do íon NH_4^+ com elevado enriquecimento no isótopo ^{15}N .

3.1.4.2 Purificação do ácido clorometilfosfônico

Os testes de purificação foram realizados em coluna de 7 cm de altura e 6 cm de diâmetro interno, preenchida com 2 ml de resina aniônica grupo forte DOWEX 2X 8 (grupo funcional amônio quartenário, granulometria de 100-200 “mesh”). A Figura 3 ilustra a coluna utilizada no processo.

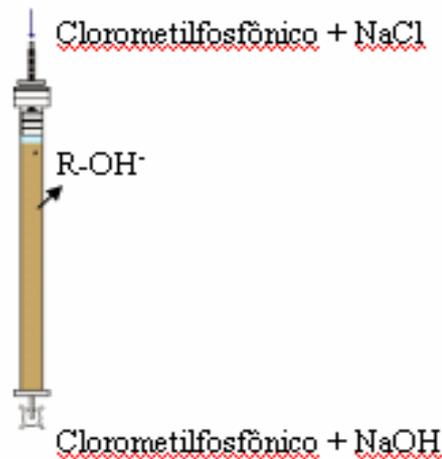


Figura 3. coluna utilizada na purificação do clorometilfosfônico

3.1.5 Resinas de troca iônica

3.1.5.1 Resina catiônica DOWEX 50W X8

Resina catiônica DOWEX 50W X8 com as especificações: fortemente ácida tipo poliestireno-divinilbenzeno (DVB) com 8% de DVB; grupo funcional sulfônico; malha 100-200 com diâmetro das pérolas de 74-149 μm ; capacidade de troca catiônica (H^+) de 1,7 meq H^+ mL^{-1} (resina úmida, equilibrada em água).

3.1.5.2. Resina aniônica DOWEX 2X8

As características da resina aniônica DOWEX 2X8 são: teor de 8% de polimerização com divinilbenzeno (DVB), grupo funcional $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})$; malha 100-200 e capacidade de troca aniônica (Cl^-) de 3,2 mmol g^{-1} (resina seca) e 1,33 meq ml^{-1} (resina úmida, equilibrada em água).

3.2.1.1 Obtenção do $^{15}\text{NH}_4^+$

A separação dos isótopos de nitrogênio é realizada utilizando-se da reação de troca isotópica entre a amônia em solução aquosa e cátion NH_4^+ adsorvidos em resinas de troca catiônica do tipo sulfônico (DOWEX 50W X8), contidas em sistemas de colunas (Trivelin, 1979; Máximo, 1998). No processo, uma banda de íon amônio desloca-se pela coluna de resina, utilizando-se como eluente solução de NaOH $0,8 \text{ mol L}^{-1}$. Essa solução, ao ser admitida no topo da coluna de resina, carregada com íons NH_4^+ ($\text{NH}_4^+\text{-R}$), promove a formação de uma banda de íons NH_4^+ , em decorrência da interação entre o íon NH_4^+ adsorvido e o íon Na^+ da solução eluente como demonstrado na Figura 5. O sistema de colunas utilizados no enriquecimento do íon NH_4^+ está descrito no item 3.1.4.1

O $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtido pela técnica de cromatografia de troca iônica foi utilizado no presente trabalho para a produção de $^{15}\text{NH}_3(\text{aq})$ (Máximo et al, 2000).

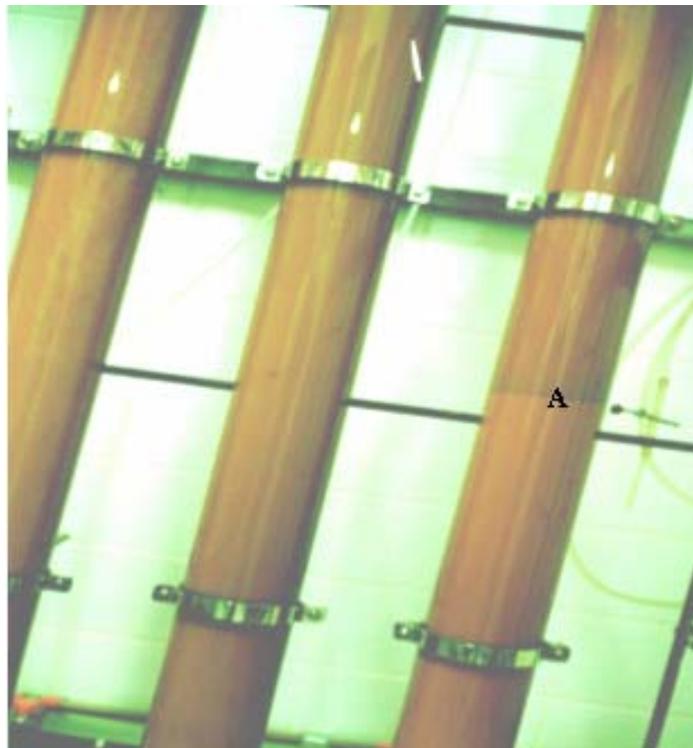
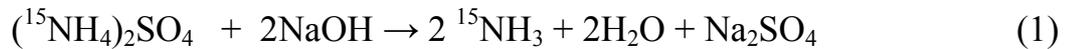


Figura 5. Coluna de cromatografia utilizada no enriquecimento de ^{15}N ; Em destaque (A), a traseira de uma banda do íon NH_4^+

3.2.1.2 Produção de amônia aquosa-¹⁵N

O sistema completo para a produção de amônia aquosa está esquematizado na Figura 6, que apresenta o balão volumétrico modificado (1 L), contendo duas entradas (E1 e E2). Através da entrada E1, admite-se o gás de arraste (N₂) e pela entrada E2 a solução de hidróxido de sódio 20 mol L⁻¹. No início, admite-se ao balão a solução de sulfato de amônio e no reator de aquamônia (R1) a água desionizada. As massas de sulfato de amônio (solução de sulfato de amônio) e água desionizada (R2) foram definidas em função da quantidade de amônia anidra que se pretende obter e da concentração de nitrogênio (%N) na solução final de aquamônia.

Na produção de aquamônia, após a montagem completa do sistema, foi admitido em E2 um volume de solução de hidróxido de sódio 20 mol L⁻¹, que representa 50% em excesso na solução final. Em seguida, aqueceu-se a solução do balão até a temperatura de 70°C, ocorrendo a liberação de amônia de acordo com a reação detalhada na equação (1):



A amônia (NH₃) e o vapor de água são arrastados do balão de reação por um fluxo de N₂, passando pelo condensador Allihn, onde o excesso de vapor de água é condensado. No condensador é mantido um fluxo de água (0 a 5°C) de 3 L min⁻¹ em circuito fechado, com auxílio de um circulador de água. Após esse estágio, a amônia contendo traços de vapor de água passa por uma coluna preenchida com pastilha de NaOH (reagente dessecante), onde fica retido todo vapor de água presente junto à amônia.

Os estágios seguintes promovem a liquefação da amônia por abaixamento de temperatura. Preliminarmente, tem-se um trocador de calor (serpentina de vidro) mergulhado em banho de gelo seco e etanol, à temperatura aproximada de -33°C, onde a amônia passa ao estado de vapor saturado. Na etapa subsequente, a amônia é liquefeita no interior do reator de aço inoxidável R1, imerso em banho de gelo seco/etanol (-73°C). A massa de água desionizada admitida em R2 foi previamente estabelecida em função da concentração desejada de N-amônia na solução final. Após períodos pré-estabelecidos e anteriormente à fase de hidratação da amônia anidra, aumenta-

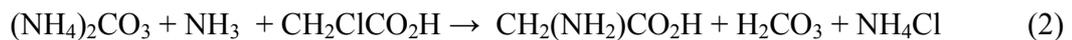
se o fluxo de gás N_2 de 200 para $350 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. A quantidade de amônia liberada nesta etapa, definida como amônia residual, foi recebida no recipiente C1, em quantidade equivalente de solução de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} (Bendassolli et al, 2002). Algumas adaptações foram realizadas recentemente na linha do produção de amônia a fim de facilitar o manuseio do sistema e aumentar a recuperação de N.



Figura 6. Linha de produção de amônia anidra e aquosa, sendo E1 – entrada do gás de arraste; E2 – entrada de soluções; R1 – reator de aquamônia em aço inoxidável; R2 – massa de água desionizada; e C1 – trap contendo H_2SO_4

3.2.1.3 Síntese da glicina

A metodologia utilizada na síntese da glicina é uma adaptação da inicialmente proposta por Vogel, (1981). Segundo esse autor, a síntese ocorre de acordo com a equação (2)



Nesta, inicialmente dissolvem-se em um balão de capacidade volumétrica de 700 mL, 180 g de carbonato de amônio em 150 mL de água morna ($40-50^\circ \text{ C}$). Após atingir a temperatura ambiente, adicionam-se 200 mL de solução concentrada de amônia, e na seqüência introduz-se

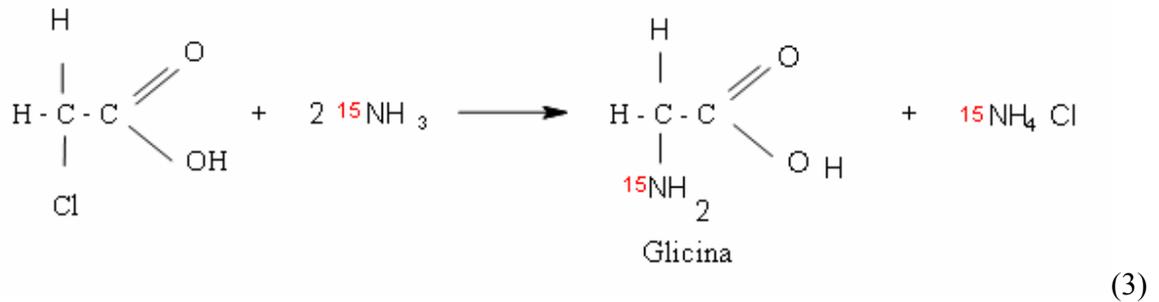
lentamente uma solução composta de 50 g de ácido cloroacético em 50 mL de água. Em seguida, o balão é fechado e permanece em repouso por 24 – 48 horas, à temperatura ambiente. Após esse período de repouso, a solução é concentrada até volume final de 100 mL, e em seguida inicia-se o processo de purificação, com adição de 400 mL de álcool metílico. O aminoácido é então levado para um refrigerador e mantido à temperatura de 4°C. Após a filtração do aminoácido, os cristais são suspensos com 150 mL de álcool metílico, filtra-se novamente o aminoácido e em seguida dissolve-se os cristais em 50 mL de água aquecida. Finalmente, a última etapa consiste em precipitar novamente o aminoácido com 200 mL de álcool metílico. A massa de glicina obtida deve ser em torno de 25 g de (rendimento de aproximadamente 60%).

Oliveira (2001) constatou que a utilização do carbonato de amônio, ao sintetizar a glicina marcada, provoca uma diluição isotópica de aproximadamente 50% utilizando como fonte nitrogenada marcada somente a amônia aquosa. Considerando que a diluição era indesejável, estudou-se a possibilidade de produzir o carbonato de amônio marcado com ^{15}N . No entanto, observou-se que o procedimento é moroso e as perdas de N no ambiente durante o processo são altas tornando o método inviável, principalmente ao se trabalhar com nitrogênio marcado.

Buscando adaptar o método inicialmente proposto por Vogel (1981), às condições oferecidas no LIE-CENA/USP, Oliveira (2001) estudou a possibilidade de eliminar a utilização do carbonato de amônio, mantendo os demais reagentes com estequiometria inalterada. Constatou-se que o rendimento da reação não foi superior a 10%, mas, no entanto, as perdas de nitrogênio foram sensivelmente reduzidas, atingindo valores em torno de 11%, que são bastante inferiores às perdas de 35% verificadas quando da utilização concomitante do carbonato de amônio.

No presente trabalho, utilizou-se a metodologia adaptada por Oliveira (2001) na síntese da glicina, procedendo-se pequenas alterações no processo de purificação do aminoácido com metanol.

A reação entre amônia aquosa concentrada em (obtido como descrito em 3.2.1.2) e ácido cloroacético ocorreu de acordo com equação (3).



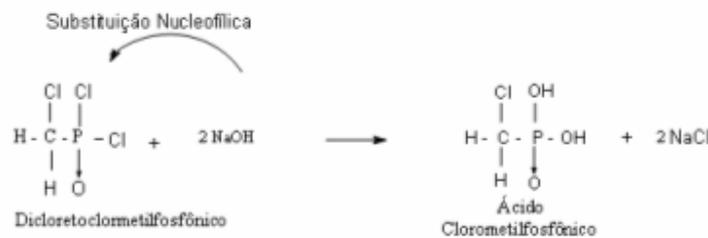
No procedimento, inicia-se a reação no balão adicionando lentamente, sob agitação, a solução contendo 25 gramas de ácido cloroacético em 25 ml de água, em 100 ml de amônia aquosa concentrada (25 % m/v). O balão de reação foi deixado em repouso por um período de 24 h, à temperatura ambiente. Ao final do tempo estabelecido, a mistura contida no balão foi transferida para sistema de concentração, à pressão sub atmosférica, sendo o volume reduzido para aproximadamente 20 ml. Na seqüência, o aminoácido sintetizado, contido na solução concentrada, foi cristalizado com adição de metanol, sendo posteriormente resfriado à temperatura de 4°C por 4-6 horas, para permitir a completa cristalização. O $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, que constitui a principal impureza no processo de síntese, foi removido repetindo-se por mais duas vezes a cristalização com metanol.

A recuperação do $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ se torna necessária por conter o isótopo ^{15}N , e a do metanol devido a sua toxidez. A recuperação do metanol foi realizada no evaporador rotativo, a baixa pressão, o mesmo utilizado na concentração do aminoácido. A $^{15}\text{NH}_3$ em excesso foi recuperada em sistema de armadilhas químicas contendo ácido sulfúrico 6 mol L⁻¹, acopladas ao sistema de concentração, conforme proposto por Oliveira (2001). Os testes foram realizados em duplicatas, com redução na escala (2 vezes) em relação as condições inicialmente previstas.

As determinações do teor de N (%) nas amostras com abundância isotópica natural e determinação isotópica na amostra de glicina enriquecida foram realizadas por espectrometria de massas (Barrie & Prosser, 1996) em duas amostras de glicina com abundância isotópica de 6,7 e 0,9% átomos de ^{15}N . As determinações da concentração de amônia presente no início da reação, no final (excesso) e a pureza do aminoácido obtido foram realizados fazendo-se uso da destilação por arraste a vapor.

3.2.1.4. Produção do ácido clorometilfosfônico, a partir do dicloreto clorometilfosfônico

A síntese do glifosato envolve reação de substituição entre o ácido clorometilfosfônico e glicina. Devido à dificuldade de aquisição do referido ácido no mercado, foi necessário sintetizá-lo em laboratório. O método avaliado envolveu a reação de substituição nucleofílica entre o dicloreto clorometilfosfônico e solução de NaOH 10% (m/v), de acordo com a reação apresentada na equação (4).



(4)

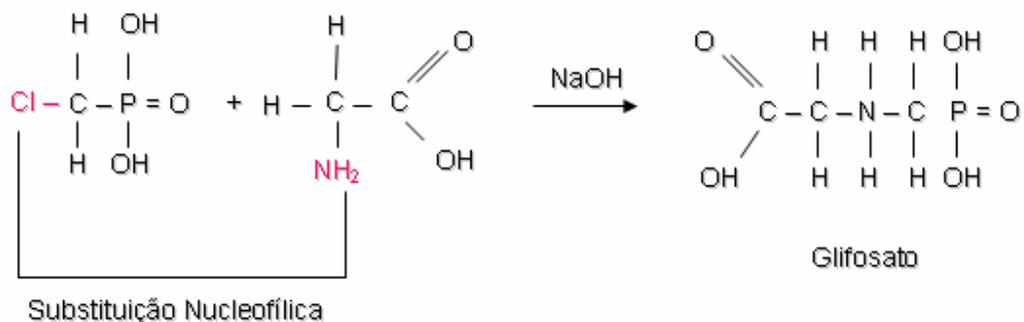
A reação ocorreu em micro escala, e a estequiometria da mesma foi avaliada. Inicialmente, a resina foi carregada à forma de hidroxila (R-OH⁻) com solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹. Na seqüência, fluiu-se no sistema (fluxo de 0,3 ml min⁻¹) a solução proveniente da reação, contendo o ácido clorometilfosfônico e cloreto de sódio (Na⁺ + Cl⁻). Em seguida, fluiu-se água desionizada na coluna para permitir a lavagem do sistema, sendo o volume amostrado a cada mL para medida do pH e concentração de OH⁻ (titulometria). Na próxima etapa, os radicais Cl⁻, retidos nos sítios ativos da resina, foram deslocados pelos ânions OH⁻ (regeneração). Foram coletadas amostras a cada 1 mL do volume eluído e procederam-se determinações de OH⁻ por titulometria e Cl⁻ por injeção em fluxo e espectofotometria colorimétrica (Zagatto et al., 1981).

Previamente ao preenchimento da coluna, a resina foi lavada várias vezes com água desionizada, com a finalidade de retirar partículas de impurezas e traços de resíduos orgânicos do processo de síntese. A etapa de lavagem se deu em sistema “batch” (Abrão, A. 1972; Collins et al., 1997), sendo o procedimento repetido por 5 vezes.

3.2.1.5 Síntese do glifosato a partir do ácido clorometilfôsfônico (Patente n° 3,799,758 - 1974)

O glifosato ácido pode ser obtido a partir do ácido iminodiacético (IDA), na presença de um ácido inorgânico (geralmente ácido clorídrico ou sulfúrico), ocorrendo uma reação de metilação, utilizando-se para tanto o formaldeído. Em seguida, é feita uma reação de fosfonação, usando-se um componente à base de fósforo, que pode ser o ácido fosforoso ou o tricloreto de fósforo. O produto então é purificado, centrifugado e seco, obtendo-se o ácido N-fosfonoiminodiacético (PIA). A partir desse intermediário, é feita uma reação de oxidação, utilizando-se, por exemplo, o peróxido de hidrogênio ou qualquer outro oxidante ou catalisador, obtendo-se o N-fosfometilglicina (glifosato ácido).

Outro rota de síntese, proposta por Franz et al. (1974), descreve a reação de substituição nucleofílica entre o ácido clorometilfôsfônico e a glicina, em condições equimolares, de acordo com a reação representada na equação (5).



(5)

Na síntese em questão, em um balão de reação, são adicionados 50 partes de glicina, 92 partes de ácido clorometilfosfônico, 50 partes de solução de hidróxido de sódio 50% (m/v) e água. A solução é mantida sob refluxo enquanto adicionam-se, lentamente, se necessário, solução 50% (m/v) de hidróxido de sódio, com a finalidade de manter o pH de reação entre 10 e 12. Após concluído o tempo de reação (20 horas), a solução é resfriada a temperatura ambiente e filtrada. Na seqüência, adicionam-se 160 partes de ácido clorídrico concentrado e realiza-se a filtração,

obtendo-se um sólido branco insolúvel em água e em solventes orgânicos, que deve se decompor em temperatura entre 200 a 230°C. A Figura 7 ilustra o sistema utilizado nesse método de síntese.

Ensaio preliminares foram realizados em triplicata fazendo-se uso da glicina com abundância isotópica natural (0,366% át de ^{15}N). As determinações analíticas objetivando confirmar a presença do herbicida, após a síntese, foram realizadas por teste de fusão, infravermelho e por espectrometria de massas.

Os testes de fusão foram realizados em cadinhos de porcelana e em mufla programada para atingir a temperatura constante de 230°C. Espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos com um espectrofotômetro de IV Nicolet, modelo IR200, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} e as análises para determinação do teor de N foram realizadas no espectrômetro de massas ANCA-SL 20-20. As amostras sintetizadas foram comparadas com o padrão sigma.



Figura 7. Sistema em micro escala utilizado na rota de síntese do glifosato.

3.2.1.6 Síntese do glifosato a partir do diaquil fosfito e glicina (Patente Nº 4, 237,065 - 1980)

A patente supracitada relata um processo para obtenção do glifosato, em várias etapas, proposta por Ehrat (1980), visando a utilização de reagentes de baixo custo e de fácil acesso no

mercado, bem como a isenção de métodos de purificação no produto final. A reação pode ser visualizada através do fluxograma apresentado na Figura 8.

De acordo com a síntese proposta, o paraformaldeído é dissolvido em um álcool, com simultânea despolimerização, na presença de uma base terciária (agente catalisador). Na solução obtida adiciona-se glicina, formando o hidroximetilglicina como intermediário. Esse intermediário reage imediatamente, sob refluxo, com o dietil fosfito adicionado. O éster formado é saponificado com a adição de solução de NaOH 30% (m/v), sendo que, após esta etapa, a base terciária e o álcool são removidos. Finalmente, a solução alcalina obtida é acidificada com precipitação do N-fosfonometil glicina.

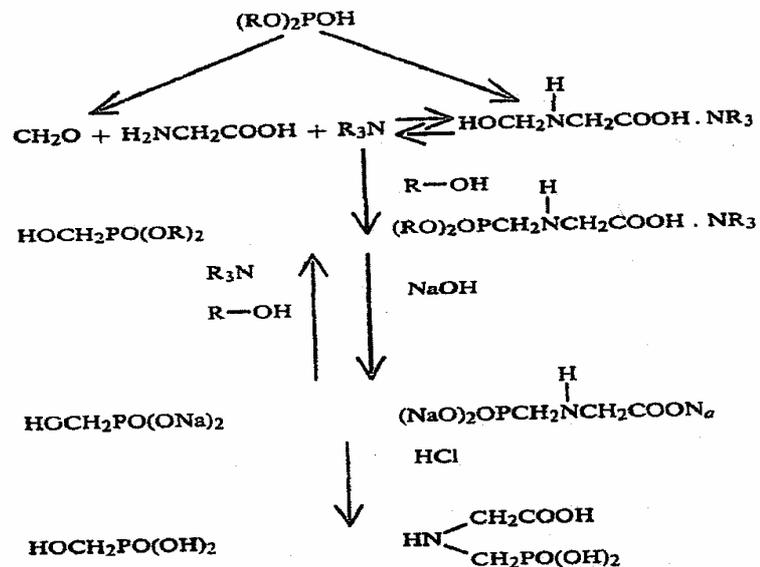


Figura 8. Rota de reação para obtenção do glifosato ácido a partir do dietil fosfito

Em condições particulares, o aminoácido glicina pode ser considerado uma simples amina solúvel em álcool ou em água. A glicina reage surpreendentemente como uma amina na reação de Mannich, envolvendo formaldeído, amina e dietil fosfito, resultando em fosfonometil amina. No entanto, nas condições estabelecidas pela invenção patenteada, a reação de Mannich não resulta em uma amina, mas sim no n-fosfonometil glicina.

Nessa reação, inicialmente, 1,5 mols de paraformaldeído são dissolvidos em 500 mL de metanol, com simultânea despolimerização, na presença de 1 mol de trietilamina (base terciária). À solução obtida, adiciona-se 1 mol de glicina, que irá reagir com o formaldeído, oriundo do processo de despolimerização, em uma condição conhecida como reação de Mannich (Holy et al., 1979). A solução é mantida por 60 minutos, sob refluxo, à temperatura de 70°C. Na seqüência, completa-se a solução com 1 mol de diaquil fosfito, gotejados lentamente, durante 30 minutos. Após 90 minutos de agitação, a solução inicial da origem a um éster, que em seguida é saponificado com 3,5 mols de solução de hidróxido de sódio 30% (m/v). Nesta etapa, a trietilamina e o metanol são recuperados através da destilação fracionada, em temperatura de 70°C. Logo após a recuperação dos solventes, o sistema retorna ao refluxo, a uma temperatura de 105°C, por um período de 2 horas. Na seqüência, a solução alcalina obtida é acidificada com ácido clorídrico concentrado até pH 1,5. A mistura permanece em repouso, à temperatura de 15°C, durante 3 a 4 horas, quando o glifosato é cristalizado e separado por filtração. O rendimento da reação é em torno de 48 a 52 % e a massa obtida é de aproximadamente 81 a 88 g.

Os testes preliminares foram realizados em triplicatas, em escala reduzida de 1:100, fazendo-se uso da glicina com abundância isotópica natural (0,366% át de ^{15}N). Após estabelecidas as melhores condições experimentais, realizou-se dois testes partindo da glicina com abundância isotópica de 6,70 e 0,90 % em átomos de ^{15}N , objetivando avaliar possível fracionamento isotópico durante o processo. O sistema utilizado nessa rota de síntese é o mesmo ilustrado na Figura 8. As determinações isotópicas no glifosato sintetizado foram realizadas no espectrômetro de massas ANCA-SL 20/20.

As determinações analíticas, após a síntese, com a finalidade de confirmar a presença do herbicida, foram realizadas através do teste de fusão, espectroscopia de infravermelho e teor total de nitrogênio por espectrometria de massas. As amostras sintetizadas foram comparadas com o padrão sigma pa.

3.2.1.7. Produção do Glifosato formulado

Uma das etapas de obtenção do glifosato formulado prevê a síntese do glifosato sal, que pode ser feito mediante a neutralização do glifosato ácido com uma base, por exemplo, a

monoisopropilamina. Essa etapa do processo de produção é chamada de pré-mistura ou primeira etapa da formulação, contendo 62% de concentração do ácido.

O glifosato ácido (ou sólido) é relativamente insolúvel em água, inviabilizando sua aplicação em campo. Diante desse fato, o glifosato é tipicamente formulado na forma de sais, tornando a molécula solúvel. Essa característica particular permitiu que vários sais fossem obtidos com o objetivo comercial. Estudos comparando a eficiência dos diferentes sais comprovaram que o isopropilamina aumenta a fitotoxicidade na planta. No entanto, o sal, associado a um surfactante, aumenta a absorção pela planta (Duke, 1988). Deve-se ressaltar, ainda, que, em termos industriais, destaca-se o glifosato sal de mono-isopropilamine (IPA) com surfactantes, comercializado pela Monsanto Company e registrado como Roundup.

Na presente investigação, optou-se pela obtenção do herbicida nas mesmas condições em que o comercializado pela Monsanto. Para isso, o glifosato ácido obtido na etapa anterior foi submetido a aminação com 13,5% de oleamida monoisopropilamida (MIPA), associado a 13% de tensoativo (surfactante – ultramina 200).

A ultramina 200 é uma amina graxa etoxilada com características umectantes. É recomendada para formulações agroquímicas, na forma pura ou combinada, como agente umectante ou solubilizante em concentrados solúveis em formulações herbicidas com base em água, apresentando efeito espalhante e auxiliar de penetração.

As amostras obtidas a partir dessa reação química foram analisadas por HPLC com detector de fluorescência, espectroscopia de infravermelho médio para amostras sólidas e líquidas. Com o objetivo de verificar a diluição isotópica de ^{15}N no glifosato formulado, foram realizados dois ensaios, tendo como precursor a glicina enriquecida a 6,7 e 0,9 % em átomos de ^{15}N .

A partir do balanço de massa isotópico, pode-se determinar, no produto final, a contribuição da fonte nitrogenada proveniente do glifosato ácido e da aminação (MIPA), bem como do tensoativo (Surfactante). A Figura 9 ilustra esquematicamente a obtenção do formulado de glifosato a partir do ácido do MIPA e Surfactante (S). A equação de balanço de massa isotópico pode ser representada por (6).



Figura 9. Fluxograma para obtenção do glifosato formulado (glifosato ácido + MIPA e Surfactante). $f^N_{(Gác.)}$ = fração de N, no produto final, proveniente do glifosato ácido; $f^N_{(M+S)}$ = fração de N, no produto final, proveniente da mistura MIPA e Surfactante; A, B e C corresponde, respectivamente, a abundância isotópica de ^{15}N (% em átomos de ^{15}N) no glifosato ácido, MIPA + Surfactante e glifosato formulado (produto final).

$$A f^N_{(Gác.)} + B f^N_{(M+S)} = C (f^N_{(Gác.)} + f^N_{(M+S)}) \quad (6)$$

onde:

A, B e C: Abundância isotópica (% em átomos de ^{15}N) no glifosato ácido, mistura MIPA e Surfactante e glifosato formulado respectivamente; $f^N_{(Gác.)}$ e $f^N_{(M+S)}$ = fração de nitrogênio, no produto final, proveniente, respectivamente, do glifosato ácido e mistura MIPA e Surfactante.

Considerando que a mistura do MIPA (oleamida monoisopropilamida) e do Surfactante (ultramina) apresenta abundância isotópica natural (0,366 % em átomos de ^{15}N) e ainda o balanço de massa nitrogenado, dado pela equação 7, podemos obter a equação 8.

$$f^N_{(Gác.)} + f^N_{(M+S)} = 100 \quad \text{ou} \quad f^N_{(M+S)} = 100 - f^N_{(Gác.)} \quad (7)$$

$$f^N_{(Gác.)} = [(C - 0,366)/(A - 0,366)] \cdot 100 \quad (8)$$

3.2.2 Métodos Analíticos

3.2.2.1 Espectrometria de Infravermelho médio

A região infravermelha do espectro eletromagnético encontra-se entre a microondas e a visível, estendendo-se desde 200 até 12500 cm^{-1} (50 a 0,8 μm). Neste amplo intervalo, a região entre 400 e 4000 cm^{-1} (25 a 2,5 μm) é a de maior importância para espectrometria no infravermelho (IV), por corresponder a faixa de energia das vibrações moleculares.

Quando um feixe de radiação microondas (10^2 a 10^1 cm^{-1}) incide em uma molécula orgânica, a energia é absorvida do feixe e convertida em energia rotacional molecular. Como os níveis rotacionais são quantizados, os espectros moleculares são compostos por linhas de absorção. Isto ocorre devido à existência de vários níveis de energia rotacional para cada transição vibracional, de modo que uma série de linhas se sobrepõe, dando origem às bandas de absorção. Nesse caso, são sensíveis à radiação infravermelha somente as vibrações moleculares que geram alterações nos momentos de dipolo, como consequência da variação da distribuição dos elétrons na ligação. O movimento de oscilação molecular gera um campo elétrico alternado que, quando em fase com o campo elétrico da radiação incidente, absorve energia do feixe, aumentando a amplitude das vibrações moleculares. É justamente a detecção da energia transferida do feixe para a molécula que constitui a espectroscopia infravermelha (IV).

Cada grupo funcional vibra com uma frequência característica, que depende da massa dos átomos, da geometria das moléculas e da constante de força da ligação. Desta forma, cada composto ou material apresenta um espectro infravermelho distinto, como se fosse sua impressão digital. A identificação de um composto através de seu espectro IV é realizada através da comparação da frequência das absorções com frequência de padrões existentes na literatura (Scheinmann, 1970; Brame & Grasselli, 1977). Este procedimento possibilita identificar a composição química e a estrutura molecular de amostras sólidas, líquidas ou gasosas.

A fração de radiação transmitida através de uma fina camada de um determinado material, frequentemente expressa como transmitância (T), depende do número de grupos absorventes existentes na amostra e da intensidade do momento de dipolo associado aos mesmos. A

transmitância é definida como a razão I/I_0 , onde I é a intensidade da luz transmitida através do sólido e I_0 é a intensidade incidente.

Moléculas grandes possuem modos de vibração complexos. Entretanto, considerando-se grupos funcionais isolados, as vibrações moleculares podem ser classificadas como deformação axial (ou de estiramento) e deformação angular. Ambos os modos podem ocorrer de forma simétrica ou assimétrica. Na deformação axial, a vibração se dá ao longo do eixo das ligações dos átomos, de modo que a distância interatômica varia periodicamente. No caso da vibração de deformação angular, o ângulo de ligação dos átomos de uma molécula varia continuamente como movimento oscilatório. A deformação angular pode ocorrer no plano e também fora do plano.

No presente trabalho de pesquisa, os espectros IV referentes às amostras de interesse foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Nicolet 200, instalado no Laboratório de Química Orgânica da UNICAMP.

3.2.2.2 Determinação isotópica de ^{15}N (% em átomos) e teor de N (%) em amostras de glifosato por espectrometria de massas

As determinações do teor de N (%) nas amostras com abundância isotópica natural e determinação isotópica na amostra de glifosato enriquecido foram realizadas por espectrometria de massas (espectrômetro de massas modelo ANCA-SL 20-20 da Europa Scientific, utilizado para amostras líquidas e sólidas). O uso, em rotina, desse equipamento instalado no Laboratório de Isótopos Estáveis facilita à pesquisa, sendo que o desenvolvimento dos espectrômetros iniciou-se na década de 80 com Preston e Owens (Barrie & Prosser, 1996).

No processo analítico, as amostras de glifosato sintetizadas, contendo cerca de 100 μg de N, foram seladas em cápsulas de estanho (8x5mm), sendo admitidas no auto-amostrador do ANCA S/L 20/20, capacitado para 66 amostras. Em seguida, as amostras foram purgadas com um fluxo de hélio ultrapuro (6.0) no auto-amostrador. Logo após, as amostras foram levadas para o interior de um tubo de combustão vertical, quando um pulso de O_2 ultrapuro substituiu temporariamente o fluxo de He. O tubo de combustão foi preenchido com um catalisador de

Cr_2O_3 e CuO em fios cortados em pequenos pedaços (responsável pela conversão de CO em CO_2 e combustões de hidrocarbonetos) e lã de prata, que tem a função de reter o enxofre (SO_2) e halogênios. Quando o pulso de O_2 chega ao forno de combustão juntamente com amostra selada na cápsula de Sn , a temperatura no local, inicialmente em 1000°C , é elevada para 1700°C para completa combustão da amostra.

Os produtos da combustão: CO_2 , N_2 , NO_x e H_2O são levados para um tubo de redução, mantido a 600°C , e que contém cobre metálico (Cu^0). No tubo de redução, os óxidos de nitrogênio são reduzidos à N_2 , sendo também retido o excesso de O_2 utilizado na combustão da amostra. A seguir, os gases são conduzidos pelo gás carregador para uma coluna preenchida com perclorato de magnésio [$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$], que retém o vapor de água. Uma pequena fração do gás gerado (0,1%) do sistema de preparação de amostra entra no IRMS através de um longo tubo capilar com uma restrição para ajuste do fluxo de gás na entrada do IRMS. O gás é então ionizado na fonte de íons e separado no campo eletromagnético (razão m/q). As determinações de N-total e razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ foram realizadas por meio das intensidades dos feixes de íons relativos às massas 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) 29 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) e 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$). O espectrômetro de massas pode ser visualizado na Figura 10.



Figura 10. Espectrômetro de massas ANCA-SL

3.2.2.3 Determinação do glifosato formulado por HPLC

Com relação à determinação feita por HPLC, foram pesadas 10 mg de amostra, diluídas em 1 mL de água Milli-Q. Da solução resultante, retirou-se alíquota de 100 μ L, sendo adicionados 900 μ L de água. Na seqüência, a amostra foi centrifugada e filtrada (filtro microporo 0,2 μ m). Do volume final, foram retirados para análise 10 μ l de amostra e misturados em 2 mL da solução de 9- fluorenilmetil cloroformato (FMOC) e 0,3 mL de solução Tampão de Borato (pH 9,0) , com o intuito de derivatizar o herbicida, tornando possível sua detecção no HPLC. O glifosato foi determinado em coluna fase reversa C18 ODS - 4 x 250 mm, fluxo de 1 ml.min⁻¹ (Hypersil), temperatura ambiente, utilizando como solventes um tampão fosfato (Tampão A) 25 mM Na₂HPO₄, desgaseificado com ultra-som e filtrado com filtro para solventes orgânicos da milipore HVPL 047 de 0,45 μ m. A fase móvel era constituída de acetonitrila grau HPLC, preparada com água deionizada (Milli-Q) e desgaseificado e filtrado a vácuo com o filtro HVPL 047 da Millipore. Após a derivatização do glifosato com FMOC, os derivados foram detectados por fluorescência com auxílio do detector de fluorescência da Shimatsu RF551, regulado para excitação (λ_{ex} = 266 nm) e emissão (λ_{em} = 305 nm).

A derivatização com FMOC é necessária uma vez que o glifosato não contém grupos cromóforos. Essa deficiência faz com que o glifosato não absorva a radiação eletromagnética visível, dificultando a detecção por métodos colorimétricos ou fluorescência, a não ser de forma indireta ou com devida derivatização (Amarante, 2002).

3.2.2.4 Testes de Fusão

O ponto de fusão do glifosato é de 230 °C, sendo o herbicida decomposto a essa temperatura (Grossbard, 1985). Quando aquecido a 200-230°C, o glifosato perde a água, e ressolidifica-se para dar forma ao dicetopiperazine do n-n 2,5 difosfonometil. O glifosato pode ser regenerado através de refluxo com ácidos minerais fortes, tais como o ácido clorídrico (Franz, 1985).

A análise física por fusão é um procedimento simples de identificação e um importante indicativo de comparação entre as amostras. Esse tipo de ensaio permite observar a completa decomposição do produto, caracterizando visualmente se a amostra de glifosato sintetizada assemelha-se ao padrão Sigma pa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 *Obtenção do $^{15}\text{NH}_4^+$*

A utilização do processo interativo entre os sistemas 1 e 2 de colunas de resina preenchida com resina DOWEX 50W X8, pode-se, obter após 3 acoplamentos, o composto sulfato de amônio ($^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) com enriquecimento médio de 42% em átomos de ^{15}N . No processo interativo entre os dois sistemas é possível produzir cerca de 200 g .mês⁻¹ do composto nitrogenado. O processo de produção, envolvendo a interação (cascata) entre os três sistemas de colunas de resina (6 acoplamentos entre o sistema 1 e 2 e três acoplamentos entre os sistemas 2 e 3), foi possível obter aproximadamente 66 g mês⁻¹ de sulfato de amônio com enriquecimento médio de 95 % em átomos de ^{15}N .

4.2. *Produção de $^{15}\text{NH}_3$ aquosa*

Com o emprego da linha adaptada (Figura 6) foi possível obter 100 ml de aquamônia com 20% de N (m/v), a partir de 94 g de sulfato de amônio. O volume de 100 ml foi definido em função das etapas futuras objetivando a síntese da glicina.

O volume de água adicionado no reator de aquamônia foi calculado em função do teor de N desejado no produto final. Sendo assim, para obter 100 ml de aquamônia com 20% N foram necessários 63 ml de água.

Com as adaptações realizadas na linha de produção de amônia aquosa foi possível obter aquamônia com 22% (m/v) de N. É importante salientar que o teor de N da aquamônia influencia no rendimento da etapa de síntese da glicina ^{15}N , reduzindo os custos de produção glicosato- ^{15}N .

Deve-se ainda mencionar as facilidades operacionais do sistema adaptado, quando comparado ao processo anterior (Bendassolli et al., 2002).

4.3 Síntese da glicina

A síntese da glicina com adaptações no processo de purificação (descrito em 3.2.1.3) permitiu obter uma massa de $2,7 \pm 0,3$ g do aminoácido, representando um acréscimo de 42% quando comparado ao rendimento obtido por Oliveira (2001). No entanto, o rendimento continua sendo inferior ao citado pela literatura em virtude da modificação da metodologia, que se fez necessária com a retirada do carbonato de amônio da reação.

Os resultados do balanço nitrogenado (recuperação do N-NH₃ no processo), obtidos a partir da destilação por arraste a vapor e a produção do aminoácido glicina (gravimetria) em função do volume de NH_{3(aq)} concentrada, estão apresentados na Tabela 2. Os valores do nitrogênio (g) em excesso foram obtidos após o período de reação, em sistema por arraste a vapor, e corresponde ao nitrogênio que permaneceu no sistema (solução) ao final do processo na forma de NH_{3(aq)}. As perdas verificadas foram principalmente na forma gasosa (NH₃) devido a manipulação.

Tabela 2. Recuperação do nitrogênio em excesso na reação e produção de glicina (n=3)

Testes	Massa de NH ₃ inicial (g)	Massa de NH ₃ final (g)	Massa de NH ₃ recuperado (g)	Recuperação %	Produção de glicina (g)	Pureza %
T1	25	21,74	18,01	83	2,78	98
T2	25	24,00	21,06	88	2,99	99
T3	25	22,87	20,74	91	2,21	98

n= número de repetições

A determinação pela técnica de cromatografia em camada delgada (TLC), objetivando a identificação da glicina, foi realizada nas amostras sintetizadas. De acordo com os resultados obtidos, que podem ser visualizados na Figura 11, todas as amostras indicaram a presença do aminoácido glicina, comparando com o padrão sigma.

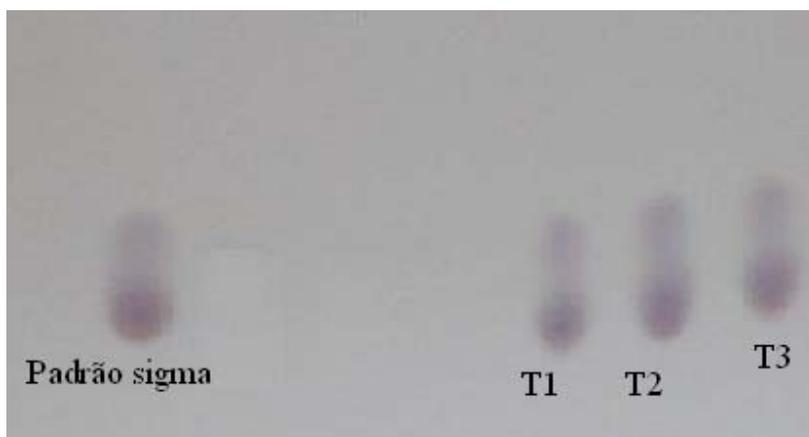


Figura 11. TLC revelada em ninidrina das amostras de glicina sintetizada

As determinações referentes ao teor de N nas amostras sintetizadas foram realizadas por espectrometria de massas ANCA-SL (Automatic Nitrogen Carbon Analyser Solid and Liquid) da PDZ Europa. Os resultados médios (mg L^{-1} de N) para todas as amostras de glicina sintetizadas (soluções preparadas a partir do aminoácido produzido) bem como para o padrão Sigma foram de $0,96 \pm 0,02$. Estes dados evidenciam que o teor de N nas amostras são compatíveis ao do padrão p.a Sigma (0,98) e a pureza do aminoácido é da mesma ordem de grandeza do padrão empregado. As determinações isotópicas mostraram que não ocorreu fracionamento nas amostras sintetizadas.

4.4 Produção do ácido clorometilfosfônico

A partir da estequiometria da reação 4 (1:2) pode-se observar que o pH da solução final foi inferior a 7. Esse resultado indicou a presença de ácido clorídrico no volume final (reação incompleta). Sendo assim, foram realizados testes utilizando-se de 100% de excesso da base (1:4), onde 2 mmol foram necessários para iniciar a clivagem da ligação entre o fósforo e o cloro e 2 mmol de NaOH para realizar a substituição. Nessas condições a solução final apresentou pH neutro (7), provavelmente indicando reação completa.

A solução (1,5 ml) proveniente da reação 4 (substituição nucleofílica) foi inserida em uma coluna de resina aniônica, conforme descrito em 3.1.4.2. Nessa etapa, os volumes foram coletados a cada 1 ml em fluxo de 0,3 ml/min. Os resultados da titulação, das amostras coletadas, com H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e a medida do pH são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Massa de hidroxíla (OH⁻) e pH da solução eluída da coluna de resina aniônica

Amostra	Massa de OH (mmol)	pH
1	-	7
2	0,68	12
3	1,10	13
4	0,50	13
5	0,01	13
6	-	9
7	-	7

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que os íons hidroxilas (OH⁻) foram deslocados nos primeiros 5 mL de amostragem (volume eluído). Os valores de pH verificados nos volumes amostrados são um indicativo de que os íons OH⁻ trocados na resina foram eluídos nos primeiros 5 mL perfazendo um total de aproximadamente 2 mmol de íons hidroxilas deslocados. Levando-se em consideração que a troca entre OH⁻ e Cl⁻ é equimolar, pode-se aferir que 2 mmol de Cl⁻ ficaram retidos na resina. Na seqüência foi necessário um volume de 5 ml de água desionizada para lavagem do ácido clorometilfósforico contido no volume intersticial da resina.

A próxima etapa consistiu na eluição dos íons Cl⁻ retidos nos sítios ativos da resina (R-Cl), com solução 0,2 mol L⁻¹ de NaOH. Foram necessários aproximadamente 20 ml de solução básica para o deslocamento de 2 mmol de íons Cl⁻. As amostras foram coletadas a cada 1 ml para determinação de Cl⁻ em sistema por injeção em fluxo (FIA) por detecção espectrofotométrica e titulação com H₂SO₄ 0,05 mol L⁻¹. Os resultados obtidos são demonstrados na Figura 12.

Com os dados da Figura 12 pode-se deduzir que houve a retenção do cloreto (Cl⁻) na resina de troca aniônica evidenciando que a reação foi completa, onde apenas o Cl⁻ ligado ao fósforo foi deslocado. Esse Cl⁻ é proveniente da reação de substituição nucleofílica entre o dicloreto e o OH⁻ (reação 4).

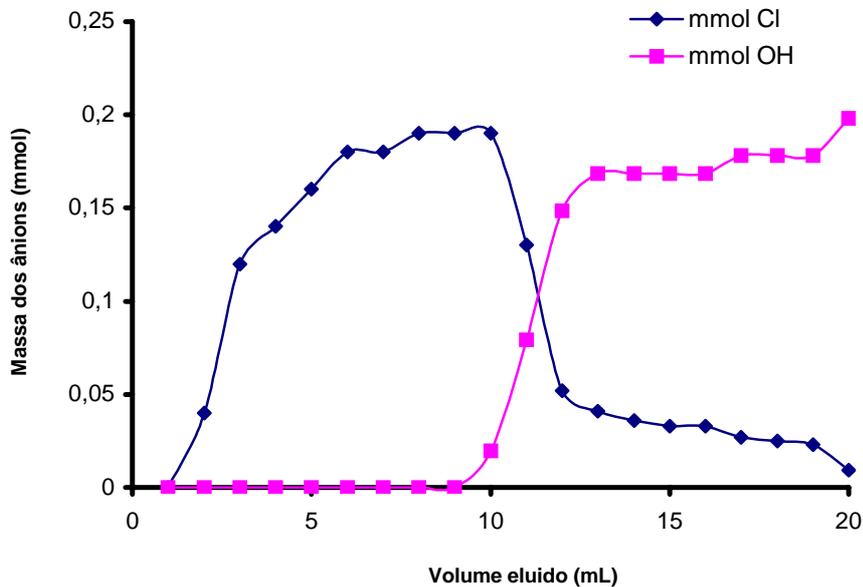


Figura 12. Massa de Cl^- e OH^- (mmol) em função do volume eluente

O cloro ligado no carbono não foi deslocado, necessitando de um nucleófilo mais reativo para iniciar a reação.

No processo de preparação da resina, foram utilizados aproximadamente 50 ml de solução de NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e em média 100 ml de água desionizada.

4.5 Produção do glifosato a partir do ácido clorometilfôsonico (Patente n° 3,799,758 - 1974)

De acordo com os resultados obtidos, considerando os testes de fusão e análises por infravermelho e espectrometria de massas, as amostras sintetizadas não correspondem ao glifosato quando comparado ao padrão sigma. Este fato evidencia que a reação não deve ter ocorrido em sua totalidade ou, possivelmente, devem ter sido formados sub produtos que interferiram na formação do produto esperado.

Com relação às análises realizadas por espectrometria de massas, o padrão sigma apresenta um teor de N de aproximadamente 8,5%, com abundância isotópica natural de 0,366% em átomos de ^{15}N . Entretanto, nas amostras sintetizadas, os valores de N foram insuficientes, levando-se em consideração a sensibilidade do equipamento.

De acordo com a literatura, o ponto de fusão do glifosato é entre 200 e 230°C (Grossbard, 1985). No entanto, as amostras sintetizadas demonstraram ter um ponto de fusão superior comparado ao padrão, uma vez que não observou-se a decomposição do produto sintetizado. As amostras desses ensaios podem ser visualizadas na Figura 13.

Posteriormente, através do espectro de infravermelho do produto obtido, as bandas 3415 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} e 1066 cm^{-1} não caracterizam estrutura molecular do glifosato conforme demonstra a observação da Figura 14 em comparação aos dados do espectro da amostra padrão na Figura 15.



Figura 13. Teste de Fusão (230°C) nas amostras sintetizadas (T1, T2 e T3) e padrão sigma

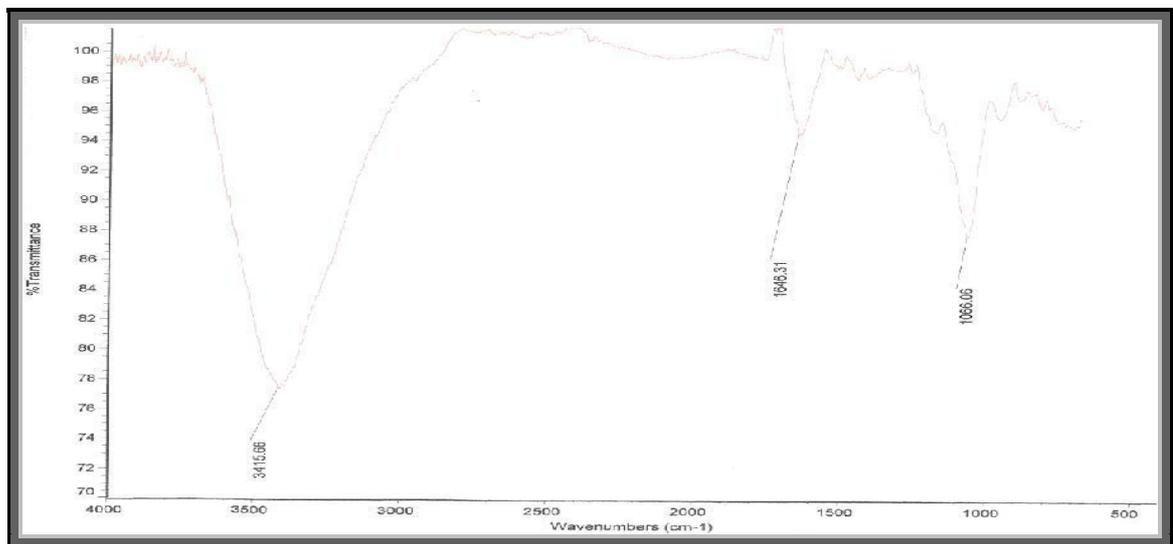


Figura 14. Espectro infravermelho para amostra sintetizada

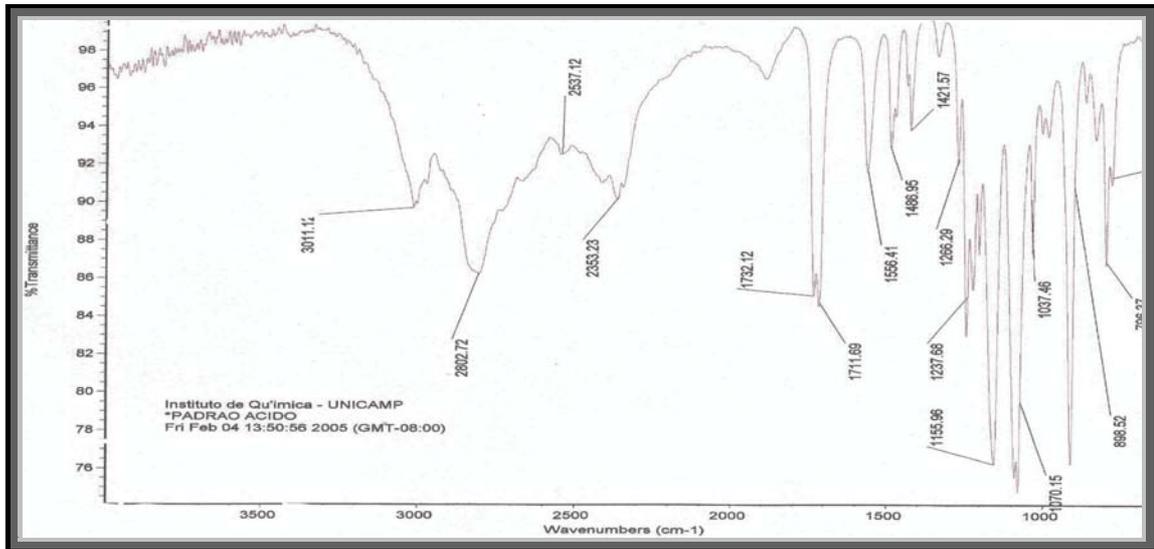


Figura 15. Espectro do infravermelho do padrão sigma do glifosato

4.6 Produção do glifosato a partir do diaquil fosfito e glicina (Patente Nº 4, 237,065 - 1980)

Com as dificuldades de síntese do glifosato a partir do clorometilfosfônico e glicina julgou-se por bem avaliar outro método de síntese que se adequasse aos interesses do trabalho. Cabe salientar que mesmo com problemas na rota inicialmente proposta, todas as demais etapas previstas foram satisfatoriamente executadas.

Com o desenvolvimento da pesquisa foram avaliados inicialmente os parâmetros envolvidos na produção de glifosato a partir da glicina sintetizada e dietil fosfito, processo estabelecida por Erhat (1980).

Os resultados obtidos a partir desse método demonstraram ser essa uma alternativa mais promissora de síntese do glifosato, dentro das condições operacionais disponíveis no Laboratório de Isótopos Estáveis.

A análise física por fusão se configura num importante indicativo de comparação entre a amostra sintetizada e o padrão sigma. Dessa forma, de acordo com a Figura 16, pode-se observar que os resultados referentes às amostras sintetizadas e o padrão sigma são semelhantes. Os testes foram realizados em triplicata (T1, T2 e T3). Com o objetivo de avaliar o percentual de N no herbicida foram realizados ensaios de síntese partindo-se de glicina p.a (sigma) e glicina sintetizada no laboratório. Os resultados desses testes são apresentados na Tabela 4.



Figura 16. Teste de fusão (230°C) realizado na amostra padrão sigma no glifosato (triplicata) obtido no laboratório. T1 glifosato sintetizado com glicina p.a, T2 glifosato sintetizado a partir de glicina sintetizada e T3 glifosato sintetizado a partir da glicina marcada.

Os dados da Tabela 4 indicam que o glifosato sintetizado, a partir do diaquil fosfíto, apresentou teor de N (%) e abundância isotópica (% átomos de ^{15}N) semelhante aos padrões Sigma e Agritec (empresa privada). Cabe salientar que a abundancia isotópica natural do isótopo pesado do nitrogênio é de $0,366 \pm 0,004$.

Tabela 4. Porcentagem de N (m/m) e abundância isotópica (% átomos de ^{15}N) em amostras de glifosato

Glifosato	Nitrogênio %	Abundância isotópica (% em átomos de ^{15}N)
T1	$8,11 \pm 0,01$	$0,363 \pm 0,002$
T2	$8,24 \pm 0,13$	$0,363 \pm 0,002$
Padrão Sigma	$8,50 \pm 0,21$	$0,366 \pm 0,001$
Padrão ácido Agritec	$8,60 \pm 0,51$	$0,365 \pm 0,003$

T1 = glifosato obtido a partir da glicina p.a ; T2 glifosato obtido a partir da glicina sintetizada.

Com relação às análises por infravermelho, os resultados são semelhantes entre as amostras sintetizadas e o padrão sigma. As Figuras 17 e 18 correspondem, respectivamente, ao glifosato sintetizado com glicina p.a e aquele obtido a partir da glicina sintetizada no Laboratório de Isótopos Estáveis. Ainda que seja desnecessária a identificação de cada um dos picos observados nas figuras, nota-se que os espectros praticamente se sobrepõem. Essa particularidade corrobora a semelhança entre as amostras estudadas e o padrão sigma ilustrado anteriormente na Figura 15.

Na Tabela 5 podem ser observados os resultados referentes a massa obtida em gramas e o rendimento da reação.

De acordo com os resultados da Tabela 5 foi possível obter, nas condições testadas, um rendimento de aproximadamente 26% comparado com 50% do previsto na literatura. Observa-se ainda, que a utilização de glicina sintetizada marcada ou natural, não influenciou no resultado final.

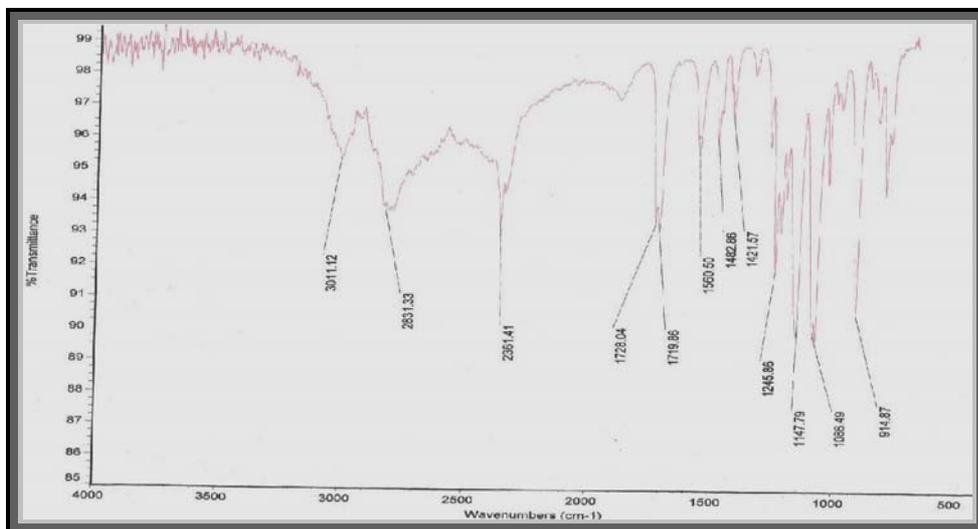


Figura 17. Espectro Infravermelho para glifosato sintetizada a partir da glicina p.a

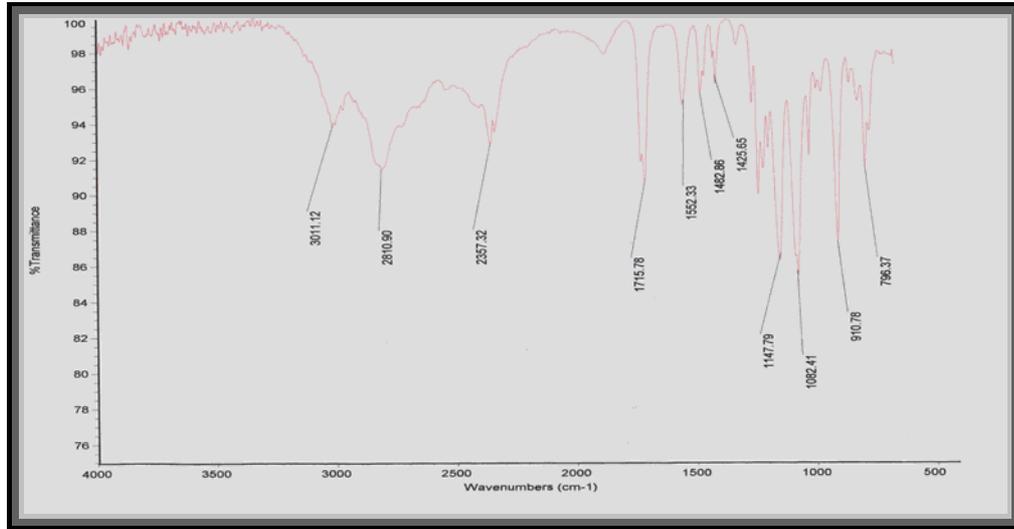


Figura 18. Glifosato obtido a partir da glicina sintetizada no Laboratório

Tabela 5. Massa e Rendimento da reação de síntese de glifosato a partir da glicina e diaquil fosfíto

Teste	Massa (g)	Rendimento (%)
*T1	0,4194	25,73
T2	0,4314	26,46
T3	0,4439	27,23
T4	0,4098	25,14
Média ± se	0,426 ± 0,01	26,14 ± 0,70

T1 – glifosato ácido obtido através da glicina sintetizada com 6,7 % ¹⁵N; T2, T3 e T4 glifosato ácido obtido a partir da glicina sintetizada no presente trabalho

4.7 Produção do Glifosato formulado

Com relação às amostras analisadas por HPLC, através da derivatização com FMOC, observa-se o tempo de retenção semelhante entre o padrão (27,60 min), a amostra sintetizada com abundância natural (27,56 min) e a amostra sintetizada marcada com ¹⁵N (27,55). Os resultados, comparados ao padrão, aparentam se tratar da mesma substância.

Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 19, 20 e 21 respectivamente, para o padrão, amostra sintetizada com abundância natural e amostra sintetizada marcada com ^{15}N .

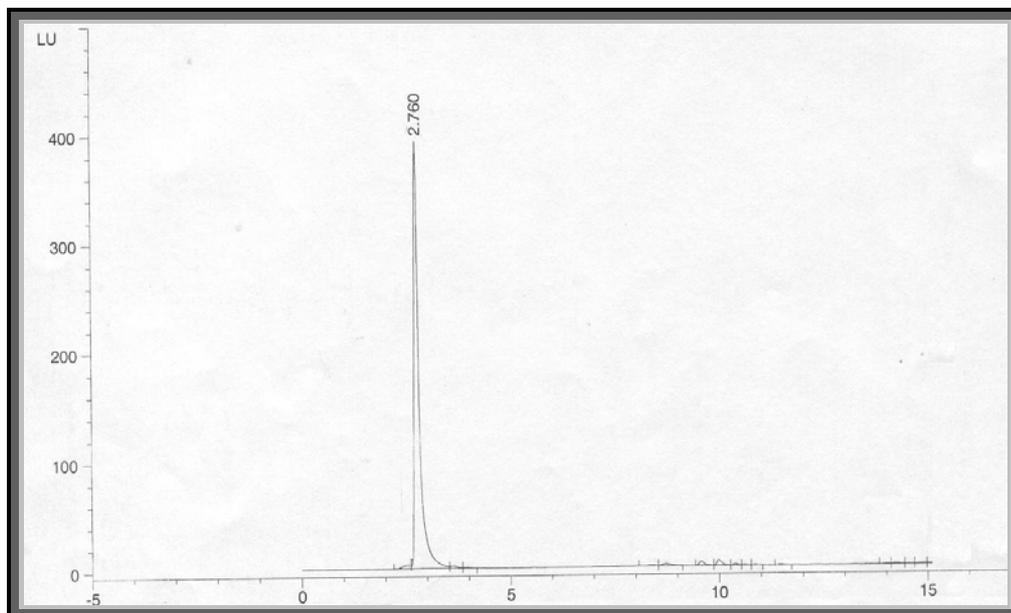


Figura 19. Padrão glifosato formulado Agritec 480 g.L⁻¹

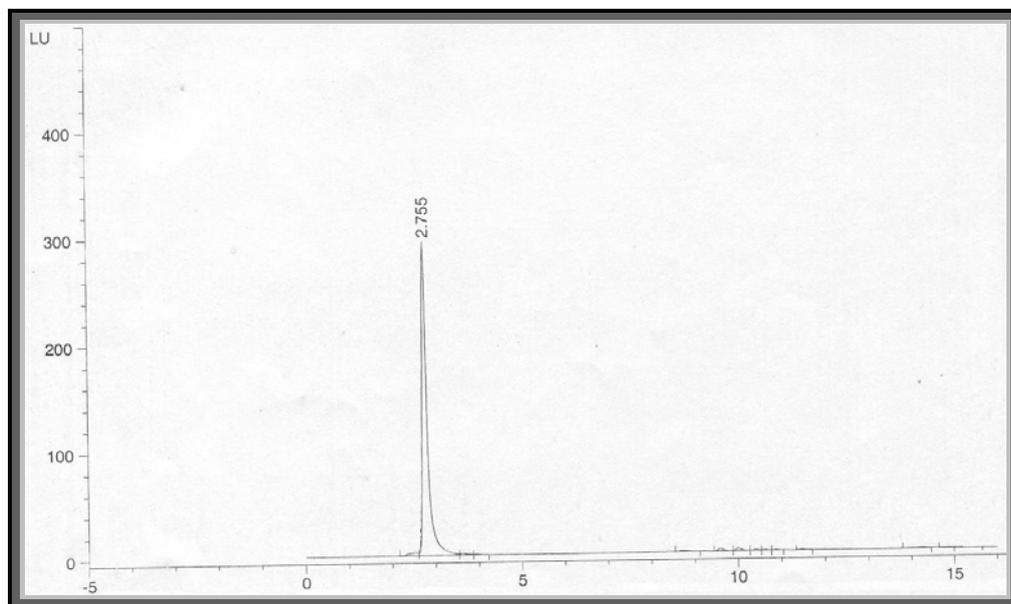


Figura 20. Amostra do glifosato formulado sintetizado com abundância isotópica natural

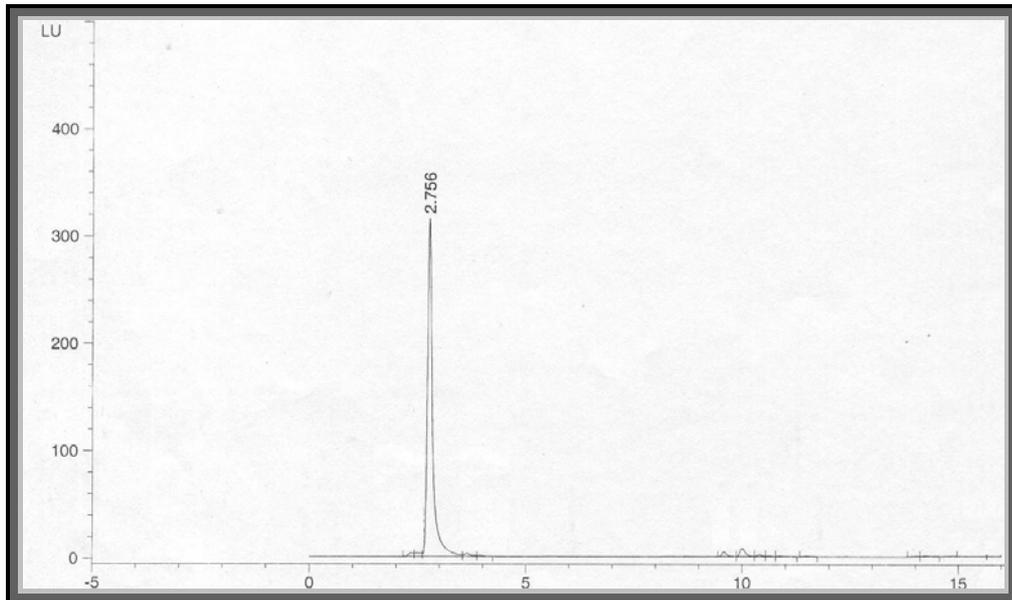


Figura 21. Amostra do glifosato sintetizado marcado com ^{15}N

Ao mesmo tempo, foram realizadas análises fazendo-se uso do infravermelho médio com amostra bruta, nas quais observa-se, comparando a amostra de glifosato com abundância natural, a amostra marcada com ^{15}N e o padrão formulado fornecido pela AGRITEC, que os picos emitidos praticamente se sobrepueram. Esses testes foram realizados no Instituto de Química – Laboratório de Química Orgânica da UNICAMP utilizando-se de um Termo Nicolet IR200 com transformada de Fourier (FTIR). Os picos das amostras formuladas diferem daqueles obtidos com as das amostras de glifosato ácido. Isso se deve ao fato das amostras formuladas estarem com excesso de amina evidenciado através do alargamento dos picos na região de 3400 cm^{-1} . No entanto os espectros das amostras e do padrão (AGRITEC) se sobrepõem evidenciando que o herbicida formulado sintetizado encontra-se nas mesmas condições que o padrão. Os resultados são demonstrados nas através das Figuras 22 (Padrão), 23 (amostra com abundância natural) e 24 (amostra marcada).

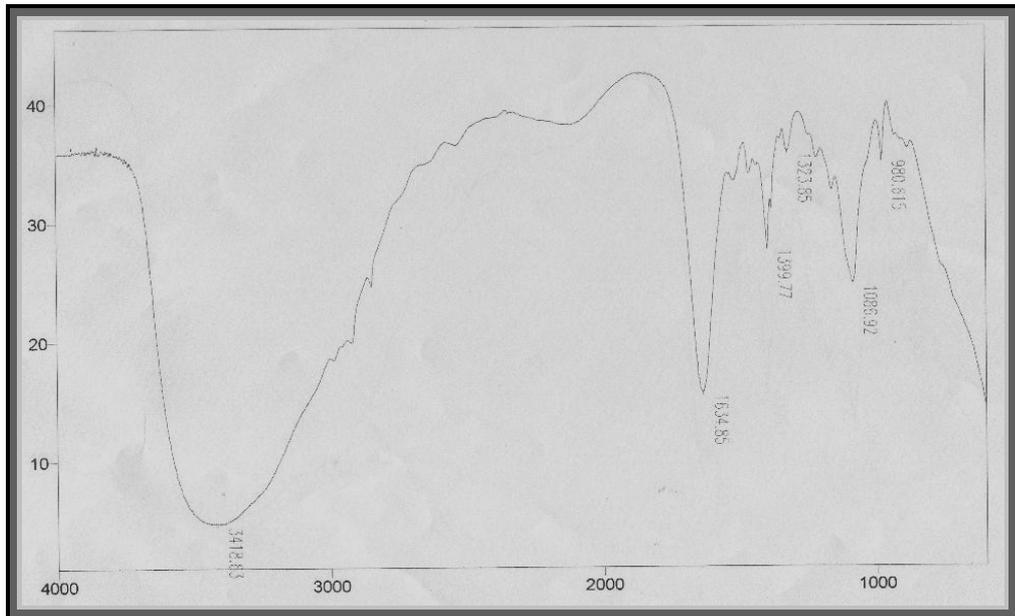


Figura 22. Espectro relativo ao padrão formulado Agritec

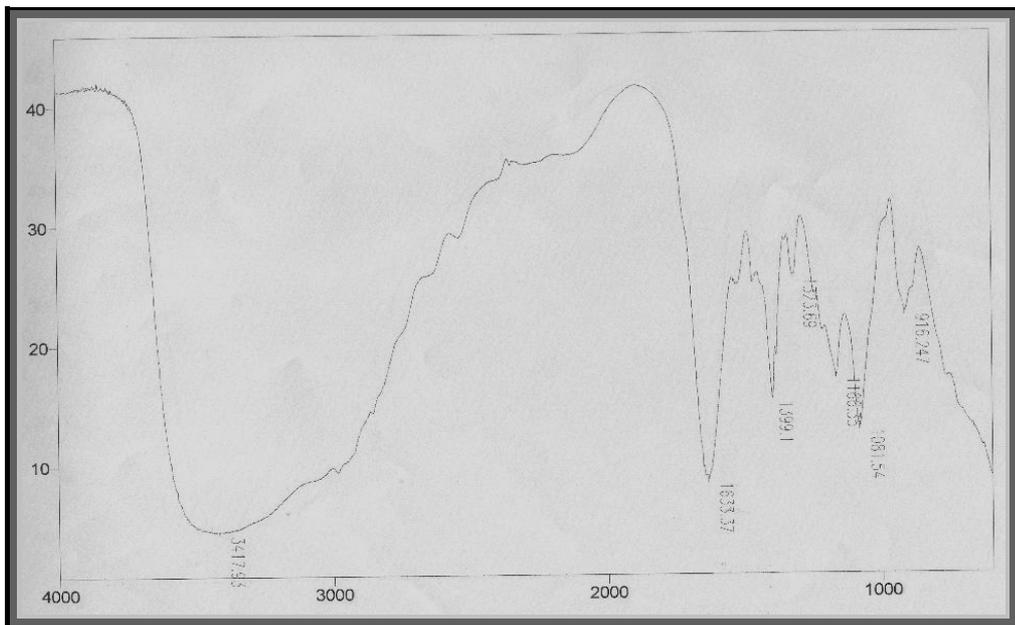


Figura 23. Espectro relativo a amostra sintetizada com abundância isotópica natural

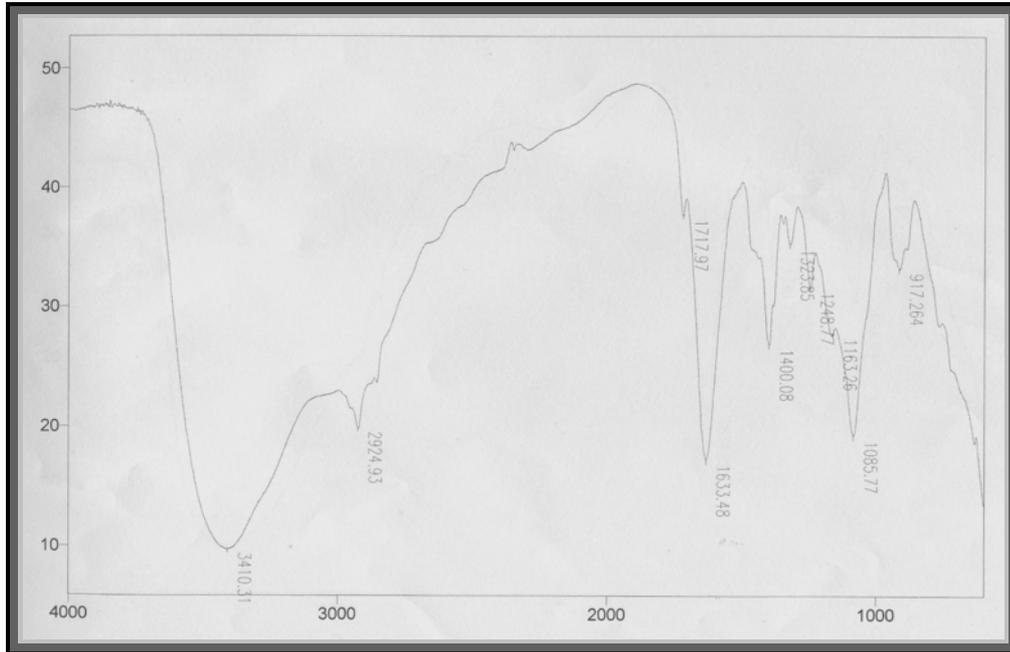


Figura 24. Espectro relativo a amostra sintetizada marcada com o isótopo ^{15}N

Com relação às amostras de glifosato enriquecidas em ^{15}N , onde utilizou-se glicina previamente enriquecida no isótopo (6,70 e 0,90 % em átomos de ^{15}N) foi possível obter o glifosato ácido e o formulado com as características isotópicas listadas na Tabela 6.

Na mesma tabela são apresentados os valores isotópicos e a contribuição das fontes nitrogenadas (N-glifosato ácido e N-MIPA+Surfactante) no produto formulado (glifosato ácido com adição do MIPA e Surfactante, conforme descrito em 3.2.1.7). A contribuição de cada fonte nitrogenada foi obtida a partir das equações de balanço isotópico apresentadas no item 3.2.1.7 (equações 6 e 8). As determinações isotópicas (abundância em % em átomos de ^{15}N) foram realizadas no espectrômetro de massas ANCA-SL 20/20.

Com os dados da Tabela 6 pode-se observar que não houve fracionamento isotópico na conversão da glicina- ^{15}N em glifosato ácido e que a diluição isotópica na obtenção do formulado foi praticamente a mesma nos ensaios utilizando-se do glifosato ácido com 6,70 e 0,90 % em átomos de ^{15}N . A diluição isotópica de ^{15}N no produto final (formulado) devido a introdução da MIPA e do Surfactante não representa problemas na utilização do herbicida como traçador, levando-se em consideração que o enriquecimento no princípio ativo é que deve ser levado em consideração.

Tabela 6. Dados isotópicos e de fração de N no produto final (glifosato formulado).

Precursor ⁽¹⁾	Composto	Abundância isotópica (% em átomos de ¹⁵ N)	Contribuição de N no produto (%) ⁽⁴⁾	
			f ^N (Gác.)	f ^N (M+S)
Glicina (6,70 % em átomos ¹⁵ N)	Glifosato ácido	6,72 ⁽²⁾	36,6	63,4
	Glifosato formulado	2,64 ⁽³⁾		
Glicina (0,90 % em átomos ¹⁵ N)	Glifosato ácido	0,87	34,5	65,5
	Glifosato formulado	0,54		

⁽¹⁾ glicina previamente enriquecida utilizada na síntese do glifosato ácido; ⁽²⁾ e ⁽³⁾ valores de A e C da equação (4); ⁽⁴⁾ obtido a partir da equação (4), correspondendo a f^N(Gác.) e f^N(M+S).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o processo de síntese utilizando clorometilfosfônico não é possível ser utilizada, uma vez que o clorometilfosfônico não encontra mais disponível no mercado, e sua síntese em laboratório não permitiu alcançar os resultados esperados. No entanto, o método utilizando o diaquil fosfito no momento é a que melhor atende aos interesses do trabalho sendo possível obter o glifosato ácido com um rendimento de aproximadamente 25 % correspondendo a 0,44 g do glifosato na forma ácida.

Com relação ao glifosato formulado na forma de sal de isopropilamina, ficou evidenciada através das análises por espectrômetro de massas uma diluição isotópica de aproximadamente 60 %. No entanto, com a produção do glifosato altamente enriquecido (80 – 90 % átomos de ^{15}N) esse problema pode ser contornado e a marcação no princípio ativo é que deve ser levado em consideração.

Através das análises fica evidenciada a obtenção do herbicida nas mesmas condições que o produto comercializado, não sendo inclusive, demonstrado a formação de impurezas indesejadas na rota de síntese.

Com isso o trabalho se finaliza disponibilizando para a pesquisa mais um composto enriquecido em ^{15}N que poderá colaborar com os estudos relacionados ao comportamento desse herbicida no ambiente.

6. REFERÊNCIAS

ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. São Paulo: IEA, 1972. 136p.

ALMEIDA, F.S.; RODRIGUES, B.N. **Guia de herbicidas**; recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina: Fundação IAPAR, 1985. 482p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Programa de análise de resíduo de agrotóxico em alimentos**: relatório anual 04/06/2001-30/06/2002. Brasília: ANVISA, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Legislação em vigilância sanitária**. Resolução RE n.33 de fevereiro de 2004: Altera RE .165 de 29 de agosto de 2003. Brasília: ANVISA, 2003.

ALVES, A. Defensivos agrícolas ou agrotóxicos? Consumo: uso e abusos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.4, n.22, p.49, 1986.

AMARANTE JUNIOR, O.P. de; SANTOS, T.C.R dos; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.420-428, 2002.

AMARANTE JUNIOR, O.P. de; SANTOS, T.C.R dos; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação: Breve Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.589-593, 2002.

ANDERSON, K.S.; JOHNSON, K.A. Kinetic and structural analysis of enzyme intermediates from EPSPs. *Chemical Reviews*, Baltimore, v.90, p.1131-1149, 1990

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**: Guia práticos de produtos fitossanitários para uso agrícola. 6. ed. São Paulo: Andrei Editora, 1999.

ARAÚJO, S.F.A. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

AZEVEDO, D.A.; LACORTE, S.; VIANNA, P.; VINHAS, T.; BARCELÓ, D. Monitoriamento de poluentes orgânicos prioritários em águas de rios de Portugal por CG/EM e CLAE/EM. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Livro de resumos**. Poços de Caldas: SBQ, 2000. QA-030.

BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.) **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.1-46.

BATEMAN, K.P.; THIBAUT, P.; DOUGLAS, D.J.; WHITE, R.L. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobactéria-using on-line chromatographic and electrophoretic separations. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v.712, n.1, p.293-268, 1995.

BENDASSOLLI, J.A. Síntese de uréia enriquecida em ^{15}N . Piracicaba, 1988. 155p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo.

BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O.; BOARETTO, A.E.; MORAES NETTO, B.M. Preparo de uran- ^{15}N , com marcação isotópica independente nas fontes N- NO_3 , N- NH_4 e N- NH_2 , a partir de KNO_3 - ^{15}N e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - ^{15}N . *Energia Nuclear e Agricultura*, Piracicaba, v.10, n.1, p.55-69, 1989

BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O.; IGNOTO, R.F. Produção de amônia anidra e aquamônia enriquecida em ^{15}N a partir de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.3, p.595-603, 2002.

BIANCHI, M.A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 23., 1996, Porto Alegre. **Ata e resumos...**Porto Alegre: UFRGS, 1996. 125p.

BONILHA, J.A. **Fundamentos da agricultura ecológica**: Sobrevivência e qualidade de vida. São Paulo: Nobel, 1992. 260p.

BRAME, E.G.; GRASSELLI, J.G. (Ed.). **Infrared and raman spectroscopy**. Part B. New York: Marcel Dekker, 1977.

CABRAL, M.F.; SOUZA, P.de.; ALVES, C.R.; MACHADO,S.A.S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, Marília, v.28, n.2, p.41-47, 2003

CAIRES, M.S. de; CASTRO, J.G.D. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta – Mato Grosso. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.2, n.1, 2002. Disponível em: <http://ihendrix.br/Biologia/revista/agrotoxico.htm>. Acesso em: 26 out. 2005

CALDAS, E.D.; SOUZA, T.C.K.R. de. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.5, p.529-537, 2000.

CENTRO DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA/FIOCRUZ - CICT/FIOCRUZ. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX). **Estatística anual de casos de intoxicações e envenenamento**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2001.

CERVEIRA, R. **Agroecologia & desenvolvimento: Estudo de caso do grupo Curupira, Jaboti-PR - São Paulo**. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CHARBONNEAU, J.P. et al. **Enciclopédia de ecologia**. São Paulo: EPU; Ed. da Universidade de São Paulo, 1979. 479p.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1997. 279p.

CONCEIÇÃO, M.Z. Segurança nas aplicações de herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2000 p.46-48.

CONGER, R.D. Suicide and rural economic problems. **Archives of General Psychiatry**, Chicago, v.56, n12, p.110-118, 1999.

COUPLAND, D. Metabolism of glyphosate in plants. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D.(Ed). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworth, 1985. p.25-33

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTERN, F.J.R. Intoxicação e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.1, p.180-186, 2004.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. Oxygen toxicity and herbicidal action; Secondary physiological effects of herbicides. In: _____. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: Prentice-Hall, 1993. p.177-188.

DICHI, I.; PAPINI-BERTO, S.J. Protein-energy status and ¹⁵N-glycine study of child a cirrhotic patients fed low-to high-protein energy diets. **Nutrition**, New York, v.12, p.519-523, 1996.

DUKE, S. Glyphosate. In: KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. (Ed) **Herbicides chemistry, degradation, and mode of action**. New York: Marcel Dekker, 1988. p.1-57.

EHRAT, R.; DINHARD, S. Luxembourg – 1980. **Process for the preparation of N-phosphonomethyl glycine** - Biological chemical activities. USA Patent n.: 4,237,065.

FARIA, N.M.X.; FACCHINI, A.A.; FASSA, A.G e TOMASI, E. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da serra gaúcha. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.33, n.4, p.391-400, 2000.

FIGHETTO, T.R. Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas agrícolas. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1997. cap.17, p.415-435.

FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS – FINEP. **Relatório Setorial Preliminar-Setor Agroquímicos** – 24/10/2005.

FOLONI, L.L. Impacto ambiental do uso de herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2000, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2000. p.49-91.

FORNALI, C.; MANGIAGALLI, A.; NIELSEN, E.; SUARDI, C.M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, n.7, p.991-997, 1999.

FRANZ, J.; CRESTWOOD, M.O. Monsanto Company, St. Louis, 1974. **N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant compositions**. USA Patent n.: 3,799,758.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **“Glyphosate: a unique global herbicide”**. Washington: ACS, 1997. 189p.

FRANZ, J.E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.1-17.

FURTADO, T. Química ao suicídio. **Atenção Brasil**, Porto Alegre, v.6, p.32-34, 1998.

GAERTNER, V.R. Monsanto Company, St. Louis, 1978. **Carbonilaldiminometanofosfato**. USA Patent n.: 4,094,928.

GARD, B.J.C.; KING, E. The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. **Developmental Biology**, New York, v.184, p.95–114, 1997.

GELMINI, G.A. **Herbicidas**: indicações básicas. Campinas, Fundação Cargil, 1988. 334p.

GOUX, W.J.; STRONG, A.A.; SCHNEIDER, B.L.; LEE, W.N.; REITZER, L.J. Utilization of aspartate as a nitrogen source in *Escherichia Coli*. Analysis of nitrogen flow and characterization of the products of aspartate catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, n.2, p. 638-646, 1995.

GRIPPI, S. O líquido precioso e o descaso. **Banas Ambiental**, São Paulo, v.2, n.12, p.30-31, 2001.

GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. Preface. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed). **The herbicide glyphosate**. London: British Library, 1986. p.1.

HAUCK, R.D.; BREMNER, J.M. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. **Advances in Agronomy**, New York, v.28, p. 219-266, 1976.

HERSHMAN, A. Monsanto Company, St. Louis –1976. **Process for producing N-phosphonomethylglycine**. USA Patent n.: 3,969,398.

HOLY, N.; FOWLER, R.; BURNETT, E.; LORENZ, R.; **Tetrahedron**, Oxford, v.35, p.613, 1979.

JACOB, G.S.; GARBOW, R.J.; HALLAS, E. L.; KIMACK M, N.; KISHORE, M.G.; JACOB, S. Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas sp.* Starin LBr. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.54, n.12, p.2953-2958, 1988.

JAGA, K.; DHARMANI, C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v.14, n.3, p.171-185, 2003.

JAMES, C. Prévía: Situação global das lavouras transgênicas comercializadas em 2002. Ithaca: ISAAA, 2002. (Briefs, 27). Disponível em: <www.isaa.org>. Acesso em: 26/10/05

JUNGSTEDT, L.O. de C. (Org.). **Direito ambiental: Legislação**. Rio de Janeiro: Thex Ed. 1999. 787p.

KERTESZ, M.A.; COOK, A.M.; LEISINGER, T. Microbial metabolism of sulfur and phosphorus – containing xenobiotics. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.15, n.2-3, p.195-215, 1995.

KIRBY, A.F.; MARTIN, A.S.; GRIFFITHS, P.L. Huntsman Corporation, Australia- 2005. **Herbicidal compositions**. USA Patent n: 6,906,005

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf, 1992. 798p.

KNOWLES, R.; BLACKBURN, T.H. **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. 311p.

KROHN, K.A.; MATHIS, C.A. The use of isotope nitrogen as a biochemical tracer. In: ROOT, J.W.; KROHN, K.A. **Short-lived isotopes in chemistry and biology**. Washington: ACS, 1981. p.233-249.

LARINI, L. Praguicidas. In: ZANINI, O. **Fundamentos de toxicologia**. Uso racional de medicamentos. São Paulo: Atheneu, 1998.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976. v.1, cap.4, p. 49-65: Aminoácidos: Os blocos construtivos das proteínas.

LEVIGARD, Y.E.A. **Interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervoso no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

LIDE, D.R. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. 77.ed. Boca Raton: CRC Press, 1997.

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.

LOPES, R.J. Poluentes ameaçam megareserva de água. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 21 de ago. 2002. Folha Ciência, Ambiente, p.A10.

LYDON, J.; DUKE, S.O. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. **Pesticide Science**, London, v.25, n.4, p.361-373, 1989.

MANETTA, G.I.; BENEDITO-CECILIO, E. Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de *turnover* em estudos ecológicos: uma síntese. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v.25, n.1, p.121-129, 2003.

MARCHINI, J.S.J.; CORTIELLA, T.; HIRAMATSU, T.; CHAPMAN, E.; YOUNG, V.R. The requirements for indispensable amino acids in adult humans: A longer-term amino acid kinetic study, with support for the adequacy of the Massachusetts Institute of Technology amino acid requirement pattern. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.58, p.670-683, 1993.

MARCONDES, D.A.S.; CHEATA, A. Herbicidas: terminou a erva. **A Granja**, Porto Alegre, v.40, p.64-67, 1984.

MAROULLI, R.P. **Desenvolvimento sustentável da agricultura no cerrado brasileiro**. 2003. Monografia (*Latu Sensu*- MBA) – ISE, Fundação Getúlio Vargas, Brasília, 2003

MÁXIMO, E. **Obtenção de $^{15}\text{NH}_4$ com alto enriquecimento no isótopo ^{15}N , por cromatografia de troca iônica em sistema cascata**. 1998. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MÁXIMO, E.; BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O. **Enrichment of ^{15}N by coupling three systems of ion-exchange chromatography columns**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ISOTOPE, 3., 2000, Vancouver.

MÁXIMO, E.; BENDASSOLLI, J.A.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSETTE, A.L.R.M.; OLIVEIRA, C.R.; PRESTES, C.V. Produção de sulfato de amônio duplamente marcado com os isótopos estáveis ^{15}N e ^{34}S . **Química Nova**, São Paulo v.28 n^o. 2, p.211-216, 2005

MEIRELLES, L.C. **Controle de agrotóxicos: Estudo de caso do estado do Rio de Janeiro, 1985/1995**. 1995. Dissertação (Mestrado) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

MENDELSON, J. Round-up o herbicida mais vendido no mundo. **The Ecologist**, Camelford, v.28, p.24-27, 1998.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: MELO, I.S.; SOUZA, C.M.M.; SCRAMINS, S.; SPESSOTTO, A. (Ed.). **Biodegradação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p.1-14.

MORAES, A.C.L. **Contribuição para o estudo da intoxicação humana por carbamatos: o problema do “chumbinho” no Rio de Janeiro.** 1999. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1999.

MOSER, H. Ciba-Geigy Corporation – Ardsley, NY, 1983. **Process for producing N-phosphonomethyl-glycine.** USA Patent n.: 4,369,142.

NASCIMENTO, A.L. **Da revolução verde á tranqenia: ruptura e continuidade de paradigmas tecnológicos.** In. EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFPR - EVINCI, 11., 2003, Londrina.

NASS, D.P.; FRANCISCO, R.H.P. Fim de doze poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Ciências**, n.5, 2002. Disponível em: <<http://www.cdcc-sc.usp.br/ciências/artigos/art-5/fimpolvente.html>>. Acesso em: 20 mar. 2004.

NISSIM, I.; YUDKOFF, M.; BROSNAM, J.T. Regulation of [¹⁵N] urea synthesis from [5-¹⁵N] glutamine. Role of pH, hormones, and pyruvate. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, n.49, p.3234-3242, 1996.

ODUM, E.P. **Fundamentos de ecologia.** Tradução de Antônio Manuel de Azevedo Gomes. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1971. 926p.

OLIVEIRA, C.R. **Síntese de alanina e glicina com elevado enriquecimento isotópico.** 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OPAS/OMS. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas e agrotóxicos.** Brasília: Representação do Brasil, 1996.

PICKETT, W.; KING, W.D.; LEES, R.E.; MORRISON, H.I.; BRISON, R.J. Suicide mortality and pesticide use among Canadian farmers. **American Journal of Industrial Medicine**, New York, v.34, n.4, p.364-372, 1998.

PINHEIRO, S. **Cartilha dos agrotóxicos**. Canoas: Editora Canoas, 1999. 26p.

PINHEIRO, S.; NARS, N.Y.; LUIZ, D. **Agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Junqueira/Candiru, 1998.

PINTO, G.M.F.; JARDIM, I.C.S.F. Análise fatorial para otimização de parâmetros de adsorção de herbicidas em solos, determinada utilizando CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: SBQ, 2000. AB-016.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. 2002. 149 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGINATTO, J.B.; TORNISIELO, V. Influência da matéria orgânica na sorção e desorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, n.4, p.945-951, 2000.

RICHARD, S.; MOSLEMI, S.; SIPAHUTAR, H.; BENACHOUR, N.; SERALINI, G.E. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.113, p.716-720, 2005.

ROBERTS, T.R.; HUTSON, D.H.; LEE, P.W.; NICHOLLS, P.H.; PLIMMER, J.R. **Metabolic pathways of agrochemicals**. Part I: Herbicides and plant growth regulators. London: The Royal Society of Chemistry, 1998. p.386-400.

ROGERS, T.E. Monsanto Company, St. Louis, 1986. **Process for preparing glyphosate and glyphosate derivatives**. USA Patent n.: 4,568,432.

SANTIAGO, P.C. Engenheiro agrônomo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.4, n.22, p.48, 1986.

SCHEINMANN, F. (Ed.). **An introduction to spectroscopic methods for the identification of organic compounds**. Oxford: Pergamon Press, 1970. v.1.

SINGH, S.P.; WISHNOK, J.S.; KESHIVE, M.; DEEN, W.N.; TANNEMBAUM, S.R. The chemistry of nitrosoglutathione/ glutathione system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.93, n.25, p.14428-14433, 1996.

SOUZA, A.P. **Atividade do Oxyfluorfen, 2-4D, e Glifosate, em solos de diferentes texturas na presença e na ausência de composto orgânico**. 1994. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

STACK, T.; REEDS, P.J.; PRESTON, T.; HAY, S.; LOYD, D.J.; AGETT, P.J. ^{15}N tracer studies of protein metabolism in low birth weight preterm infants: a comparison of ^{15}N -glycine and ^{15}N -yeast protein hydrolysate and of human milk and formula fed babies. **Pediatric Research**, Basel, v.25, p.167-172, 1989.

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. **Zoologia geral**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2001. 815p. (Série 3. Ciências Puras, 8).

TEIXEIRA, G. Agricultura. Aqui, o Brasil também pode ser campeão mundial. **Brasil Nuclear**, Rio de Janeiro, n.25, 2002.

TRAPÉ, A.Z. O caso dos agrotóxicos. In: ROCHA, E.L. et al. **Isto é trabalho de gente?: vida, doença e trabalho no Brasil**. São Paulo: Vozes, 1994. 672p. cap.27.

TRIVELIN, P.C.O.; RODRIGUÊS, J.C.S.; VICTÓRIA, R.L. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-¹⁵N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p.89-99, 1996.

TRIVELIN, P.C.O.; BENDASSOLLI, J.A.; MURAOKA, T.; CARNEIRO JUNIOR, F. Sulfur utilization by rice and *Crotalaria juncea* from sulfate - ³⁴S applied to the soil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.205-207, 2002.

TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E.; MATSUI, E. Enriquecimento isotópico de ¹⁵N por cromatografia de troca iônica. II-Produção de sulfato de amônio enriquecido em ¹⁵N. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v.1, n.2, p.59-75, 1979.

VIDAL, R.A.; WINKLER, L.M. Resistência de plantas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactado sintase (ALS). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.12, p.31-42, 2002.

VOGEL, A.I. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1980. v.2, cap.3, p.461: Preparação e reação de compostos alifáticos – glicina e alanina.

WATERLOW, J.C.; GOLDEN, M.H.N.; GARLICK, P.J. Protein turnover in man preasured with ¹⁵N [nitrogen isotope] comparison of end products and dose regimes. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.235, n.2, p. E165-E174, 1978.

WINKLER, L.M.; VIDAL, R.A.; BARBOSA NETO, J.F. Aspectos genéticos envolvidos na resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Plantio Direto**, Passo Fundo, v.70, n.4, p.21-24, 2002.

WYRILL, J.B.; BURNSIDE, O.C. Glyphosate toxicity to common milkweed and hemp dogbane as influenced by surfactants. **Weed Science**, Ithaca, v.25, p.275-287, 1977.

XU, T.; COWARD, J.K. ^{13}C -and ^{15}N -labeled peptide substrates as mechanistic probes of oligosaccharyltransferase. **Biochemistry**, Washington, v.36, n.48, p.14683-14689, 1997.

YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. Pesticides in drinking water—a case study. **Food and Chemistry Toxicology**, London, v.38, p.S87, 2000.

YOUNG, U. Dynamics of human whole body amino and metabolism: use of stable isotope probes and relevance to nutritional requirements. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v.27, n.5, p.395-413, 1981.

ZAGATTO, E.A.G.; JACINTO, A.O.; REIS, B.F.; KRUG, F.J.; PESSENDA, L.C.R.; MORTATTI, J.; GUINÉ ROSSIAS, M.F. **Manual de análises de plantas e águas empregando sistemas de injeção em fluxo**. Piracicaba: CENA-USP, 1981. 45p.

ZHAO, F.J.; VERKAMPEN, K.C.J.; BIRDSEY, M.; BLAKE-KALFF, M.M.A.; MaCRATH, S.P. Use of the enriched stable isotope ^{34}S to study sulphur uptake and distribution in wheat. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, p.1551, 2001.