

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Agrícola



Tese

**Impacto da soja geneticamente modificada e da
aplicação do glifosato no ambiente, na qualidade e na
segurança dos grãos**

Giani Mariza Bärwald Böhm

Pelotas, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GIANI MARIZA BÄRWALD BÖHM

**Impacto da soja geneticamente modificada e da aplicação
do glifosato no ambiente, na qualidade e na segurança dos
grãos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de conhecimento: Avaliação de Impacto Ambiental).

Orientação

Cesar Valmor Rombaldi

Antônio Costa de Oliveira

Danilo Dufech Castilhos

Norma Gouvea Rumjanek

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B676i Böhm, Giani Mariza Bärwald

Impacto da soja geneticamente modificada e da aplicação do glifosato no ambiente, na qualidade e na segurança dos grãos / Giani Mariza Bärwald Böhm ; orientador Cesar Valmor Rombaldi ; co-orientadores Antônio Costa de Oliveira, Danilo Dufech Castilhos, Norma Gouvea Rumjanek. – Pelotas, 2007. – 120f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Isoflavona. 3.Soja geneticamente modificada. 4.Microbiota. 5.Fixação biológica de nitrogênio. 6.Resíduos de glifosato. I.Rombaldi, Cesar Valmor. II.Oliveira, Antônio Costa de. III.Castilhos, Danilo Dufech. IV.Rumjanek, Norma Gouvea. V.Título.

CDD: 633.34

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi (orientador), Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Danilo D. Castilhos, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Eliana Badiale Furlong, Fundação Universidade do Rio Grande

Prof. Dr. Luciano do Amarante, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me agraciado de saúde, disposição e tenha me reservado um caminho de luz.

Ao meu esposo Emerson Böhm, por todo amor e companheirismo e por sempre me incentivar acreditando em meu potencial.

A minha filha Emilly pelo carinho, amor e luz em minha vida.

A minha mãe e ao meu pai (in memoriam), pelas primeiras lições de vida e por terem me possibilitado este momento.

Aos professores Dr. Cesar Valmor Rombaldi, Dr. Antônio Costa de Oliveira, Dr. Danilo Dufech Castilhos e Dra. Norma Gouvea Rumjanek pela valiosa orientação, experiência e confiança dispensadas na execução deste trabalho, o qual contribuiu para meu amadurecimento e formação profissional.

À equipe colaboradora, Dr. Bruno Alves, Dr. Eloy Paulleto, Dr. Gustavo Xavier, Msc. Jesus O. Pinto, Dra. Maria Inês Genovese, Dr. Paulo D. Zimmer e Dra. Tânia M.G. Morselli, pela experiência, apoio e contribuições na execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, contribuições e dedicação.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas pela dispensa para realização do Curso.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola.

À Embrapa Agrobiologia/RJ pelo apoio, disponibilidade e confiança.

À Embrapa Trigo, de Passo Fundo-RS pelo fornecimento das sementes de soja;

Ao Laboratório de Biotecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos-UFPel, na pessoa do prof. Jorge Adolfo Silva e sua equipe pelo apoio, disponibilidade e confiança.

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de solos-UFPEL, pela disponibilidade, confiança e pelo apoio de toda equipe.

Ao Campus Agropecuário da Palma/UFPEL pelo apoio na instalação do experimento a campo.

Aos produtores rurais que participaram dessa pesquisa pela disponibilidade e confiança.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola pelo estímulo, ensinamentos, dedicação e amizade.

Aos alunos de pós-graduação, bolsistas e estagiários do laboratório de Biotecnologia de Alimentos pela convivência, contribuições, dedicação e amizade.

Aos estagiários Gustavo, Daniel e Fernando pelo apoio e dedicação.

A todos os colegas de pós-graduação em Biotecnologia Agrícola que contribuíram para meu crescimento pessoal, pelo incentivo e amizade.

À FAPERGS pelo financiamento (Proade 3, 05/2234-4) à pesquisa.

RESUMO

BÖHM, Giani Mariza Bärwald. **Impacto da soja geneticamente modificada e da aplicação do glifosato no ambiente, na qualidade e na segurança dos grãos.** 2007. 120 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.], geneticamente modificada resistente ao herbicida glifosato (GM_{RR}), tem se destacado no cenário mundial como o produto de maior expressão da biotecnologia vegetal, considerando-se os 58,6 milhões de hectares cultivados. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de soja GM_{RR}, a partir da autorização do cultivo desse genótipo em 1998, pelo Comitê Técnico Nacional de Biossegurança (CTNBio). Após alguns anos de temática controvertida incluindo questões de segurança ambiental e do alimento, de ética, de soberania científico-tecnológica e, de dependência econômica e ideológica, ainda é elemento de dúvidas e discussões. Os efeitos da transformação genética e do uso de glifosato no controle de plantas daninhas no cultivo de soja GM_{RR}, nas condições edafoclimáticas do Brasil, ainda não foram elucidados. Neste contexto, foram cultivados dois genótipos de soja, GM_{RR} BRS 244 RR e não modificada (NM) BRS 154, no Centro Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas (CAP), nas safras de 2005/2006 e 2006/2007. Para o controle de plantas daninhas, testaram-se, tratamentos com glifosato, imazetapir e capina. Com esse modelo experimental foi possível analisar os efeitos do cultivo da soja GM_{RR} sobre a microbiota do solo, a fixação biológica de nitrogênio, os resíduos de glifosato e de ácido aminometilfosfônico (AMPA) nos grãos e solo, e os teores de isoflavonas nos grãos. Para monitorar o comportamento da microbiota do solo foram avaliados o carbono orgânico total, o carbono da biomassa microbiana, a respiração basal e o quociente metabólico. Verificou-se que a aplicação de glifosato resultou em menor incorporação de carbono pela biomassa microbiana, bem como maior respiração basal, não havendo resposta ao número de aplicações desse herbicida. Essa maior respiração basal nos tratamentos com glifosato indicaram que a microbiota do solo foi capaz de utilizar o glifosato como fonte de carbono. O menor valor do quociente metabólico e a maior relação entre o carbono da biomassa microbiana e o carbono

1 orgânico total foram obtidos no tratamento sem o uso de herbicida, o que qualificou
2 esse tratamento como o de maior estabilidade da microbiota em relação aos demais.
3 A hipótese de que a aplicação de glifosato pudesse afetar o metabolismo da planta
4 e/ou o mecanismo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi parcialmente
5 confirmada, pois o glifosato reduziu a nodulação e a FBN, mas não reduziu a
6 produtividade de grãos, pelo contrário, aumentou. Verificou-se, ainda que a
7 modificação genética não afetou o metabolismo da FBN. Quanto aos resíduos de
8 herbicida constatou-se que a aplicação de glifosato resultou em resíduos dessa
9 molécula e de AMPA nos grãos, sendo os teores de glifosato superiores aos
10 permitidos pela legislação vigente. Resíduos de glifosato e AMPA também foram
11 detectados no solo. Portanto, o manejo de soja BRS 244 RR com aplicações de
12 glifosato no controle de plantas daninhas, em dosagens recomendadas pelo
13 fabricante, resultou em resíduos dessa molécula. Entretanto, ao analisar-se o perfil e
14 a distribuição das isoflavonas em grãos de soja de diferentes genótipos, verificou-se
15 que o metabolismo secundário de produção de isoflavonas não foi afetado pela
16 presença do gene EPSPS exógeno na planta, nem pela aplicação de glifosato.
17 Como estudo exploratório complementar coletou-se amostras de grãos e solo de
18 duas áreas de cultivo comercial, visando realizar um diagnóstico da situação fora
19 das condições do experimento no CAP. Detectou-se a presença de elevados teores
20 de glifosato e de AMPA nos grãos e no solo em ambas as áreas testadas. Assim
21 confirmou-se que os resíduos de glifosato e do metabólito AMPA também estão
22 presentes em áreas de cultivo comercial do Rio Grande do Sul.

23

24 **Palavras-chave:** Soja geneticamente modificada, microbiota, fixação biológica de
25 nitrogênio, resíduos de glifosato, isoflavonas

ABSTRACT

BÖHM, Giani Mariza Bärwald. **Impact of genetically modified soybean and use of glyphosate on environment, quality and safety the grains**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The genetically modified soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], resistant to glyphosate (GM_{RR}), has been the best example for the success of plant biotechnology, regarding its cultivated are of 58,6 million hectares. Brazil is currently the third top producer of GM_{RR} soybean in the world. The release of this genotype for cultivation occurred in 1998, by the National Technical Biosafety Committee (CTNBio). After many years of thematic controversy including concepts of environmental and food safety, ethical, scientific-technological sovereignty, economical dependence and ideological reasons, there is still room for doubts and discussions. The effects of genetic transformation and the use of glyphosate for weed control in soybean GM_{RR} fields, in Brazilian soil and environmental conditions have not yet been tested. In this context, two genotypes of soybean were cultivated, GM_{RR} BRS 244 RR and the non-genetically modified (NM) BRS 154, in field conditions at Centro Agropecuário da Palma (CAP) of the Universidade Federal de Pelotas, during 2005/2006 and 2006/2007 seasons. Weed control tests were performed with glyphosate, imazethapyr and manual weeding. With this experiment, it was possible to analyze the effects of GM_{RR} soybean cultivation on soil microbial content, biological nitrogen fixation (BNF), glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in grains and in the soil and also isoflavone levels in grains. In order to observe soil microbial changes, total organic carbon, carbon of microbial biomass, basal breathing and metabolic quotient were assessed. It was verified that glyphosate application resulted in lower incorporation of carbon by the microbial biomass, as well higher basal breathing, however no differences were found regarding the number of herbicide applications. The higher basal breathing in treatments with glyphosate indicated that the soil microbial biomass was capable of using glyphosate as a carbon source. The lowest value for the metabolic quotient and the maximum ratio

1 between carbon of microbial biomass and organic carbon was obtained for the
2 treatment without herbicide, suggesting that this treatment promotes the best stability
3 of soil microbial content when compared to other treatments. The hypothesis that
4 glyphosate application could affect the plant metabolism and/or the mechanism of
5 biological nitrogen fixation (BNF) was partially confirmed, since glyphosate reduced
6 nodulation and BNF, but it did not reduce productivity of grains, on the contrary, it
7 increased. It was observed that the genetic modification did not affect the metabolism
8 of BNF. Regarding the herbicide residues it was observed that application of
9 glyphosate resulted in residues of this molecule and AMPA in grains. The level of
10 glyphosate was higher than the maximum value allowed by the present legislation.
11 Glyphosate residues and AMPA were also detected on soil. Therefore, cultivation of
12 BRS 244 RR soybean with glyphosate applications for weed control, in doses
13 recommended by the manufacturer, resulted in residues of this molecule. However,
14 when analyzing the profile and distribution of isoflavones in grains from different
15 genotypes of soybean, it was observed that the secondary metabolism of isoflavones
16 was not affected by the presence of the exogenous EPSPS gene, neither by
17 glyphosate applications. As a complementary study, samples of grains and soil of
18 two areas of commercial cultivation were collected, in order to evaluate the situation
19 outside experimental conditions. High levels of glyphosate and AMPA in grains and
20 soil were detected in both areas. Therefore, it was confirmed that residues of
21 glyphosate and AMPA are present in areas of commercial cultivation in Rio Grande
22 do Sul state.

23

24 **Key words:** Genetically modified organism, microbial biomass, biological nitrogen
25 fixation, glyphosate residues, isoflavones

LISTA DE FIGURAS

Artigo 2

- FIGURA 1-** Liberação acumulada de carbono (CO₂) no solo, dos diferentes tratamentos de manejo da soja BRS 244 RR, no período de 26 dias de incubação.....58
- FIGURA 2-** Liberação acumulada de carbono (CO₂) no solo submetido à aplicação de sacarose, dos diferentes tratamentos de manejo da soja BRS 244 RR.59

LISTA DE TABELAS

Artigo 2

- TABELA 1-** Características físico-químicas do solo na área experimental do Centro Agropecuário da Palma, UFPel, Pelotas, RS.53
- TABELA 2-** Carbono orgânico total do solo (COT), carbono da biomassa microbiana (CBM) e a relação carbono microbiano e carbono orgânico total (CBM/COT).....57
- TABELA 3-** Respiração basal induzida com sacarose (RB ind), respiração basal sem indução (RB), degradação da sacarose adicionada após 26 dias de incubação e quociente metabólico (qCO₂).61

Artigo 3

- TABELA 1** – Produção de matéria seca e produtividade da soja geneticamente modificada (GM_{RR}, BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS 154) tratadas com herbicidas ou capinas, cultivada no Centro Agropecuário da Palma na safra 2005/2006.78
- TABELA 2-** Teor de N nas partes aéreas de plantas de soja geneticamente modificada (GM_{RR}, BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS 154) tratadas com

1	herbicidas ou capinas, cultivada no Centro Agropecuário da Palma na safra	
2	2005/2006.	78
3	TABELA 3 – Teores de δ 15N de plantas invasoras e nas diferentes partes da planta	
4	de soja geneticamente modificada (GM _{RR} , BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS	
5	154) tratadas com herbicidas ou capinas, cultivada no Centro Agropecuário da	
6	Palma na safra 2005/2006.	79
7	TABELA 4 – Número e massa de nódulos e dependência pela fixação biológica de	
8	nitrogênio de plantas de soja geneticamente modificada (GM _{RR} , BRS 244 RR) e não	
9	modificada (NM, BRS 154) tratadas com herbicidas ou capinas, cultivada no Centro	
10	Agropecuário da Palma na safra 2005/2006.	79
11		
12	Artigo 4	
13	TABELA 1- Características físico-químicas do solo na área experimental do Centro	
14	Agropecuário da Palma, UFPel, Pelotas, RS.	85
15	TABELA 2- Resíduos do glifosato, imazetapir e AMPA no solo e nos grãos.	90
16	TABELA 3. Conteúdo total de isoflavonas dos grãos de soja submetidos aos	
17	diferentes tratamentos, expresso em agliconas.	92
18	TABELA 4. Perfil de isoflavonas dos grãos de soja submetidos aos diferentes	
19	tratamentos.	93
20	TABELA 5. Distribuição das formas totais de isoflavonas presentes dos grãos de	
21	soja submetidos aos diferentes tratamentos.	94
22		
23	Artigo 5	
24	TABELA 1- Resíduos do glifosato e do ácido aminometilfosfônico no solo e nos	
25	grãos de soja GM _{RR} em experimento junto ao Centro Agropecuário da Palma,	
26	localizado no Capão do Leão (RS), safra 2006/2007.	109
27	TABELA 2- Resíduos do glifosato e do ácido aminometilfosfônico no solo e nos	
28	grãos de soja GM _{RR} das áreas do estudo de caso localizadas em Sananduva (RS) e	
29	Pelotas (RS), safra 2006/2007.	109
30		
31		
32		

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2 AGROFIT- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
3 AMPA- Ácido aminometilfosfônico
4 ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
5 *B. japonicum*- *Bradyrhizobium japonicum*
6 BaCl₂- Cloreto de Bário
7 C- Carbono
8 CV- Coeficiente de Variação
9 CAP- Centro Agropecuário da Palma
10 CBM- Carbono da Biomassa Microbiana
11 CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
12 CO₂- Dioxido de Carbono
13 COT- Carbono Orgânico Total
14 C-P- Carbono-Fósforo
15 CTNBio- Comitê Técnico Nacional de Biossegurança
16 DAD- Detector com Arranjo de Diodo
17 DAHP- 3-deoxi-D-arabino- heptulose-7-fosfato
18 dap- dias após o plantio
19 DNA- Ácido desoxirribonucléico
20 ECP- estudo de caso de Pelotas
21 ECS- estudo de caso de Sananduva
22 EPSP- 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato
23 EPSPS- 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
24 EUA- Estados Unidos da America
25 FAEM- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
26 FBN- fixação biológica de nitrogênio
27 FMOC- 9-fluorenylmethyl chloroformate
28 g- grama
29 GM_{RR} - Geneticamente modificada *Roundup Ready*
30 GOX- Enzima glifosato redutase
31 GTS - Glyphosate tolerant soybeans
32 h- hora
33 ha- hectare
34 HCl- Ácido Clorídrico
35 i.a- ingrediente ativo
36 IDA- Ingestão Diária Aceitável
37 INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
38 kg- kilograma
39 KH₂PO₄- Dihidrogenofosfato de Potássio
40 Km- Constante de Michaelis
41 mg- miligrama
42 MHz- megahertz
43 min.- minutos
44 μmol- micromol
45 mM- milimol
46 MP- Medida Provisória
47 N- Nitrogênio
48 NaOH- Hidróxido de Sódio
49 n.d. - não detectado

- 1 NM – Não modificada
- 2 PEP – Fosfofenolpiruvato
- 3 qCO_2 -Quociente Metabólico
- 4 RB- Respiração Basal
- 5 RR- Roundup Ready
- 6 S3P- Chiquimato-3-fosfato
- 7 t-DNA- DNA transferido
- 8 UFPel- Universidade Federal de Pelotas
- 9 V2- estágio vegetativo 2
- 10 V4- estágio vegetativo 4

SUMÁRIO

1		
2	IMPACTO DA SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA E DA APLICAÇÃO DO	
3	GLIFOSATO NO AMBIENTE, NA QUALIDADE E NA SEGURANÇA DOS GRÃOS	1
4	RESUMO.....	7
5	ABSTRACT.....	9
6	LISTA DE FIGURAS.....	11
7	LISTA DE TABELAS.....	11
8	LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
9	1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
10	2. ARTIGO 1.....	23
11	EFEITO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E DA APLICAÇÃO DO GLIFOSATO	
12	NA MICROBIOTA DO SOLO, FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO,	
13	QUALIDADE E SEGURANÇA DE GRÃOS DE SOJA GENETICAMENTE	
14	MODIFICADA.....	23
15	RESUMO.....	24
16	ABSTRACT.....	25
17	INTRODUÇÃO.....	26
18	EFEITO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E DA APLICAÇÃO DO GLIFOSATO	
19	NA MICROBIOTA DO SOLO.....	29
20	EFEITO DO GLIFOSATO SOBRE A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM	
21	SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA (GM_{RR}).....	32
22	RESÍDUOS DO GLIFOSATO E DO ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO, E TEORES	
23	DE ISOFLAVONAS EM GRÃOS DE SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA	
24	(GM_{RR}).....	35
25	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
26	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	41
27	3. ARTIGO 2.....	46
28	EFEITO DO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS NA BIOMASSA E ATIVIDADE	
29	MICROBIANA EM PLANOSSOLO CULTIVADO COM SOJA BRS 244RR.....	46
30	RESUMO.....	47
31	ABSTRACT.....	48
32	INTRODUÇÃO.....	49
33	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
34	Material vegetal.....	52
35	Delineamento experimental e tratamentos.....	52
36	ANÁLISES.....	53
37	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55

1	CONCLUSÕES	61
2	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	62
3	4. ARTIGO 3	64
4	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA GENETICAMENTE	
5	MODIFICADA, TRATADA COM GLIFOSATO, CULTIVADA EM REGIÃO DE	
6	PLANOSSOLO	64
7	RESUMO	65
8	ABSTRACT	66
9	INTRODUÇÃO	67
10	MATERIAL E MÉTODOS	69
11	Material vegetal	69
12	Delineamento experimental e tratamentos	69
13	Avaliações.....	70
14	Nitrogênio Total e ¹⁵ N.....	71
15	Análise estatística.....	71
16	RESULTADOS	72
17	DISCUSSÃO	73
18	CONCLUSÃO	75
19	AGRADECIMENTOS	75
20	REFERÊNCIAS	76
21	5. ARTIGO 4	80
22	RESÍDUOS DO GLIFOSATO E DO ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO, E TEORES	
23	DE ISOFLAVONAS EM SOJA BRS 244 RR E BRS 154	80
24	RESUMO	81
25	ABSTRACT	82
26	1- INTRODUÇÃO	82
27	2- MATERIAL E MÉTODOS	85
28	2.2- Delineamento experimental e tratamentos	85
29	2.3- Avaliações	86
30	2.4- Detecção e quantificação de resíduo de glifosato e AMPA no solo e nos grãos	87
31	2.5- Extração e quantificação de isoflavonas.....	88
32	2.6- Análise estatística	88
33	3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
34	4- CONCLUSÃO	94
35	5- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	94
36	6. ARTIGO 5	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil tem se destacado como um dos principais produtores mundiais de soja, incluindo cultivares geneticamente modificadas resistentes a glifosato (GM_{RR}) e não modificadas (NM), disputando a liderança com os EUA, na pauta de produção e exportação desse grão, do farelo e do óleo, além de sub-produtos como proteínas isoladas, lecitina, fibras, entre outros (AGROLINK, 2007). O faturamento bruto que a comercialização de grãos, farelo e óleo proporcionavam em 1995 era de 3,79 bilhões de dólares, tendo passado para 11,87 bilhões de dólares em 2007. Afora isso a soja é a principal cultura agrícola em volume e geração de renda, incluindo 243 mil propriedades em 17 estados brasileiros. O impacto dessa espécie na pauta de exportação agroindustrial é marcante, representando, em 2007, 8% do total (ABIOVE, 2007).

A área cultivada com soja GM_{RR}, resultante da pesquisa biotecnológica agrícola, tem sido incrementada de forma acelerada no mundo inteiro. Em 2006 atingiu 58,6 milhões de hectares, que representa 57% da área global da agricultura biotecnológica. O Brasil se insere nesse cenário como terceiro maior produtor mundial de soja GM_{RR}, totalizando 11,5 milhões de hectares (ISAAA, 2006).

A liberação para o cultivo em escala comercial da soja GM_{RR} no Brasil ocorreu a partir da autorização do cultivo desse genótipo em 1998, pelo Comitê Técnico Nacional de Biossegurança (CTNBio). Essa liberação foi embasada em trabalhos consistentes, mas, na grande maioria, realizados em condições edafoclimáticas distintas dos ecossistemas de cultivo de soja no Brasil. Uma intensa discussão foi gerada em torno do tema, questionando-se aspectos éticos, de soberania científico-tecnológica, de dependência econômica, e inclusive ideológica, além dos aspectos de segurança ambiental e dos alimentos. Porém, os devidos estudos de impacto da soja GM_{RR} sobre o meio ambiente ainda não foram apresentados, nem pela empresa detentora da patente, nem por órgãos de pesquisa nacionais. Interpretação similar pode ser estendida no que concerne aos resíduos de herbicidas, até então autorizados para aplicação pré-plantio.

Na soja GM_{RR}, a resistência ao glifosato foi obtida pela introdução do gene codificador de uma isoforma da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, E.C. 2.5.1.19). Este herbicida é um eficiente inibidor da enzima EPSPS uma das envolvidas na via biossintética dos aminoácidos aromáticos. Pela ação do

1 herbicida glifosato dá-se o bloqueio da síntese de aminoácidos aromáticos pela
2 inativação da enzima EPSPS, enzima-chave na via metabólica para a síntese
3 desses aminoácidos. Na ausência do glifosato, a enzima EPSPS atua catalisando a
4 reação da chiquimato-3-fosfato (S3P), e da fosfoenolpiruvato (PEP), dando
5 condições para a produção de 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato
6 orgânico, que são moléculas necessárias à síntese dos aminoácidos aromáticos.

7 Com a presença do glifosato, há a restrição da produção desses aminoácidos
8 aromáticos, além da inibição da síntese de várias proteínas vitais, fazendo com que
9 a planta paralise o crescimento, tanto do sistema radicular, como da parte aérea,
10 conduzindo-a à senescência. Na soja GM_{RR} que codifica uma variante da EPSPS,
11 que possui baixa afinidade ao glifosato (elevado Km), a via metabólica dos
12 aminoácidos aromáticos não é inibida, conferindo assim tolerância ao herbicida
13 (ZHU et al., 2004).

14 O cultivo intensivo de soja GM_{RR} com o gene da enzima EPSPS, que confere
15 resistência ao glifosato, incorporou nova sistemática de manejo de plantas daninhas,
16 possibilitando, uma ou mais aplicações de um herbicida que até então não vinha
17 sendo utilizado na pós-emergência. Existem dúvidas se o cultivo de soja GM_{RR},
18 através de alterações químicas da planta ou da prática agrícola de utilização do
19 herbicida glifosato, pode afetar a comunidade bacteriana do solo (BUSSE et al.,
20 2001; HANEY et al., 2002). Essa indagação pode ser estendida para a microbiota
21 simbiote, podendo ou não modificar o perfil assim como a eficiência da fixação
22 biológica de nitrogênio (FBN) (KING et al., 2001; REDDY & ZABLOTOWICZ, 2003;
23 ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007). Esses questionamentos são feitos em âmbito
24 internacional. Outro aspecto amplamente debatido é o fato de ao realizarem-se
25 aplicações em fases mais avançadas de cultivo, ou apenas na pós-emergência,
26 poderia-se gerar resíduos do princípio ativo nos grãos acima do limites permitidos.
27 Estudos realizados na Argentina (ARREGUI et al., 2003) e nos EUA (TAKAHASHI et
28 al., 1991; KELLEY et al., 2004; DUKE et al., 2003) têm verificado que há o risco de
29 presença de resíduos nos grãos, especialmente quando da aplicação de dosagens
30 elevadas (acima de 1260 g ia ha⁻¹) e aplicações a partir do florescimento. Porém, a
31 diversidade de respostas é significativa, variando em função de cultivar, sistema e
32 local de cultivo. Afora isso, destaca-se que se torna difícil comparar resultados, pois,
33 em alguns casos, os experimentos foram realizados com genótipos distintos. Nesse
34 caso, quando há ou não diferença no que concerne à FBN ou quanto aos teores de

1 metabólitos secundários, não há como relacionar com o efeito do manejo, visto que
2 se sabe que a característica genotípica afeta essas variáveis. Outros experimentos
3 foram realizados apenas em casa de vegetação, em condições controladas,
4 dificultando extrapolar-se o comportamento para prováveis respostas em campo
5 experimental.

6 No presente estudo, buscou-se a partir de genótipos isogênicos,
7 geneticamente modificado (BRS 244 RR) e não modificado (BRS 154), em
8 experimento a campo, estudar a atividade microbiana do solo; o efeito da
9 modificação genética e de glifosato na fixação biológica de nitrogênio; a presença de
10 glifosato e de metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) no solo e nos grãos; e
11 os teores de isoflavonas nos grãos.

12 Complementarmente realizaram-se análises de resíduos de glifosato e AMPA
13 em grãos e solos de áreas com cultivo comercial com soja GM_{RR} tratada com
14 glifosato.

15 Considerando a problemática vigente e conhecimento disponível quando da
16 implantação do projeto, emitiram-se as seguintes hipóteses:

- 17 1. A aplicação de glifosato no manejo de soja GM_{RR} tem efeito inibitório sobre
18 microrganismos do solo que possuem a enzima EPSPS endógena não tolerante
19 ao herbicida.
- 20 2. A aplicação de glifosato no manejo de soja GM_{RR} pode afetar o metabolismo
21 da planta e/ou o mecanismo de FBN.
- 22 3. A aplicação de glifosato no manejo de soja GM_{RR} resulta em resíduos da
23 própria molécula e de AMPA no solo e nos grãos.
- 24 4. A presença do gene EPSPS exógeno na soja GM_{RR} afeta seu metabolismo
25 secundário reduzindo os teores de isoflavonas.

26 Assim, foram traçados os seguintes objetivos: 1) avaliar métodos de controle
27 de plantas daninhas, incluindo capina manual e herbicidas, sobre a biomassa e a
28 atividade microbiana de um Planossolo cultivado com soja BRS 244 RR; 2) avaliar o
29 efeito da modificação genética e da aplicação de glifosato sobre a FBN, os teores de
30 N na planta, a nodulação e a produtividade de grãos; 3) quantificar resíduos da
31 molécula de glifosato e seu metabólito, AMPA, nos grãos e no solo, no cultivo de
32 soja GM_{RR}, BRS 244 RR; 4) avaliar o efeito da modificação genética e de herbicidas
33 sobre os teores de isoflavonas nos grãos dos genótipos BRS 244 RR e BRS 154; 5)

1 avaliar os resíduos de glifosato e do AMPA, nos grãos e no solo de soja GM_{RR} de
2 produtores rurais, cultivados em diferentes condições edafoclimáticas.

3 Optou-se por apresentar a tese na forma de artigos científicos, organizados
4 na sequência de atividades que permitiram tecer as hipóteses. Essa modalidade foi
5 considerada muito mais prática que o modelo de tese tradicional, uma vez que
6 propicia uma divulgação objetiva e rápida dos resultados obtidos.

7 Inicialmente é apresentada uma revisão bibliográfica (artigo 1) sobre o efeito
8 da modificação genética e da aplicação do glifosato na microbiota do solo, na
9 fixação biológica de nitrogênio, na qualidade e segurança de grãos de soja
10 geneticamente modificada. Revisaram-se e discutiram-se os principais aspectos
11 ambientais, agronômicos e de segurança relacionados com o impacto do cultivo da
12 soja GM_{RR}, bem como do uso do herbicida glifosato nessa cultura. Discutiu-se ainda
13 a ocorrência de resíduos de herbicida no solo e nos grãos. Esta revisão foi
14 submetida à **Revista Ciência Rural** (Universidade Federal de Santa Maria- UFSM).

15 Em seguida, o artigo 2 trata do efeito do herbicida glifosato, utilizado no
16 controle de plantas daninhas, na biomassa e atividade microbiana em Planossolo
17 cultivado com soja BRS 244 RR. Este artigo foi submetido à **Revista Brasileira de**
18 **Agrociência** (Universidade Federal de Pelotas- Faculdade de Agronomia Eliseu
19 Maciel).

20 O artigo 3 aborda o efeito da modificação genética e do uso do glifosato, no
21 controle de plantas daninhas, sobre a FBN, teores de N na planta, nodulação e
22 produtividade de grãos das cultivares GM_{RR} BRS 244 RR e NM BRS 154 cultivadas
23 em Planossolo.

24 Na continuidade, foram analisados resíduos da molécula de glifosato e do
25 AMPA nos grãos e no solo, bem como a concentração de isoflavonas em soja BRS
26 244 RR e BRS 154 cultivadas em Planossolo. Os resultados mostraram que a
27 aplicação de glifosato no controle de plantas daninhas resultou em teores elevados
28 de glifosato e ácido aminometilfosfônico no solo. Nos grãos, o teor de isoflavonas
29 não foi afetado pela aplicação de glifosato, mas os resíduos desse herbicida foram
30 superiores ao permitido pela legislação vigente, que é de 10 mg kg⁻¹. Este artigo foi
31 submetido à **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, em Maio
32 de 2007.

33 No último artigo, foram analisados os resíduos de glifosato e de AMPA tanto
34 em condições experimentais de campo como em áreas de produtores rurais,

- 1 cultivadas com distintos genótipos de soja GM_{RR}, solos e condições edafoclimáticas.
- 2 Os resultados mostraram a presença de resíduos de glifosato, superiores ao
- 3 permitido pela legislação vigente e, do AMPA em todos os genótipos GM_{RR}
- 4 analisados.

1 **2. ARTIGO 1**

2

3 **EFEITO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E DA**
4 **APLICAÇÃO DO GLIFOSATO NA MICROBIOTA DO SOLO,**
5 **FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO, QUALIDADE E**
6 **SEGURANÇA DE GRÃOS DE SOJA GENETICAMENTE**
7 **MODIFICADA**

8 (Revisão submetida à **Revista Ciência Rural**)

1 **Efeito da transformação genética e da aplicação do glifosato na microbiota**
2 **do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de**
3 **soja geneticamente modificada**

4
5 **Effect of genetic transformation and the use glyphosate on soil microbial, biological**
6 **nitrogen fixation, quality and safety of genetically modified soybean**

7
8 Giani Mariza Bärwald Böhm¹ Cesar Valmor Rombaldi²

9
10 -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

11
12 **RESUMO**

13
14 A soja geneticamente modificada resistente ao herbicida glifosato (GM_{RR}) é o
15 principal produto da biotecnologia vegetal, considerando-se a evolução da área cultivada e o
16 consumo desse grão. Os EUA, a Argentina e o Brasil são os maiores produtores de soja
17 GM_{RR}. A liberação para cultivo da soja GM_{RR} no Brasil foi efetivada baseando-se, quase que
18 exclusivamente, em trabalhos realizados em outros países, sem a devida validação nas
19 condições edafoclimáticas locais. Nesse contexto, buscou-se coletar e analisar os principais
20 trabalhos que versam sobre impacto ambiental, metabolismo da planta, qualidade e segurança
21 da soja GM_{RR} tratada e não tratada com glifosato. De modo geral, os trabalhos analisados
22 apresentam algumas características comuns: a) avaliam poucas variáveis; b) inferem, a partir
23 de simulação com ensaios em casa de vegetação ou “*in vitro*”, possíveis respostas no cultivo

¹ Departamento de Tecnologia Ambiental, Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas, 455, Pelotas, RS. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/nº, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP 96010-900. E-mail: gbbohm@terra.com.br.

² Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/nº, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP 96010-900.

1 comercial. Embora ainda escassos, os estudos realizados apontam para o fato de que a
2 transformação genética não afeta os microrganismos do solo, nem a fixação biológica de
3 nitrogênio e nem a composição dos grãos. O fator que pode afetar essas variáveis é a
4 aplicação do glifosato no controle de plantas daninhas, ou seja, os riscos de perigo ao
5 ambiente e à segurança dos produtos derivados dessa matéria-prima se devem ao insumo
6 aplicado durante o cultivo, e não a transformação genética propriamente dita.

7 **Palavras-chave:** Soja transgênica, microrganismos do solo, resíduos de herbicida,
8 isoflavonas.

9

10 **ABSTRACT**

11 The genetically modified soybean resistant to glyphosate (GM_{RR}) is the main product
12 of plant biotechnology, regarding the evolution of area cultivated and the use of this grain.
13 EUA, Argentina and Brazil are the biggest producer of GM_{RR}. The release of GM_{RR} soybean
14 cultivation in Brazil was done based on works that were accomplished in other countries
15 without the validation of the same edaphoclimatic conditions. In this context, the main works
16 about environmental impact, plant metabolism, quality and safety of GM_{RR} soybean with or
17 without glyphosate application were collected and investigated. In general, the works
18 investigated showed some similar characteristics: a) few variables were studied; b)
19 simulations in green house or “*in vitro*” are used to infer possible answer on the field.
20 Although scarce, the works denoted that the genetic transformation did not affect soil
21 microorganisms, biological nitrogen fixation and composition of grains. The factor which
22 could affects these variables is the glyphosate application in weed control, thus the risk of
23 damage to the environmental and safety of products derived from this active principle are due
24 to the use of the herbicide during of cultivation, and not the genetic transformation.

25 **Key words:** Transgenic soybean, soil microorganisms, herbicides residue, isoflavones.

1 INTRODUÇÃO

2

3 A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] geneticamente modificada *Roundup Ready* (GM_{RR}),
4 resistente ao glifosato, é o produto biotecnológico de maior importância econômica nos
5 últimos quinze anos atingindo uma área cultivada de 58,6 milhões de hectares em 2006, o que
6 representa 57% da área total cultivada com plantas geneticamente modificadas. O Brasil
7 ocupa o terceiro lugar mundial em área cultivada com soja GM_{RR}, totalizando 11,5 milhões de
8 hectares (ISAAA, 2006). Na soja GM_{RR}, a resistência ao herbicida glifosato foi obtida pela
9 introdução, juntamente com a região t-DNA e do gene marcador de seleção, do gene
10 correspondente à isoforma da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase; E.C.
11 2.5.1.19, CP4 EPSPS), com peptídeo sinal, da via do chiquimato, resistente ao glifosato,
12 mantendo ativa a via biossintética de aminoácidos aromáticos nas plantas. Essa via de
13 biossíntese é inibida em genótipos de soja não modificada (NM), sem a isoforma CP4 EPSPS
14 (BUSSE et al., 2001), tendo em vista que o herbicida glifosato [(N-(fosfometil) glicina;
15 Roundup (Monsanto, St. Louis, MO)], inibe a síntese de aminoácidos aromáticos
16 (fenilalanina, triptofano e tirosina) em plantas (FISHER et al., 1986). O mecanismo de ação
17 do glifosato compreende a inibição da EPSPS, que catalisa a condensação do ácido
18 chiquímico e fosfofenolpiruvato, dando origem a bioconversão de aminoácidos aromáticos. A
19 inibição da via de chiquimato pelo glifosato resulta na acumulação do ácido chiquímico e/ou
20 ácidos hidroxibenzóicos bem como ácidos protocatequímicos e/ou ácidos gálicos em espécies
21 de plantas sensíveis (DUKE, 1988) e em *Bradyrhizobium japonicum* (ZABLOTOVICZ &
22 REDDY, 2004). Efeitos tóxicos do glifosato podem ser atribuídos à inibição da síntese de
23 aminoácidos aromáticos, à exaustão energética resultante do consumo de adenosina trifosfato
24 (ATP) e fosfofenolpiruvato na síntese do chiquimato, 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato,
25 ácidos hidroxibenzóicos e gálico, e à toxicidade resultante do acúmulo de moléculas

1 intermediárias na via do chiquimato (FISHER et al., 1986). Desse modo, é possível que haja
2 alterações no metabolismo secundário, incluindo a síntese de compostos fenólicos, que inclui
3 esses metabólitos (REDDY et al., 2000).

4 A liberação para o cultivo em escala comercial da soja GM_{RR} ocorreu a partir de
5 parecer favorável do Comitê Técnico Nacional de Biossegurança (CTNBio) em 24/09/1998,
6 em resposta ao processo enviado pela Monsanto do Brasil Ltda. (nº 01200.002402/98-60). A
7 CTNBio deliberou favoravelmente à liberação argumentando que, à luz do conhecimento
8 disponível até aquela data, não havia evidências de riscos de perigos ambientais e à saúde
9 humana e animal, decorrentes do cultivo e consumo da soja GM_{RR} do genótipo GTS 40-3-2 e
10 suas progênes (CTNBio, 2007). Nesse contexto, a CTNBio embasou essa afirmativa
11 argumentando que: 1) a soja é uma espécie exótica, de auto-polinização, com baixa taxa de
12 alogamia (em torno de 1%), não possuindo espécies nativas no Brasil passíveis de serem
13 fecundadas com pólen de soja geneticamente modificada; 2) não existe demonstração de
14 efeito pleiotrófico de sua introdução em estudos conduzidos em vários ambientes; 3) com
15 exceção de três espécies de plantas conhecidas como naturalmente tolerantes ao herbicida
16 glifosato (*Richardia brasiliensis*, *Commelina virginica*, *Spermacoce latifolia*), o uso deste
17 herbicida, durante duas décadas, não induziu a tolerância em outras espécies de plantas
18 daninhas; 4) não existem evidências de que a utilização do herbicida glifosato no cultivo de
19 soja tenha resultado em efeito negativo sobre a FBN; e, 5) não há efeito negativo do cultivo
20 de cultivares derivadas do genótipo GTS 40-3-2 sobre o perfil e dinâmica populacional de
21 insetos já associados ao cultivo da soja não modificada.

22 Complementarmente, quanto à saúde humana e animal, a CTNBio argumenta que a
23 introdução do gene CP4 EPSPS não altera a composição química da soja, com exceção da
24 própria isoforma CP4 EPSPS, considerada segura quanto aos aspectos toxicológicos e
25 alergênicos. Também foi ressaltado que a utilização da soja GM_{RR} e seus produtos derivados

1 na América do Sul, Central e do Norte, Europa e Ásia não registraram casos de reação
2 alérgica em pessoas, a menos que já fossem alérgicas à soja não modificada. Não há,
3 entretanto, referências e argumentações quanto ao risco do perigo de resíduos do insumo
4 associados à soja GM_{RR}, o glifosato e o metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA).

5 No Brasil, 3º maior produtor mundial de soja GM_{RR}, poucos trabalhos têm sido
6 conduzidos visando estudar possíveis respostas resultantes do cultivo da soja GM_{RR}, do ponto
7 de vista ambiental, agrônômico e de segurança do produto (grão), num mesmo modelo
8 experimental. Além disso, os trabalhos publicados, na sua maioria, em outros países, visaram
9 avaliar causas-conseqüências analisando duas ou três variáveis pontuais (ELMORE et al.,
10 2001; DUKE et al., 2003; ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007), ou limitaram-se a ensaios em
11 laboratório (*in vitro*) (BUSSE et al., 2001; REDDY & ZABLOTOWICZ, 2003), ou em casa
12 de vegetação (REDDY et al., 2004).

13 Alguns resultados sobre o efeito do glifosato no cultivo de soja GM_{RR} têm sido
14 reportados por diversos grupos de pesquisa, como por exemplo, o aumento da atividade
15 microbiana (HANEY et al., 2000; BUSSE et al., 2001; HANEY et al., 2002; ARAÚJO et al.,
16 2003a; RATCLIFF et al., 2006), alterações na biomassa microbiana (WARDLE &
17 PARKINSON, 1990), toxicidade do glifosato para bactérias e fungos (ARAÚJO et al., 2003a;
18 BUSSE et al., 2001), mineralização do glifosato por *Pseudomonas* spp. (GINSING et al.,
19 2004), resíduos de glifosato e do metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) em nódulos
20 e no solo (REDDY & ZABLOTOWICZ, 2003; ARAÚJO et al., 2003a), redução da FBN
21 (KING et al., 2001; ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007), redução no conteúdo de leg-
22 hemoglobina nos nódulos (REDDY et al., 2000), além de resíduos de glifosato e AMPA nos
23 grãos (DUKE et al., 2003).

24 Dessa forma, o objetivo dessa revisão visa contemplar aspectos ambientais,
25 agrônômicos e de segurança relacionados com o impacto do cultivo da soja GM_{RR}, bem como

1 do uso do herbicida glifosato nessa cultura, a fim de sumarizar os principais avanços técnicos
2 científicos nessa temática, amplamente polêmica, mesmo após 10 anos de cultivo.

4 **Efeito da transformação genética e da aplicação do glifosato na microbiota do solo**

5 As pesquisas realizadas visando elucidar o efeito do cultivo da soja GM_{RR} e do
6 controle de plantas daninhas com aplicação de glifosato sobre a microbiota de solos têm
7 gerado informações variáveis em função do tipo de solo e das condições de manejo. Assim,
8 por exemplo, verificou-se que a aplicação desse herbicida pode estimular (HANEY et al.,
9 2000) ou inibir (BUSSE et al., 2001) o processo de mineralização de compostos orgânicos no
10 solo. No segundo caso, os efeitos tóxicos do glifosato sobre microrganismos do solo
11 provavelmente se devem à ação dessa molécula sobre a enzima EPSPS de microrganismos
12 (BUSSE et al., 2001).

13 Em condições controladas de laboratório, foi demonstrado que o glifosato interfere
14 negativamente no desenvolvimento de microrganismos de reconhecida importância no solo,
15 como é o caso de *Bradyrhizobium japonicum*, bactéria que estabelece relação simbiótica com
16 a soja, fixando nitrogênio biologicamente (KING et al., 2001). Por outro lado, foi verificado
17 que a presença do glifosato pode oferecer vantagens competitivas para microrganismos
18 capazes de degradá-lo. GINSING et al. (2004), investigaram, em condições de laboratório, a
19 mineralização do glifosato e a adsorção do metabólito AMPA em cinco tipos de solos, nos
20 quais observaram que o principal metabolismo de bioconversão de glifosato no solo está
21 associado à mineralização, especialmente, por *Pseudomonas* spp.

22 Outros efeitos do herbicida são relatados por HANEY et al. (2002), como o aumento
23 do carbono da biomassa microbiana e da liberação de CO₂ quando Roundup Ultra[®] foi
24 aplicado na dosagem de 840 g ia ha⁻¹, em nove tipos de solos, com diferentes valores de pH e
25 teores de carbono orgânico e argila, na Georgia e no Texas-EUA. Nesse mesmo estudo, os

1 autores observaram que solos com maior conteúdo de carbono orgânico tendem a mineralizar
2 o glifosato mais rapidamente do que solos com baixo teor de carbono orgânico, possivelmente
3 devido à maior biomassa microbiana no primeiro caso.

4 De forma semelhante, ARAÚJO et al. (2003a) detectaram um incremento de 10 a 15%
5 na liberação de CO₂ em solos onde houve aplicação de glifosato na dosagem de 4320 g ia ha⁻¹,
6 sugerindo que a microbiota do solo é capaz de metabolizar o glifosato como uma fonte de
7 carbono. Outro fato relatado nesse trabalho foi a detecção de resíduo de glifosato e AMPA no
8 solo, em maiores concentrações em áreas onde realizaram-se aplicações de glifosato em anos
9 sucessivos. LIPHADZI et al. (2005) ao avaliarem o efeito do herbicida glifosato na dosagem
10 de 1120 g ia ha⁻¹, bem como de outros herbicidas recomendados para a cultura de milho e
11 soja, não detectaram alterações no carbono da biomassa microbiana e na respiração basal.
12 Complementarmente, verificaram que os tratamentos não afetaram a população de
13 nematóides.

14 Em experimento em campo, BOHM et al. (2007a), estudaram o efeito do cultivo de
15 soja GM_{RR} e do controle de plantas daninhas, com uma ou duas aplicações de glifosato a 960
16 g ia ha⁻¹, e verificaram que houve menor incorporação de carbono pela biomassa microbiana e
17 maior produção de CO₂ nas parcelas com aplicação de glifosato. Complementarmente,
18 BOHM et al. (2007b) verificaram que o glifosato aplicado em soja GM_{RR}, resulta em resíduo
19 dessa molécula no solo (0,30 mg kg⁻¹ a 0,40 mg kg⁻¹), bem como da molécula de AMPA (1,03
20 mg kg⁻¹ a 1,70 mg kg⁻¹). De acordo com SOUZA et al. (1999), os fatores que influenciam a
21 persistência do glifosato estão relacionados com sua adsorção ao solo e ao metabolismo da
22 biodegradação. A degradação do glifosato no solo pode seguir duas vias principais: a primeira
23 consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium*
24 *radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase); a segunda rota consiste na
25 transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA) sob a ação da bactéria

1 *Anthrobacter atrocyaneus* e *Flavobacterium* sp., e do próprio metabolismo da planta
2 (AMARANTE & SANTOS, 2002).

3 Em estudo sobre biodegradação de glifosato (fase adsorvida e fase não-adsorvida),
4 EBERBACH (1998) observou que há rápida degradação do glifosato no primeiro dia após a
5 aplicação, seguido de diminuição da velocidade de degradação a partir daí, e que a adsorção
6 restringe a disponibilidade do glifosato para biodegradação ao longo do tempo. Assim, a
7 meia-vida da molécula depende da forma como a molécula está no solo, adsorvida ou não
8 adsorvida. No segundo caso é de 6 a 9 dias e a parte adsorvida é de 222 a 835 dias.

9 ROBERTSON & ALEXANDER (1994) conduziram estudo para avaliar a ocorrência
10 de degradação acelerada de alguns herbicidas e observaram que o glifosato é mais
11 rapidamente mineralizado quando se repete a aplicação no mesmo solo. Segundo esses
12 autores, o glifosato, quando aplicado repetidamente na mesma área, por vários anos, pode ter
13 a taxa de degradação aumentada, pois os microrganismos presentes podem estar mais
14 adaptados à presença do composto e/ou haver pressão de seleção para microrganismos com
15 enzimas específicas para metabolizá-lo.

16 Para ARAÚJO et al. (2003b) a meia vida do glifosato no solo pode variar em função
17 do tipo de solo, pois ao avaliar o efeito do glifosato na dosagem de 2160 g ia kg⁻¹, em
18 amostras de solo Argissolo Vermelho-Amarelo e Latossolo Vermelho, com e sem histórico de
19 aplicação prévia do herbicida em campo, verificaram que a meia-vida do glifosato foi menor
20 nas amostras do Argissolo do que do Latossolo. Segundo esses autores, esse fato pode estar
21 relacionado à maior quantidade de argila presente em Latossolos, fazendo com que seja mais
22 adsorvido a essas partículas, dificultando a ação microbiana, e aumentando a meia-vida nesse
23 solo. Outros autores, como CARLISLE & TREVORS (1988), também reportaram que a
24 meia-vida do glifosato no ambiente é dependente do tipo de solo e da atividade microbiana,
25 podendo variar de uma semana até anos. ANDRÉA et al. (2003), avaliando o efeito de

1 repetidas aplicações de glifosato em solo, na sua metabolização, verificaram redução rápida
2 dos resíduos extraíveis de glifosato (meia-vida $0,92 \pm 0,29$ mês), mas meia-vida crescente de
3 2,2 a 3,4 meses para mineralização total, de acordo com o aumento de 1 a 4 aplicações desse
4 herbicida.

5

6 **Efeito do glifosato sobre a fixação biológica de nitrogênio em soja geneticamente** 7 **modificada (GM_{RR})**

8 A fixação biológica de nitrogênio (FBN) pode disponibilizar de 65 a 160 kg N ha⁻¹
9 durante o cultivo da soja, o que pode representar até 100% do nitrogênio requerido por essa
10 espécie (ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007). Manter a relação simbiótica da planta com as
11 bactérias fixadoras de N é importante para se obter uma boa produtividade sem necessidade
12 de incrementar o N do solo por fonte externa. A FBN pode ser afetada pela aplicação de
13 glifosato de forma direta por danos às bactérias simbiotes, ou indireta, por afetar a fisiologia
14 da planta hospedeira, reduzindo a eficácia do processo de fixação/absorção. Efeitos do
15 glifosato sobre nodulação, FBN e fisiologia de soja GM_{RR} foram estudados por REDDY et al.
16 (2000), KING et al. (2001), REDDY & ZABLOTOWICZ (2003) e ZABLOTOWICZ &
17 REDDY (2007).

18 Inicialmente, REDDY et al. (2000) e KING et al. (2001), verificaram alterações em
19 vários parâmetros da nodulação, utilizando glifosato na dosagem recomendada pelo
20 fabricante, em experimentos realizados em casa de vegetação. Por exemplo, REDDY et al.
21 (2000) observaram que glifosato aplicado na dosagem de 1120 g ia ha⁻¹ reduziu 28% o
22 número de nódulos, 47% a massa de nódulos e 13% o conteúdo de leg-hemoglobina. KING et
23 al. (2001) também observaram que aplicações de glifosato na dosagem de 1680 g ia ha⁻¹, num
24 período de 5 a 12 dias após a emergência (estádio V2), reduziram em 33% a biomassa de
25 nódulos. Porém, aplicações tardias de glifosato, após 18, 25 ou 32 dias, não afetaram a massa

1 de nódulos. Desse modo, o período de aplicação pode afetar o processo de nodulação e,
2 provavelmente, de fixação de N. Complementarmente, REDDY & ZABLOTOWICZ (2003),
3 testaram o efeito de uma (estádio V2) ou duas aplicações (estádios V2 e V4) de glifosato na
4 dosagem de 1120 g ia ha⁻¹, em condições de experimento em campo, sobre a nodulação, e
5 observaram que o número de nódulos não foi afetado para uma aplicação de glifosato no
6 estágio V2. Porém, duas aplicações (V2 e V4) reduziram a massa de nódulos em
7 aproximadamente 28% e o conteúdo de leg-hemoglobina em 10% quando comparados com o
8 tratamento controle, sem herbicida. Esses resultados são contraditórios com os obtidos por
9 KING et al. (2001) segundo os quais, aplicações mais tardias de glifosato não afetam a
10 nodulação.

11 O efeito do glifosato sobre as bactérias simbiotes (*B. japonicum*) e sobre a redução de
12 acetileno em condições de ensaio em meio de cultura e em casa de vegetação foi citado por
13 ZABLOTOWICZ & REDDY (2004). Concentrações de glifosato de 0,5 e 1,0 mM inibiram a
14 redução de acetileno a partir de 20% a 28% nas cepas mais sensíveis e, nas cepas mais
15 tolerantes, de 8% a 20%, respectivamente. MALTY et al. (2006) avaliaram o efeito do
16 glifosato sobre três estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29, INPA 80A e INPA 553A) e
17 uma de *Bradyrhizobium japonicum* (BR 86), em meio de cultivo com concentrações
18 crescentes do herbicida (0 a 454 µmol L⁻¹). Nesse experimento, foi verificado que o glifosato
19 apresentou efeitos inibitórios sobre o crescimento de *Bradyrhizobium* em meio de cultura.
20 Complementarmente, estudaram os efeitos sobre a nodulação da soja, em casa de vegetação,
21 em solo que recebeu, antes do plantio, dosagens crescentes do herbicida de 600 até 4800 g ia
22 ha⁻¹. Nesse caso, não houve efeito sobre a nodulação, evidenciando que as respostas são
23 distintas dependendo do modelo de estudo (*in vitro* ou em casa de vegetação).

24 Em contrapartida, ZABLOTOWICZ & REDDY (2007) observaram, em experimento
25 a campo, conduzido de 2002 a 2004, que a nodulação e a FBN são variáveis entre safras, e

1 que o glifosato tem pouco efeito sobre essas variáveis se aplicado nas dosagens recomendadas
2 pelo fabricante (até 2240 g ia ha⁻¹). Porém, quando o glifosato foi aplicado em dosagens de
3 3360 g ia ha⁻¹, foram observadas reduções na FBN, bem como, nos teores de N foliar que
4 reduziram entre 8% a 13%, e nos grãos reduziram de 17% a 32%. Esses mesmos autores
5 (ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007) relatam que as respostas fisiológicas e de rendimento
6 de grãos, com aplicação de glifosato em soja GM_{RR}, podem variar em função de genótipos,
7 localização geográfica, condições ambientais, tipo de solo, população nativa de
8 *Bradyrhizobium*, dentre outros fatores. O potencial de impacto negativo do glifosato aplicado
9 em soja GM_{RR} é também relatado por REDDY et al. (2004), que observaram a formação do
10 AMPA a partir da degradação do glifosato por microrganismos do solo. Em condições de
11 campo, essa formação depende das dosagens do herbicida, do genótipo e das condições
12 edafoclimáticas. Os efeitos do AMPA sobre a nodulação, FBN e assimilação ainda necessitam
13 ser estudados.

14 Outros aspectos relacionados ao impacto ambiental da soja GM_{RR} também foram
15 citados por CERDEIRA et al. (2007) e CERDEIRA & DUKE (2007). CERDEIRA et al.
16 (2007) observaram que altas temperaturas, luminosidade, estresses por déficit hídrico e
17 aplicações precoces do glifosato podem diminuir a resistência da soja GM_{RR} a esse herbicida,
18 ocasionando clorose, incidência de infecções por *Fusarium solani*, reduções na FBN, perdas
19 na produtividade e redução de biomassa. Porém, a influência do glifosato sobre a
20 suscetibilidade a doenças em soja GM_{RR} é variável, algumas vezes reduzindo e em outras
21 incrementando. Relataram ainda que, em geral, existe pouco efeito negativo do glifosato sobre
22 a microflora, pássaros e artrópodes, e quando isso ocorre se deve ao efeito indireto do
23 glifosato sobre a vegetação do local. CERDEIRA et al. (2007) e CERDEIRA & DUKE
24 (2007) argumentam que há vantagens no uso de glifosato em relação a outros herbicidas
25 utilizados durante o cultivo da soja GM_{RR}, o glifosato é menos tóxico, a DL₅₀ do glifosato é

1 5600 mg kg⁻¹ enquanto que outros herbicidas como o Imazaquim e Trifluralin são de 5000 mg
2 kg⁻¹ e, Fomesafen é de 2000 mg kg⁻¹; e a aplicação de glifosato no cultivo de soja GM_{RR}
3 proporciona o cultivo sem remoção do solo, contribuindo para redução da erosão, da
4 compactação do solo e perda de umidade. Entretanto, verificaram que o maior potencial de
5 impacto negativo, relacionado ao cultivo de soja GM_{RR} com aplicação de glifosato, é a
6 possibilidade do surgimento de plantas daninhas resistentes a esse herbicida, além daquelas
7 que já são naturalmente resistentes.

8

9 **Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico, e teores de isoflavonas em grãos de** 10 **soja geneticamente modificada (GM_{RR})**

11 No que concerne aos aspectos relativos ao impacto do manejo da soja GM_{RR}, com o
12 uso de glifosato, sobre a qualidade e segurança dos grãos, verifica-se que a maioria dos
13 estudos foram realizados abordando a composição química dos grãos. Poucas informações
14 foram obtidas frente às prováveis respostas à aplicação do glifosato, quanto aos resíduos da
15 própria molécula e do metabólito AMPA nos grãos, bem como sobre o metabolismo
16 secundário.

17 O efeito do glifosato na composição de grãos de soja GM_{RR} foi avaliado por
18 PADGETTE et al. (1995), TAYLOR et al. (1999), DUKE et al. (2003) e MCCANN et al.
19 (2005). Inicialmente, PADGETTE et al. (1995) avaliaram a expressão do gene CP4 EPSPS
20 em soja GM_{RR} na presença e ausência desse herbicida, e verificaram acúmulo similar da
21 proteína CP4 EPSPS em ambas as condições. Na seqüência, TAYLOR et al. (1999)
22 compararam duas cultivares de soja GM_{RR} (40-3-2 e 61-67-1), tratadas com glifosato em pré-
23 emergência e em pós-emergência, nas dosagens recomendadas para o produto comercial, com
24 a cultivar parental NM (A 5403), quanto à qualidade geral, incluindo teor de proteínas, fibras,
25 lipídios, carboidratos, aminoácidos e isoflavonas. Os resultados demonstraram que nem o
26 genótipo nem a aplicação do glifosato interferiram nas características químicas e funcionais

1 do grão. Segundo esses autores, a via de biossíntese de aminoácidos aromáticos não foi
2 afetada pela modificação genética, resultando em teores de aminoácidos aromáticos similares
3 entre as variedades testadas. Complementarmente, verificaram que o gene CP4 EPSPS
4 exerceu sua atividade tanto na presença como na ausência de glifosato para a produção de
5 aminoácidos aromáticos.

6 Outra classe de compostos derivados da via de biossíntese de aminoácidos são as
7 isoflavonas, que têm sido reportadas por possuírem atividades estrogênicas, antioxidantes e
8 hipocolesterolêmicas (GENOVESE et al., 2005). Estudos realizados por DELANNAY et al.
9 (1995), sugerem que o incremento de isoflavonas em soja é resultado de indução por estresses
10 bióticos e abióticos. Assim, se esperaria que a aplicação de glifosato, em soja GM_{RR}, pudesse
11 resultar em estresses à planta e afetar a síntese dessas moléculas. Porém, essa hipótese não foi
12 confirmada, tendo-se verificado que o tratamento com o herbicida não afeta a síntese e
13 acúmulo de isoflavonas (TAYLOR et al., 1999; BOHM et al., 2007b).

14 É fato, entretanto, que há significativa variação de concentração de isoflavonas em
15 soja, em função de genótipos, regiões e condições de cultivo, independentemente de ser
16 modificada ou não. GENOVESE et al. (2005), por exemplo, avaliaram quatorze variedades
17 de soja NM fornecidas pela Embrapa no ano de 2003, produzidas em Ponta Grossa (Paraná,
18 Brasil), e detectaram concentrações variando de 57 mg 100 g⁻¹ a 188 mg 100 g⁻¹. Em
19 genótipos cultivados nos EUA, WANG et al. (2000) reportaram valores de 116 mg 100 g⁻¹ a
20 274 mg 100 g⁻¹. DUKE et al. (2003) observaram valores mais elevados, entre de 361 mg 100
21 g⁻¹ a 590,3 mg 100 g⁻¹, em outros genótipos. BOHM et al. (2007b) ao compararem os teores
22 médios de isoflavonas de soja GM_{RR} (221,08 mg 100 g⁻¹) e não transgênica (182,16 mg 100 g⁻¹),
23 verificaram que a transformação genética não afetou essa variável de forma significativa, o
24 que também havia sido observado por TAYLOR et al. (1999).

1 Complementarmente, MCCANN et al. (2005), estudaram por três anos consecutivos
2 25 cultivares de soja GM_{RR} tratadas com glifosato em dosagens recomendadas pelo fabricante
3 do produto comercial e 25 cultivares NMs, não tratadas com glifosato. Esses autores
4 verificaram que os teores de componentes nutricionais do grão são similares entre as
5 variedades testadas. Além disso, os teores de lectina, inibidores de tripsina e a composição de
6 isoflavonas apresentaram variabilidade entre as safras estudadas para todos os genótipos, mas
7 não houve efeito da modificação genética ou da aplicação de glifosato. Assim, pode-se
8 verificar que, de forma geral, segundo esses autores, a aplicação de glifosato em soja GM_{RR},
9 não afeta as características nutricionais do alimento, bem como a concentração de isoflavonas,
10 moléculas resultantes do metabolismo secundário.

11 No que concerne aos resíduos, ARREGUI et al. (2003) detectaram teores de 0,1 a 1,8
12 mg kg⁻¹ do princípio ativo do glifosato em grãos de soja GM_{RR} quando o produto foi aplicado
13 durante os primeiros estádios do cultivo. DUKE et al. (2003), detectaram teores de 2,18 a 3,08
14 mg kg⁻¹ do princípio ativo do glifosato, e 7,27 a 25,00 mg kg⁻¹ do metabólito AMPA em grãos
15 de soja GM_{RR} tratada com herbicida na dosagem de 1260 g ia ha⁻¹, aplicado 56 dias após o
16 plantio. Esses valores estão abaixo do parâmetro preconizado pela legislação brasileira
17 vigente que é de 10 mg kg⁻¹. Porém, ressalta-se, ainda, que até 1994, o limite máximo
18 permitido de glifosato nos grãos era de 0,2 mg kg⁻¹ e, a partir daí, aumentou-se em 50 vezes
19 esse limite para a soja GM_{RR}, passando para 10 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2007). Destaca-se que
20 esse herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de
21 animais, quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado, embora a
22 ingestão diária aceitável (IDA) por massa corpórea deste composto é relativamente baixa
23 (IDA= 0,042 mg kg⁻¹d⁻¹) (ANVISA, 2007). Os estudos de respostas crônicas em animais
24 alimentados com dietas dentro das concentrações permitidas não mostraram perda de peso ou
25 alterações nas variáveis sanguíneas e do pâncreas ou, ainda, evidência de carcinogenicidade

1 em células humanas. No entanto, estudos realizados com ratos demonstraram perda de peso,
2 descarga nasal e morte de matrizes grávidas, além de desordens digestivas (AMARANTE &
3 SANTOS, 2002).

4 Recentemente, BOHM et al. (2007b), ao avaliarem resíduos de glifosato nos grãos da
5 cultivar GM_{RR} BRS 244RR, com uma e duas aplicações de glifosato na dosagem de 960 g ia
6 ha⁻¹, verificaram que há presença dessa molécula nos grãos, proporcionalmente à dosagem
7 aplicada. No tratamento em que se realizou uma aplicação de glifosato, a concentração foi de
8 19 mg kg⁻¹, enquanto naquele onde realizaram-se duas aplicações a concentração aumentou
9 para 36 mg kg⁻¹. Ao monitorarem-se as concentrações de AMPA, o comportamento foi
10 similar, ou seja, em soja tratada uma vez com glifosato, o resíduo foi de 9 mg kg⁻¹ e nas
11 parcelas tratadas duas vezes, detectaram-se 12 mg kg⁻¹.

12 Os teores de glifosato detectados por BOHM et al. (2007b), são superiores aos teores
13 máximos permitidos pela legislação vigente, bem como superiores aos detectados
14 previamente por DUKE et al. (2003), mesmo que as dosagens utilizadas por esses últimos
15 autores tenham sido maiores. As causas prováveis para essas diferenças ainda não são
16 conhecidas, mas é provável que a metabolização da molécula na planta seja dependente, além
17 do genótipo, das condições edafoclimáticas durante o cultivo, como citado por REDDY et al.
18 (2004).

19

20 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

21 Dentre as espécies geneticamente modificadas liberadas para o cultivo convencional a
22 soja GM_{RR} tem se destacado como o produto da biotecnologia vegetal de maior expressão
23 mundial, ao menos em área cultivada, totalizando, em 2006, 58,6 milhões de hectares. O
24 Brasil se insere nesse cenário como terceiro maior produtor mundial de soja GM_{RR}, a partir da
25 autorização do cultivo desse genótipo em 1998, pela CTNBio.

1 Temática polêmica incluindo conceitos de segurança ambiental e do alimento,
2 perpassando por discussões éticas, de soberania científico-tecnológica, de dependência
3 econômica, e inclusive ideológica, ainda é elemento de dúvidas e discussões. Nessa revisão
4 observa-se que a liberação do cultivo no Brasil foi embasada em trabalhos consistentes, mas,
5 na grande maioria, realizados em condições edafoclimáticas distintas dos ecossistemas de
6 cultivo de soja no Brasil. Afora isso, há aspectos técnico-científicos a serem esclarecidos: 1) o
7 efeito da transformação genética da soja GM_{RR}, no ambiente e na segurança dos produtos à
8 base desse grão; e, 2) o efeito do insumo associado à soja GM_{RR}, o glifosato, sobre essas
9 mesmas variáveis.

10 Nessa compilação de dados observou-se que há consenso de que a transformação
11 genética realizada pela introdução do gene CP4 EPSPS e do gene de seleção, não afeta a
12 microbiota do solo, a fixação do nitrogênio, a composição físico-química básica (teor de
13 proteínas, extrato etéreo, carboidratos e minerais), nem o teor de isoflavonas dos grãos. A
14 única alteração detectada é a presença da proteína CP4 EPSPS, o que é absolutamente normal,
15 tendo em vista que se trata do produto de tradução do gene inserido, sem o qual a planta não
16 seria resistente ao glifosato. Embora grande parte dos trabalhos que geraram essas
17 informações foram realizados em outros países (TAYLOR et al., 1999; DUKE et al., 2003;
18 MCCANN et al., 2005; ZABLOTOWICZ & REDDY, 2007), há relatos e dados consistentes
19 de equipes brasileiras confirmando, em parte ou na totalidade, esse comportamento nas
20 condições locais (ARAÚJO et al., 2003a; CERDEIRA et al., 2007; BOHM et al., 2007b).
21 Mas, não há unanimidade quanto ao efeito do cultivo de soja GM_{RR}, com a aplicação do
22 herbicida glifosato, sobre o impacto ambiental, fixação biológica de nitrogênio e segurança
23 dos grãos. Nesse caso, dependendo do solo, da região e das condições de cultivo (a campo,
24 em casa de vegetação, em vasos ou *in vitro*), dosagens e época de aplicação do glifosato, pode

1 ou não haver efeito do herbicida sobre o comportamento biológico do solo, na FBN, e a
2 presença de resíduos de glifosato no solo e nos grãos.

3 Mas detalhadamente, há significativas controvérsias entre os resultados de trabalhos
4 que estudaram o efeito da aplicação de glifosato em soja GM_{RR} sobre os resíduos dessa
5 molécula e do metabólito AMPA nos grãos. A priori, de acordo com a recomendação técnica
6 dos produtos registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
7 (MAPA), respeitando as dosagens, tecnologia de aplicação e o período de carência, não
8 deverá haver problemas com resíduos acima dos teores permitidos pela legislação vigente,
9 que é de 10 mg kg⁻¹, ou seja, 50 vezes maior do que permitido até 1994. Avaliando-se os
10 trabalhos que versam sobre essa problemática, há evidência de que respeitados esses
11 pressupostos os resíduos de glifosato nos grãos mantêm-se abaixo dos limites máximos
12 (ARREGUI et al., 2003; DUKE et al., 2003). Outros trabalhos, inclusive realizados no Brasil
13 (BOHM et al., 2007b), demonstram que há risco significativo do perigo de resíduos nos grãos.
14 É o caso da soja GM_{RR}, cultivada em duas safras (2005/2006 e 2006/2007), com aplicações
15 do glifosato dentro das recomendações técnicas, que apresentaram resíduos acima do limite
16 máximo. Tal fato também foi observado pelos mesmos autores, que coletaram grãos em
17 propriedades agrícolas brasileiras, e o problema foi confirmado.

18 Frente a essa situação, recomenda-se a realização de experimentos em cada região de
19 produção, em anos sucessivos, em condições de campo, de modo a obterem-se as reais
20 respostas à aplicação de glifosato na soja GM_{RR}. Essa afirmativa é feita em função de que a
21 maioria dos trabalhos encontrados abordou a problemática em apenas uma safra, ou em
22 condições de simulação (casa de vegetação, vasos, *in vitro*), ou avaliando apenas algumas das
23 variáveis citadas nessa revisão. Além disso, embora haja citações de que o problema não
24 existe (DUKE et al., 2003; CERDEIRA & DUKE, 2007), há risco de ocorrência de perigos

1 ambientais e de segurança dos grãos de soja GM_{RR}, associados à aplicação do herbicida e não
2 à transformação genética (BOHM et al., 2007b).

3

4 **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

5 AMARANTE, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação.

6 **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.

7 **ANVISA-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Capturado em 14 fev. 2007. Online.

8 Disponível na Internet em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

9 ANDRÉA, M.M. et al. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and
10 soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.11, p.1329-1335, 2003.

11 ARAÚJO, A.S.F. et al. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils.

12 **Chemosphere**, Oxford, v.52, p.799-804, 2003a.

13 ARAÚJO, A.S.F. et al. Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. **Pesticidas: R.**

14 **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.157-164, 2003b.

15 ARREGUI, M.C. et al. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant

16 soybean. **Pest Management Science**, v.60, n.2, p.163-166, 2003.

17 BOHM, G.M.B. et al. Efeito do controle de plantas daninhas na biomassa e atividade

18 microbiana em planossolo cultivado com soja BRS 244RR. **Revista Brasileira de**

19 **Agrociência**, Pelotas, (no prelo) 2007a.

20 BOHM, G.M.B. et al. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico, e teores de

21 isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154 cultivadas em planossolo. **Revista Brasileira de**

22 **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas (no prelo) 2007b.

1 BUSSE, M.D. et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control and
2 soil on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1777-
3 1789, 2001.

4 CARLISLE, S.M.; TREVORS, J.T. Glyphosate in the environment. **Water, Air, Soil**
5 **Pollution**, v.39, p.409-420, 1988.

6 CERDEIRA, A.L. et al. Review of potencial environmental impacts of transgenic glifosate-
7 resist ant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42,
8 p.539-549, 2007.

9 CERDEIRA, A.L.; DUKE, S.O. Environmental impacts of transgenic herbicide-resistant
10 crops. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and**
11 **Natural Resources**, v.2, n.033, 2007.

12 CTNBio- Comitê Técnico Nacional de Biossegurança. Capturado em 15 abr. 2007. Online.
13 Disponível na Internet em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3664.html>>.

14 DELANNAY, X. et al. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment
15 with glyphosate. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1461–1467, 1995.

16 DUKE, S.O. et al. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of
17 glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food**
18 **Chemistry**, Columbus, v.51, n.1, p. 340-344, 2003.

19 DUKE, S.O. Glyphosate. In *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*;
20 Kearney, P. C., Kaufman, D. D., Eds.; Dekker: New York, v. 3, p. 1-70, 1988.

21 EBERBACH, P.L. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the
22 simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-phosphonomethyl) glycine in
23 four soils. **Pesticide Science**, Chichester, v.52, p.229-240, 1998.

1 ELMORE, R.W. et al. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to glyphosate.
2 **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, p. 404-407, 2001.

3 FISHER, R.S. et al, Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in
4 Eubacteria. **Journal Bacteriol.** V. 168, p. 1147-1154, 1986.

5 GENOVESE, M.I. et al. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean
6 varieties. **Food Science and Technology International**, Londres, v.11, n.3, p.205–211, 2005.

7 GIMSING, A.L. et al. Chemical and microbiological soil characteristics controlling
8 glyphosate mineralisation in Danish surface soils. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p.233–242,
9 2004.

10 HANEY, R.L. et al. Bioremediation and biodegradation: effect of roundup ultra on microbial
11 activity and biomass from selected soils. **Journal Environmental Quality**, Madison , v.31,
12 p.730-735, 2002.

13 HANEY, R.L. et al. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed**
14 **Science**, Champaign, v.48, p. 89–93, 2000.

15 ISAAA- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - Global
16 Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. Capturado em 15 maio 2007.
17 Online. Disponível na Internet em:
18 <<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html>>.

19 KING, C.A. et al. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in
20 response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, p.79–186,
21 2001.

22 LIPHADZI, K.B. et al. Soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate
23 and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. **Weed Science**, Champaign, v.
24 53, n.4, p.536-545, 2005.

- 1 MALTY, J.S. et al. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em
2 meio de cultura e casa de vegetação. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2,
3 p.285-291, 2006.
- 4 MCCANN, M.C. et al. Glyphosate-tolerant soybeans remain compositionally equivalent to
5 conventional soybeans (*Glycine max* L.) during three years of field testing. **Journal of**
6 **Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.53, p.5331-5335, 2005.
- 7 PADGETTE, S.R. et al. Development, identification, and characterization of a glyphosate-
8 tolerant soybean line. **Crop Science**, Madison, v.35, p.1451–1461, 1995.
- 9 RATCLIFF, A.W. et al. Changes in microbial community structure following herbicide
10 (glyphosate) additions to forest soils. **Applied Soil Ecology**, v.34, p.114–124, 2006.
- 11 REDDY, K.N et al. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury
12 in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food**
13 **Chemistry**, Columbus, v.52, n.16, p. 5139-5143, 2004.
- 14 REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to various
15 salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**,
16 Champaign, v. 51, p. 496–502, 2003.
- 17 REDDY, K.N. et al. Effect of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in
18 glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. **Journal New Seeds**,
19 v.2, p.37–52, 2000.
- 20 ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Growth-linked and cometabolic biodegradation:
21 possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. **Pesticide**
22 **Science**, Chichester, v.41, p.311-318, 1994.
- 23 SOUZA, A.P. et al. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr.
24 **Planta Daninha**, Viçosa, v.17, p.387-398, 1999.

- 1 TAYLOR, N.B. et al. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with
2 glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, p.4469- 4473,
3 1999.
- 4 VEIGA, F. et al. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in
5 Galicia, north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 271,
6 p.135-144, 2001.
- 7 WANG, C. Isoflavone content among maturity group 0 to II soybeans. **Journal of the**
8 **American Oil Chemists' Society**, v.77, p.483-487, 2000.
- 9 WARDLE, D.A; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and
10 activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.122, p.21-28, 1990.
- 11 ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield
12 responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, v.26, p.370-376,
13 2007.
- 14 ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Impact of glyphosate on the bradyrhizobium
15 japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal**
16 **Environmental Quality**, Madison, v.33, p. 825-831, 2004.

1 **3. ARTIGO 2**

2

3 **EFEITO DO CONTROLE DE PLANTAS DANINHAS NA**
4 **BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA EM PLANOSSOLO**
5 **CULTIVADO COM SOJA BRS 244 RR**

6

7 (Submetido à **Revista Brasileira de Agrocência**, FAEM/UFPeI em novembro de
8 2006).

1 respiração basal e quociente metabólico. Verificou-se que a aplicação de glifosato
2 resultou em menor incorporação de carbono pela biomassa microbiana, bem como
3 maior liberação de CO₂ pela respiração, não havendo resposta ao número de
4 aplicações desse herbicida. O menor valor do quociente metabólico e a maior
5 relação entre o carbono da biomassa microbiana e o carbono orgânico total foram
6 obtidos no tratamento sem uso de herbicida, o que qualifica esse tratamento como o
7 de maior estabilidade da microbiota em relação aos demais.

8 **Palavras-chave:** Glifosato, imazetapir, resíduos, soja geneticamente modificada

9

10 **ABSTRACT**

11 The biomass and microbial activity of albaqualf cultivated with soybean BRS 244
12 RR, with different methods of weed control, were evaluated. During the 2005/2006
13 season, in setup experiment at Centro Agropecuário da Palma, of UFPEL, in area
14 without previous cultivation with soybean. Treatments tested were, all with soybean
15 BRS 244RR, with four repetition, in a completely randomized design. T1- without
16 application of herbicide, hand weeded; T2- one application of 960 g ai ha⁻¹ of
17 glyphosate; T3- two application of 960 g ai ha⁻¹ of glyphosate; T4- one application of
18 100 g ai ha⁻¹ of Imazethapyr. Aspects relative to organic carbon total, carbon of
19 microbial biomass, basal breathing and metabolite quotient were assessed. The
20 conclusion was that the treatment with application of glyphosate decreased carbon of
21 microbial biomass, but increased liberation of CO₂, regardless the number of
22 herbicide application. The lower value of metabolite quotient and the greater relation
23 between carbon of microbial biomass and organic carbon were obtained for
24 treatment without use of herbicide, that qualify this treatment as most stable
25 regarding soil microbial in relation to others.

1 **Key words:** Glyphosate, imazethapyr, residue, genetically modified soybean

2

3 **INTRODUÇÃO**

4 A área com cultivo de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] geneticamente modificada
5 *Roundup Ready* (GM_{RR}), resistente ao glifosato, foi substancialmente incrementada
6 durante a última década, sem haver conhecimento amplo dos efeitos do manejo
7 desse cultivo sobre os processos biológicos do ecossistema. A produção mundial de
8 soja foi de 220 milhões de toneladas em 2005, sendo o Brasil, atualmente, o
9 segundo maior produtor com 53 milhões de toneladas (MINISTÉRIO DA
10 AGRICULTURA, 2006). Desse total, aproximadamente, 6 milhões de toneladas
11 foram produzidas no Rio Grande do Sul, das quais estima-se que 85% seja
12 originada de sementes GM_{RR}.

13 A soja GM_{RR}, pela modificação genética do gene que codifica a enzima EPSPS
14 (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase; E.C. 2.5.1.19) tornou-se tolerante ao
15 herbicida glifosato, que inibe a enzima EPSPS, envolvida na via biossintética de
16 aminoácidos aromáticos (BUSSE et al., 2001). O fato de ter-se induzido essa
17 resistência, com a introdução de um gene que corresponde a uma izoenzima da
18 EPSPS, tem possibilitado a aplicação de glifosato na pós-emergência no cultivo de
19 soja GM_{RR}, gerando a dúvida se esse procedimento pode ou não causar impacto
20 negativo na microbiota do solo.

21 Vários autores como BUSSE et al. (2001), HANEY et al. (2002), ARAUJO et al.
22 (2003), GINSING et al. (2004) e LIPHADZI et al. (2005), avaliaram o efeito do
23 herbicida glifosato, em diferentes tipos de solos e condições de manejo, sobre a
24 atividade microbiana do solo, tendo-se verificado que a aplicação desse herbicida
25 pode estimular ou inibir os processos de mineralização de compostos orgânicos no

1 solo. Efeitos tóxicos do glifosato sobre microrganismos do solo podem ocorrer
2 devido à ação sobre a enzima EPSPS que é inibida pelo glifosato tanto em plantas
3 como microrganismos (BUSSE et al., 2001). Entretanto, HANEY et al. (2002)
4 observaram significativo aumento do carbono da biomassa microbiana e evolução
5 de CO₂ quando Roundup Ultra[®] foi adicionado na dosagem de 234 mg ia kg⁻¹, em
6 nove tipos de solos, com diferentes valores de pH e teores de carbono orgânico e
7 argila, na Georgia e no Texas-EUA. Nesse mesmo estudo, também observaram que
8 solos com maior conteúdo de carbono orgânico tendem a mineralizar o glifosato
9 mais rapidamente do que solos com baixo teor de carbono orgânico, possivelmente
10 devido à maior biomassa microbiana no primeiro caso.

11 De forma semelhante, ARAUJO et al. (2003) detectaram um incremento de 10%
12 a 15% na liberação de CO₂ em solos onde houve aplicação de glifosato na dosagem
13 de 4320 g ia ha⁻¹, sugerindo que a microbiota do solo é capaz de metabolizar o
14 glifosato como uma fonte de carbono, em ensaios *in vitro*. Outro fato relatado nesse
15 trabalho foi o incremento de fungos, indicando que esses microrganismos foram
16 beneficiados diante à aplicação de glifosato, demonstrando estarem aptos a utilizá-lo
17 como fonte de nutrientes e energia.

18 GINSING et al. (2004), investigaram, em condições de laboratório, a
19 mineralização do glifosato e a adsorção do metabólito ácido aminometilfosfônico
20 (AMPA) em cinco tipos de solos agriculturáveis coletados na Dinamarca, nos quais
21 observaram que o principal metabolismo de bioconversão de glifosato no solo está
22 associado à mineralização, especialmente, por *Pseudomonas* spp.

23 Em contraste, BUSSE et al. (2001) aplicando glifosato nas concentrações
24 recomendáveis para a cultura de pinus (5-50 mg ia kg⁻¹), seja a campo ou em
25 laboratório, não detectaram diferença sobre a evolução de CO₂ e populações de

1 bactérias e fungos. Entretanto, quando esse herbicida foi aplicado em dosagens cem
2 vezes maior do que o recomendado houve incremento significativo na evolução de
3 CO₂ em áreas tratadas, tanto a campo quanto em ensaios laboratoriais. Nos ensaios
4 com microbiota isolada em meio de cultura o glifosato mostrou-se tóxico para fungos
5 e bactérias. Quando esses estudos foram conduzidos em vasos com solo esse
6 efeito não se reproduziu.

7 Em condições de campo, LIPHADZI et al. (2005) analisando o efeito do herbicida
8 glifosato a 1120 g ia ha⁻¹, bem como de outros herbicidas recomendados para a
9 cultura de milho e soja, não detectaram alterações para variação de carbono da
10 biomassa microbiana e da respiração basal. Complementarmente, verificaram que
11 os tratamentos não afetaram a população de nematóides.

12 No entanto, essas mudanças ainda não foram estudadas em Planossolos
13 cultivados com soja GM_{RR}, com o gene EPSPS, que incorporaram nova sistemática
14 de manejo de plantas daninhas, ou seja, a aplicação de um herbicida que até então
15 não vinha sendo aplicado na pós-emergência, o glifosato. Além disso, tem-se
16 empregado, em alguns casos, mais do que uma aplicação desse princípio ativo.
17 Nesse contexto, buscou-se avaliar métodos de controle de plantas daninhas,
18 incluindo capina manual e herbicidas, sobre a biomassa e a atividade microbiana de
19 um solo cultivado com soja GM_{RR} BRS 244 RR. A hipótese do trabalho é que a
20 aplicação de herbicidas no controle de plantas daninhas no cultivo de soja GM_{RR}
21 causa alterações na microbiota do solo que possam implicar em mudanças no
22 funcionamento do ecossistema e na qualidade do solo.

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 Material vegetal

3 O experimento foi instalado, na safra 2005/2006, em campo experimental do
4 Centro Agropecuário da Palma (CAP) da Universidade Federal de Pelotas,
5 localizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O solo da
6 área experimental é classificado como Planossolo Háplico Eutrófico Solódico, tendo
7 como origem sedimentos derivados de granito (EMBRAPA, 2006). Como material
8 vegetal foram utilizadas sementes de soja GM_{RR} da cultivar BRS 244 RR fornecidas
9 pela Embrapa-Trigo (Passo Fundo).

10 Delineamento experimental e tratamentos

11 A área experimental foi selecionada considerando-se o histórico (nunca houve
12 plantio de soja), homogeneidade topográfica (plana), tipo e características do solo
13 (2,6% matéria orgânica e 16 g kg⁻¹ argila).

14 As parcelas experimentais constaram de áreas individuais com 4 x 5 m,
15 aleatoriamente distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado dentro do
16 campo experimental com 04 repetições.

17 O plantio foi realizado durante a primeira quinzena de dezembro de 2005, com
18 sementes previamente tratadas com fungicida Derosal Plus[®] e inoculadas com
19 *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587.

20 Os tratamentos foram:

21 T1 - sem aplicação de herbicida, com capina 28 dias após o plantio (dap).

22 T2 - uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, 28 dap.

23 T3 - duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, 28 e 56 dap.

24 T4 - uma aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹, 28 dap.

1 ANÁLISES

2 *Caracterização físico-química do solo*

3 As principais características físico-químicas do solo foram determinadas
4 conforme proposto por TEDESCO et al. (1995) e os resultados estão descritos na
5 tabela 1.

6 **Tabela 1.** Características físico-químicas do solo na área experimental do Centro
7 Agropecuário da Palma, UFPel, Pelotas, RS.

Variável	Valor
Argila (g kg^{-1})	16
pH	4,5
Índice SMP	5,7
Matéria Orgânica (%)	2,6
Fósforo (mg dm^{-3})	4,9
Potássio (mg dm^{-3})	27
Cálcio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	1,2
Magnésio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	1
Alumínio ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	1,4
Cobre (mg dm^{-3})	1,4
Ferro (g dm^{-3})	10
Manganês (mg dm^{-3})	51
Zinco (mg dm^{-3})	1,3
Sódio (mg dm^{-3})	48

8

9 *Variáveis dependentes*

10 Aos 90 dias após o plantio, correspondendo ao estágio R6 do desenvolvimento
11 da soja, foram retiradas, com auxílio do trado de rosca, quatro amostras de solo de
12 cada unidade experimental, para análise química (carbono orgânico total-COT) e de
13 atividade microbiana do solo (carbono da biomassa microbiana-CBM e respiração
14 basal-RB). Complementarmente, calculou-se a relação entre CBM/COT e RB/CBM.

15

16 *Carbono Orgânico Total (COT)*

17 Os teores de Carbono Orgânico Total (COT) foram determinados pelo método de
18 Walkley-Black conforme método descrito por TEDESCO et al. (1995).

Carbono da Biomassa Microbiana (CBM)

O Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) foi determinado baseando-se no método descrito por VANCE et al. (1987). Entretanto, para eliminação dos microrganismos, substituiu-se o clorofórmio por tratamento com microondas a 2.450 MHz, durante quatro minutos. Esse procedimento foi validado por FERREIRA et al. (1999).

O valor de Carbono da Biomassa Microbiana foi calculado através da fórmula:

$CBM = (C_i - C_{ni}) / K_c$, sendo, CBM= carbono da biomassa microbiana do solo; C_i = Leitura da amostra irradiada; C_{ni} = Leitura da amostra não irradiada; $K_c = 0,33$ (fator de correção adotado por PASSIANOTO et al. (2001). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ solo.

Relação Carbono da Biomassa microbiana (CBM): Carbono Orgânico Total (CBM/COT)

A relação CBM/COT foi obtida pela razão entre o carbono da biomassa microbiana e o carbono orgânico total do solo.

Respiração Basal (RB)

A Respiração Basal (RB), que consiste em mensurar a atividade microbiana através da decomposição do carbono orgânico e da quantificação do CO_2 liberado, foi determinada conforme método proposto por ANDERSON & DOMSCH (1978), e adaptado por SANTOS et al. (2004). Cada repetição de 100 g de solo foi acondicionada em frascos de vidro com capacidade de 0,8 L, hermeticamente fechados. Para cada tratamento, 4 repetições foram adicionados de 2 g sacarose, e outras 4 permaneceram sem adição desse açúcar. Em cada frasco, colocou-se um becker de 50 mL contendo 20 mL de NaOH 1 M, à temperatura de 21 °C. A RB do

1 solo foi determinada pela quantificação do dióxido de carbono (CO₂) liberado no
2 processo de respiração microbiana durante 26 dias de incubação. O CO₂ foi
3 quantificado por titulação, com uma solução de HCl 1 M após a adição de uma
4 solução de BaCl₂ (25% m/v) e 3 gotas de fenolftaleína (1%) como indicador.

5 A quantidade de CO₂ liberada em cada tratamento e período de avaliação foi
6 calculada através da fórmula: $RB = (VPB - VA) \times M \text{ ácido} \times \text{Eq. C-CO}_2$, Sendo: VPB=
7 volume de HCL gasto na prova em branco; VA= Volume de HCL gasto na amostra;
8 M ácido= concentração do HCL; Eq. C-CO₂= Equivalente grama do C-CO₂ (6). Os
9 resultados foram expressos em mg C-CO₂ 100 g⁻¹.

10

11 *Taxa de respiração por unidade de biomassa, ou quociente metabólico (qCO₂)*

12 A taxa de respiração por unidade de biomassa ou quociente metabólico (qCO₂),
13 foi obtida pela relação entre a taxa de respiração basal, que consiste na medida da
14 produção de CO₂, resultante da atividade metabólica do solo, e biomassa microbiana
15 (ANDERSON & DOMSCH, 1990).

16

17 *Análise estatística*

18 Os dados foram submetidos à análise de variância, e à comparação de médias
19 pelo método LSD, utilizando-se o programa Statistix 8.0[®].

20

21 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

22 Os maiores valores de COT foram constatados nas parcelas tratadas com
23 herbicida Imazetapir, em média, 28% superiores aos valores observados nos demais
24 tratamentos. Não houve diferenças significativas entre os demais tratamentos
25 (Tabela 2). Esse fato pode estar relacionado com a maior presença da cobertura

1 vegetal no tratamento com imazetapir, no qual observou-se menor eficiência (dados
2 não apresentados) no controle de plantas daninhas, quando comparado com as
3 demais formas de manejo.

4 O CBM diminuiu em torno de 36,7% e 40% nos tratamentos com uma e duas
5 aplicações de glifosato, respectivamente, quando comparado com os demais
6 tratamentos (Tabela 2). Diferentemente desses resultados, HANEY et al. (2002)
7 detectaram maior CBM em solos nos quais houve aplicação de herbicida glifosato.
8 Para esses autores, aplicações de glifosato a 234 mg ia kg⁻¹ de solo, estimula a
9 atividade microbiana de solos com pH entre 4,7 a 8,2 e com COT de 4,1 a 52,3 g kg⁻¹
10 de solo e com teor de argila de 6 a 45% em solos da Georgia e Texas. BUSSE et
11 al. (2001) avaliando essa variável em solos com cultivo de *Pinus sp.* verificaram que
12 a aplicação de glifosato, nas concentrações recomendadas para essa cultura (5-50
13 mg ia kg⁻¹), não afetou o CBM, provavelmente por não ter afetado a população de
14 fungos e bactérias.

15 Para a relação CBM/COT, que indica o percentual do carbono orgânico total
16 representado pelo carbono microbiano, os tratamentos com herbicida (T2, T3 e T4)
17 tiveram uma redução significativa de 40%, 43% e 30%, respectivamente, quando
18 comparado ao solo sem herbicida, com capina (T1). Resultados semelhantes foram
19 obtidos por LIPHDZI et al. (2005) quando testaram o efeito de glifosato a 1120 g ia
20 ha⁻¹ em cultivos de soja nos EUA. Isso indica que os herbicidas podem apresentar
21 um efeito inibidor sobre populações de microrganismos do solo.

22
23
24
25

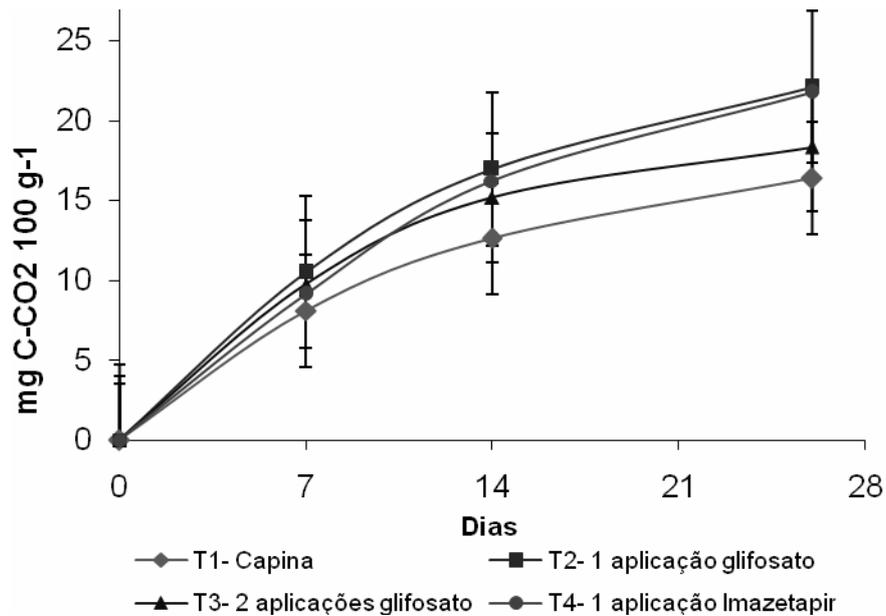
1 **Tabela 2.** Carbono orgânico total do solo (COT), carbono da biomassa microbiana
 2 (CBM) e a relação carbono microbiano e carbono orgânico total (CBM/COT).

Tratamentos	COT %	CBM $\mu\text{g g}^{-1}$ solo	CBM/COT %
T1- controle- capina	1,057 b	590,48 a	5,72 a
T2- 1 aplicação de glifosato a 960g ia ha ⁻¹	1,103 b	373,75 b	3,39 b
T3- 2 aplicações glifosato a 960g ia ha ⁻¹	1,093 b	350,86 b	3,23 b
T4- 1 aplicação de imazetapir a 100 g ia ha ⁻¹	1,353 a	536,93 a	3,98 b
Média	1,15	463,00	4,084
CV (%)	11,14	20,93	27,31
P	0,0251	0,0097	0,031

3 CV: coeficiente de variação. P: Probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras, na mesma
 4 coluna, não se diferem estatisticamente pelo teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.

5
 6 Na Figura 1 pode-se observar que a atividade microbiana foi crescente no
 7 período de estudo, sendo mais intensa nos primeiros dias de incubação. Esse
 8 comportamento pode ser atribuído à maior disponibilidade de nutrientes nessa
 9 primeira fase. Os tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram um aumento significativo na
 10 evolução de CO₂ de 53,79%, 25,64% e 51,57%, respectivamente, em relação à
 11 capina (T1). Esse comportamento, embora com valores absolutos distintos, é
 12 semelhante ao descrito por HANEY et al. (2002), que atribuem a maior liberação de
 13 CO₂ na presença do glifosato ao fato desse herbicida ser facilmente metabolizável
 14 pelos microrganismos do solo. Entretanto, os resultados de BUSSE et al. (2001),
 15 indicam que essa resposta depende das concentrações de glifosato. Por exemplo,
 16 dosagens de glifosato entre 5-50 mg kg⁻¹ de solo não afetam a liberação de CO₂,
 17 mas concentrações cem vezes maiores resultam em aumento significativo na
 18 evolução de CO₂. GIMSING et al. (2004), reportaram que a mineralização do
 19 glifosato, para cinco diferentes tipos de solos testados, está diretamente relacionada
 20 com a população de bactérias heterotróficas, principalmente o tamanho da
 21 população de *Pseudomonas spp.* PASSIANOTO et al. (2001), que avaliaram o

1 comportamento da atividade microbiana do solo diante de aplicações de resíduos
2 com diversos contaminantes químicos, afirmam que a respiração basal é maior em
3 solos contaminados como consequência do maior consumo de energia pelos
4 microrganismos, como forma de garantir a sobrevivência.



5

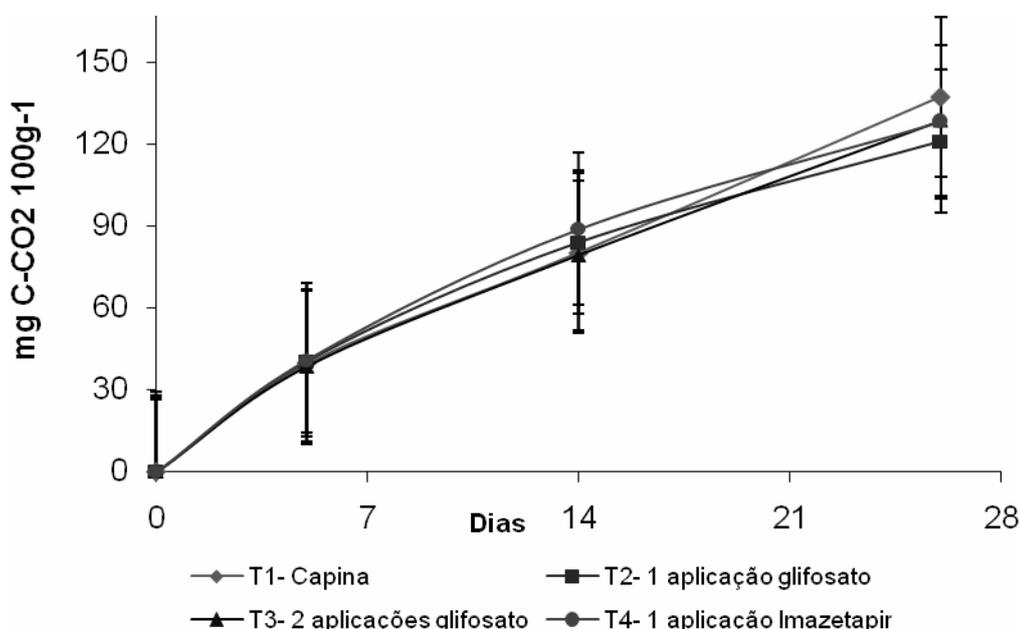
6 Figura 1- Liberação acumulada de CO₂ no solo, dos diferentes tratamentos de
7 manejo da soja BRS 244 RR, no período de 26 dias de incubação.

8

9 A respiração basal induzida pela aplicação de sacarose e medida pela liberação
10 de CO₂ apresentou comportamento crescente no período estudado, sem, no
11 entanto, esgotar a fonte do substrato aplicado (Figura 2).

12 Entre os tratamentos não houve diferença significativa, indicando que as
13 dosagens e tipos de herbicidas não afetaram a metabolização da sacarose. LIPHDZI
14 et al. (2005) obtiveram resultados similares para a evolução de CO₂ induzido por
15 substrato.

1 O potencial de biodegradação da sacarose pela microbiota heterotrófica não
2 diferiu entre os tratamentos no período estudado (Tabela 3). Esse fato pode ser
3 relacionado à ausência de efeitos tóxicos dos herbicidas testados e/ou ao fato do
4 período de incubação não ter sido suficiente para obter maior degradação do
5 carbono orgânico adicionado. Essa argumentação é feita tendo em vista que mesmo
6 após os 26 dias de incubação a fonte de carbono orgânico ainda estava presente e
7 continuava sendo mineralizada, conforme demonstrado na figura 2.



8
9 Figura 2- Liberação acumulada de carbono (CO₂) no solo submetido à aplicação de
10 sacarose, dos diferentes tratamentos de manejo da soja BRS 244 RR.

11
12 Após 26 dias de incubação do solo verificou-se que a taxa de respiração basal foi
13 maior para os tratamentos com aplicação de herbicidas, não havendo diferença
14 entre dosagens e tipo de herbicida. GINSING et al. (2004) também detectaram um
15 aumento nas taxas de RB em solos na presença de glifosato a 3,4 mg ia kg⁻¹. Esse

1 comportamento não é unânime, como por exemplo, BUSSE et al. (2001) e LIPADZI
2 et al. (2005), não observaram incremento na RB. Desse modo, percebe-se que as
3 respostas à aplicação de glifosato são variáveis entre os trabalhos realizados. A
4 causa exata não está determinada, mas acredita-se que as variações se devem às
5 diferenças entre procedimentos experimentais (ensaios a campo ou laboratório ou
6 casa de vegetação), tipo de solo (características físico-químicas e biológicas), bem
7 como a cultura em estudo e as dosagens testadas.

8 Os tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram maior qCO_2 , quando comparados com
9 a capina (T1). Esse resultado é consequência da maior atividade microbiana, com
10 maior liberação de CO_2 por unidade de CBM, provocada pela presença de um
11 substrato facilmente assimilável para o desenvolvimento da atividade microbiana,
12 corroborando com os resultados de SANTOS et al. (2004). O qCO_2 tem sido
13 utilizado como um indicador biológico do equilíbrio do solo, uma vez que à medida
14 que a biomassa microbiana se torna mais eficiente, menos carbono é liberado como
15 CO_2 pela respiração e uma maior proporção de carbono é incorporada à biomassa
16 microbiana (ANDERSON & DOMSCH, 1990). De modo geral, a aplicação de
17 glifosato e imazetapir resultaram em aumento no qCO_2 em comparação ao
18 tratamento com capina. É conhecido que fatores de estresse (herbicidas, metais
19 pesados, pH, limitações de nutrientes), assim como fatores de perturbação
20 (condições ambientais) induzem à ineficiência microbiana. Um efeito potencial da
21 aplicação do herbicida glifosato no solo é o estímulo ou inibição de microrganismos
22 do solo com funções importantes como nos processos de mineralização e
23 imobilização de nutrientes (BUSSE et al., 2001).

O menor valor de qCO_2 e a maior relação CBM/COT foi obtida no tratamento sem uso de herbicida com controle das plantas daninhas com capina, o que qualifica esse tratamento como o de maior estabilidade da microbiota.

Tabela 3. Respiração basal induzida com sacarose (RB ind), respiração basal sem indução (RB), degradação da sacarose adicionada após 26 dias de incubação e quociente metabólico (qCO_2).

Tratamentos	RB ind	RB	Degradação ¹	qCO_2
	mg C-CO ₂ 100 g ⁻¹	mg C-CO ₂ 100 g ⁻¹	%	10 ⁻⁴
T1- controle- capina	137,25	14,35 b	15,36	3,92 b
T2- 1 aplicação glifosato a 960g ia ha ⁻¹	120,98	22,07 ^a	12,36	10,4 a
T3- 2 aplicações glifosato a 960g ia ha ⁻¹	128,67	18,03 ^a	13,80	8,50 a
T4- 1 aplicação Imazetapir a 100 g ia ha ⁻¹	128,10	21,75 ^a	13,29	6,80 a
Média	128,75	19,12	13,70	7,40
CV (%)	11,28	19,26	12,29	34,90
P	0,497	0,0378	0,1381	0,024

¹ Para o cálculo foi usada a seguinte expressão: [(mg C-CO₂ liberado tratamento c/ sacarose - mg C-CO₂ trat. s/ sacarose)/ C adicionado] X 100.

CV: coeficiente de variação. P: Probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras, na mesma coluna, não se diferem estatisticamente pelo teste de LSD ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

O cultivo da soja geneticamente modificada (GM_{RR}) BRS 244 RR, com uso do glifosato no controle de plantas daninhas, resulta em maior atividade microbiana representada pela maior respiração basal e maior quociente metabólico, indicando maior mineralização do solo. A não aplicação de glifosato favorece uma maior estabilidade da microbiota.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Trigo, de Passo Fundo-RS pelo fornecimento das sementes de soja, à FAPERGS pelo financiamento (Proade 3, 05/2234-4) à pesquisa e bolsa, ao PROAP/CAPES pelo apoio financeiro, à SESU-MEC pela bolsa PET e ao Centro Agropecuário da Palma pelo apoio na instalação do experimento.

1 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 2 ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. *Aplication of eco-physiological quocientes*
3 *(qCO₂ and qP) on microbial biomasses from soils of diferent cropping histories. Soil*
4 **Biology and Bioquimistry**, Oxford, v.22, n.2, p.251-255, 1990.
- 5 ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. *A physiological method for the quantitative*
6 *measurement of microbial biomass in soil. Soil Biology and Bioquimistry*, Oxford,
7 v.10, p.215-221, 1978.
- 8 ARAUJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. *Efect of glyphosate on the*
9 *microbial activity of two Brazilian soils. Chemosphere*, Oxford, v.52, p.799-804,
10 2003.
- 11 BUSSE, M.D.; RATCLIFF, G.A.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. *Glyphosate toxicity*
12 *and the effects of long-term vegetation control and soil on soil microbial communities.*
13 **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1777-1789, 2001.
- 14 COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. *Recomendações de adubação e*
15 *calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. 4 ed., Passo
16 Fundo:SBCS – Núcleo Regional Sul, 2004.
- 17 EMBRAPA- *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos* – Brasília: Embrapa.
18 Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2 ed., 306p, 2006.
- 19 FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; VIDOR, C. *Utilização do microondas na*
20 *avaliação da biomassa microbiana do solo. Revista Brasileira de Ciência do Solo*,
21 Viçosa- MG, v.23, p.991-996, 1999.
- 22 GIMSING, A.L.; BORGGGAORD, O.K.; JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J.; SORENSEN,
23 J. *Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate*
24 *mineralisation in Danish surface soils. Applied Soil Ecology*, v.27, p.233–242, 2004.

1 HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, F.M. *Bioremediation and biodegradation:*
2 *effect of roundup ultra on microbial activity and biomass from selected soils.* **Journal**
3 **Environmental Quality**, Texas, v.31, p.730-735, 2002.

4 LIPHADZI, K.B.; AL-KHATIB, K.; BENSCH, C.N.; STAHLMAN, P.W.; DILLE, J.A.;
5 TODD, T.; RICE, C.W.; HORAK, M.J.; HEAD, G. *Soil microbial and nematode*
6 *communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant*
7 *cropping system.* **Weed Science**, Champaign, v. 53, n.4, p. 536-545, 2005.

8 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Site <<http://www.agricultura.gov.br>> acesso em
9 set. 2006.

10 PASSIANOTO, C.C.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; LIMA, A.C.R.; LIMA,
11 C.L.R. *Atividade e biomassa microbiana no solo com a aplicação de dois diferentes*
12 *lodos de curtume.* **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.2, p.125-130,
13 2001.

14 SANTOS, V.B.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; PAULETTO, E.A.;
15 GOMES, A.S.; SILVA, D.G. *Biomassa, atividade microbiana e teores de carbono e*
16 *nitrogênio totais de um planossolo sob diferentes sistemas de manejo.* **Revista**
17 **Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p.333-338, 2004.

18 TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BONHEN, H. *Análises de solos, plantas e*
19 *outros materiais.* 2ª ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
20 174p, 1995 (Boletim Técnico 5).

21 VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. *An extracion method for*
22 *measuring soil microbial biomass c.* **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19,
23 n.6, p.703-707, 1987.

1
2
3
4
5

4. ARTIGO 3

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA, TRATADA COM GLIFOSATO, CULTIVADA EM REGIÃO DE PLANOSSOLO

(Artigo no formato da **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**)

1 **Fixação biológica de nitrogênio em soja geneticamente modificada, tratada**
2 **com glifosato, cultivada em região de Planossolo**

3 Giani Mariza Bärwald Bohm⁽¹⁾; Bruno José Rodrigues Alves⁽²⁾; Fernando Hax⁽¹⁾ e Cesar
4 Valmor Rombaldi⁽¹⁾.

5 ⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/nº, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP 96010-900. E-mail: gbbohm@terra.com.br,
6 hax2020@yahoo.com.br, cesarvrf@ufpel.tche.br. ⁽²⁾ Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, CEP 23890-000, Seropédica, RJ. E-mail:
7 bruno@cnpab.embrapa.br.
8

9 **Resumo**

10 A principal fonte de nitrogênio no cultivo de soja é a fixação biológica. O efeito da
11 modificação genética por alterações no metabolismo da planta de soja transgênica resistente
12 ao glifosato e/ou pela aplicação de glifosato, poderia interferir de forma direta por danos às
13 bactérias simbiotes, ou indireta, por afetar a fisiologia da planta hospedeira, reduzindo a
14 eficácia do processo de fixação/absorção. Nesse contexto, buscou-se avaliar o efeito da
15 transformação genética e da aplicação do glifosato, usado no controle de plantas daninhas,
16 durante o cultivo de soja, sobre a produtividade de grãos, massa de nódulos, fixação biológica
17 de nitrogênio e nitrogênio na planta. Nesse sentido, desenvolveu-se um estudo em campo
18 experimental do Centro Agropecuário da Palma da Universidade Federal de Pelotas, na safra
19 de 2005/2006, em área de Planossolo. Testaram-se dois genótipos de soja, BRS 244 RR
20 geneticamente modificada e BRS 154 não modificada, num delineamento inteiramente
21 casualizado, com quatro repetições, composto pelos tratamentos: T1- soja BRS 244 RR sem
22 aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dias após o plantio (dap); T2- soja BRS
23 154 sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dap; T3 - soja BRS 244 RR com
24 uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 dap; T4 - soja BRS 244 RR com duas
25 aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 e 56 dap; T5 - soja BRS 244 RR com uma
26 aplicação de herbicida Imazetapir a 100 g ia ha⁻¹, aos 28 dap e, T6 - soja BRS 154 com uma

1 aplicação de herbicida Imazetapir a 100 g ia ha⁻¹, aos 28 dap. Verificou-se que não houve
2 efeito da transformação genética sobre a nodulação e fixação biológica de nitrogênio, porém o
3 manejo de plantas daninhas com uma ou duas aplicações de glifosato na dosagem de 960 g ia
4 ha⁻¹ em soja BRS 244 RR, cultivada em Planossolo, resultou em redução na nodulação e na
5 fixação biológica de nitrogênio. No entanto, o bom controle das plantas daninhas resultou em
6 maior produtividade de grãos nas parcelas tratadas com glifosato.

7 **Termos para indexação:** Soja transgênica, abundância natural de ¹⁵N, nodulação,
8 produtividade de grãos

9
10 **Biological nitrogen fixation in genetically modified soybean with use of**
11 **glyphosate, cultivated in area of Albaqualf**

12 **Abstract**

13 The main source of nitrogen in cultivation of soybean is the biological fixation. The effect of
14 the genetic modification for alterations in metabolism of transgenic soybean resistant to
15 glyphosate and/or the use glyphosate could interfere on direct way for damages on symbiotic
16 microbes or indirect way for affecting the physiology of host plant reducing the effectiveness
17 of fixation/absorption process. In this context seeking to evaluate the effect of genetic
18 transformation and use of glyphosate for weed control, during the soybean cultivation, about
19 the productivity of grains, nodules mass, biological nitrogen fixation and nitrogen in plant.
20 Therefore, was installed experiment at Centro Agropecuário da Palma of Universidade
21 Federal de Pelotas, during the 2005/2006 season, in area of Albaqualf. Two soybean
22 genotypes were tested, BRS 244 RR genetically modified and BRS 154 not modified, in a
23 completely randomized design, with four repetitions, composed by treatments: T1 - soybean
24 BRS 244 RR without herbicide application, with hand weeded at 28 days after the planting
25 (dap); T2 - soybean BRS 154 without herbicide application, with hand weeded at 28 dap; T3 -

1 soybean BRS 244 RR with an application of 960 g ai ha⁻¹ of glyphosate at 28 dap; T4 -
2 soybean BRS 244 RR with two applications of 960 g ai ha⁻¹ of glyphosate at 28 and 56 dap;
3 T5 - soybean BRS 244 RR with an application of 100 g ai ha⁻¹ of imazethapyr at 28 dap; and
4 T6 - soybean BRS 154 with an application of 100 g ai ha⁻¹ of imazethapyr at 28 dap. Was
5 verified that genetic transformation did not affect the nodulation and the biological nitrogen
6 fixation, however the handling of weeds with one or two applications of 960 g ai ha⁻¹ of
7 glyphosate in soybean BRS 244 RR cultivated in Alaquara resulted in reduction of
8 nodulation and of biological nitrogen fixation. However, the best weeds control resulted in
9 larger productivity of grains in areas treated with glyphosate.

10 **Index terms:** Transgenic soybean, natural abundance of ¹⁵N, nodulation, grains productivity.

11

12

Introdução

13 No Brasil, a área cultivada com transgênicos já ultrapassou 11,5 milhões de hectares
14 (ISAAA, 2006), destacando-se a produção de soja resistente ao herbicida glifosato, que foi a
15 primeira planta geneticamente modificada (GM_{RR}) de importância comercial a ser aprovada
16 para o cultivo e alimentação humana e animal no país.

17 Entre os principais fatores bióticos que contribuem para a elevada produção de soja
18 destaca-se a fixação biológica do nitrogênio (FBN), uma vez que a demanda de nitrogênio das
19 cultivares brasileiras pode ser suprida total ou parcialmente pelo processo biológico, por meio
20 da inoculação com estirpes selecionadas de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium*
21 *elkanii* (Hungria et al., 2005). Manter a relação simbiótica da planta com as bactérias
22 fixadoras de nitrogênio é importante para se obter uma boa produtividade sem necessidade de
23 incrementar esse nutriente do solo por fonte externa.

1 Efeitos do glifosato sobre nodulação, fixação biológica de nitrogênio e fisiologia da
2 planta foram estudados por Reddy et al. (2000), King et al. (2001), Reddy & Zablutowicz
3 (2003) e Zablutowicz & Reddy (2007). Inicialmente, Reddy et al. (2000) e King et al. (2001)
4 observaram, em condições de casa de vegetação, que glifosato aplicado na dosagem
5 recomendada pelo fabricante, reduziu o número e a massa de nódulos, o conteúdo de leg-
6 hemoglobina e o teor de N na planta. Esse efeito foi parcialmente observado por Zablutowicz
7 & Reddy (2007) em condições de campo.

8 O efeito negativo do glifosato sobre as bactérias simbiontes (*B. japonicum*) e sobre a
9 redução de acetileno em condições de ensaio em meio de cultura e em casa de vegetação
10 foram citados por Reddy & Zablutowicz (2003). Maltby et al. (2006) verificaram que o
11 glifosato apresenta efeitos inibitórios sobre o crescimento de *Bradyrhizobium* em meio de
12 cultura. Para Fisher et al. (1986), aplicações de glifosato podem inibir a síntese de
13 aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) ocasionando toxicidade para os
14 microrganismos. O mecanismo de ação do glifosato é único e age exclusivamente sobre a
15 enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, E.C. 2.5.1.19), que catalisa a
16 condensação do ácido chiquímico e o fosfofenolpiruvato. A inibição da via do chiquimato
17 pelo glifosato resulta em acúmulo do ácido chiquímico e/ou ácidos hidroxibenzóicos em
18 plantas (Duke, 1988) e em *Bradyrhizobium japonicum*, podendo causar toxicidade
19 (Zablutowicz & Reddy, 2003).

20 Zablutowicz & Reddy (2007) observaram, em experimento a campo, conduzido de
21 2002 a 2004, que a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio são variáveis entre safras, e
22 que o glifosato tem pouco efeito sobre esses parâmetros se aplicado em dosagens de até 2240
23 g ia ha⁻¹. Porém, quando aplicado em dosagens de 3360 g ia ha⁻¹, foram observadas reduções
24 na FBN. Esses mesmos autores relatam, ainda, que as respostas fisiológicas e de rendimento
25 de produção, com aplicação de glifosato, podem variar em função de genótipos, localização

1 geográfica, condições ambientais, tipo de solo, população nativa de *Bradyrhizobium*, dentre
2 outros fatores.

3 No entanto, não há dados publicados sobre a FBN para cultivares de soja GM_{RR}
4 cultivadas em Planossolo. Nesse contexto, buscou-se avaliar o efeito da modificação genética
5 e da aplicação do glifosato, usado no controle de plantas daninhas, sobre a FBN, os teores de
6 N na planta, matéria seca de nódulos e rendimento de grãos das cultivares GM_{RR} BRS 244 RR
7 e NM BRS 154 cultivadas em área de Planossolo. Esse objetivo está baseado na hipótese de
8 que a aplicação de glifosato pudesse afetar o metabolismo da planta e/ou o mecanismo de
9 fixação biológica do nitrogênio.

10

11

Material e Métodos

Material vegetal

13 O experimento foi instalado na safra 2005/2006, em campo experimental do Centro
14 Agropecuário da Palma (CAP), da Universidade Federal de Pelotas, localizado no município
15 do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O solo da área experimental é classificado
16 como Planossolo Háptico Eutrófico Solódico (Embrapa, 2006) tendo pH 4,5, índice SMP 5,5,
17 matéria orgânica 2,6 g dm³ e 16% de argila. Como material vegetal foram utilizadas sementes
18 de soja dos genótipos BRS 244 RR e BRS 154 fornecidas pela Embrapa-Trigo (Passo Fundo-
19 RS).

20

Delineamento experimental e tratamentos

22 As parcelas experimentais constaram de áreas individuais com 4 x 5 m, aleatoriamente
23 distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado dentro do campo experimental,
24 com 04 repetições por tratamento. O plantio foi realizado, na primeira quinzena de dezembro,

1 com uma densidade de 40 plantas por m². As sementes foram inoculadas com uma mistura de
2 *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587. A fertilização
3 foi realizada com 250 kg ha⁻¹ de P e K, utilizando-se adubo 0-20-20 na semeadura.

4 Os tratamentos aplicados para testar a hipótese foram:

5 T1 - soja GM_{RR} BRS 244 RR sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dias
6 após o plantio (dap);

7 T2- soja BRS 154 sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dap;

8 T3 - soja GM_{RR} BRS 244 RR com uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 dap;

9 T4 - soja GM_{RR} BRS 244 RR com duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 e 56
10 dap;

11 T5 - soja GM_{RR} BRS 244 RR com uma aplicação de herbicida Imazetapir a 100g ia ha⁻¹, aos
12 28 dap;

13 T6- soja BRS 154 com uma aplicação de herbicida Imazetapir a 100g ia ha⁻¹, aos 28 dap.

14

15 **Avaliações**

16 Foram retiradas amostras de plantas de cada unidade experimental quando
17 encontravam-se entre os estádios R5 e R6 do desenvolvimento da soja, para determinação de
18 Nitrogênio total e do isótopo ¹⁵N. Utilizaram-se dez plantas por unidade experimental
19 coletadas aleatoriamente, separando-se folhas, caule e vagens para serem analisadas
20 separadamente. O teor de nitrogênio nas diferentes partes das plantas foi expresso em g 100 g⁻¹
21 de matéria seca e o N por m², foi expresso em g m⁻², considerando-se a matéria seca total da
22 área. Para contagem e determinação da massa de nódulos as plantas foram coletadas aos 90
23 dias após o plantio. Os nódulos foram retirados cuidadosamente das raízes da planta, lavados
24 e contados. Após a coleta foram armazenados em frascos hermeticamente fechados com
25 sílica-gel até obter massa constante. Para se estimar a produtividade pesaram-se os grãos

1 provenientes da colheita de sementes de 1 m² de cada parcela. A produtividade foi expressa
2 em g m⁻².

3 ***Nitrogênio Total e ¹⁵N***

4 A contribuição da FBN foi quantificada, para a cultura da soja, pela técnica de diluição
5 isotópica de ¹⁵N, baseada na abundância natural desse isótopo (Shearer & Kohl, 1986). Além
6 das amostras da parte aérea das plantas de soja, obtidas no estádio R6, espécies espontâneas,
7 não-leguminosas (*Bidens pilosa* e *Echinochloa spp.*), foram também coletadas das mesmas
8 parcelas para serem utilizadas como referência, ou controle, da abundância natural de ¹⁵N do
9 N disponível no solo. O material colhido foi seco a 65 °C, moído e analisado para abundância
10 natural de ¹⁵N (Okito et al., 2004), esta última realizada através do método de Dumas (técnica
11 de combustão a seco), utilizando-se um analisador elementar CN acoplado a um
12 espectrômetro de massas Finnigan Delta Plus. A porcentagem de N derivada da FBN na
13 planta (%FBN) foi calculada pela fórmula $\%FBN = [(\delta^{15}N_c - \delta^{15}N_s)/(\delta^{15}N_c - B)] \times 100$, em
14 que $\delta^{15}N_c$ e $\delta^{15}N_s$ correspondem aos valores de abundância natural de ¹⁵N das plantas
15 controle (espécies espontâneas) e da soja, respectivamente; e B é uma constante relacionada
16 ao processo de discriminação isotópica de ¹⁵N pelo processo da FBN, aqui considerada como
17 sendo -1,3 δ (Bergersen et al., 1988). A quantidade total de N na planta derivada da FBN foi
18 calculada pela multiplicação da %FBN pelo total de N acumulado pela planta.

19 ***Análise estatística***

20 Os dados foram submetidos à análise de variância, e à comparação de médias pelo
21 método Tukey, utilizando-se o programa Statistix 8.0[®].

22

Resultados

A produção de matéria seca média foi de 942,9 g m⁻², não tendo havido efeito da transformação genética, nem do manejo das plantas daninhas sobre essa variável. Frente a essa situação era esperado que a produtividade também não variasse, tendo em vista que, dentro de certos limites, está correlacionada à produção de matéria seca (Sinclair et al., 2003). Porém, as áreas tratadas com glifosato apresentaram maior produtividade, atingido 241,8 g m⁻². Os menores rendimentos foram obtidos nos tratamentos com imazetapir (188 g m⁻²), seguido das capinas (214 g m⁻²). Esse fato era esperado, pois a eficiência no controle de plantas daninhas não foi satisfatória, nesses tratamentos, o que deve ter aumentado a competição e resultado em menor produtividade de grãos (Tabela 1).

Ao avaliar-se o N total nas diferentes partes da planta, somente observaram-se efeitos dos tratamentos no teor de N do caule (Tabela 2), em maior concentração no tratamento com soja não modificada (NM). Excetuando-se o caule, nas folhas e vagens não houve diferença de concentração de N, à semelhança do que ocorreu com a matéria seca.

A análise da abundância natural de ¹⁵N das plantas espontâneas indicou que a marcação do N disponível do solo era de 5,37 δ¹⁵N, variando de 5,49 ± 0,15 em plantas de picão preto (*Bidens pilosa*), a 5,26 ± 0,07 δ¹⁵N em plantas de capim-arroz (*Echinochloa spp.*) (Tabela 3). Os órgãos aéreos das plantas de soja mostraram valores de δ¹⁵N consideravelmente mais baixos do que os observados nas espécies espontâneas, sendo observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 3). Considerando-se os resultados ponderados de δ¹⁵N para a planta inteira, tem-se o indicativo de efeito dos tratamentos sobre a FBN na soja.

Os tratamentos com glifosato na soja GM_{RR} repercutiram em menor dependência da planta pela FBN (abaixo de 70%), quando comparados à soja GM_{RR} sob capina, cuja dependência pela FBN foi estimada em 80% (Tabela 4). O uso de imazetapir para o controle

1 das invasoras não prejudicou a FBN na soja, independente da cultivar. Não houve variação
2 estatisticamente significativa no número de nódulos, mas a matéria seca de nódulos foi menor
3 quando a soja GM_{RR} foi tratada com glifosato, concordando com os resultados de FBN.

5 **Discussão**

6 As possíveis respostas do cultivo de soja GM_{RR}, com o uso de glifosato para o controle
7 de plantas daninhas, frente à FBN, em comparação com a soja NM, ainda não foram descritos.
8 Os trabalhos que abordaram essa temática, normalmente estudaram apenas o genótipo GM_{RR}
9 com e sem aplicação de herbicida (Reddy & Zablotowicz, 2003; Correia & Durigan, 2007;
10 Zablotowicz & Reddy, 2007). Diante disso, buscou-se complementar esses estudos,
11 analisando-se, além da soja GM_{RR}, com e sem glifosato, a cultivar NM BRS 154, cultivada
12 sem aplicação de glifosato. Complementarmente, testou-se o imazetapir, como herbicida
13 tolerado pela soja BRS 244 RR e pela BRS 154.

14 Desses tratamentos verificou-se que, nas parcelas tratadas com glifosato, houve maior
15 produtividade de grãos, em média 236 g m⁻², comparados a 214 g m⁻² nas áreas com capina, e
16 188 g m⁻² nas parcelas com imazetapir. Esse comportamento pode ser explicado pelo controle
17 mais eficiente de plantas daninhas nas parcelas tratadas com glifosato. Observou-se que,
18 nitidamente, houve presença de plantas daninhas nas parcelas com imazetapir, e reinfestação
19 nas áreas com capinas. Cerdeira et al. (2007) já citaram que isso ocorre, pois a aplicação de
20 glifosato proporciona excelente controle de plantas invasoras e favorece, pela menor
21 concorrência, melhor aproveitamento fotossintético e de nutrientes, aumentando a
22 produtividade. Esses autores ainda relatam que o uso desse herbicida permite o plantio direto,
23 mas às vezes, favorece a seleção de plantas daninhas resistentes ao glifosato.

24 Ao avaliarem-se variáveis relacionadas à FBN, verificou-se que nas parcelas com
25 glifosato houve menor massa de nódulos e menor percentual de N fixado biologicamente, o

1 que ficou evidenciado pelos maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ nesses tratamentos. Esse resultado não é
2 coerente com o fato de que, geralmente, menor nodulação e menor FBN geram menor
3 produtividade.

4 Os trabalhos que abordaram essa temática têm mostrado que a aplicação de glifosato
5 tem pouco efeito sobre a nodulação e, como conseqüência, pouco efeito sobre a FBN, a
6 menos que elevadas dosagens desse herbicida sejam aplicadas (Zablotowicz & Reddy, 2007).
7 Esses autores obtiveram esse comportamento em experimento a campo. King et al. (2001) e
8 Reddy & Zablotowicz (2003), em condições de casa de vegetação, observaram que a
9 aplicação de glifosato afeta a nodulação e a FBN, devido à redução do conteúdo de leg-
10 hemoglobina e acumulação de glifosato nos grãos em níveis letais ao *Bradyrhizobium* sp., que
11 acabam por afetar o desenvolvimento dos nódulos. Desse modo observa-se que as respostas
12 são distintas frente ao modelo de estudo adotado. Esse fato também ocorreu neste
13 experimento realizado em área de Planossolo, no qual detectou-se efeito do glifosato na
14 redução de nodulação e FBN, mas contribuiu para melhor produtividade.

15 Ao analisarem-se esses resultados, deve-se levar em conta que o efeito na nodulação, e
16 conseqüentemente da FBN, podem não afetar a produtividade no curto prazo, mas colaboram
17 para um balanço negativo de N no solo, que somente será constatado no longo prazo,
18 dependendo da rotação de culturas utilizada. Quanto mais pobre em N for o solo, mais
19 dependente da FBN será a cultura, condição em que o efeito negativo do glifosato será
20 acentuado (Alves et al., 2003). A argumentação feita por Alves et al. (2003) corrobora os
21 resultados obtidos por Bohm et al. (2007) que relataram que em parcelas tratadas com
22 glifosato, há maior atividade microbiana representada pela maior respiração basal e maior
23 quociente metabólico, indicando maior mineralização. Essa maior mineralização de nutrientes
24 do solo pode ser o mecanismo, no curto prazo, de disponibilidade de N não fixado
25 biologicamente.

1 Os níveis de $\delta^{15}\text{N}$ do solo foram suficientes para a adequada utilização da técnica de
2 abundância natural de ^{15}N para quantificação da dependência das plantas de soja pela FBN
3 (Unkovich & Pate, 2000). Além disso, as amostragens feitas nas parcelas experimentais
4 mostraram homogeneidade na marcação do N disponível do solo para as plantas. A interação
5 entre a massa de nódulos e a FBN ($R^2= 0,70$, $p=0,03$) explicou praticamente 70% da variação
6 da dependência das plantas pela FBN, aumentando a confiança nas estimativas da técnica
7 isotópica. A massa de nódulos como consistente indicadora de FBN foi demonstrada por
8 Dobreiner et al. (1970). Os resultados encontrados sugerem que o glifosato foi mais negativo
9 para o sistema fixador de N da soja do que o imazetapir, porém este último, pela menor
10 eficiência no controle de plantas daninhas, de alguma forma interferiu negativamente na
11 produtividade da cultura de soja.

12 **Conclusão**

13 A aplicação de glifosato em soja GM_{RR} BRS 244 RR interfere negativamente na FBN,
14 mas, pela eficiência no controle de plantas daninhas, promove maior produtividade de grãos.
15 A modificação genética da planta não interfere no mecanismo da FBN.

16 **Agradecimentos**

17 À Embrapa Trigo, de Passo Fundo-RS pelo fornecimento das sementes de soja, à
18 FAPERGS pelo financiamento (Proade 3, 05/2234-4) à pesquisa e bolsa de IC, ao
19 PROAP/CAPES pelo apoio financeiro, ao CNPQ pela bolsa de apoio técnico a pesquisa e, ao
20 Centro Agropecuário da Palma pelo apoio na instalação do experimento.

Referências

- 1
2 ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of soybean in Brazil. **Plant**
3 **and Soil**, v.252, p.1-9, 2003.
- 4 BERGERSEN, F.J.; PEOPLES, M.B.; TURNER, G.L. Isotopic discriminations during the
5 accumulation of nitrogen by soybeans. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.407-
6 420, 1988.
- 7 BOHM, G.M.B.; CASTILHOS, D.; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, D.; ROMBALDI, C.V. Efeito
8 do controle de plantas daninhas na biomassa e atividade microbiana em planossolo cultivado
9 com soja BRS 244RR. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, (no prelo) 2007.
- 10 CERDEIRA, A.L.; GAZZIERO, D.P.L.; DUKE, S.O.; MATALLO, M.B.; SPADOTTO, C.A.
11 Review of potencial environmental impacts of transgenic glifosate-resistant soybean in Brazil.
12 **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42, p.539-549, 2007.
- 13 CORREIA, N.M.; DURIGAN, J.C. Seletividade de diferentes herbicidas à base de glyphosate
14 a soja RR. **Planta Daninha**, v.25, p.375-379, 2007.
- 15 DOBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de
16 excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, 155-161,1970.
- 17 EMBRAPA- Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – Brasília: Embrapa. Produção de
18 informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2 ed., 306p, 2006.
- 19 FISHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of
20 glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. **Journal Bacteriol**, v.168, p. 1147-
21 1154, 1986.
- 22 HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of
23 nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E.
24 (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Dordrecht:
25 Springer, p.25-42, 2005.
- 26 ISAAA- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - Global
27 Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. Online. Disponível na Internet
28 em:<<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html>>.
29 Acesso em 15 maio 2007.

- 1 KING, C.A.; PURCELL, L. C.; VORIES, E.D. Plant growth and nitrogenase activity o
2 glyphosate-tolerant soybean in responde to foliar glyphosate applications. **Agronomy**
3 **Journal**, v.93, p.179-186, 2001.
- 4 MALTY, J.S.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Efeitos do glifosato sobre
5 microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Revista**
6 **Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.285-291, 2006.
- 7 OKITO, A.; ALVES, B.R.J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Isotopic fractionation N₂
8 fixation by four tropical legumes. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1179-1190, 2004.
- 9 REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to various
10 salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed Science**, v.51,
11 p.496-502, 2003.
- 12 REDDY, K.N.; HOAGLAND, R. E; ZABLOTOWICZ, R.M. Effect of glyphosate on
13 growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (Glycine
14 max) varieties. **Journal New Seeds**, v.2, p.37-52, 2000.
- 15 SHEARER, G.B.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N
16 abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1986.
- 17 SINCLAIR, T.R.; FARIAS, J.R.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L. Modelling
18 nitrogen accumulation and use by soybean. **Field Crops Research**, v.81, p.149-158. 2003.
- 19 UNKOVICH, M.J.; PATE, J.S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂
20 fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p.211-228, 2000.
- 21 ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield
22 responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, v.26, p.370-376,
23 2007.

1 **Tabela 1** – Produção de matéria seca e produtividade de grãos da soja geneticamente
 2 modificada (GM_{RR}, BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS 154) tratadas com herbicidas
 3 ou capinas, cultivada no Centro Agropecuário da Palma na safra 2005/2006.

2005/2006 Tratamentos	Matéria Seca	Produtividade
	g m ⁻²	g m ⁻²
T1- 244RR capina	841,90	207,20 ^{bc}
T2- 154 capina	1037,70	222,30 ^{abc}
T3- 244RR 1x glifosato	1142,50	241,80 ^a
T4- 244RR 2x glifosato	1238,90	224,60 ^{ab}
T5- 244RR 1x imazetapir	777,30	176,50 ^d
T6- 154 1x imazetapir	919,00	200,00 ^{cd}
Média	992,90	212,00
CV (%)	29,16	7,53
P	0,23	0,0004

4 CV: Coeficiente de Variação. P: Probabilidade. Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam
 5 diferença significativa (P<0,05).

6

7 **Tabela 2-** Teor de N nas partes aéreas de plantas de soja geneticamente modificada (GM_{RR},
 8 BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS 154) tratadas com herbicidas ou capinas, cultivada
 9 no Centro Agropecuário da Palma na safra 2005/2006.

2005/2006 Tratamentos	N folhas	N caule	N vagem	N folhas	N caule	N vagem	N planta
	g 100 g ⁻¹			g/m ⁻²			
T1- 244RR capina	3,11	1,08 ^b	3,32	5,06	4,54	7,62	17,23
T2- 154 capina	3,28	1,48 ^{ab}	3,48	6,92	7,90	9,94	24,77
T3- 244RR 1x glifosato	3,41	1,37 ^b	3,21	8,40	7,92	10,47	26,80
T4- 244RR 2x glifosato	3,34	1,50 ^{ab}	3,45	8,68	10,22	11,59	30,50
T5- 244RR 1x imazetapir	3,24	1,35 ^b	3,14	5,48	5,69	6,73	20,84
T6- 154 1x imazetapir	3,30	1,84 ^a	3,57	6,88	9,91	9,45	26,25
Média	3,28	1,44	3,36	6,09	7,69	9,30	24,39
CV (%)	15,15	20,46	9,54	35,05	41,20	35,36	32,96
P	0,97	0,04	0,38	0,24	0,12	0,34	0,299

10 CV: Coeficiente de Variação. P: Probabilidade. Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam
 11 diferença significativa (P<0,05).

1 **Tabela 3** – Teores de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas invasoras e nas diferentes partes da planta de soja
 2 geneticamente modificada (GM_{RR}, BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS 154) tratadas
 3 com herbicidas ou capinas, cultivada no Centro Agropecuário da Palma na safra 2005/2006.

2005/2006	folhas	caule	vagem	total
Tratamentos	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$
T1- 244RR capina	- 0,18 ^c	-0,03 ^c	0,36	0,02 ^c
T2- 154 capina	0,17 ^{bc}	0,58 ^{bc}	0,61	0,48 ^{bc}
T3- 244RR 1x glifosato	1,85 ^a	1,09 ^a	1,02	1,61 ^a
T4- 244RR 2x glifosato	1,16 ^{ab}	1,08 ^b	0,74	1,01 ^b
T5- 244RR 1x imazetapir	0,98 ^{abc}	0,96 ^b	0,94	0,48 ^{bc}
T6- 154 1x imazetapir	0,22 ^{bc}	0,68 ^{bc}	0,59	0,53 ^{bc}
<i>Bidens pilosa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	5,49
<i>Echinochloa spp</i>	n.d.	n.d.	n.d.	5,36
Média	0,70	0,87	0,71	0,69
CV (%)	111,6	53,08	79,86	56,57
P	0,016	0,0005	0,6	0,0005

4 n.d. - não detectado. CV: Coeficiente de Variação. P: Probabilidade. Médias, na mesma coluna, com letras iguais
 5 não apresentam diferença significativa (P<0,05).

6

7 **Tabela 4** – Número e massa de nódulos e dependência pela fixação biológica de nitrogênio de
 8 plantas de soja geneticamente modificada (GM_{RR}, BRS 244 RR) e não modificada (NM, BRS
 9 154) tratadas com herbicidas ou capinas, cultivada no Centro Agropecuário da Palma na safra
 10 2005/2006.

2005/2006	Nódulos	Massa	FBN
Tratamentos	n ^o	g	%
T1- 244RR capina	31,75	0,447 ^{ab}	80,20 ^a
T2- 154 capina	37,25	0,399 ^{abc}	73,27 ^{ab}
T3- 244RR 1x glifosato	17,50	0,229 ^c	56,45 ^c
T4- 244RR 2x glifosato	33,75	0,293 ^{bc}	65,45 ^b
T5- 244RR 1x imazetapir	43,00	0,413 ^{ab}	73,27 ^{ab}
T6- 154 1x imazetapir	43,50	0,525 ^a	72,60 ^{ab}
Média	34,46	0,385	70,21
CV (%)	42,39	31,40	8,28
P	0,18	0,03	0,0005

11 CV: Coeficiente de Variação. P: Probabilidade. Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam
 12 diferença significativa (P<0,05).

1

5. ARTIGO 4

2

RESÍDUOS DO GLIFOSATO E DO ÁCIDO

3

AMINOMETILFOSFÔNICO, E TEORES DE ISOFLAVONAS

4

EM SOJA BRS 244 RR E BRS 154

5

(Submetido à **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, em Maio de

6

2007)

RESÍDUOS DO GLIFOSATO E DO ÁCIDO AMINOMETILFOSFÔNICO, E TEORES DE ISOFLAVONAS EM SOJA BRS 244 RR E BRS 154

Glifosato e isoflavonas em soja RR

Giani Mariza Bärwald BOHM¹; Maria Inés GENOVESE²; Gustavo PIGOSSO³; Daniel TRICHEZ³; Cesar Valmor ROMBALDI⁴

RESUMO

A principal forma de controle das plantas daninhas durante o cultivo de soja geneticamente modificada (GM_{RR}) BRS 244 RR é o uso de glifosato. Porém, existem dúvidas quanto à segurança desse herbicida, na qualidade dos grãos e do solo da soja GM_{RR} cultivada em Planossolo. Resíduos da molécula do glifosato e do metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) podem estar presentes nos grãos, bem como, podem afetar a concentração de isoflavonas. Por isso avaliaram-se as sojas BRS 244 RR e BRS 154 cultivadas nos seguintes tratamentos: T1- soja BRS 244 RR, sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dias após o plantio (dap); T2- soja BRS 154 sem aplicação de herbicida, com capina manual também aos 28 dap; T3 - soja BRS 244 RR com uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹ aos 28 dap; T4 - soja BRS 244 RR com duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹ aos 28 e 56 dap; T5 - soja BRS 244 RR com uma aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹ aos 28 dap; T6- soja BRS 154 com uma aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹ aos 28 dap. Verificou-se que a aplicação de glifosato no controle de plantas daninhas resultou em teores elevados de glifosato e ácido aminometilfosfônico no solo. Nos grãos, o teor de isoflavonas não foi afetado pela aplicação de glifosato, mas os resíduos desse herbicida foram superiores ao permitido pela legislação vigente, que é de 10 mg kg⁻¹.

Palavras-chave: Herbicida, AMPA, soja transgênica

¹ Professora do Centro Federal de Educação Tecnológica, doutoranda do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/n°, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP 96010-900. E-mail: gbbohm@terra.com.br.

² Professor Doutor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

³ Estudantes de graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas. Bolsista FAPERGS e PET- SESU-MEC.

⁴ Professor Titular do Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/n°, Capão do Leão, RS, CEP 96010-900.

Apoio financeiro: FAPERGS e PROAP/UFPel.

1 **RESIDUE OF GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID, AND**
2 **LEVELS OF ISOFLAVONES IN SOYBEAN BRS 244 RR AND BRS 154**

3
4 **ABSTRACT**

5 Glyphosate is the main form of weed control during cultivation of genetically
6 modified soybean (GM_{RR}) BRS 244 RR. However there are doubt about the safety
7 this herbicide on the quality of grains and soil this soybean GM_{RR} cultivated in
8 Albaqualf. Glyphosate residues and the metabolite aminomethylphosphonic acid
9 (AMPA) could be present in grains and affect the isoflavones concentration.
10 Therefore were evaluated soybeans BRS 244 RR and BRS 154 cultivated with the
11 following treatments: T1- soybean BRS 244 RR, without application of herbicide,
12 hand weeded at 28 days after the planting (dap); T2- soybean BRS 154, without
13 application of herbicide, hand weeded at 28 dap; T3- soybean BRS 244 RR with one
14 application of 960 g ai ha⁻¹ of glyphosate at 28 dap; T4- soybean BRS 244 RR with
15 two application of 960 g ai ha⁻¹ of glyphosate at 28 and 56 dap; T5- soybean BRS
16 244 RR with one application of 100 g ai ha⁻¹ of imazethapyr at 28 dap; and T6-
17 soybean BRS 154 with one application of 100 g ai ha⁻¹ of imazethapyr at 28 dap. It
18 was verified that the glyphosate application for weed control resulted in high levels of
19 glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soil. In grains, the levels of
20 isoflavones were not affected the glyphosate application, but the residues of this
21 herbicide were higher than allowed by the present legislation, that is 10 mg kg⁻¹.

22
23 **Key words:** Herbicide, AMPA, transgenic soybean

24
25 **1- INTRODUÇÃO**

26
27 A planta geneticamente modificada mais cultivada no Brasil é a soja [Glycine
28 max (L.) Merr.] resistente ao herbicida glifosato, com 11,5 milhões de hectares
29 cultivados (ISAAA, 2006). A soja geneticamente modificada resistente ao glifosato
30 (GM_{RR}) foi obtida pela introdução, juntamente com a região t-DNA e o gene
31 marcador de seleção, de gene correspondente à enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-
32 fosfato sintase (EPSPS, E.C. 2.5.1.19, CP4), enzima da via de chiquimato, resistente

1 ao glifosato, mantendo ativa a via biossintética de aminoácidos aromáticos (BUSSE
2 et al., 2001). O glifosato [N-(fosfonometil) glicina], age sobre a enzima EPSPS
3 inibindo a via de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais, fenilalanina,
4 triptofano e tirosina, os quais são precursores de outros produtos, como lignina,
5 alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (AMARANTE & SANTOS, 2002). A priori
6 a soja GM_{RR} é tolerante ao glifosato por possuir uma isoforma da EPSPS resistente
7 a essa molécula. Porém, é sabido que o glifosato será absorvido e metabolizado
8 pela planta podendo alterar o metabolismo secundário uma vez que a enzima
9 EPSPS endógena se mantém inalterada (REDDY et al., 2000).

10 A recomendação técnica prescrita no registro do produto comercial que
11 contém glifosato para aplicação pós-emergente de soja GM_{RR}, junto ao Ministério da
12 Agricultura, é de 1 a 5 L ha⁻¹ (480 a 2400 g ia ha⁻¹), dependendo da marca comercial
13 do produto. O período de carência para utilização do glifosato é de 56 dias antes da
14 colheita. Essa orientação parte do pressuposto de que respeitadas as dosagens e
15 prazo de carência, serão mantidos os limites de resíduo no grão abaixo do
16 parâmetro preconizado pela legislação vigente que é de 10 mg kg⁻¹. Ressalta-se,
17 ainda, que até 1994, o limite máximo permitido de glifosato nos grãos era de 0,2 mg
18 kg⁻¹ e, a partir daí, aumentou-se em 50 vezes esse limite para a soja GM_{RR},
19 passando para 10 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2007).

20 Embora o Brasil seja o 3º maior produtor mundial de soja GM_{RR}, somente
21 superado pelos EUA e Argentina, poucos trabalhos têm sido conduzidos no País
22 com o intuito de avaliar, em ensaios a campo, o impacto dessa tecnologia sobre a
23 qualidade e segurança dos grãos, num mesmo modelo experimental, em áreas de
24 Planossolo, que constitui-se a base experimental deste trabalho. Alguns autores
25 como PADGETTE et al. (1995), TAYLOR et al. (1999), DUKE et al. (2003), REDDY
26 et al. (2004) e MCCANN et al. (2005) estudaram o efeito da aplicação de glifosato no
27 manejo de soja GM_{RR} e na composição básica dos grãos. Inicialmente, PADGETTE
28 et al. (1995) avaliaram a expressão do gene CP4 EPSPS em soja GM_{RR} na
29 presença e ausência desse herbicida e verificaram um acúmulo similar da proteína
30 CP4 EPSPS em ambas condições. Na seqüência, TAYLOR et al. (1999) e MCCANN
31 et al. (2005), ao compararem variedades comerciais de soja GM_{RR} com as
32 convencionais verificaram que a transformação genética não interfere nos teores de
33 proteínas, carboidratos, gorduras, aminoácidos e de isoflavonas. Mas no que

1 concerne a resíduos, DUKE et al. (2003), analisando o manejo da soja GM_{RR} tratada
2 com glifosato sob diferentes dosagens, detectaram elevados teores do AMPA nos
3 grãos, porém, à semelhança de TAYLOR et al. (1999) e MCCANN et al. (2005), não
4 observaram efeito da aplicação do herbicida sobre os teores de chiquimato e de
5 isoflavonas. REDDY et al. (2004) observaram efeitos tóxicos para a planta e redução
6 dos teores de clorofilas quando o glifosato foi aplicado na dosagem 13.440 g ia ha⁻¹,
7 afetando a composição dos grãos. Para REDDY et al. (2000) a soja GM_{RR} não é
8 completamente resistente ao glifosato, podendo haver inibição no crescimento e
9 desenvolvimento da planta em dosagens a partir de 2240 g ia ha⁻¹ em certas
10 condições edafoclimáticas. Assim é possível que o herbicida glifosato afete os níveis
11 de isoflavonas em grãos produzidos por soja GM_{RR}.

12 Outro aspecto relacionado com o efeito do manejo da soja GM_{RR} é a
13 presença de resíduo do herbicida no solo. GINSING et al. (2004) investigaram, em
14 condições de laboratório, a mineralização do glifosato e a adsorção do metabólito
15 AMPA em cinco tipos de solos coletados na Dinamarca, nos quais observaram que o
16 principal metabolismo de bioconversão de glifosato no solo está associado à
17 mineralização, especialmente, por *Pseudomonas* spp. ARAÚJO et al. (2003)
18 detectaram incremento de 10 a 15% na liberação de CO₂ em solos onde houve
19 aplicação de glifosato na dosagem de 4320 g ia ha⁻¹, sugerindo que a microbiota do
20 solo é capaz de metabolizar o glifosato como uma fonte de carbono, em ensaios *in*
21 *vitro*. Outro fato relatado nesse trabalho foi a detecção de resíduo de glifosato e do
22 AMPA no solo, em maiores concentrações em áreas onde realizaram-se aplicações
23 de glifosato em anos sucessivos.

24 No entanto, não há dados publicados sobre as respostas à aplicação de
25 glifosato em soja GM_{RR} cultivada em Planossolos, amplamente conhecidos pela alta
26 concentração de argila e permeabilidade lenta. Além disso poucas variáveis foram
27 monitoradas na maioria dos trabalhos que abordam essa temática, ou que
28 estruturaram os experimentos *in vitro* (BUSSE et al., 2001; ARAÚJO et al., 2003), ou
29 em casa de vegetação (REDDY et al., 2004), ou, desenvolvidas a campo, (ELMORE
30 et al., 2001; DUKE et al., 2003). Nesse contexto, buscou-se avaliar o efeito da
31 aplicação do glifosato para o controle de plantas daninhas, nos resíduos dessa
32 molécula e de AMPA no solo e nos grãos, bem como nos teores de isoflavonas nos
33 grãos. A hipótese do trabalho é que a aplicação de glifosato no controle de plantas

1 daninhas no cultivo de soja GM_{RR}, cultivada em áreas de Planossolo, resulta em
2 resíduos de glifosato e AMPA nos grãos e solo, bem como pode afetar a síntese e
3 acúmulo de compostos relacionados com o metabolismo secundário da planta, como
4 é o caso de isoflavonas.

5

6 **2- MATERIAL E MÉTODOS**

7 **2.1- Material vegetal**

8 O experimento foi instalado, na safra 2005/2006, em campo experimental do
9 Centro Agropecuário da Palma (CAP), da Universidade Federal de Pelotas,
10 localizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O solo da
11 área experimental é classificado como Planossolo Háplico Eutrófico Solódico, tendo
12 como origem sedimentos derivados de granito (EMBRAPA, 2006). Como material
13 vegetal foram utilizadas sementes de soja GM_{RR} das cultivares BRS 244 RR e BRS
14 154 fornecidas pela Embrapa-Trigo (Passo Fundo-RS).

15

16 **2.2- Delineamento experimental e tratamentos**

17 A área experimental foi selecionada considerando-se o histórico (nunca houve
18 plantio de soja), homogeneidade topográfica (plana). As principais características
19 físico-químicas do solo da área experimental estão apresentados na tabela 1.

20 **TABELA 1-** Características físico-químicas do solo na área experimental do Centro
21 Agropecuário da Palma, UFPel, Pelotas, RS.

Variável	Valor
Argila (g kg ⁻¹)	16
pH	4,5
Índice SMP	5,7
Matéria Orgânica (%)	2,6
Fósforo (mg dm ⁻³)	4,9
Potássio (mg dm ⁻³)	27
Cálcio (cmol _c dm ⁻³)	1,2
Magnésio (cmol _c dm ⁻³)	1
Alumínio (cmol _c dm ⁻³)	1,4
Cobre (mg dm ⁻³)	1,4
Ferro (g dm ⁻³)	10
Manganês (mg dm ⁻³)	51
Zinco (mg dm ⁻³)	1,3
Sódio (mg dm ⁻³)	48

22

1 As parcelas experimentais constaram de áreas individuais com 4m x 5m,
2 aleatoriamente distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado dentro do
3 campo experimental, com 04 repetições por tratamento.

4 O plantio foi realizado durante a primeira quinzena de dezembro de 2005,
5 com sementes previamente tratadas com fungicida Derosal Plus® e inoculadas com
6 *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587.

7 Os tratamentos aplicados para testar a hipótese foram:

8 T1 - soja BRS 244 RR sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dias
9 após o plantio (dap);

10 T2- soja BRS 154 sem aplicação de herbicida, com capina manual aos 28 dap ;

11 T3 - soja BRS 244 RR com uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 dap;

12 T4 - soja BRS 244 RR com duas aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, aos 28 e 56
13 dap;

14 T5 - soja BRS 244 RR com uma aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹,
15 aos 28 dap;

16 T6- soja BRS 154 com uma aplicação de herbicida imazetapir a 100 g ia ha⁻¹, aos 28
17 dap.

19 **2.3- Avaliações**

20 Aos 90 dias após a emergência da planta, correspondendo ao estágio R6 do
21 desenvolvimento da soja, foram retiradas, com auxílio do trado de rosca, amostras
22 de solo na profundidade de 0-20 cm de cada unidade experimental para análise de
23 resíduo de glifosato e AMPA. Para análise de resíduo de glifosato e AMPA, bem
24 como de isoflavonas em grãos, as amostras foram coletados por ocasião da colheita
25 quando apresentavam, em média, 21% de umidade. Os grãos foram secos até
26 aproximadamente 12% de umidade em estufa com circulação forçada de ar a 60° C
27 ± 5°C.

28 A colheita foi realizada na primeira quinzena de maio de 2006. Desse modo,
29 os tratamentos realizados em 28 e 56 dap, correspondem a 120 e 90 dias antes da
30 colheita, respectivamente, atendendo ao período de carência exigido para a
31 aplicação do glifosato.

2.4- Detecção e quantificação de resíduo do glifosato e do AMPA no solo e nos grãos

O método adotado segue exatamente o protocolo escrito por VEIGA et al. (2001). Para análise de resíduo da molécula de glifosato e AMPA, amostras do solo foram secas a 40°C e, em seguida peneiradas em peneiras de 2 mm. O glifosato e AMPA foram extraídos com solução de dihidroxifosfato de potássio. Cinco gramas da amostra foram mantidos em agitação durante 15 minutos em 25 ml 0,1 M de KH_2PO_4 em agitador orbital, centrifugado 10 minutos a 2500 g e filtrado com filtro Whatman® n° 2. A extração foi repetida duas vezes, obtendo-se 75 ml de extrato de cada amostra. Os extratos foram concentrados a baixas temperaturas (freeze-dried Vac®) e dissolvidos em água purificada em sistema Milli-Q® num volume final de 10 ml. Esses extratos foram filtrados através de membrana de Millipore® 0,45 μm , e armazenados a -20 °C até análise por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Para realizar a derivação, 0,1 ml de extrato foi adicionado de 0,9 ml de tampão borato 0,025 M (pH 9,0), 0,9 ml de acetona e 0,1 ml 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC). A amostra foi agitada por 5 minutos, seguida de 20 minutos de repouso, após os quais realizaram-se três lavagens com éter etílico.

O equipamento de CLAE usado é composto por injetor de 50 μl Loop Rheodyne®, coluna de troca aniônica de 250 x 4,6 mm com partícula de 5 μm e detector espectrofluorométrico Shimadzu®. Os padrões analíticos de 9-9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), glifosato e AMPA foram obtidos da Sigma-Aldrich®. A acetona, éter etílico e acetonitrila foram obtidos da Merck®.

A análise de resíduo do glifosato e do AMPA nos grãos foi realizada por método similar, excetuando o preparo da amostra que consistiu em utilizar 1 g de grãos moídos, submetidos à extração com 15 ml de água purificada em sistema Milli-Q®, mantidos sob agitação por 30 minutos, seguidos por sonicação por 20 minutos e centrifugação a 2000 g a 20°C por 20 minutos. Após, 4 ml do sobrenadante foram retirados e filtrados em membrana Millipore® 0,45 μm . Ao pellet foram adicionados 5 ml de água e repetiu-se a sonicação, centrifugação e filtração. A partir daí seguiram-se os mesmos procedimentos de derivação e quantificação descritos por VEIGA et al. (2001). Os limites de quantificação foram de 0,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a molécula de glifosato, 0,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para o AMPA e 0,10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para imazetapir.

2.5- Extração e quantificação de isoflavonas

Para análise de isoflavonas, os grãos de soja foram moídos em moinho Janke & Kunkel A-10 (Wilmington, USA) com peneira de 0,25 mm. A extração das isoflavonas foi realizada com agitador mecânico e barra magnética por 2 horas a 4 °C, na proporção de 1:20 (m/v), com metanol 80% (GENOVESE & LAJOLO, 2001). Os extratos foram filtrados utilizando-se papel de filtro Whatman nº 6 e submetidos a rotaevaporação (Rotavapor-RE 120 – Büchi, Flawil, Suíça) até atingir o volume de 2 mL. A seguir completou-se o volume para 5 mL em balão volumétrico com metanol (grau CLAE). As amostras foram filtradas utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0,22 µm de poro para posterior análise por CLAE. As extrações foram realizadas em triplicata.

A separação das isoflavonas foi realizada em coluna C18 Novapak (Waters, Milford, EUA) de acordo com o método proposto por SONG et al. (1998). O cromatógrafo líquido utilizado foi o da Hewlett Packard (Palo Alto, EUA) série 1100, equipado com detector com arranjo de diodo (DAD). Os padrões de daidzeína e genisteína foram obtidos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, E.U.A.), daidzina e genistina foram obtidos da Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, Reino Unido), glicitina e gliciteína foram obtidos da Fujicco Co. Ltd. (Kyoto, Japão), acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina foram obtidos da LC Laboratories (Woburn, E.U.A.). A identificação foi feita a partir dos tempos de retenção e dos espectros. As amostras foram injetadas em duplicatas. Os resultados foram expressos como mg de isoflavona por 100 g de amostra (b.u.), após normalização das diferenças de peso molecular das amostras glicosiladas, feita multiplicando-se a massa de cada derivado pela razão entre o peso molecular da respectiva aglicona e o peso molecular da forma glicosilada, conforme SONG et al. (1998).

2.6- Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, e à comparação de médias pelo método LSD, utilizando-se o programa Statistix 8.0[®].

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de glifosato na soja GM_{RR} resultou na presença de resíduos no solo e nos grãos (Tabela 2). O que era esperado com base nos trabalhos prévios de VEIGA et al. (2001), ARAÚJO et al. (2003) e DUKE et al. (2003), embora os valores tenham sido distintos entre os trabalhos realizados. De modo geral, as concentrações de resíduos detectados neste trabalho foram superiores aos citados por estes autores. Mais detalhadamente, verificou-se que a realização de uma (T3) ou duas (T4) aplicações de glifosato, na dosagem de 960 g ia ha⁻¹, resultou em resíduos de 0,40 e 0,30 mg kg⁻¹ de solo, não havendo diferença significativa entre os tratamentos (p ≤ 0,05). O resíduo de AMPA foi significativamente superior (p ≤ 0,05) no solo de parcelas que receberam duas aplicações de glifosato (T4), passando de 1,03 mg kg⁻¹ no T3 para 1,70 mg kg⁻¹ no T4. Embora não se tenha encontrado referências com esses tratamentos, há trabalhos (ARAÚJO et al., 2003; GINSING et al., 2004) que reportam que a biodegradação do glifosato é mais rápida do que a do AMPA, o que explicaria o fato de teores do herbicida serem relativamente baixos e não diferirem entre si no solo, enquanto o metabólito AMPA é significativamente superior quando aumenta-se a quantidade de princípio ativo aplicado. De modo geral, é citado que a meia vida do glifosato é menor do que a do AMPA, o que explicaria a detecção e acúmulo de AMPA em solos com elevadas dosagens desse herbicida. Essa afirmativa é embasada no trabalho de ARAÚJO et al. (2003), que verificaram maiores teores de AMPA nos solos nos quais houve aplicações sucessivas de glifosato.

Nos tratamentos com imazetapir não houve diferenças significativas (p ≤ 0,05) nos teores de resíduo desse herbicida no solo entre as parcelas cultivadas com soja transgênica T5 (0,54 mg kg⁻¹) e com a convencional T6 (0,60 mg kg⁻¹). Esse comportamento foi similar quando se avaliaram os grãos, detectando-se valores entre 0,12 mg kg⁻¹ (T5) e 0,16 mg kg⁻¹ (T6). Essas concentrações são superiores ao limite máximo permitido desse herbicida segundo normativa ANVISA que é de 0,10 mg kg⁻¹ (AGROFIT, 2007).

Ao avaliarem-se os resíduos do glifosato nos grãos, verificou-se que há presença dessa molécula, proporcionalmente à dosagem aplicada. No tratamento em que realizou-se uma aplicação de glifosato (T3) a concentração foi de 19 mg kg⁻¹ enquanto naquele onde realizaram-se duas aplicações (T4) a concentração

1 aumentou para 36 mg kg⁻¹. Esses resultados são preocupantes, uma vez que o
 2 limite máximo estabelecido pela ANVISA é de 10 mg kg⁻¹ (AGROFIT, 2007). O
 3 herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies
 4 de animais, quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado.
 5 A dose diária aceitável por massa corpórea deste composto é relativamente baixa
 6 (IDA = 0,042 mg kg⁻¹ d⁻¹) (ANVISA, 2007). Os estudos crônicos de alimentação não
 7 mostraram perda de peso, efeitos ao sangue e pâncreas ou, ainda, evidência de
 8 carcinogenicidade nos seres humanos. No entanto, estudos feitos com ratos
 9 demonstraram perda de peso, descarga nasal e morte de matrizes grávidas, além de
 10 desordens digestivas (AMARANTE & SANTOS, 2002).

11 Ao monitorarem-se as concentrações de AMPA, o comportamento foi similar,
 12 ou seja, em soja tratada uma vez com glifosato, o resíduo foi de 9 mg kg⁻¹ (T3) e nas
 13 parcelas tratadas duas vezes, detectaram-se 12 mg kg⁻¹ (T4). DUKE et al. (2003)
 14 detectaram menores valores de resíduos de glifosato nos grãos (2,18 e 3,08 mg kg⁻¹
 15 ¹), mas os de AMPA foram elevados (7,27 e 25,00 mg kg⁻¹) em grãos de soja
 16 geneticamente modificada tratada com o herbicida na dosagem de 1260 g ia ha⁻¹,
 17 aplicado 8 semanas após o plantio (56 dias). As causas dos menores teores de
 18 resíduo de glifosato nesses grãos (DUKE et al., 2003), embora a dosagem tenha
 19 sido superior (1260 g ia ha⁻¹) à empregada neste trabalho (960 g ia ha⁻¹) não foram
 20 demonstradas, mas é conhecido que a metabolização da molécula na planta é
 21 dependente, além do genótipo, das condições edafoclimáticas durante o cultivo,
 22 podendo ser essas as causas das diferenças.

23 **TABELA 2-** Resíduos do glifosato, imazetapir e AMPA no solo e nos grãos

Tratamento	Solo			Grãos		
	Glifosato (mg kg ⁻¹)	Imazetapir (mg kg ⁻¹)	AMPA (mg kg ⁻¹)	Glifosato (mg kg ⁻¹)	Imazetapir (mg kg ⁻¹)	AMPA (mg kg ⁻¹)
T1- BRS 244 RR capina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T2- BRS 154 capina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T3- BRS 244 RR 1X glifosato	0,40	n.d.	1,03 ^b	19 ^b	n.d.	9
T4- BRS 244 RR 2X glifosato	0,30	n.d.	1,70 ^a	36 ^a	n.d.	12
T5- BRS 244 RR 1X imazetapir	n.d.	0,54	n.d.	n.d.	0,12	n.d.
T6- BRS 154 1X imazetapir	n.d.	0,60	n.d.	n.d.	0,16	n.d.

24 n.d.- não detectado. Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam diferença
 25 significativa (P<0,05).

1 Os maiores teores de isoflavonas totais foram detectados em grãos de soja
2 GM_{RR} tratada com imazetapir (T5), em média 19% superiores aos da cultivar
3 convencional com o mesmo tratamento (T6). Não houve diferenças significativas ($p \leq$
4 0,05) entre os demais tratamentos com a cultivar GM_{RR} (Tabela 3). Os maiores
5 teores de isoflavonas no T5 podem estar relacionados com a maior competição das
6 plantas desse tratamento, devido à maior presença da cobertura vegetal no
7 tratamento com imazetapir, no qual observou-se menor eficiência (dados não
8 apresentados) no controle de plantas daninhas, quando comparado às demais
9 formas de manejo.

10 Os teores de isoflavonas variaram de 177 a 231 mg 100 g⁻¹, sendo os teores
11 médios de 211 mg 100 g⁻¹ e 182 mg 100 g⁻¹ para a cultivar GM_{RR} e não modificada
12 (NM), respectivamente. Esses valores situam-se dentro dos valores comumente
13 citados na literatura (GENOVESE et al., 2005; WANG et al., 2000; CARRÃO-
14 PANIZZI et al., 2003). É fato, entretanto, que há significativa variação de
15 concentração de isoflavonas em soja, em função de genótipos, regiões e condições
16 de cultivo. GENOVESE et al. (2005), por exemplo, avaliaram catorze variedades de
17 soja NM fornecidas pela Embrapa no ano de 2003, produzidas em Ponta Grossa
18 (Paraná, Brasil), e as concentrações variaram de 57 mg 100 g⁻¹ a 188 mg 100 g⁻¹.
19 Em genótipos cultivados nos EUA, WANG et al. (2000) reportaram valores de 116
20 mg 100 g⁻¹ a 274 mg 100 g⁻¹. DUKE et al. (2003) observaram valores mais elevados
21 entre de 361 mg 100 g⁻¹ a 590 mg 100 g⁻¹, em outros genótipos.

22 Ao compararem-se os teores médios de isoflavonas de soja GM_{RR} (211,2 mg
23 100 g⁻¹) e NM (182,2 mg 100 g⁻¹), verifica-se que a transformação genética não
24 afetou essa variável de forma significativa ($p \leq 0,05$), o que também foi observado por
25 TAYLOR et al. (1999). De modo similar, MCCANN et al. (2005) verificaram que os
26 teores médios e variações de isoflavonas entre 25 variedades de soja GM_{RR} e 25
27 variedades NM obtidas da Monsanto nas safras de 2000, 2001 e 2002 foram
28 similares dentro de cada safra, mas variando entre safras.

29 Alguns autores como PADGETTE et al. (1995), DUKE et al. (2003) e
30 MCCANN et al. (2005) afirmam que as variações encontradas nos teores de
31 isoflavonas estão mais relacionadas com o genótipo, tipo de solo, temperatura ou
32 outras condições adversas no cultivo do que o fato de ter-se alterado a resistência
33 ao herbicida glifosato. Neste trabalho isso também foi observado. As sementes

1 provenientes da Embrapa-Trigo de Passo Fundo, utilizadas neste experimento,
 2 apresentaram, em média 141 (± 9) mg 100 g⁻¹ para a cultivar GM_{RR} e 123 (± 1) mg
 3 100 g⁻¹ para a NM. Ao cultivar-se esse material na Região Sul do RS, em
 4 Planossolo, os teores médios passaram para 211 mg 100 g⁻¹ e 182 mg 100 g⁻¹ para
 5 soja GM_{RR} e NM, respectivamente. Isso pode ser conseqüência das variações mais
 6 acentuadas de temperatura e de umidade na região de Planossolo, do que na região
 7 de Latossolo Vermelho Distrófico típico de Passo Fundo. As isoflavonas constituem-
 8 se em metabólitos secundários indicadores de respostas a estresses bióticos e
 9 abióticos, sugerindo-se, com isso, que adversidades edafoclimáticas durante o
 10 cultivo podem induzir à maior síntese e acúmulo desses compostos nos grãos.

11

12 **TABELA 3.** Conteúdo total de isoflavonas dos grãos de soja submetidos aos
 13 diferentes tratamentos, expresso em agliconas.

Tratamentos	Isoflavonas (mg/100 g b.u.)
T1- BRS 244 RR capina	196 \pm 9 ^{abc}
T2- BRS 154 capina	177 \pm 8 ^c
T3- BRS 244 RR 1X glifosato	193 \pm 28 ^{abc}
T4- BRS 244 RR 2X glifosato	225 \pm 4 ^{ab}
T5- BRS 244 RR 1X imazetapir	231 \pm 14 ^a
T6- BRS 154 1X imazetapir	187 \pm 9 ^{bc}

14 Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam diferença significativa ($P < 0,05$).

15 O perfil das isoflavonas presentes nas duas variedades de soja submetidas
 16 aos diferentes tratamentos é apresentado na tabela 4, e mostra que a maioria (98,3-
 17 99,5%) se encontra na forma glicosilada na semente. A ausência de
 18 acetilglicosídeos está justificada uma vez que sua formação está associada a
 19 processamentos envolvendo calor seco, como a tostagem e a extrusão da farinha de
 20 soja (COWARD et al., 1998). Por outro lado, a formação de agliconas resulta da
 21 atuação das β -glicosidases endógenas, como por exemplo quando a soja é deixada
 22 de molho ou mesmo durante armazenamento prolongado em condições de alta
 23 umidade relativa (MATSUURA et al., 1989; LEE et al., 2003). Isso explica a baixa
 24 porcentagem presente nas sementes, cuja formação foi provavelmente decorrente
 25 do processo de moagem e extração da soja para a análise. As pequenas diferenças

1 observadas entre as porcentagens de malonilglicosídeos e β -glicosídeos não
 2 parecem relacionadas aos tratamentos aplicados, e seriam atribuídas à baixa
 3 estabilidade térmica dos malonilglicosídeos, que através de desesterificação formam
 4 facilmente os β -glicosídeos.

5 Em relação à distribuição das isoflavonas (Tabela 5), diferenças significativas
 6 foram encontradas entre as variedades GM_{RR} BRS 244 RR e NM BRS 154, tratadas
 7 ou não, principalmente no que concerne à menor porcentagem de daidzeína e maior
 8 de genisteína total da BRS 154 em relação à BRS 244 RR. Novamente, a aplicação
 9 ou não de herbicidas não resultou em diferenças nesses parâmetros avaliados,
 10 exceto por uma tendência a um aumento de daidzeína com conseqüente diminuição
 11 de genisteína total na BRS 244 RR submetida a duas aplicações de glifosato. As
 12 variações encontradas nas porcentagens são similares às relatadas para as
 13 variedades da Embrapa, safra 2003 (GENOVESE et al., 2005).

14
 15 **TABELA 4.** Perfil de isoflavonas dos grãos de soja submetidos aos diferentes
 16 tratamentos.

Tratamentos	%			
	β -glicosídeos	Malonilglicosídeos	Acetilglicosídeos	Agliconas
T1- BRS 244 RR capina	15,1 \pm 1,0 ^{ab}	84,4 \pm 1,0 ^{bc}	n.d.	0,6 \pm 0,0 ^c
T2- BRS 154 capina	11,9 \pm 1,1 ^c	87,5 \pm 1,2 ^a	n.d.	0,5 \pm 0,1 ^c
T3- BRS 244 RR 1X glifosato	12,5 \pm 1,6 ^{bc}	86,8 \pm 1,8 ^{ab}	n.d.	0,7 \pm 0,2 ^{bc}
T4- BRS 244 RR 2X glifosato	17,4 \pm 2,4 ^a	81,9 \pm 2,5 ^c	n.d.	0,8 \pm 0,1 ^b
T5- BRS 244 RR 1X imazetapir	12,5 \pm 0,3 ^c	86,0 \pm 0,4 ^a	n.d.	1,5 \pm 0,2 ^a
T6- BRS 154 1X imazetapir	17,3 \pm 1,2 ^a	81,0 \pm 1,2 ^c	n.d.	1,7 \pm 0,2 ^a

17 n.d. não detectados. Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam diferença
 18 significativa ($P < 0,05$).

1 **TABELA 5.** Distribuição das formas totais de isoflavonas presentes dos grãos
 2 de soja submetidos aos diferentes tratamentos.

Tratamentos	% total*		
	Daidzeína	Gliciteína	Genisteína
T1- BRS 244 RR capina	46,0 ± 0,7 ^b	5,6 ± 0,2 ^a	48,4 ± 0,6 ^b
T2- BRS 154 capina	41,2 ± 0,5 ^c	4,5 ± 0,3 ^b	54,2 ± 0,7 ^a
T3- BRS 244 RR 1X glifosato	47,7 ± 1,8 ^{ab}	5,8 ± 0,1 ^a	46,5 ± 1,9 ^{bc}
T4- BRS 244 RR 2X glifosato	49,7 ± 0,2 ^a	5,9 ± 0,1 ^a	44,4 ± 0,1 ^c
T5- BRS 244 RR 1X imazetapir	46,1 ± 0,4 ^b	5,9 ± 0,2 ^a	48,0 ± 0,4 ^b
T6- BRS 154 1X imazetapir	39,8 ± 0,3 ^c	5,3 ± 0,4 ^a	54,9 ± 0,6 ^a

3 *A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas presentes,
 4 expressas como agliconas. Médias, na mesma coluna, com letras iguais não apresentam diferença
 5 significativa ($P < 0,05$).
 6

7 **4- CONCLUSÃO**

8 A aplicação de glifosato em pós-emergência, no controle de plantas daninhas
 9 durante o cultivo de soja GM_{RR} BRS 244 RR, em áreas de planossolo, resulta em
 10 resíduos dessa molécula nos grãos, ultrapassando o limite máximo permitido pela
 11 legislação brasileira, bem como a presença de resíduos de AMPA no solo e nos
 12 grãos. O teor e o perfil das isoflavonas não foram afetados pela aplicação de
 13 glifosato, nem pela transformação genética.
 14

15 **5- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

16 AMARANTE, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e
 17 legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.

18 AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Online. Disponível na Internet
 19 em: <<http://www.agrofit.com.br>>. Acesso em jan. 2007.

20 ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Online. Disponível na Internet
 21 em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em fev. 2007.

22 ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the
 23 microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 799-804,
 24 2003.

- 1 BUSSE, M.D., RATCLIFF, G.A., SHESTAK, C.J. E POWERS, R.F. Glyphosate
2 toxicity and the effects of long-term vegetation control and soil on soil microbial
3 communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1777-1789, 2001.
- 4 CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCH, A. Efeitos de genótipos, ambientes
5 e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos
6 de soja. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p.897-902, 2003.
- 7 COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of
8 isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **American Journal of**
9 **Clinical Nutrition**, Bethesda, v.68, p.1486S-1491S, 1998.
- 10 DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; PACE, P.F.; REDDY, K.N; SMEDA, R.J. Isoflavone,
11 glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated,
12 glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
13 Columbus , v.51, n.1, p. 340-344, 2003.
- 14 DUKE, S.O. Glyphosate. In **Herbicides: chemistry, degradation, and mode of**
15 **action**; Kearney, P. C., Kaufman, D. D., Eds.; Dekker: New York, v. 3, p. 1-70, 1988.
- 16 ELMORE, R.W.; ROETH, F. W.; KLEIN, R.N.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A.;
17 NELSON, L. A.; SKAPIRO, C.A. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to
18 glyphosato. **Agronomy Journal**, Madison, v.93, p.404-407, 2001.
- 19 EMBRAPA- Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – Brasília: Embrapa.
20 Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2ª ed., 306p, 2006.
- 21 GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de
22 soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p. 86-93, 2001.
- 23 GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M. Isoflavone profile and
24 antioxidant activity of brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology**
25 **International**, Londres, v.11, n.3, p.205–211, 2005.
- 26 GIMSING, A.L.; BORGGAARD, O.K.; JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J.; SORENSEN,
27 J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate
28 mineralization in Danish surface soils. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p.233–242,
29 2004.

1 ISAAA- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - Global
2 Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. Online. Disponível na Internet
3 em:<<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html>>. Acesso em 15 maio 2007.

4

5 LEE, S.J.; AHN, K.; KIM, S.H.; KIM, J.T.; HAN, S.J.; JUNG, M.Y.; CHUNG, I.M.
6 Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration.
7 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, n.11, p.3382-3389,
8 2003.

9 MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk
10 developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**,
11 Chicago, v.54, n.3, p.602-605, 1989.

12 MCCANN, M.C.; LIU, K.; TRUJILLO, W.A.; DOBERT, R.C. Glyphosate-tolerant
13 soybeans remain compositionally equivalent to conventional soybeans (*Glycine max*
14 L.) during three years of field testing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.
15 Columbus, v.53, p.5331-5335, 2005.

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

21 REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a
22 metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant
23 soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.16,
24 p.5139-5143, 2004.

25 REDDY, K.N.; HOAGLAND, R.E; ZABLOTOWICZ, R.M. Effect of glyphosate on
26 growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean
27 (*Glycine max*) varieties. **Journal New Seeds**, v.2, p.37–52, 2000.

28 SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P.A. Soy isoflavone analysis:
29 quality control and a new internal standard. **American Journal of Clinical Nutrition**,
30 Bethesda, v.68, p.1474S–1479S, 1998.

- 1 TAYLOR, N.B.; FUCHS, R.L.; MACDONALD, J.; SHARIFF, A.R.; PADGETTE, S.R.
2 Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate.
3 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, p.4469- 4473, 1999.
- 4 VEIGA, F.; ZAPATA, J.M.; FERNANDEZ MARCOS, M.L.; ALVAREZ, E. Dynamics of
5 glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west
6 Spain. **The Science of the Total Environment**, v.271, p.135-144, 2001.
- 7 WANG, C.; SHERRARD, M.; PAGADALA, S.; WIXON, R.; SCOTT, R.A. Isoflavone
8 content among maturity group 0 to II soybeans. **Journal of the American Oil**
9 **Chemists' Society**, v.77, p.483-487, 2000.

10

11 **6- AGRADECIMENTOS**

12

13 À Embrapa Trigo, de Passo Fundo-RS pelo fornecimento das sementes de
14 soja, à FAPERGS pelo financiamento (Proade 3, 05/2234-4) à pesquisa e bolsa de
15 IC, ao PROAP/CAPES pelo apoio financeiro, à SESU-MEC pela bolsa PET, e ao
16 Centro Agropecuário da Palma pelo apoio na instalação do experimento.

1

6. ARTIGO 5

2

RESÍDUOS DO GLIFOSATO E DO ACIDO

3

AMINOMETILFOSFÔNICO EM GRÃOS E NO SOLO

4

CULTIVADO COM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA

5

(Artigo no formato da **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**)

RESÍDUOS DO GLIFOSATO E DO ACIDO AMINOMETILFOSFÔNICO EM GRÃOS E NO SOLO CULTIVADO COM SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA

Glifosato e AMPA em soja

Giani Mariza Bärwald BOHM¹; Fernando HAX²; Cesar Valmor ROMBALDI³

RESUMO

A aplicação do herbicida glifosato é o principal método utilizado para o controle de plantas daninhas em soja [*Glycine max* (L.) Merr.] geneticamente modificada (GM_{RR}). A presença de resíduos desse herbicida e do ácido aminometilfosfônico (AMPA) nos grãos de soja e no solo da área de cultivo ainda constitui-se em temática controversa. Este trabalho teve por objetivo quantificar os resíduos do glifosato e do AMPA no solo e nos grãos e verificar se essas concentrações apresentam risco ao ambiente e à qualidade dos grãos. Para isso instalou-se experimento a campo no Centro Agropecuário da Palma (CAP), na safra de 2006/2007, em área de Planossolo, com a cultivar GM_{RR} BRS 244RR, na qual aplicou-se uma ou duas pulverizações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹. Como tratamento controle realizou-se capina. Complementarmente coletaram-se amostras de grãos e de solo de duas áreas de produtores rurais, cultivadas na mesma safra, em diferentes condições edafoclimáticas, visando realizar um diagnóstico da situação fora das condições do CAP. Verificou-se que a aplicação do glifosato no controle de plantas daninhas resultou em resíduos do glifosato e do AMPA no solo. Nos grãos, as concentrações de glifosato foram superiores ao permitido pela legislação brasileira que é de 10 mg kg⁻¹. Os teores de AMPA nos grãos foram elevados.

Palavras-chave: segurança, soja transgênica, herbicida

¹ Professora do Centro Federal de Educação Tecnológica, doutoranda do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/nº, Capão do Leão, RS, Brasil, CEP 96010-900. E-mail: gbbohm@terra.com.br.

² Engenheiro Agrônomo. Universidade Federal de Pelotas. Bolsista CNPq.

³ Professor Titular do Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, s/nº, Capão do Leão, RS, CEP 96010-900.

Apoio financeiro: FAPERGS e PROAP/UFPel.

1 **RESIDUE OF GLYPHOSATE AND OF AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID IN**
2 **GRAINS AND SOIL CULTIVATED WITH GENETICALLY MODIFIED SOYBEAN**

3
4 **ABSTRACT**

5 Glyphosate is the main method used for weed control in soybean [Glycine max (L.)
6 Merr.] genetically modified (GM_{RR}). The presence of residues this herbicide and
7 aminomethylphosphonic acid (AMPA) in grains of soybean and soil in area of
8 cultivation still constituted in thematic controverted. This work had for objective to
9 quantify residues of glyphosate and AMPA in soil and grains and to verify these
10 concentrations are show risk for environmental and quality of grains. Therefore
11 instaled experiment at Centro Agropecuário da Palma (CAP), during the 2006/2007
12 season, in area of Albaqualf, with soybean GM_{RR} BRS 244 RR which was applied
13 ane or two spaying of 960 g ai ha⁻¹ of glyphosate. Weed control tests were performed
14 with manual weeding. Additionally were collected samples of grains and soil of two
15 areas of rural producers, cultivated in the same crop, in different conditions
16 edaphoclimatic, seeking to accomplish a diagnosis of the situation outside of
17 conditions of CAP. It was verified that the application of the glyphosate for weed
18 control resulted in residues of glyphosate and AMPA in the soil. In the grains, the
19 glyphosate concentrations were higher than allowed by the Brazilian legislation that
20 is 10 mg kg⁻¹. The levels of AMPA in the grains were high.

21 **Key words:** safety, transgenic soybean, herbicide

22
23 **1- INTRODUÇÃO**

24 Na soja [Glycine max (L.) Merr.] geneticamente modificada (GM_{RR}), a
25 resistência ao glifosato foi obtida pela introdução, juntamente com a região t-DNA e
26 do gene marcador de seleção, do gene codificador de uma isoforma da enzima
27 EPSPS, enzima da via do chiquimato. A expressão da enzima 5-
28 enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, E.C. 2.5.1.19) resistente ao glifosato
29 mantém a síntese de aminoácidos aromáticos em soja GM_{RR} mesmo quando
30 submetida a tratamentos com glifosato (PADGETTE et al., 1995).

1 O herbicida glifosato inibe a biossíntese de aminoácidos aromáticos
2 (fenilalanina, triptofano e tirosina) em plantas e microrganismos, inibindo a síntese
3 protéica, e de produtos do metabolismo secundário, afetando negativamente a via
4 do chiquimato (DUKE, 1988). O mecanismo de ação do glifosato é único e age
5 exclusivamente sobre a EPSPS, que catalisa a condensação do ácido chiquímico e
6 o fosfofenolpiruvato (PEP). A inibição da via do chiquimato pelo glifosato resulta em
7 acúmulo do ácido chiquímico e/ou ácidos hidroxibenzóicos em plantas (DUKE, 1988)
8 e em *Bradyrhizobium japonicum* (ZABLOTOVICZ & REDDY, 2004). Efeitos tóxicos
9 do glifosato podem ser atribuídos à incapacidade dos organismos em sintetizar
10 aminoácidos aromáticos, à drenagem de energia nos organismos resultantes da
11 adenosina trifosfato e fosfofenolpiruvato (PEP) gastos na acumulação do chiquimato,
12 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato (DAHP) e ácidos hidroxibenzóicos, e à
13 toxicidade de moléculas intermediárias na via do chiquimato (FISHER et al., 1986).

14 A recomendação técnica prescrita no registro do produto comercial que
15 contém glifosato para aplicação pós-emergente de soja, junto ao Ministério da
16 Agricultura, depende da marca comercial, variando de 1 a 5 L ha⁻¹ (480 a 2400 g ia
17 ha⁻¹). O período de carência para utilização do glifosato preconizado é de 56 dias
18 antes da colheita. Essa orientação parte do pressuposto de que respeitadas essas
19 dosagens e prazo de carência, serão mantidos os limites de resíduo no grão abaixo
20 do parâmetro preconizado pela legislação vigente que é de 10 mg kg⁻¹. Ressalta-se,
21 no entanto, que até 1994, o limite máximo permitido de glifosato nos grãos era de
22 0,2 mg kg⁻¹ e, a partir daí, foi aumentado em 50 vezes, passando para 10 mg kg⁻¹
23 (ANVISA, 2007).

24 O glifosato é metabolizado para ácido aminometilfosfônico (AMPA) em soja,
25 e resíduos de AMPA têm sido detectados em partes da planta e grãos de soja
26 tratada com este herbicida (DUKE et al., 2003; ARREGUI et al., 2003). Também
27 foram relatados por REDDY et al. (2004) efeitos tóxicos, cloroses, necroses e
28 redução nos teores de clorofilas nas plantas quando o glifosato foi aplicado na
29 dosagem 13.440 g ia ha⁻¹, afetando a composição dos grãos. Essa dosagem (13.440
30 g ia ha⁻¹) é aproximadamente cinco vezes maior do que o máximo permitido no
31 Brasil. As extensões dos danos para a planta são dependentes dos genótipos de
32 soja e das condições edafoclimáticas (REDDY et al., 2004). A detecção de AMPA na
33 planta e nos grãos em soja GM_{RR} tratada com glifosato sugere que a enzima

1 glifosato oxidase (GOX) seja responsável pela conversão de glifosato em AMPA
2 (NANDULA et al., 2007).

3 Outro aspecto relacionado com o efeito do manejo da soja GM_{RR} é a
4 presença de resíduo do herbicida no solo. GINSING et al. (2004) investigaram, em
5 condições de laboratório, a mineralização do glifosato e a adsorção do metabólito
6 AMPA em cinco tipos de solos coletados na Dinamarca, nos quais observaram que o
7 principal metabolismo de bioconversão de glifosato no solo está associado à
8 mineralização, especialmente, por *Pseudomonas* spp. De forma semelhante,
9 ARAÚJO et al. (2003a) detectaram incremento de 10 a 15% na liberação de CO₂ em
10 solos onde houve aplicação de glifosato na dosagem de 4320 g ia ha⁻¹, sugerindo
11 que a microbiota do solo é capaz de metabolizar o glifosato como uma fonte de
12 carbono, em ensaios *in vitro*. Outro fato relatado nesse trabalho foi a detecção de
13 resíduo de glifosato e do AMPA no solo, em maiores concentrações em áreas onde
14 realizaram-se aplicações de glifosato em anos sucessivos. Resíduos de glifosato,
15 também foram detectados por VEIGA et al. (2001) em solos com outros tipos de
16 cultivo. Conforme SOUZA et al. (1999) os fatores que influenciam a persistência do
17 glifosato estão relacionados com sua adsorção ao solo e ao metabolismo de
18 biodegradação. A biodegradação do glifosato no solo pode seguir duas rotas. A
19 primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria
20 *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase). Essa
21 via é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda, consiste na transformação
22 do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA) por ação da bactéria *Anthrobacter*
23 *atrocyaneus* e *Flavobacterium* sp. (AMARANTE & SANTOS, 2002).

24 EBERBACH (1998) observou que há rápida degradação do glifosato no
25 primeiro dia após a aplicação, seguida de diminuição a partir daí, sendo que sua
26 adsorção ao solo restringe a disponibilidade para biodegradação ao longo do tempo.
27 Assim, a meia-vida da molécula depende se a molécula está não-adsorvida (6 a 9
28 dias) ou adsorvida (222 a 835 dias). Duas coletâneas recentes (CERDEIRA et al.,
29 2007; CERDEIRA & DUKE, 2007) revisaram os principais avanços nos estudos de
30 impacto ambiental no cultivo de soja GM_{RR}. Nesses relatos praticamente não há
31 registro de riscos significativos, nem do cultivo nem da aplicação do herbicida, sobre
32 a microbiota, fixação biológica de nitrogênio e de resíduos do herbicida nos grãos.
33 Quando foram observados problemas, esses estiveram relacionados, principalmente

1 estresses abióticos. Mas, desde 2005 vem-se desenvolvendo estudos, em campo
2 experimental no Centro Agropecuário da Palma (CAP), Pelotas-RS, e nesses
3 experimentos prévios detectaram-se resíduos de glifosato em grãos de soja GM_{RR}
4 tratados com esse herbicida dentro das dosagens e período de carência
5 recomendados.

6 Diante disso, entende-se que novos estudos sobre a presença da molécula
7 de glifosato e seu metabólito, AMPA, nos grãos e no solo, no cultivo de soja GM_{RR},
8 são necessários para verificar a segurança ambiental e qualidade do produto
9 comercial. Nesse contexto, buscou-se detectar e quantificar resíduos da molécula de
10 glifosato e de AMPA no solo e nos grãos de soja GM_{RR}. Complementarmente
11 coletaram-se amostras em áreas de produção de soja GM_{RR} de duas regiões do
12 Estado do Rio Grande do Sul (Região Sul-Pelotas, e Região Norte-Sananduva)
13 visando diagnosticar a presença ou não deste problema.

15 **2- MATERIAL E MÉTODOS**

16 **2.1- Experimento no CAP**

17 O experimento foi conduzido na safra de 2006/2007, em campo experimental
18 do Centro Agropecuário da Palma (CAP), da Universidade Federal de Pelotas,
19 localizado no município do Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. O solo da
20 área experimental é classificado como Planossolo Háplico Eutrófico Solódico, tendo
21 como origem sedimentos derivados de granito (EMBRAPA, 2006) tendo pH 4,5,
22 índice SMP 5,5, matéria orgânica 2,6 g dm³ e 16% de argila. Como material vegetal
23 foram utilizadas sementes de soja GM_{RR} BRS 244 RR, fornecida pela Embrapa-Trigo
24 (Passo Fundo-RS).

25 As parcelas experimentais constaram de áreas individuais com 4 x 5 m,
26 aleatoriamente distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado dentro do
27 campo experimental, com 04 repetições por tratamento. O plantio foi realizado, na
28 primeira quinzena de dezembro, com sementes inoculadas com uma mistura de
29 *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 e *Bradyrhizobium elkanii* Semia 587. A
30 fertilização foi realizada com 250 kg ha⁻¹ de P e K, utilizando-se adubo 0-20-20 na
31 semeadura. Foi aplicado fungicida Folicur[®] aos 28 dias após o plantio (dap) e
32 inseticida Tamarom[®] aos 28 e 56 dap. O genótipo BRS 244 RR foi cultivado com

1 uma (T2) ou duas aplicações de glifosato (T3) e, sem aplicação de herbicida com
2 capina manual para servir de tratamento controle (T1). Nessa área experimental,
3 cada parcela esta recebendo, pela segunda vez, o mesmo tratamento, ou seja, nas
4 parcelas do tratamento T3, na safra 2005/2006 cultivou-se soja GM_{RR} e realizou-se
5 duas aplicações de glifosato, e em 2006/2007 repetiu-se essa operação.

7 **2.1.1- Estudo de caso**

8 Com intuito de verificar a presença de resíduos de glifosato e de AMPA em
9 solos e grãos de áreas de produtores rurais do Rio Grande do Sul, cultivadas na
10 mesma safra (2006/2007), em diferentes condições edafoclimáticas, selecionaram-
11 se duas regiões, sendo uma em Sananduva (Região Norte), e a outra em Pelotas
12 (Região Sul).

13 Na propriedade rural que constituiu o estudo de caso em Sananduva (ECS),
14 foram cultivados 10 ha com soja GM_{RR} genótipo 6001 em sistema de plantio direto.
15 O solo dessa área é classificado como Latossolo (EMBRAPA, 2006) com pH 5,1,
16 índice SMP 5,5, matéria orgânica 3,9 g dm³ e 70% de argila. A fertilização foi
17 realizada com 250 kg ha⁻¹ de P e K, utilizando-se adubo 0-20-20 na semeadura. O
18 plantio foi realizado na segunda quinzena de novembro de 2006. O herbicida
19 glifosato, da marca comercial Glifos[®], foi aplicado na dosagem de 1200 g ia ha⁻¹
20 tanto no período de pré-emergência, como na pós-emergência aos 28 dap. Foram
21 realizadas aplicações de inseticidas aos 70 dap (Dimelim[®]) e aos 90 dap
22 (Tamarom[®]). A produtividade média obtida na área amostrada foi de 54 sacas ha⁻¹.

23 Na propriedade rural que constituiu o estudo de caso em Pelotas (ECP),
24 foram cultivados 55 ha com soja GM_{RR} genótipo 8000 em sistema de plantio
25 convencional. O solo dessa área é classificado como Argissolo (EMBRAPA, 2006)
26 com pH 4,7, índice SMP 5,7, matéria orgânica 2,5 g dm³ e 18% de argila. A
27 fertilização foi realizada com 300 kg ha⁻¹ de P e K, utilizando-se adubo 0-20-20 na
28 semeadura. O plantio foi realizado na segunda quinzena de novembro de 2006. O
29 herbicida glifosato, da marca comercial Roundup Ready[®] foi aplicado na dosagem
30 de 1680 g ia ha⁻¹ aos 28 dap. Foram realizadas duas aplicações de inseticida do
31 produto comercial Tamarom[®] aos 50 e 80 dap. A produtividade obtida na área
32 amostrada foi de 47 sacas ha⁻¹.

2.2- Avaliações

Por ocasião da colheita, foram retiradas, com auxílio do trado de rosca, amostras de solo na profundidade de 0-20 cm de cada unidade experimental para análise de resíduo de glifosato e de AMPA. Nesse mesmo período foram coletados os grãos, quando apresentavam, em média, 21% de umidade. Os grãos foram secos até aproximadamente 12% de umidade em estufa com circulação forçada de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

2.2.1- Detecção e quantificação de resíduo de glifosato e de AMPA no solo e nos grãos

Os procedimentos seguem os princípios descritos por VEIGA et al. (2001). Para análise de resíduo de glifosato e de AMPA, as amostras do solo foram secas a 40°C e, em seguida, peneiradas em peneiras com malha de 2 mm. O glifosato e o AMPA foram extraídos com solução de diidroxifosfato de potássio. Cinco gramas da amostra foram mantidos em agitação durante 15 min em 25 ml 0,1 M de KH_2PO_4 em agitador orbital, após os quais centrifugou-se por 10 min a 2500 g, e filtrado com filtro Whatman[®] n° 2. A extração foi repetida duas vezes, obtendo-se 70 a 75 ml de extrato de cada amostra. Os extratos foram concentrados sob baixas temperaturas (freeze-dried Vac[®]) e dissolvidos em água Milli-Q[®] até volume final de 10 ml. Esses extratos foram filtrados através de membrana de Millipore[®] 0,45 μm e armazenados a -20°C até análise por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). A derivação foi realizada com 0,1 ml de extrato adicionado de 0,9 ml de tampão borato 0,025 M (pH 9,0), 0,9 ml de acetona e 0,1 ml 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC). A amostra foi agitada por 5 minutos, seguida de 20 minutos de repouso, após os quais realizaram-se três lavagens com éter etílico.

O equipamento de CLAE usado era composto por injetor de 50 μl Loop Rheodyne[®], coluna de troca aniônica de 250 x 4,6 mm com partícula de 5 μm e detector espectrofluorométrico Shimadzu[®]. Os padrões analíticos de FMOC, glifosato e AMPA foram obtidos da Sigma-Aldrich[®]. A acetona, éter etílico e acetonitrila foram obtidos da Merck[®].

As análises de resíduo do glifosato e do AMPA nos grãos foram realizadas por método similar, excetuando o preparo da amostra que consistiu em utilizar 1 g

1 de grãos moídos, submetidos à extração com 15 ml de água Milli-Q[®], mantidos sob
2 agitação por 30 minutos, seguidos por sonicação por 20 minutos e centrifugação a
3 2000 g a 20°C por 20 minutos. Após, 4 ml do sobrenadante foram retirados e
4 filtrados em membrana Millipore[®] 0,45 μm. Ao precipitado foram adicionados 5 ml de
5 água e repetiu-se a sonicação, centrifugação e filtração. A partir daí seguiram-se os
6 mesmos procedimentos de derivação e quantificação descritos por VEIGA et al.
7 (2001). Os limites de quantificação são de 0,04 μg kg⁻¹ para a molécula de glifosato
8 e de 0,60 μg kg⁻¹ para o AMPA e de recuperação entre 90 e 95% para ambas as
9 moléculas.

10 Os dados foram submetidos à análise de variância, e à comparação de
11 médias pelo método LSD, utilizando-se o programa Statistix 8.0[®].

13 **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

14 A aplicação de glifosato no cultivo de soja GM_{RR} resultou na presença de
15 resíduos no solo e nos grãos nas diferentes áreas analisadas (Tabela 1 e 2). Isso
16 era esperado baseando-se nos trabalhos prévios de VEIGA et al. (2001), ARAÚJO
17 et al. (2003a), ARREGUI et al. (2003), DUKE et al. (2003) e BÖHM et al. (2007),
18 embora os valores tenham sido distintos entre os trabalhos realizados. A realização
19 de uma (T2) ou duas (T3) aplicações de glifosato, na dosagem de 960 g ia ha⁻¹ em
20 Planossolo, resultou em resíduos de 2 e 4,33 mg kg⁻¹ de solo, respectivamente,
21 diferindo-se significativamente entre si (Tabela 1). Os resíduos de AMPA no solo
22 foram significativamente superior (p≤ 0,05) no tratamento T3, que atingiu 10,66 mg
23 kg⁻¹, enquanto o tratamento T2 foi de 5 mg kg⁻¹. Em estudo anterior, BÖHM et al.
24 (2007) avaliando, na mesma área experimental (CAP- Capão do Leão), os resíduos
25 de glifosato e AMPA resultante de uma ou duas aplicações de glifosato na dosagem
26 de 960 g ia ha⁻¹, detectaram teores de 0,40 mg kg⁻¹ e 0,30 mg kg⁻¹ da molécula de
27 glifosato, e resíduos da molécula de AMPA de 1,03 mg kg⁻¹ e 1,70 mg kg⁻¹ para uma
28 e duas aplicações desse herbicida, respectivamente. Há trabalhos (ARAÚJO et al.,
29 2003b; GINSING et al., 2004) que reportam que a biodegradação do glifosato é mais
30 rápida do que a do AMPA, o que explicaria o fato de teores do herbicida serem
31 menores que os de AMPA. De modo geral, é citado que a meia vida do glifosato é
32 menor do que a do AMPA, o que explicaria o acúmulo de AMPA. Essa afirmativa é
33 corroborada no trabalho de ARAÚJO et al. (2003b), que verificaram maiores teores

1 da molécula de AMPA nos solos nos quais houve aplicações sucessivas de
2 glifosato. Assim, é justificável que as parcelas de Planossolo cultivadas com soja
3 GM_{RR} pelo segundo ano consecutivo apresentem maiores teores de AMPA do que
4 as parcelas analisadas por BÖHM et al. (2007). Conforme SOUZA et al. (1999) os
5 fatores que influenciam a persistência do glifosato estão relacionados com sua
6 adsorção ao solo e com o metabolismo para biodegradação.

7 Nas áreas do estudo de caso, verificou-se que o resíduo da molécula de
8 glifosato foi superior em Latossolo que recebeu uma aplicação de glifosato na
9 dosagem de 1200 g ai ha⁻¹ Estudo de Caso Sananduva (ECS), o que resultou em
10 resíduos de 6 mg kg⁻¹ de solo. A aplicação de glifosato, na dosagem de 1680 g ia ha⁻¹
11 ¹ Estudo de Caso Pelotas (ECP), em Argissolo, resultou em resíduos de 4 mg kg⁻¹ de
12 solo (Tabela 2). Nas áreas ECS e ECP os resíduos do AMPA no solo foram de 9,67
13 mg kg⁻¹ e 9,33 mg kg⁻¹, respectivamente.

14 A meia vida do glifosato no solo pode variar em função do tipo de solo,
15 ARAÚJO et al. (2003b) ao avaliarem o efeito do glifosato na dosagem de 2160 g ia
16 kg⁻¹ em amostras de solo Argissolo Vermelho-Amarelo e Latossolo Vermelho, com e
17 sem histórico de aplicação prévia do herbicida em campo, verificaram que a meia-
18 vida do glifosato foi menor nas amostras do Argissolo do que do Latossolo. Segundo
19 esses autores, esse fato pode estar relacionado à maior quantidade de argila
20 presente em Latossolos, fazendo com que seja mais adsorvido a essas partículas,
21 dificultando a ação microbiana, e aumentando a meia-vida nesse solo. Isso
22 explicaria os maiores teores de glifosato e do AMPA detectados no ECS em cultivo
23 em Latossolo com elevado teor de argila (70%), que embora não tenha recebido as
24 maiores dosagens desse herbicida, resultaram em maiores teores de resíduos.

25 O fato de não existirem limites para os resíduos de glifosato e de AMPA em
26 solos é preocupante, pois a longo prazo poderá afetar a produtividade de outras
27 culturas utilizadas na mesma área. São necessários estudos complementares para
28 testar essa hipótese.

29 Ao determinar os resíduos de glifosato nos grãos (Tabela 1), verificou-se que
30 há presença dessa molécula, proporcionalmente à dosagem aplicada. No tratamento
31 (T2) com uma aplicação de glifosato a 960 g ia ha⁻¹, os resíduos foram 15 mg kg⁻¹,
32 enquanto que naquele onde realizaram-se duas aplicações de glifosato a 960 g ia
33 ha⁻¹ (T3) a concentração aumentou para 20,67 mg kg⁻¹. Nos grãos das áreas ECS e

1 ECP as concentrações de resíduos do glifosato foram de 12 mg kg⁻¹ e 21 mg kg⁻¹,
2 respectivamente (Tabela 2). Esses resultados são alarmantes, uma vez que o limite
3 máximo estabelecido pela ANVISA é de 10 mg kg⁻¹ (ANVISA, 2007), e há evidência
4 de que o uso do glifosato no cultivo de soja GM_{RR}, é perigo significativo, mesmo que
5 respeitadas as dosagens e o período de carência.

6 Ao monitorarem-se as concentrações de AMPA, o comportamento foi similar
7 ao do glifosato, ou seja, em soja tratada com herbicida a 960 g ia ha⁻¹ (T2) os
8 resíduos foram de 16,33 mg kg⁻¹, enquanto naquele onde se realizaram duas
9 aplicações de glifosato a 960 g ia ha⁻¹ (T3) a concentração aumentou para 24,33 mg
10 kg⁻¹. Nas áreas ECS e ECP detectaram-se resíduos de AMPA de 19 mg kg⁻¹ e 25
11 mg kg⁻¹, respectivamente. Em estudo anterior BÖHM et al. (2007) também
12 detectaram teores elevados de resíduos do glifosato nos grãos de soja cultivados
13 com uma ou duas aplicações de glifosato na dosagem de 960 g ia ha⁻¹,
14 respectivamente 19 mg kg⁻¹ e 36 mg kg⁻¹. Os resíduos de AMPA nesses mesmos
15 tratamentos foram de 9 mg kg⁻¹ e 12 mg kg⁻¹.

16 DUKE et al. (2003) detectaram resíduos de glifosato nos grãos entre 2,18 e
17 3,08 mg kg⁻¹, e de AMPA entre 7,27 e 25,00 mg kg⁻¹ em grãos de soja GM_{RR} tratada
18 com o herbicida na dosagem de 1260 g ia ha⁻¹, aplicado 8 semanas após o plantio
19 (56 dap). As causas dos menores teores de resíduo de glifosato nesses grãos
20 (DUKE et al., 2003), do que as observadas nesse trabalho, não foram
21 demonstradas, mas é conhecido que a metabolização da molécula na planta é
22 dependente, além do genótipo, das condições edafoclimáticas durante o cultivo,
23 podendo ser uma das causas das diferenças (REDDY et al., 2004). Independente
24 das diferenças, o fato realmente é de que o risco da ocorrência do perigo “resíduos”
25 nos grãos é significativo nas condições de cultivo em área de Planossolo.
26 Adicionalmente ao diagnosticarem-se propriedades rurais confirmou-se essa
27 problemática em áreas de Argissolo e Latossolo.

1 **TABELA 1-** Resíduos do glifosato e do ácido aminometilfosfônico no solo e nos
 2 grãos de soja GM_{RR} em experimento junto ao Centro Agropecuário da Palma,
 3 localizado no Capão do Leão (RS), safra 2006/2007.

Tratamentos	Solo		Grãos	
	Glifosato (mg kg ⁻¹)	AMPA (mg kg ⁻¹)	Glifosato (mg kg ⁻¹)	AMPA (mg kg ⁻¹)
T1- BRS 244 RR capina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T2- BRS 244 RR com 1x glifosato	2,00 ^b	5,00 ^b	15,00 ^b	16,33 ^b
T3- BRS 244 RR com 2x glifosato	4,33 ^a	10,66 ^a	20,67 ^a	24,33 ^a
Média	3,16	7,83	17,83	20,33
CV	13,64	13,79	16,98	10,24
P	0,003	0,003	0,05	0,009

4 CV- coeficiente de variação. P- probabilidade. n.d. - não detectado. Médias, na mesma coluna, com
 5 letras iguais não apresentam diferença significativa (P<0,05).
 6

7 **TABELA 2-** Resíduos do glifosato e do ácido aminometilfosfônico no solo e nos
 8 grãos de soja GM_{RR} das áreas do estudo de caso localizadas em Sananduva (RS) e
 9 Pelotas (RS), safra 2006/2007.

Estudo de caso	Solo		Grãos	
	Glifosato (mg kg ⁻¹)	AMPA (mg kg ⁻¹)	Glifosato (mg kg ⁻¹)	AMPA (mg kg ⁻¹)
ECS- Sananduva com 1200 g ai ha ⁻¹	6,00	9,67	12,00	19,00
ECP- Pelotas com 1680 g ai ha ⁻¹	4,00	9,33	21,00	25,00

10 ECS- estudo de caso Sanaduva; ECP- estudo de caso Pelotas
 11

12 4- CONCLUSÃO

13 A aplicação de glifosato em pós-emergência, no controle de plantas
 14 daninhas durante o cultivo de soja GM_{RR} resulta em resíduos dessa molécula nos
 15 grãos ultrapassando o limite máximo permitido pela legislação brasileira que é de 10
 16 mg kg⁻¹. Esse tratamento resulta na presença de resíduos do AMPA no solo e nos
 17 grãos. Esse problema também foi verificado em duas áreas de cultivo comercial do
 18 Rio Grande do Sul.
 19

20 5- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

21 AMARANTE, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e
 22 legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.

1 ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Capturado em 14 fev. 2007.
2 Online. Disponível na Internet em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

3 ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the
4 microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 799-804,
5 2003a.

6 ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B.; SOUZA, L.S.
7 Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e**
8 **Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.157-164, 2003b.

9 ARREGUI, M.C.; LENARDÓN, A.; SANCHEZ, D.; MAITRE, M.I.; SCOTTA, R.;
10 ENRIQUE, S. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant
11 soybean. **Pest Management Science**, v.60, n.2, p.163-166, 2003.

12 BOHM, G.M.B.; GENOVESE, M.I.; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, D.; ROMBALDI, C.V.
13 Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico, e teores de isoflavonas em soja
14 BRS 244 RR e BRS 154 cultivadas em Planossolo. **Revista Brasileira de Ciência e**
15 **Tecnologia de Alimentos**, Campinas (no prelo) 2007.

16 CERDEIRA, A.L.; GAZZIERO, D.P.L.; DUKE, S.O.; MATALLO, M.B.; SPADOTTO,
17 C.A. Review of potencial environmental impacts of transgenic glifosate-resistant
18 soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42,
19 p.539-549, 2007.

20 CERDEIRA, A.L.; DUKE, S.O. Environmental impacts of transgenic herbicide-
21 resistant crops. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science,**
22 **Nutrition and Natural Resources**, v.2, n.033, 2007.

23 DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; PACE, P.F.; REDDY, K.N.; SMEDA, R.J. Isoflavone,
24 glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated,
25 glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
26 Columbus, v.51, n.1, p. 340-344, 2003.

27 DUKE, S.O. Glyphosate. In **Herbicides: chemistry, degradation, and mode of**
28 **action**; Kearney, P. C., Kaufman, D. D., Eds.; Dekker: New York, v. 3, p. 1-70, 1988.

29 EBERBACH, P.L. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate
30 the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-

1 phosphonomethyl) glycine in four soils. **Pesticide Science**, Chichester, v.52, p.229-
2 240, 1998.

3 EMBRAPA- Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – Brasília: Embrapa.
4 Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2ª ed., 306p, 2006.

5 FISHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of
6 glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. **Journal Bacteriol.** V. 168, p.
7 1147-1154, 1986.

8 GIMSING, A.L.; BORGGAARD, O.K.; JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J.; SORENSEN,
9 J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate
10 mineralization in Danish surface soils. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p.233–242,
11 2004.

12 NANDULA, V.K.; REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; POSTON, D.H.
13 Glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine Max*) and canola (*Brassica*
14 *napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. **Journal of**
15 **Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.55, p.3540-3545, 2007.

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

21 REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a
22 metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant
23 soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.16,
24 p.5139-5143, 2004.

25 SOUZA, A.P.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A. Respiração microbiana do solo sob
26 doses de glyphosate e de imazapyr. **Planta Daninha**, Viçosa, v.17, p.387-398, 1999.

27 VEIGA, F.; ZAPATA, J.M.; FERNANDEZ MARCOS, M.L.; ALVAREZ, E. Dynamics of
28 glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west
29 Spain. **The Science of the Total Environment**, v.271, p.135-144, 2001.

1 ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Impact of glyphosate on the bradyrhizobium
2 japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview.
3 **Journal Environmental Quality**, Madison, v.33, p. 825–831, 2004.

4

5 **6- AGRADECIMENTOS**

6 À Embrapa Trigo, de Passo Fundo-RS pelo fornecimento das sementes de
7 soja, aos produtores rurais das áreas do estudo de caso, à FAPERGS pelo
8 financiamento (Proade 3, 05/2234-4) à pesquisa e bolsa de IC, ao PROAP/CAPES
9 pelo apoio financeiro, ao CNPQ pela bolsa de apoio técnico a pesquisa e, ao Centro
10 Agropecuário da Palma pelo apoio na instalação do experimento.

CONCLUSÕES

1
2
3 - O cultivo da soja geneticamente modificada (GM_{RR}) BRS 244 RR, com uso
4 do glifosato no controle de plantas daninhas, resulta em maior atividade microbiana
5 representada pela maior respiração basal e maior quociente metabólico, indicando
6 maior mineralização do solo. A não aplicação de glifosato favorece uma maior
7 estabilidade da microbiota.

8 - A aplicação de glifosato em soja GM_{RR} BRS 244 RR interfere negativamente
9 na fixação biológica de nitrogênio (FBN), mas, pela eficiência no controle de plantas
10 daninhas, promove maior produtividade de grãos. A modificação genética da planta
11 não interfere no mecanismo da FBN.

12 - A aplicação de glifosato no cultivo de soja GM_{RR} BRS 244 RR, em áreas de
13 Planossolo, resulta em resíduos dessa molécula nos grãos, ultrapassando o limite
14 máximo permitido pela legislação brasileira, bem como na presença de resíduos de
15 AMPA no solo e nos grãos. Esse problema também foi verificado em áreas de
16 cultivo comercial do Rio Grande do Sul.

17 - O teor e o perfil das isoflavonas não foram afetados nem pela aplicação de
18 glifosato, nem pela transformação genética da soja GM_{RR} BRS 244 RR.

Referências Bibliográficas Gerais

- 1
- 2
- 3 ABIOVE- Disponível na Internet em <<http://www.abiove.com.br/export.html>>. Acesso
- 4 em set. 2007.
- 5 AGROLINK- Disponível na Internet em <<http://www.agrolink.com.br>>. Acesso em jan.
- 6 2007.
- 7 AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível na Internet em:
- 8 <<http://www.agrofit.com.br>>. Acesso em jan. 2007.
- 9 ALVES, B.J.R., BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of soybean in Brazil.
- 10 **Plant and Soil**, v.252, p.1-9, 2003.
- 11 AMARANTE, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e
- 12 Legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p.589-593, 2002.
- 13 ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. Application of eco-physiological quocientes
- 14 (qCO₂ and qP) on microbial biomasses from soils of diferent cropping histories. **Soil**
- 15 **Biology and Bioquimistry**, Oxford, v22, N.2, p.251-255, 1990.
- 16 ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative
- 17 measurement of microbial biomass in soil. **Soil Biology and Bioquimistry**, Oxford,
- 18 v.10, p.215-221, 1978.
- 19 ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B.; LUCHINI, L.C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO,
- 20 M.B; SAVOY, V.L.T. Influence of repeated applications of glyphosate on its
- 21 persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38,
- 22 n.11, p.1329-1335, 2003.
- 23 ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível na internet em:
- 24 <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 14 fev. 2007.
- 25 ARAUJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Efect of glyphosate on the
- 26 microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 799-804,
- 27 2003a.
- 28 ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B; SOUZA, L.S. Biodegradação
- 29 de glifosato em dois solos brasileiros. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**,
- 30 Curitiba, v.13, p.157-164, 2003b.

- 1 ARREGUI, M. C.; LENARDÓN, A.; SANCHEZ, D.; MAITRE, M. I.; SCOTTA, R. ;
2 ENRIQUE, S. Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant
3 soybean. **Pest Management Science**, v.60, n.2, p.163-166, 2003.
- 4 BERGERSEN, F.J.; PEOPLES, M.B.; TURNER, G.L. Isotopic discriminations during
5 the accumulation of nitrogen by soybeans. **Australian Journal of Plant Physiology**,
6 v.15, p.407-420, 1988.
- 7 BOHM, G.M.B.; CASTILHOS, D. ; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, D.; ROMBALDI, C.V.
8 Efeito do controle de plantas daninhas na biomassa e atividade microbiana em
9 planossolo cultivado com soja BRS 244RR. **Revista Brasileira de Agrociência**,
10 Pelotas, (no prelo) 2007a.
- 11 BOHM, G.M.B.; GENOVESE, M.I.; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, D.; ROMBALDI, C.V.
12 Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico, e teores de isoflavonas em soja
13 BRS 244 RR e BRS 154 cultivadas em planossolo. **Revista Brasileira de Ciência e**
14 **Tecnologia de Alimentos**, Campinas (no prelo) 2007b.
- 15 BUSSE, M.D.; RATCLIFF, G.A.; SHESTAK, C.J.; POWERS, R.F. Glyphosate toxicity
16 and the effects of long-term vegetation control and soil on soil microbial communities.
17 **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1777-1789, 2001.
- 18 CARLISLE, S.M.; TREVORS, J.T. Glyphosate in the environment. **Water, Air, Soil**
19 **Pollution**, v.39, p.409-420, 1988.
- 20 CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCH, A. Efeitos de genótipos, ambientes
21 e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos
22 de soja. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p.897-902, 2003.
- 23 CERDEIRA, A.L.; DUKE, S.O. Environmental impacts of transgenic herbicide-
24 resistant crops. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science,**
25 **Nutrition and Natural Resources**, v.2, n.033, 2007.
- 26 CERDEIRA, A.L.; GAZZIERO, D.P.L.; DUKE, S.O.; MATALLO, M.B.; SPADOTTO,
27 C.A. Review of potencial environmental impacts of transgenic glifosate-resistant
28 soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42,
29 p.539-549, 2007.
- 30 COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. Recomendações de adubação e
31 calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. 4 ed., Passo
32 Fundo:SBCS – Núcleo Regional Sul, 2004.

- 1 CORREIA, N.M.; DURIGAN, J.C. Seletividade de diferentes herbicidas à base de
2 glyphosate a soja RR. **Planta Daninha**, v.25, p.375-379, 2007.
- 3 COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of
4 isoflavones in soyfoods during cooking and processing. **American Journal of**
5 **Clinical Nutrition**, Bethesda, v.68, p.1486S-1491S, 1998.
- 6 CTNBio- Comitê Técnico Nacional de Biossegurança. Capturado em 15 abr. 2007.
7 Disponível na Internet: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3664.html>>.
- 8 DELANNAY, X.; BAUMANN, T.T.; BEIGHLEY, D.H. et al. Yield evaluation of a
9 glyphosatetolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**,
10 Madison, v. 35, p. 1461–1467, 1995.
- 11 DOBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de
12 excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, 155-161, 1970.
- 13 DUKE, S.O.; RIMANDO, A.M.; PACE, P.F.; REDDY, K.N; SMEDA, R.J. Isoflavone,
14 glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated,
15 glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
16 Columbus , v.51, n.1, p. 340-344, 2003.
- 17 DUKE, S.O. Glyphosate. In **Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of**
18 **Action**; Kearney, P. C., Kaufman, D. D., Eds.; Dekker: New York, v. 3, p. 1-70, 1988.
- 19 EBERBACH, P.L. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate
20 the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-
21 phosphonomethyl) glycine in four soils. **Pesticide Science**, Chichester, v.52, p.229-
22 240, 1998.
- 23 ELMORE, R.W.; ROETH, F.W.; KLEIN, R.N.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A.;
24 NELSON, L.A.; SKAPIRO, C.A. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to
25 glyphosato. **Agronomy Journal**, Madison, v.93, p.404-407, 2001.
- 26 EMBRAPA- Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – Brasília: Embrapa.
27 Produção de informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2 ed., 306p, 2006.
- 28 FISHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of
29 glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. **Journal Bacteriol.** V. 168, p.
30 1147-1154, 1986.
- 31 GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Determinação de isoflavonas em derivados de
32 soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p. 86-93, 2001.

- 1 GENOVESE, M.I.; HASSIMOTTO, N.M.A.; LAJOLO, F.M.. Isoflavone Profile and
2 Antioxidant Activity of Brazilian Soybean Varieties. **Food Science and Technology**
3 **International**, Londres, v.11, n.3, p.205–211, 2005.
- 4 GIMSING, A.L.; BORGGGAORD, O.K.;JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J.;SORENSEN,
5 J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate
6 mineralisation in Danish surface soils. **Applied Soil Ecology**, Denmark, v. 27,
7 p.233–242, 2004.
- 8 HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, F.M. Bioremediation and Biodegradation:
9 Effect of Roundup Ultra on Microbial Activity and Biomass from Selected Soils.
10 **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, p.730-735, 2002.
- 11 HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of
12 nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: **WERNER, D.; NEWTON,**
13 **W.E. (Ed.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the**
14 **environment**. Dordrecht: Springer, p.25-42, 2005.
- 15 ISAAA- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - Global
16 Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. Disponível na internet
17 em:<<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/default.html>>. Acesso em 15 maio 2007.
- 18
- 19 KELLEY, K. B.; WAX, L.M.; HAGER, A.G.; RIECHERS, D.E. Soybean response to
20 plant growth regulator herbicides is affected by other postemergence herbicides.
21 **Weed Science**: Vol. 53, No. 1, p. 101–112. 2004.
- 22 KING, C.A.; PURCELL, L.C.; VORIES, E.D. Plant growth and nitrogenase activity o
23 glyphosate-tolerant soybean in responde to foliar glyphosate applications.
24 **Agronomy Journal**, Madison, v.93, p.179-186, 2001.
- 25 LEE, S.J.; AHN, K.; KIM, S.H.; KIM, J.T.; HAN, S.J.; JUNG, M.Y.; CHUNG, I.M.
26 Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration.
27 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, n.11, p.3382-3389,
28 2003.
- 29 LIPHADZI, K.B.; AL-KHATIB, K.; BENSCH, C.N.; STAHLMAN, P.W.; DILLE, J.A.;
30 TODD, T.; RICE, C.W.; HORAK, M.J.; HEAD, G. Soil microbial and nematode
31 communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant
32 cropping system. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n.4, p. 536-545, 2005.

- 1 MALTY, J.S.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Efeitos do glifosato sobre
2 microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação.
3 **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.285-291, 2006.
- 4 MATSUURA, M.; OBATA, A.; FUKUSHIMA, D. Objectionable flavor of soy milk
5 developed during the soaking of soybeans and its control. **Journal of Food Science**,
6 Chicago, v.54, n.3, p.602-605, 1989.
- 7 MCCANN, M.C.; LIU, K.; TRUJILLO, W.A.; DOBERT, R.C. Glyphosate-tolerant
8 soybeans remain compositionally equivalent to conventional soybeans (*Glycine max*
9 L.) during three years of field testing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.
10 Columbus, v.53, p.5331-5335, 2005.
- 11 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível na Internet em:
12 <<http://www.agricultura.gov.br>> acesso em set. 2006.
- 13 OKITO, A.; ALVES, B.R.J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Isotopic fractionation N₂
14 fixation by four tropical legumes. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1179-1190,
15 2004.
- 16 PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.;
17 TINIUS, C.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.;
18 PESCHKE, V.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B.; KISHORE, G.M. Development,
19 identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop**
20 **Science**, v.35, p.1451-1461, 1995.
- 21 PASSIANOTO, C.C.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; LIMA, A.C.R.; LIMA,
22 C.L.R. Atividade e biomassa microbiana no solo com a aplicação de dois diferentes
23 lodos de curtume. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n. 2, p. 125-130,
24 2001.
- 25 RATCLIFF, A.W.; BUSSE, M.D.; SHESTAK, C.J. Changes in microbial community
26 structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. **Applied Soil**
27 **Ecology**, v. 34, p. 114-124, 2006.
- 28 REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a
29 metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant
30 soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.16,
31 p.5139-5143, 2004.

- 1 REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to
2 various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. **Weed**
3 **Science**, Champaign, v. 51, p. 496–502, 2003.
- 4 REDDY, K.N.; HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M. Effect of glyphosate on
5 growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean
6 (Glycine max) varieties. **Journal New Seeds**, v.2, p.37–52, 2000.
- 7 ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Growth-linked and cometabolic
8 biodegradation: possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide
9 biodegradation. **Pesticide Science**, Chichester, v.41, p.311-318, 1994.
- 10 SANTOS, V.B.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M.V.; PAULETTO, E.A.;
11 GOMES, A.S.; SILVA, D.G. Biomassa, atividade microbiana e teores de carbono e
12 nitrogênio totais de um planossolo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista**
13 **Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p. 333-338, 2004.
- 14 SINCLAIR, T.R.; FARIAS, J.R.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L. Modelling
15 nitrogen accumulation and use by soybean. **Field Crops Research**, v.81, p.149-158.
16 2003.
- 17 SHEARER, G.B.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on
18 natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.13, p.699-756,
19 1986.
- 20 SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G.; MURPHY, P.A. Soy isoflavone analysis:
21 quality control and a new internal standard. **American Journal of Clinical Nutrition**,
22 Bethesda, v.68, p.1474S–1479S, 1998.
- 23 SOUZA, A.P.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A. Respiração microbiana do solo sob
24 doses de glyphosate e de imazapyr. **Planta Daninha**, Viçosa, v.17, p.387-398, 1999.
- 25 TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BONHEN, H. Análises de solos, plantas e
26 outros materiais. 2^a ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
27 174p, 1995 (Boletim Técnico 5).
- 28 TAKAHASHI, K.; HORIE, M.; AOBA, N. Analysis of glyphosate and its metabolite,
29 aminomethylphosphonic acid, in **agricultural products by HPLC**. Saitama Institute
30 of Public Health: 639-1, Kamiokubo, Saitama-shi, Saitama 338-0824, Japan. *J Assoc*
31 *Off Anal Chem*.v.74, n.5, p.842-7,1991.

- 1 TAYLOR, N.B.; FUCHS, R.L.; MACDONALD, J.; SHARIFF, A.R.; PADGETTE, S.R.
2 Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate.
3 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, p.4469- 4473, 1999.
- 4 UNKOVICH, M.J.; PATE, J.S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic
5 N₂ fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p.211-228,
6 2000.
- 7 VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extracion method for
8 measuring soil microbial biomass c. **Soil Biology and Bioquimistry**, Oxford, v.19,
9 n.6, p.703-707, 1987.
- 10 VEIGA, F.; ZAPATA, J.M.; FERNANDEZ MARCOS, M.L.; ALVAREZ, E. Dynamics of
11 glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west
12 Spain. **The Science of the Total Environment**, v.271, p.135-144, 2001.
- 13 WANG, C.; SHERRARD, M.; PAGADALA S.; WIXON R.; SCOTT, R.A. Isoflavone
14 content among maturity group 0 to II soybeans. **Journal of the American Oil**
15 **Chemists' Society**, v.77, p.483-487, 2000.
- 16 WARDLE, D.A; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass
17 and activity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.122, p.21-28, 1990.
- 18 ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield
19 responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**, v.26,
20 p.370–376, 2007.
- 21 ZABLOTOWICZ, R.M.; REDDY, K.N. Impact of glyphosate on the bradyrhizobium
22 japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview.
23 **Journal Environmental Quality**, Madison, v.33, p.825–831, 2004.
- 24 ZHU, Y.; LI, D.; WANG, F.; YIN, J.; JIN, H. Nutritional assessment and fate of DNA of
25 soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats. **Archives of**
26 **Animal Nutrition**, v.58, n.4, p.295-310, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)