



Università degli Studi di Padova

Scuola di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica

Direttore: Prof. Federico Rea

U.O.C. Medicina del Lavoro

Direttore: Prof. Angelo Moretto

TESI DI LAUREA

**Escrezione urinaria dell'erbicida glifosate nei lavoratori e
nella popolazione generale:
considerazioni tossicocinetiche**

Relatore: Prof. Angelo Moretto

Controrelatore: Prof. Guido Viel

Laureando: Francesco Urzi

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
1 INTRODUZIONE	5
1.1 Introduzione e accenni storici sullo sviluppo del Glifosate	7
1.2 Meccanismo d'azione del glifosate	12
1.3 Chimica del glifosate	14
1.4 Vie di assunzione del glifosate nell'uomo	15
1.5 Metabolismo ed escrezione nell'uomo del glifosate	17
1.5.1 AMPA, il metabolita del glifosate	18
2 SCOPO	21
3 MATERIALI E METODI	23
3.1 Metodologia dello studio	23
3.2 Metodologia della raccolta del campione urinario	24
3.3 Tecniche analitiche per la misurazione del glifosate urinario	25
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	28
4.1 Analisi dei risultati degli studi sulla popolazione dei lavoratori	28
4.2 Sicurezza sul lavoro e uso dei DPI	34
4.3 Analisi dei risultati degli studi sulla popolazione dei non lavoratori	35
4.4 Confronto della stima di esposizione con i limiti stabiliti da EFSA	40
4.5 Esposizione e protezione della popolazione dei non lavorativi	41
4.6 Confronto tra i livelli di esposizione al glifosate nei lavoratori e non lavoratori	42
5 CONCLUSIONI	44
BIBLIOGRAFIA	47

Abstract

Introduction and purpose of the study

Glyphosate is one of the most widely used herbicides globally and is the subject of much debate regarding its potential effects on human health and the environment. The purpose of this study is to analyze the levels of glyphosate found in the urine of workers professionally exposed and non-workers, to assess the excretion of the substance as an indicator of exposure and compare the results with health-based limits established by health authorities, such as EFSA.

Materials and methods

The study is based on a review of published scientific articles regarding glyphosate exposure, in which the urinary excretion of the substance was measured in human populations. Studies that distinguish between workers exposed to glyphosate and non-workers were selected, focusing on urine samples collected, for workers, at known times after exposure. The data were compared with the health-based limits established by EFSA, which has set an acceptable daily intake (ADI) of 0.5 mg/kg of body weight.

Results

Workers professionally exposed showed an increase in urinary glyphosate levels immediately after the application of the herbicide, with peaks that subsequently decrease rapidly within 24-48 hours. Non-workers, indirectly exposed, recorded significantly lower levels. In both groups, the urinary

glyphosate levels were well below the limits set by EFSA, suggesting well controlled exposure in occupational settings.

Conclusion

The results confirm that, although workers are more exposed to glyphosate than non-workers, overall exposure remains within safety limits, especially when appropriate personal protective equipment (PPE) is used. Therefore, the claims that adverse effects occur after occupational or non-occupational exposure are not supported by these findings.

Riassunto

Introduzione e scopo dello studio

Il glifosate è uno degli erbicidi più utilizzati a livello globale e rappresenta un argomento di grande dibattito riguardo ai potenziali effetti sulla salute umana e sull'ambiente. Lo scopo di questo studio è analizzare i livelli di glifosate rilevati nelle urine di lavoratori e individui non lavoratori esposti professionalmente, per valutare l'escrezione della sostanza come indicatore dell'esposizione e confrontare i risultati con i limiti di sicurezza stabiliti dalle autorità sanitarie, come l'EFSA.

Materiali e metodi

Lo studio si basa su una revisione di articoli scientifici pubblicati riguardanti l'esposizione al glifosate, in cui è stata misurata l'escrezione urinaria della sostanza in popolazioni umane. Sono stati selezionati studi che distinguono tra lavoratori esposti al glifosate e non lavoratori, concentrandosi su campioni di urina prelevati, per i lavoratori, in momenti noti dopo l'esposizione. I dati sono stati confrontati con i limiti di sicurezza definiti dall'EFSA, che stabilisce un'assunzione giornaliera ammissibile (ADI) di 0,5 mg/kg di peso corporeo.

Risultati

I lavoratori esposti professionalmente hanno mostrato un aumento dei livelli urinari di glifosate subito dopo l'applicazione dell'erbicida, con picchi che successivamente si riducono rapidamente entro 24-48 ore. I non

lavoratori, esposti indirettamente, hanno invece registrato livelli significativamente inferiori. In entrambi i gruppi, i livelli di glifosate nelle urine sono risultati ben al di sotto dei limiti stabiliti dall'EFSA, suggerendo un'esposizione ben controllata in ambito lavorativo.

Conclusione

I risultati confermano che, nonostante i lavoratori siano maggiormente esposti al glifosate rispetto ai non lavoratori, l'esposizione complessiva rimane entro i limiti di sicurezza, soprattutto se si adottano adeguati dispositivi di protezione individuale (DPI). Pertanto, le affermazioni secondo cui si verificano effetti avversi dopo esposizione occupazionale o non occupazionale non sono supportate da questi risultati analizzati.

1 INTRODUZIONE

Il glifosate è un erbicida ampiamente utilizzato a livello globale, introdotto commercialmente dalla Monsanto nel 1974 sotto il marchio Roundup. Sin dalla sua introduzione, è diventato uno degli erbicidi più diffusi nel settore agricolo grazie alla sua capacità di inibire l'enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasi (EPSPS), essenziale per la sintesi di aminoacidi aromatici nelle piante. Questa caratteristica ha permesso agli agricoltori di controllare in modo efficace una vasta gamma di erbe infestanti, contribuendo a migliorare la produttività agricola (Franz, 1980).

Negli ultimi anni, il glifosate è stato al centro di un acceso dibattito scientifico e pubblico riguardante la sua sicurezza per la salute umana e l'ambiente. Mentre alcune agenzie come l'EFSA (European Food Safety Authority) e l'EPA (Environmental Protection Agency) degli Stati Uniti hanno affermato che il glifosate non rappresenta un rischio significativo per la salute umana quando utilizzato secondo le normative stabilite, un gruppo di lavoro ad hoc della IARC (International Agency for Research on Cancer), ha sollevato preoccupazioni riguardo alla sua possibile correlazione con effetti negativi sulla salute, in particolare su potenziali rischi cancerogeni.

Uno strumento utile per la valutazione dell'esposizione al glifosate è la misura della sua escrezione urinaria (monitoraggio biologico). Questo parametro rappresenta un utile indicatore biologico per monitorare l'esposizione sia tra i lavoratori esposti professionalmente all'erbicida, come agricoltori e operatori del verde, sia tra la popolazione non lavorativa che potrebbe essere esposta indirettamente attraverso l'ambiente, l'acqua o il cibo.

La presente tesi si propone di analizzare gli studi in cui sono stati misurati i livelli di glifosate nelle urine di lavoratori e non lavoratori, al fine di valutarne le caratteristiche di eliminazione e stimare l'entità dell'esposizione e assorbimento. Attraverso una revisione di studi condotti su popolazioni umane, si cerca di comprendere meglio i fattori che influenzano l'esposizione e l'eliminazione del glifosate, nonché le implicazioni per la salute pubblica. In particolare, la tesi esplora le differenze nei livelli di esposizione tra lavoratori e non lavoratori e confronta i dati con i limiti di sicurezza stabiliti dall'EFSA, tenendo conto delle variabili come l'uso di dispositivi di protezione individuale (DPI), le pratiche agricole, e il tempo trascorso dall'esposizione.

1.1 Introduzione e accenni storici sullo sviluppo del glifosate

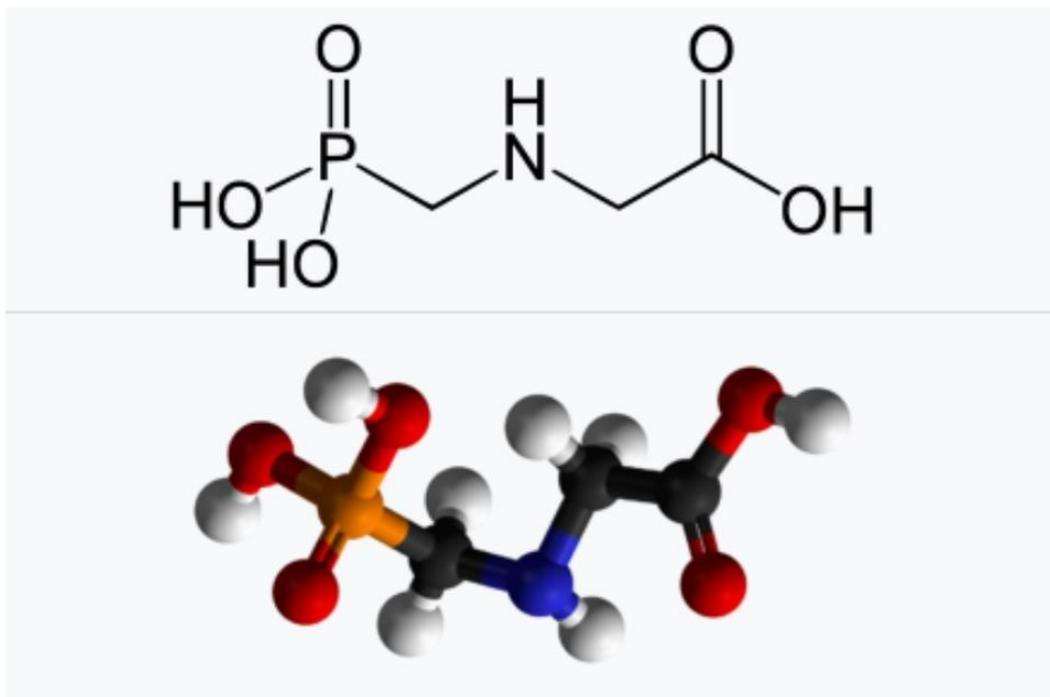


Figura 1: struttura chimica del glifosate (Wikipedia contributors, 2024)

Il glifosate, introdotto commercialmente nel 1974 dall'azienda Monsanto sotto il marchio Roundup, è diventato rapidamente uno degli erbicidi più utilizzati a livello globale. La sua molecola agisce inibendo una componente chiave per la crescita delle piante. Questo meccanismo, specifico delle piante e di alcuni microrganismi, ha reso il glifosate particolarmente efficace nel controllo di una vasta gamma di erbe infestanti, consentendo agli agricoltori di migliorare significativamente la produttività agricola (Franz, 1980).

Esistono numerose formulazioni commerciali disponibili sul mercato che tipicamente contengono dal 41% al 53% di glifosate come ingrediente attivo, spesso sottoforma di sale isopropilamminico, ed includono

coadiuvanti come tensioattivi che ne migliorano la penetrazione nelle foglie delle piante aumentandone l'efficacia.

Le concentrazioni di glifosate e la presenza di coadiuvanti possono variare tra le diverse formulazioni commerciali, influenzando così la loro tossicità e il loro impatto ambientale (Folmar et al., 1979). Ad esempio, le formulazioni più concentrate, come quelle utilizzate in applicazioni agricole, possono contenere fino al 50/53% di glifosate, mentre le formulazioni pronte all'uso per il giardinaggio domestico hanno tendenzialmente concentrazioni inferiori, in genere intorno all'1/3%. Queste ultime, peraltro, sono spesso miscelate con coadiuvanti talora dotati di tossicità propria (Williams et al., 2000). Recenti studi (Dörr, 2019), infatti, hanno evidenziato che la tossicità dei formulati commerciali contenenti glifosate può variare significativamente a seconda dei coformulanti, con effetti potenzialmente dannosi per la fauna acquatica e per gli invertebrati terrestri, specialmente quando esposti a lungo termine o in ambienti sensibili.

Negli anni Novanta, l'introduzione delle colture geneticamente modificate resistenti al glifosate, come la soia, il mais e il cotone, rappresentò una svolta significativa nell'agricoltura moderna (Green, 2014). Queste colture, dette "Roundup Ready" (RR), vennero sviluppate attraverso tecniche di ingegneria genetica allo scopo di rendere le piante tolleranti verso le applicazioni di glifosate senza subire danni e di permettere agli agricoltori di utilizzare l'erbicida in modo più efficiente per eliminare le erbe infestanti anche durante la fase di crescita delle piante, senza compromettere la resa delle colture. Nello specifico, tale resistenza viene ottenuta inserendo nei geni delle piante il gene *cp4 epsps* proveniente dal batterio *Agrobacterium tumefaciens*, che consente alla pianta di sintetizzare un enzima non inibito dal glifosate (Duke, 2005; Funke et al., 2006).

La scoperta portò ad un rapido aumento dell'adozione di tali colture su larga scala, specialmente negli Stati Uniti, dove la soia Roundup Ready divenne la varietà dominante in breve tempo. L'adozione massiccia di queste colture portò a numerosi vantaggi per gli agricoltori: per esempio, questa tecnica ridusse la necessità di ricorrere a pratiche agricole dannose per il suolo, come il c.d. *tillage*, che, erodendo il terreno, ne determina la perdita di nutrienti (Levy-Booth et al., 2009).

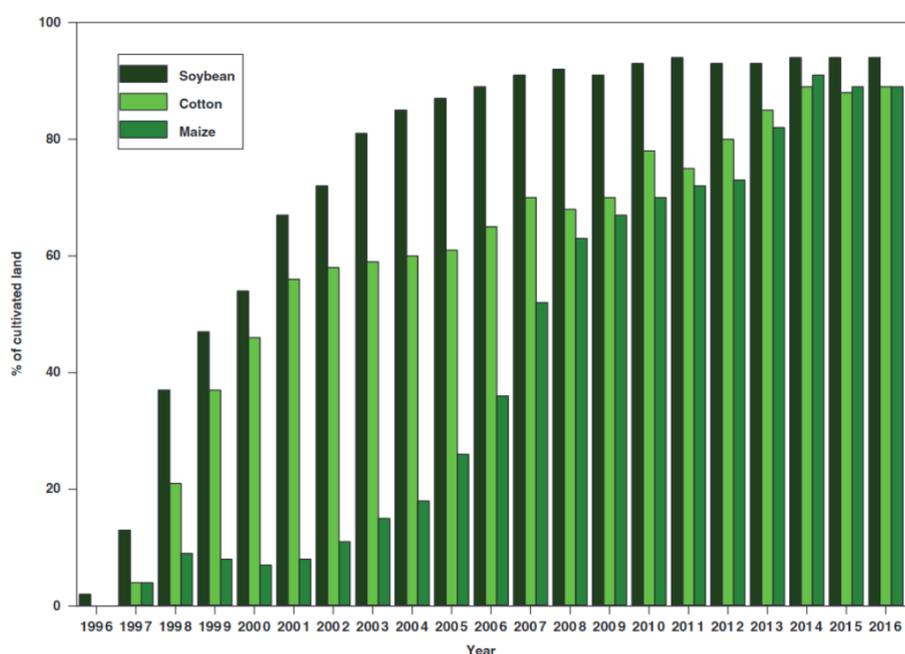


Figura 2: Adozione del GRC nella soia, nel mais e nel cotone per anno negli Stati Uniti (Duke, 2018).

Dall'altro lato, l'uso continuato e intensivo del glifosate su queste colture favorì l'emergere di erbe infestanti resistenti, costringendo gli agricoltori a utilizzare quantità sempre maggiori di erbicidi. Il fenomeno, manifestato inizialmente in diverse regioni degli Stati Uniti, divenne presto una sfida globale.

Tali piante infestanti svilupparono resistenze attraverso vari meccanismi: tra i più comuni, si annovera una mutazione genetica in grado di alterare il sito

di legame del glifosate a livello dell'enzima EPSPS, rendendo l'erbicida inefficace. In alcuni casi, le piante svilupparono resistenze multiple, combinando mutazioni genetiche con meccanismi di difesa alternativi, come l'aumento dell'attività delle pompe di efflusso, che riduce la concentrazione di glifosate all'interno delle cellule vegetali. In altri casi, queste piante infestanti modificarono il metabolismo per neutralizzare l'erbicida (Powles and Yu, 2010; Sammons and Gaines, 2014). Questo fenomeno non solo ridusse l'efficacia del glifosate, ma costrinse gli agricoltori a rivedere le loro strategie di gestione delle piante infestanti. In molti casi, si dovette ricorrere a miscele di erbicidi o a rotazioni colturali più complesse per controllare le infestanti resistenti.

Il fenomeno della resistenza ha stimolato un intenso dibattito nel settore agricolo e nella comunità scientifica riguardo all'uso sostenibile del glifosate ed alla necessità di sviluppare nuove pratiche agricole in grado di ridurre la dipendenza da un singolo erbicida (Sammons and Gaines, 2014; Duke, 2018).

La sfida della resistenza ha anche incoraggiato la ricerca su nuove molecole erbicide e sull'esplorazione di possibili alternative, inclusi approcci biologici e meccanici, per gestire le piante infestanti in modo più sostenibile. Tuttavia, la complessità della resistenza e la continua diffusione di piante infestanti resistenti al glifosate sottolineano l'importanza di un approccio integrato alla gestione delle infestanti che consideri non solo l'efficacia immediata, ma anche gli impatti a lungo termine sull'ecosistema agricolo (Duke, 2018).

Parallelamente alla questione della resistenza, il glifosate è stato oggetto di un crescente scrutinio sul versante della sua sicurezza per la salute umana e l'ambiente. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno esaminato la potenziale correlazione tra l'esposizione al glifosate e vari problemi di

salute, inclusi i disturbi endocrini, la tossicità riproduttiva e il rischio di sviluppare neoplasie. In particolare, il dibattito scientifico si è particolarmente acceso nel 2015 dopo che l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), ente affiliato, ma autonomo, all'Organizzazione Mondiale della Sanità ha classificato il glifosate come "probabile cancerogeno per l'uomo" (Gruppo 2A) (IARC, 2015), basandosi su studi epidemiologici, prove sugli animali e meccanismi biologici plausibili (Guyton et al., 2015). Da notare che IARC non ha alcun compito regolamentatorio ma fornisce solo pareri.

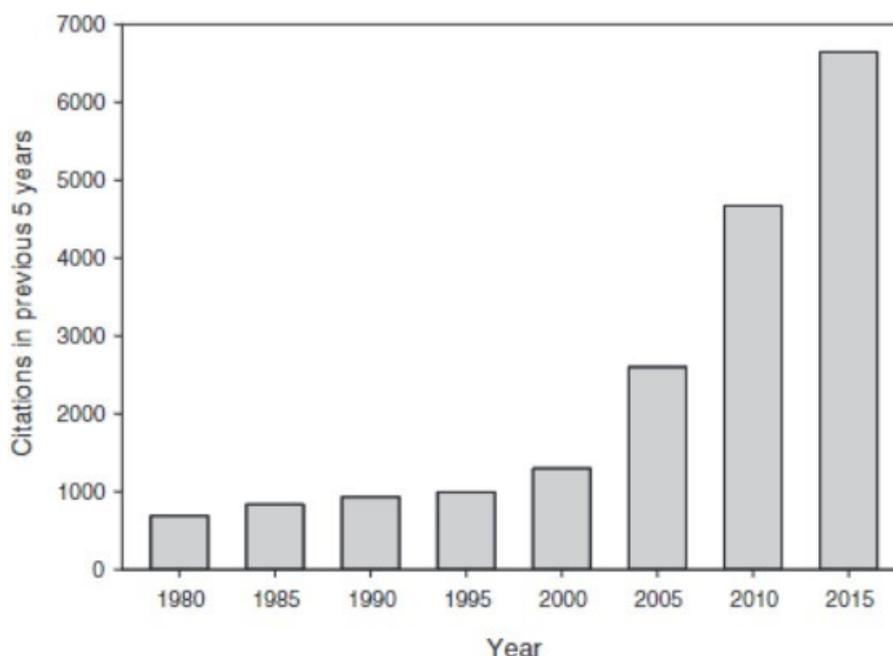


Figura 3: Articoli e brevetti recuperati in SciFinder utilizzando la parola chiave 'glifosate'. Ogni barra rappresenta il totale di quell'anno più i 4 anni precedenti (Duke, 2018).

Questa conclusione non ha però raccolto un consenso unanime: tutte le agenzie regolatorie che hanno valutato il glifosate, come l'Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti (EPA) e l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), asseriscono, infatti, che è improbabile che il glifosate causi il cancro negli esseri umani, in particolare considerate anche

le dosi a cui essi sono esposti durante l'uso agricolo (Mink et al., 2012; Tarazona et al., 2017).

L'ampio utilizzo del glifosate e le preoccupazioni ad esso associate hanno portato ad un aumento degli sforzi per sviluppare strategie di gestione integrata delle infestanti, promuovendo pratiche agronomiche sostenibili e riducendo la dipendenza dagli erbicidi chimici. Per altro verso, la ricerca continua a esplorare possibili alternative al glifosate e a sviluppare nuove molecole con meccanismi d'azione differenti per contrastare l'emergere di resistenze (Duke, 2018).

1.2 Meccanismo d'azione del glifosate

Il meccanismo d'azione del glifosate è unico tra gli erbicidi a causa della sua capacità di inibire l'enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasi (EPSPS), un componente essenziale del percorso biosintetico dello shikimato, che è presente esclusivamente nelle piante, nei batteri e in alcuni funghi, ma non negli animali (Patterson et al., 2018). L'EPSPS è coinvolto in una fase critica della sintesi degli aminoacidi aromatici essenziali, come il triptofano, la fenilalanina e la tirosina, che sono precursori di molti metaboliti secondari vitali per la crescita e lo sviluppo della pianta, compresi alcuni fitoalessine, lignine e altre sostanze fenoliche. Questi composti svolgono un ruolo chiave nella difesa delle piante contro patogeni e stress ambientali, nella formazione delle pareti cellulari, e, infine, nella regolazione della crescita (Funke, 2006).

Il glifosate agisce come un analogo del fosfoenolpiruvato (PEP), il substrato naturale dell'EPSPS, competendo per il sito di legame sull'enzima. Quando il glifosate si lega all'EPSPS, forma un complesso stabile che impedisce la conversione dello shikimato-3-fosfato e del fosfoenolpiruvato in 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato. Questo blocco biochimico conduce all'accumulo di intermedi nel percorso dello shikimato e alla deplezione degli aminoacidi aromatici, compromettendo la sintesi proteica e portando alla disfunzione cellulare e, infine, alla morte della pianta (Steinrücken and Amrhein, 1980; Duke and Powles, 2008).

Oltre alla sua azione primaria sull'EPSPS, il glifosate ha anche effetti secondari che contribuiscono alla sua efficacia come erbicida. Poiché il glifosate è altamente idrosolubile, viene facilmente assorbito dalle foglie delle piante e traslocato attraverso il floema verso le regioni di crescita attiva, come le radici e i germogli apicali. Questa traslocazione sistemica permette al glifosate di accumularsi nei tessuti meristemati, dove la biosintesi degli aminoacidi è particolarmente attiva e l'inibizione dell'EPSPS ha effetti più pronunciati (Dill, 2005). Inoltre, la capacità del glifosate di persistere nel suolo e di essere parzialmente adsorbito da componenti minerali e organici contribuisce alla sua azione duratura e alla prevenzione della ricrescita delle infestanti (Giesy et al., 2000).

Un'altra caratteristica rilevante del meccanismo d'azione del glifosate riguarda la sua selettività. Poiché gli animali, compresi gli esseri umani, non possiedono la via metabolica dello shikimato, l'EPSPS non è presente nell'organismo, il che rende il glifosate relativamente sicuro per la fauna e la salute umana, soprattutto alle dosi comunemente utilizzate in agricoltura (Williams et al., 2000).

1.3 Chimica del glifosate

Il glifosate, noto chimicamente come N-(fosfonometil)glicina, è un composto la cui struttura chimica comprende un gruppo fosfonato ($-\text{PO}_3\text{H}_2$) legato ad un atomo di azoto della glicina, un amminoacido semplice. Questa struttura conferisce al glifosate proprietà uniche che lo rendono un erbicida estremamente efficace e, di conseguenza, ampiamente utilizzato (Pollegioni et al., 2011).

Chimicamente, il glifosate è una molecola anfifilica, capace di dissolversi bene in acqua grazie alla presenza del gruppo fosfonato, che è fortemente polare. Questa solubilità in acqua facilita la preparazione di formulazioni erbicide liquide e la sua applicazione come spray, consentendo al glifosate di essere facilmente assorbito attraverso le foglie delle piante (Rodríguez-Gil et al., 2021). La sua struttura consente inoltre una traslocazione sistemica all'interno della pianta, raggiungendo i tessuti meristemati dove il danno è più devastante. Tuttavia, la presenza del gruppo fosfonato rende il glifosate altamente reattivo con cationi presenti nel suolo, come calcio, magnesio e ferro, che possono formare complessi con il glifosate, riducendone la disponibilità biologica e, quindi, l'efficacia come erbicida (Duke and Powels, 2008).

Un aspetto chimico interessante del glifosate è la sua stabilità e resistenza alla biodegradazione, attribuibile alla sua configurazione molecolare. Questa caratteristica ha implicazioni sia positive che possibili negative: prolunga la sua azione nel controllo delle infestanti, ma solleva preoccupazioni per l'accumulo nel suolo e la contaminazione delle acque. Il gruppo fosfonato, in particolare, forma legami stabili con i minerali del suolo, riducendo il tasso di biodegradazione e aumentando la persistenza ambientale (Vereecken, 2005; Borggaard and Gimsing, 2008).

1.4 Vie di assunzione del glifosate nell'uomo

Le vie di assunzione del glifosate nell'uomo includono principalmente l'ingestione orale e l'inalazione ed ognuna di queste vie di assorbimento comporta rischi specifici che variano a seconda del contesto di esposizione e delle misure di protezione adottate (Bradberry et al., 2004).

L'ingestione orale avviene principalmente attraverso il consumo di alimenti trattati con l'erbicida. Infatti, dopo l'uso del diserbante, sui prodotti agricoli possono persistere residui di glifosate (Glynn et al., 2011). Le concentrazioni di glifosate possono variare ampiamente nei prodotti alimentari, a seconda delle pratiche agricole e dei livelli di trattamento (Hale et al., 2013). Anche l'ingestione di acqua potabile contaminata può contribuire all'esposizione orale, soprattutto in aree caratterizzate dall'uso intensivo di glifosate e in cui il trattamento delle acque non è sufficientemente avanzato (Montero et al., 2016).

L'inalazione di glifosate può rappresentare una via di esposizione per coloro che applicano il prodotto e che utilizzano applicazioni a spruzzo in cui si possono formare particelle di dimensioni respirabili. Alcuni studi (Acquavella et al., 2004; Kaundun and Salas, 2014) hanno misurato anche elevate concentrazioni di glifosate nell'aria durante e immediatamente dopo l'applicazione. Infatti, durante queste attività è essenziale l'uso di equipaggiamenti di protezione adeguati al fine di ridurre sia l'esposizione per deposizione cutanea di particelle di maggiori dimensioni, che sono la parte preponderante, sia l'inalazione della quota minore di particelle inalabili (Kaundun and Salas, 2014).

Un'altra via di esposizione al glifosate è l'assorbimento cutaneo, che nell'agricoltore risulta essere preponderante. L'assorbimento della sostanza attraverso la pelle può avvenire non solo a causa dell'applicazione senza protezioni adeguate o della manipolazione del prodotto, ma anche tramite il contatto accidentale con superfici contaminate. Degli studi (Williams et al., 2000) hanno dimostrato che il glifosate può essere assorbito attraverso la pelle e che questo assorbimento può variare in base alla durata e alla frequenza del contatto, nonché alla condizione della pelle.

Per le ragioni sopra evidenziate, l'adozione di adeguate misure di protezione personale, come l'uso di indumenti protettivi, guanti e respiratori, è cruciale per ridurre il rischio di esposizione. Tuttavia, l'aderenza a queste pratiche non è sempre uniforme, e la formazione in materia di sicurezza può variare notevolmente tra i lavoratori (Huang et al., 2017).

In sintesi, le diverse vie di assunzione del glifosate possono contribuire a un'esposizione complessiva che varia a seconda delle pratiche agricole, delle condizioni ambientali e delle misure di protezione adottate. La combinazione di ingestione orale, inalazione e assorbimento cutaneo rappresenta un insieme complesso di rischi di assunzione che richiede un'attenta considerazione per valutare i potenziali impatti sulla salute umana e ambientale (Solomon, 2019).

1.5 Metabolismo ed escrezione nell'uomo del glifosate

Il metabolismo e l'escrezione del glifosate nell'uomo sono processi cruciali per comprendere l'impatto di questo erbicida sulla salute umana. Il glifosate, una volta introdotto nel corpo principalmente attraverso l'ingestione, viene assorbito solo parzialmente nel tratto gastrointestinale, con una biodisponibilità che varia tra il 20% e il 30% della dose ingerita. Questo basso assorbimento limita la quantità di glifosate che entra nel circolo sistemico (Peillex and Pelletier, 2020). Una volta nel corpo, il glifosate viene distribuito ed escreto rapidamente dal corpo (Huch et al., 2022).

Il glifosate è soggetto ad un metabolismo molto limitato nell'organismo umano, giacchè la maggior parte della sostanza è escreta tal quale. Il principale prodotto metabolico è l'acido aminometilfosfonico (AMPA), che è presente in quantità molto ridotte rispetto alla molecola originale. Il rapido processo di escrezione rende trascurabile il rischio di accumulo nel corpo umano, sebbene la presenza di tracce di glifosate e AMPA nelle urine di soggetti esposti indichi una continua esposizione ambientale.

Nonostante l'eliminazione relativamente rapida, il glifosate e il suo metabolita AMPA sono stati rilevati in diversi studi di biomonitoraggio nella popolazione generale, evidenziando una presenza diffusa, seppur a basse concentrazioni, tra la popolazione generale. Questo ha sollevato preoccupazioni riguardo all'esposizione cronica e ai potenziali effetti a lungo termine sulla salute, specialmente dopo che la IARC nel 2015, unico fra gli enti, ha classificato il glifosate come possibile cancerogeno (Solomon, 2016). Tuttavia, i più esaurienti studi suggeriscono che, nelle condizioni di esposizione tipiche, non vi sono rischi associati all'esposizione al glifosate. (Acquavella et al., 2004; Anadón et al., 2009).

1.5.1 AMPA, il metabolita del glifosate

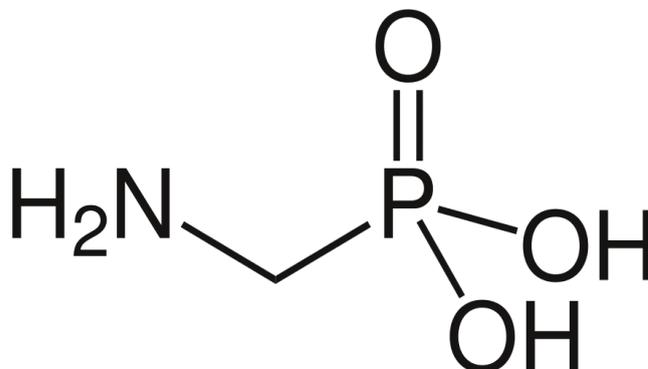


Figura 4: struttura chimica dell'acido aminometilfosfonico (AMPA) (Wikipedia contributors, 2024).

L'acido aminometilfosfonico (AMPA) è il principale metabolita derivante dalla degradazione del glifosate. La trasformazione del glifosate in AMPA avviene principalmente attraverso un processo di idrolisi chimica, che determina la scissione del legame carbonio-fosforo del glifosate. Questo processo è mediato da specifici microrganismi presenti nell'ambiente, come batteri del suolo, che esprimono enzimi capaci di catalizzare questa reazione (Sviridov et al., 2015). Anche nel corpo umano, sebbene in misura infinitamente molto più limitata, la degradazione del glifosate in AMPA può verificarsi grazie all'azione di enzimi microbici presenti nel tratto gastrointestinale. Una volta formato, l'AMPA può essere assorbito nel circolo sistemico e, similmente al glifosate, viene eliminato principalmente tramite escrezione renale (Rueppel et al., 1977).

La presenza di AMPA nel corpo umano è solo in una piccola parte legata all'esposizione al glifosate, poiché AMPA si trova comunemente nell'ambiente come prodotto della degradazione di molti detersivi di uso comune. Diversi studi di biomonitoraggio hanno evidenziato la presenza di AMPA nelle urine di individui esposti, suggerendo che questo metabolita possa persistere nell'organismo per un certo periodo prima di essere

completamente eliminato (Buekers et al., 2022), anche se è probabile un'esposizione continua legata ai prodotti di degradazione dei detersivi.

Il meccanismo esatto attraverso il quale il glifosate si converte in AMPA nel corpo umano non è stato ancora completamente compreso, ma si ipotizza che l'attività microbica intestinale giochi un ruolo significativo. Studi su modelli animali hanno confermato che, dopo l'assunzione di glifosate, una piccola parte viene metabolizzata a AMPA, la quale viene poi rapidamente escreta (Anadòn et al., 2009). Tuttavia, l'accumulo e la distribuzione di AMPA nei tessuti umani rimangono limitati, e la maggior parte del composto è eliminata entro 24-48 ore.

L'AMPA, sebbene meno tossico del glifosate, può comunque avere effetti biologici significativi, specialmente in caso di esposizione cronica (Anadòn et al., 2009). Studi in vitro hanno suggerito che l'AMPA potrebbe avere un impatto su alcune vie metaboliche cellulari, ma i dati in vivo sono limitati e richiedono ulteriori indagini per chiarire la sua rilevanza tossicologica (Mao et al., 2018).

La presenza di AMPA nelle urine potrebbe essere un indicatore dell'esposizione al glifosate, dato che rappresenta uno dei principali prodotti di degradazione di questo erbicida. Tuttavia, è importante considerare che la maggior parte dell'esposizione all'AMPA può derivare da fonti non legate al glifosate. In particolare, l'AMPA è anche un sottoprodotto della degradazione di sostanze chimiche utilizzate comunemente nei detersivi e nei prodotti per la pulizia. Di conseguenza, la sola rilevazione di AMPA nelle urine non può essere considerata un indicatore univoco di esposizione al glifosate, poiché potrebbe riflettere l'uso o la presenza di prodotti di pulizia contenenti queste sostanze chimiche (Franke et al., 2020). Questo implica che, per

monitorare efficacemente l'esposizione al glifosate, è necessario valutare anche altre fonti potenziali di AMPA.

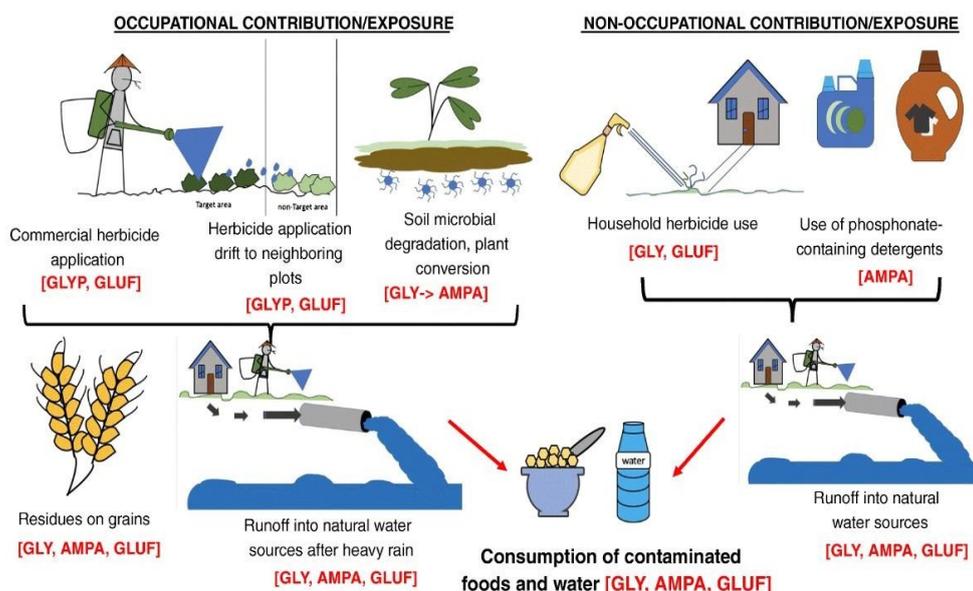


Figura 5: Possibili vie di contaminazione da parte del glifosate, dell'AMPA e di detersivi. Questo dimostra che la presenza di AMPA non è correlata per forza con la presenza del glifosate ma può derivare dall'uso di detersivi e detersivi di uso domestico. (Franke et al., 2020).

Dunque, mentre l'analisi dell'AMPA può essere utile nel contesto di studi sull'esposizione al glifosate, è fondamentale considerare anche altre potenziali fonti di questo metabolita per evitare diagnosi errate o valutazioni incomplete. Numerosi studi, come quello condotto da Zhang et al. (2020), dimostrano una correlazione significativa tra l'esposizione al glifosate e la presenza di AMPA nelle urine, soprattutto in ambienti di lavoro a stretto contatto con l'erbicida. Tuttavia, queste analisi devono tener conto di altre variabili che potrebbero influire sui risultati (Zhang et al., 2020).

Fonti aggiuntive confermano che il monitoraggio a lungo termine di AMPA dovrebbe essere accompagnato da un'analisi delle possibili fonti non agricole del composto (Franke et al., 2020).

2 SCOPO

L'obiettivo di questo capitolo è condurre un'analisi comparativa dei livelli di glifosate rilevati nelle escrezioni urinarie di due gruppi distinti: lavoratori esposti professionalmente e non lavoratori non esposti direttamente a questo erbicida. Questo confronto mira a chiarire come l'esposizione professionale al glifosate influenzi le concentrazioni di questo composto e dei suoi metaboliti nelle urine, fornendo indicazioni su eventuali rischi per la salute legati all'uso regolare di questa sostanza in ambito lavorativo.

La presenza di glifosate nelle urine rappresenta un importante indicatore biologico dell'esposizione all'erbicida. Il glifosate, infatti, viene assorbito principalmente per via cutanea e, in minor parte, per inalazione nei contesti occupazionali, e una volta entrato nell'organismo, viene eliminato in buona parte attraverso le urine (Zhang et al., 2020). Monitorare i livelli urinari è quindi una pratica consolidata per stimare l'esposizione interna, specie nei lavoratori del settore agricolo o in coloro che operano nella manutenzione di spazi verdi (Soukup et al., 2020). Ad esempio, studi su agricoltori e famiglie esposte hanno la rapidità tanto dell'assorbimento quanto dell'eliminazione della sostanza dall'organismo (Gillezeau et al., 2019).

Per isolare gli effetti dell'esposizione professionale è poi essenziale operare un confronto tra coloro che lavorano a contatto col glifosate e coloro che invece, non lavorandoci, non ne sono direttamente esposti alla sostanza: in proposito, diverse indagini hanno mostrato come i livelli di glifosate nelle urine di lavoratori agricoli e operatori del verde siano significativamente superiori rispetto a quelli riscontrati nella popolazione generale, con variazioni dipendenti anche dalle pratiche di sicurezza adottate, come l'uso di dispositivi di protezione individuale (DPI) (Gillezeau et al., 2019; Niemann et al., 2015). Gli agricoltori che non indossano adeguati DPI, come guanti e

mascherine, mostrano concentrazioni urinarie di glifosate più elevate, sottolineando l'importanza delle misure preventive per limitare gli effetti dell'esposizione (Niemann et al., 2015).

Oltre al confronto tra lavoratori e non lavoratori, questo capitolo si propone di utilizzare i valori urinari rilevati per valutare il rispetto ai limiti di sicurezza stabiliti dalle principali autorità di regolamentazione, come l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). Al fine di garantire la protezione della salute umana a lungo termine, l'EFSA ha infatti stabilito un valore di riferimento per l'assunzione giornaliera ammissibile (ADI) di glifosate pari a 0,5 mg per chilogrammo di peso corporeo (Soukup et al., 2020). Attraverso il confronto tra i livelli urinari osservati e questi valori soglia, sarà possibile valutare se l'esposizione nei contesti occupazionali sia tale da superare le dosi considerate sicure e se, pertanto, sia necessario adottare talune misure correttive.

Utilizzando i dati sull'escrezione urinaria, è possibile "back-calcolare" la dose totale di esposizione. La formula comunemente utilizzata per stimare la dose interna è:

$$\text{Dose Interna } (\mu\text{g}/\text{kg}) = \frac{\text{Concentrazione Urinaria di Glifosato} \times \text{Volume Urinario}}{\text{Peso corporeo del soggetto}}$$

Ad esempio, se un individuo elimina 6 µg/L di glifosate nelle urine e produce 2 litri di urina al giorno, per un soggetto di 60 kg, la dose interna risultante è di circa 0,2 µg/kg di peso corporeo (Niemann et al., 2015). Questo valore può essere confrontato con l'ADI dell'EFSA per valutare se l'esposizione di questi lavoratori supera i limiti di sicurezza.

Questo tipo di analisi è cruciale per comprendere l'effettiva esposizione e il rischio potenziale per i lavoratori e determinare se sono necessarie ulteriori misure di protezione o regolamentazioni.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Metodologia dello studio

Gli studi inclusi in questa revisione sono stati scelti attraverso l'analisi degli articoli disponibili su PubMed riguardanti l'escrezione urinaria di glifosate. La selezione ha seguito un processo strutturato, che ha incluso una ricerca preliminare basata su parole chiave specifiche come "glyphosate", "glyphosate human", "glyphosate urine concentration", "glyphosate workers", "glyphosate non-workers". Dopo la raccolta di circa 600 articoli, è stato effettuato un lavoro di scrematura, diretto ad escludere gli articoli non scritti in lingua inglese (percentuale molto bassa). Di questo insieme di studi, sono stati considerati solo gli studi condotti su popolazioni umane in cui era stata misurata l'escrezione urinaria di glifosate, rispettando due condizioni fondamentali: (a) la misurazione doveva essere effettuata in tempi noti e (b) i soggetti dovevano essere ben caratterizzati. In particolare, sono stati selezionati solo quegli studi che distinguevano chiaramente tra lavoratori esposti professionalmente al glifosate e individui non lavoratori, al fine di raccogliere dati utili per un confronto accurato tra i due gruppi ed è stata effettuata una scrematura significativa, poiché più del 90% degli articoli inizialmente individuati non soddisfaceva i criteri di selezione. Alla fine gli studi che sono stati valutati sono stati 11.

3.2 Metodologia della raccolta del campione urinario

La raccolta dei campioni di urina negli studi valutati è stata eseguita con procedure standardizzate, generalmente documentate negli studi selezionati, per garantire la qualità e la comparabilità dei risultati. La maggior parte degli studi ha utilizzato campioni di urina raccolti su base giornaliera o in specifiche fasce orarie, come campioni mattutini o campioni post-esposizione. Questa strategia permette di monitorare l'andamento dell'escrezione di glifosate in funzione del tempo e dell'esposizione. In alcuni studi, i partecipanti hanno raccolto campioni di urina prima e dopo l'applicazione di erbicidi contenenti glifosate per tracciare il picco di escrezione.

In alcuni studi, la raccolta è stata eseguita su un arco temporale di più giorni, consentendo di valutare non solo l'esposizione acuta ma anche quella cronica, rendendo possibile identificare eventuali accumuli o picchi di escrezione urinaria dopo l'esposizione (Zhang et al., 2020; Connolly et al., 2020).

3.3 Tecniche analitiche per la misurazione del glifosate urinario

Diversi studi selezionati hanno utilizzato tecniche analitiche avanzate per misurare con precisione i livelli di glifosate nelle urine. Le cinque principali metodologie utilizzate sono: la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevazione a fluorescenza; la cromatografia liquida tandem con

spettrometria di massa (LC-MS/MS); la spettrometria di massa tandem con cromatografia ionica (IC-MS/MS); l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); l'immunoassay a fluorescenza covalente su microbead (FCMIA).

1) HPLC con rilevazione a fluorescenza

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rilevazione a fluorescenza è una delle tecniche più comuni utilizzate per la misurazione del glifosate nelle urine. Questa tecnica richiede una fase di derivatizzazione per rendere il glifosate fluorescente e quindi rilevabile. Il campione urinario viene separato attraverso la colonna cromatografica e il glifosate viene quantificato grazie alla sua emissione fluorescente. Questa metodologia offre una buona sensibilità ed è stata largamente utilizzata in studi passati, anche se richiede una fase di preparazione dei campioni più complessa rispetto ad altre tecniche più recenti (Grau et al., 2023).

2) Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)

Il metodo LC-MS/MS è considerato lo standard di riferimento per la quantificazione del glifosate nelle urine per la sua altissima sensibilità e specificità. La cromatografia liquida separa il glifosate dagli altri componenti del campione, mentre la spettrometria di massa tandem consente una rilevazione estremamente precisa degli ioni di glifosate. Questo metodo permette di quantificare anche piccole quantità di glifosate, rendendolo particolarmente utile per studi su popolazioni esposte a basse dosi. La precisione della LC-MS/MS riduce al minimo il rischio di risultati falsi positivi o interferenze da parte di altre sostanze presenti nelle urine (Li and Kannan, 2022).

3) Spettrometria di massa tandem con cromatografia ionica (IC-MS/MS).

La spettrometria di massa tandem con cromatografia ionica (IC-MS/MS) è un'altra tecnica avanzata utilizzata per la rilevazione del glifosate, in particolare quando si tratta di separare e analizzare ioni e composti polari. In questo caso, la cromatografia ionica viene utilizzata per separare gli ioni del glifosate dagli altri ioni presenti nel campione, seguita da un'analisi dettagliata mediante spettrometria di massa tandem. Questa tecnica è particolarmente utile per analizzare campioni in cui la componente ionica gioca un ruolo chiave nell'interpretazione dei risultati (Schütze et al., 2021).

4) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

L'ELISA è una tecnica immunoenzimatica che utilizza anticorpi specifici per il glifosate per rilevarne la presenza nelle urine. Questo metodo è ampiamente utilizzato per la sua semplicità e rapidità, oltre alla possibilità di processare un grande numero di campioni contemporaneamente. Tuttavia, rispetto alle tecniche cromatografiche come l'HPLC e la LC-MS/MS, l'ELISA può essere meno specifico e più suscettibile a reazioni crociate con altre molecole simili, il che può portare a una sovrastima dei livelli di glifosate. Nonostante queste limitazioni, l'ELISA è stato utilizzato in diversi studi per monitorare rapidamente l'esposizione in grandi popolazioni (Rendon-von Osten and Dzul-Caamal, 2017).

5) Immunoassay a fluorescenza covalente su microbead (FCMIA).

L'immunoassay a fluorescenza covalente su microbead (FCMIA) è una tecnica relativamente nuova che utilizza microsferi funzionalizzate con anticorpi specifici per il glifosate. Queste microsferi legano il glifosate presente nel campione e un secondo anticorpo marcato con un fluoroforo consente il rilevamento. La fluorescenza emessa viene poi rilevata e quantificata. Questa tecnica offre il vantaggio di poter analizzare simultaneamente più analiti, permettendo così l'analisi multiplex, oltre a essere rapida ed efficiente per grandi quantità di campioni (Biagini et al., 2004).

La varietà delle tecniche utilizzate riflette le diverse esigenze degli studi in termini di precisione, sensibilità e praticità. Mentre l'HPLC e la LC-MS/MS sono metodi più complessi ma altamente affidabili, l'ELISA e l'immunoassay a fluorescenza covalente su microbead (FCMIA) rappresentano soluzioni più semplici e veloci, specialmente per studi su larga scala. La IC-MS/MS, con la sua capacità di separare ioni, risulta particolarmente utile in contesti dove è importante isolare specie ioniche, fornendo un'opzione alternativa per l'analisi precisa del glifosate in campioni complessi. Complessivamente, la metodologia adottata per la raccolta e l'analisi dei campioni di urina è stata fondamentale per garantire risultati accurati e comparabili, rendendo possibile una stima efficace dei livelli di esposizione al glifosate tra lavoratori e non lavoratori.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Analisi dei risultati degli studi sulla popolazione dei lavoratori

Numero di lavoratori coinvolti nello studio	Uso DPI	Metodo di rilevazione	t esposizione iniziale	Rilevazione t1 [ppb]	Rilevazione t2 [ppb]	Rilevazione t3 [ppb]	Articolo di riferimento
48	guanti di gomma: 71%	HPLC con rilevazione a fluorescenza, LOD 1 ppb	Giorno dell'applicazione del glifosate	60% lavoratori, GM: 3.2 ppb, Max: 233 ppb 1 giorno dopo applicazione	48% lavoratori, GM: 1.7 ppb, Max: 126 ppb 2 giorni dopo applicazione	33% lavoratori, GM: 1.1 ppb, Max: 81 ppb 3 giorni dopo l'applicazione	Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. (Acquavella et al., 2004)
20	Guanti: 100% Tute protettive (Tyvek): 90% Respiratori (RPE): 97%	Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)	Giorno dell'applicazione del glifosate	GM: 1,17 ppb Rilevazione entro 1h da esposizione	GM: 0,83 ppb Entro 24 ore da esposizione	Non eseguita	Characterising glyphosate exposures among amenity horticulturists using multiple spot urine samples (Connolly et al., 2018)
18	guanti: 94% Tute protettive (Tyvek): 67% Respiratori (RPE): 83%	Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)	Giorno dell'applicazione del glifosate	GM: 0,42 ppb Max: 3,43 ppb Rilevazione pre-esposizione	GM: 0,66 ppb Max: 10,66 ppb Rilevazione entro un'ora dalla fine dell'applicazione	Non eseguita	Exposure assessment using human biomonitoring for glyphosate and fluoroxy pyr users in amenity horticulture (Allison et al., 2017)
24	Guanti di gomma: 60%	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Giorno dell'applicazione del glifosate	GM: 1,9 ppb Max: 18 ppb Rilevazione avvenuta tra 1-5 giorni dall'applicazione	GM: 1,6 ppb Rilevazione avvenuta 4 settimane da t1	Non eseguita	Urinary Pesticide Concentrations Among Children, Mothers and Fathers Living in Farm and Non-Farm Households in Iowa (Curwin et al., 2006)
1	Guanti di gomma: 100%	HPLC con rilevazione a fluorescenza	Giorno dell'applicazione del glifosate	9,5 ppb Rilevazione a 7h da esposizione	2 ppb Rilevazione a 24h da esposizione	2 ppb Rilevazione a 48h da esposizione	Glyphosate Exposure in a Farmer's Family (Mesnage et al., 2012)

Numero di lavoratori coinvolti nello studio	Uso DPI	Metodo di rilevazione	t esposizione iniziale	Rilevazione t1 [ppb]	Rilevazione t2 [ppb]	Rilevazione t3 [ppb]	Articolo di riferimento
81	Non menzionato	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Giorno dell'applicazione del glifosato	GM: 0,47 ppb Rilevazione entro 72h da esposizione	Non eseguita	Non eseguita	Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico (Rendon-von Osten and Dzul-Caamal, 2017)
10	Non menzionato	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Giorno dell'applicazione del glifosato	GM: 109,09 ppb Rilevazione entro 24h da esposizione	Non eseguita	Non eseguita	Simultaneous exposure to multiple heavy metals and glyphosate may contribute to Sri Lankan agricultural nephropathy (Jayasumana et al., 2015)
13	Guanti di gomma: 30,8% Stivali di gomma: 100%. Maschere o respiratori: 23,1%	Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)	Giorno dell'applicazione del glifosato	GM: 23,7 ppb Rilevazione a 6h da esposizione	GM: 11,5 ppb ppb Rilevazione tra le 12 e 18h da esposizione	GM: 6,4 ppb Rilevazione tra le 18 e 24h da esposizione	Urinary glyphosate kinetics after occupational exposure (Kohsuwan et al., 2022)
12	Maschere o respiratori: 58,3% guanti di gomma: 83,3% stivali di gomma: 100% Uso di occhiali protettivi o visiere: 33,3%	Cromatografia liquida tandem con spettrometria di massa (LC-MS/MS)	2 applicazioni di glifosato a 24h di distanza	GM: 28,3 ppb Rilevazione a 6h da seconda esposizione	GM: 15,8 ppb Rilevazione tra le 12 e 18h da seconda esposizione	GM: 14,9 ppb Rilevazione tra le 18 e 24h da seconda esposizione	Urinary glyphosate kinetics after occupational exposure (Kohsuwan et al., 2022)

Tabella 1: Studi di rilevazione del glifosato nei lavoratori

La tabella 1 analizzata raccoglie i risultati di diversi studi che hanno monitorato i livelli di glifosate nelle urine dei lavoratori esposti professionalmente all'erbicida. Questi studi hanno osservato una tendenza coerente: i livelli di glifosate nelle urine aumentano notevolmente subito dopo l'applicazione dell'erbicida, raggiungendo il picco entro le prime ore, per poi ridursi progressivamente nelle rilevazioni successive. Questa diminuzione suggerisce che il glifosate viene espulso rapidamente dall'organismo, con un'eliminazione significativa nelle ore e nei giorni seguenti l'esposizione (Connolly et al., 2020). Diversi studi confermano che il glifosate viene eliminato in gran parte attraverso l'urina entro 24-48 ore dall'assorbimento, confermando una bassa tendenza all'accumulo nel corpo umano, così come previsto anche dagli studi sugli animali (Niemann et al., 2015).

Nello studio di Acquavella et al. (2004), condotto su 48 lavoratori, i livelli medi geometrici (GM) di glifosate nelle urine erano di 3,2 ppb il giorno dell'applicazione, con un picco massimo osservato di 233 ppb. Entro il primo giorno dall'esposizione, il livello medio scendeva a 1,7 ppb, e il massimo registrato era di 126 ppb. Due giorni dopo l'applicazione, la GM era ulteriormente diminuita a 1,1 ppb, con un massimo di 81 ppb. Dopo tre giorni, la percentuale di lavoratori con tracce rilevabili di glifosate era significativamente ridotta (v. tabella 1). Questo declino graduale dei livelli di glifosate nel tempo conferma una eliminazione relativamente rapida della sostanza, coerente con altri studi che indicano che il glifosate viene escreto principalmente attraverso le urine entro pochi giorni dall'esposizione (Gillezeau et al., 2019).

Un altro studio di rilievo, condotto da Connolly et al. (2018), ha esaminato orticoltori esposti al glifosate. Il giorno dell'applicazione, i livelli di glifosate nelle urine avevano un GM di 117 ppb, ma, già entro un'ora dall'applicazione, il livello medio era sceso a 83 ppb. Anche se non sono

state effettuate rilevazioni successive a 24 ore, la riduzione osservata nell'arco di un'ora mostra come, anche in questo caso, l'organismo inizi a eliminare rapidamente il glifosate dopo l'esposizione (v. tabella 1). Un andamento simile è stato osservato nello studio di Allison et al. (2017), in cui il GM rilevato il giorno dell'applicazione era di 42 ppb, ma, anche in questo caso, si è assistito a una rapida diminuzione nei campioni successivi (v. tabella 1).

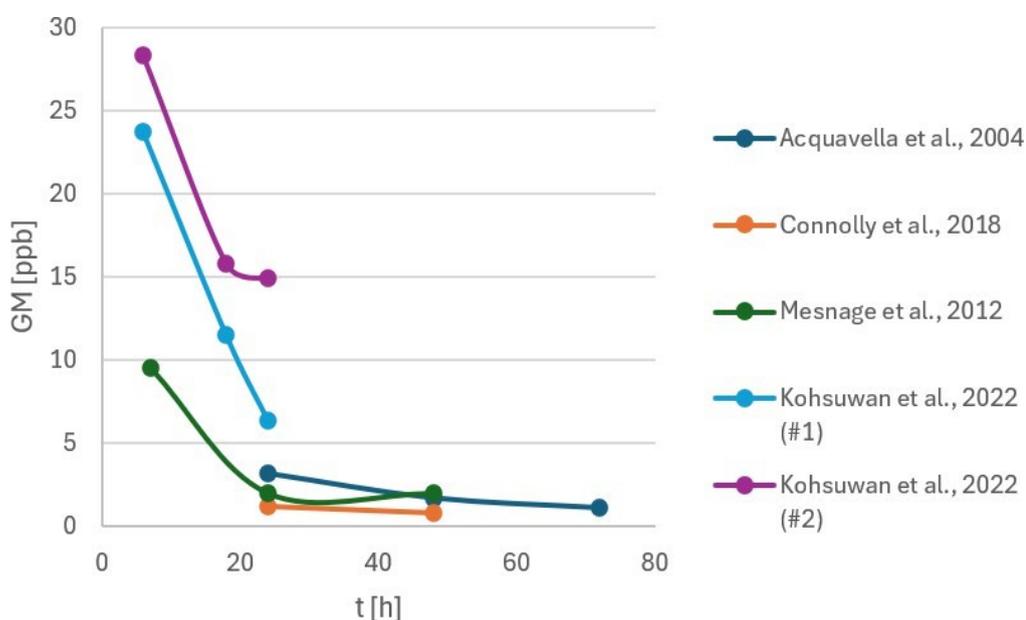


Figura 6: Andamento della concentrazione di glifosate urinario al passare del tempo.

Questo andamento di riduzione dei livelli di glifosate dopo l'esposizione pone l'attenzione su un tema cruciale: quanto questi livelli siano al di sotto o al di sopra dei limiti di sicurezza stabiliti dalle principali agenzie di regolamentazione. Secondo le linee guida dell'EFSA (2015), l'assunzione giornaliera ammissibile (ADI) di glifosate è di 0,5 mg per kg di peso corporeo. Questo significa che, per un adulto di circa 70 kg, l'assunzione massima sicura è di 35 mg al giorno.

I livelli riportati nella tabella sono espressi in ppb (parti per miliardo, ovvero µg/litro). Si prenda ora in considerazione il valore massimo osservato, pari a 233 ppb nello studio di Acquavella et al. (2004) e corrispondente a 0,233 mg/L. Se si considera una stima di volume urinario medio giornaliero di 2 litri, l'escrezione totale in un giorno risulta essere di circa 0,466 mg di glifosate, vale a dire un valore ampiamente inferiore alla soglia di sicurezza stabilita dall'EFSA.

Questa conclusione si ottiene calcolando l'esposizione giornaliera al glifosate a partire dai livelli urinari, utilizzando la formula già introdotta precedentemente basata sul volume urinario, il peso corporeo e la concentrazione urinaria di glifosate.

Considerando che circa il 20% del glifosate ingerito viene eliminato con le urine (Connolly et al., 2020), è possibile affermare che un lavoratore che espelle 233 ppb di glifosate in 2 litri di urina ha probabilmente assorbito circa 2,33 mg, che rappresenta meno dell'1% dell'ADI per una persona di 70 kg.

Pertanto, si può concludere che i livelli di glifosate osservati nelle urine dei lavoratori, anche al picco massimo, sono ampiamente inferiori ai limiti di sicurezza stabiliti dall'EFSA. Questi dati indicano che, pur essendo necessaria una sorveglianza continua per garantire la sicurezza, i livelli di esposizione attuale risultano ben controllati e non rappresentano una preoccupazione immediata per la salute dei lavoratori (Connolly et al., 2020; Grau et al., 2023).

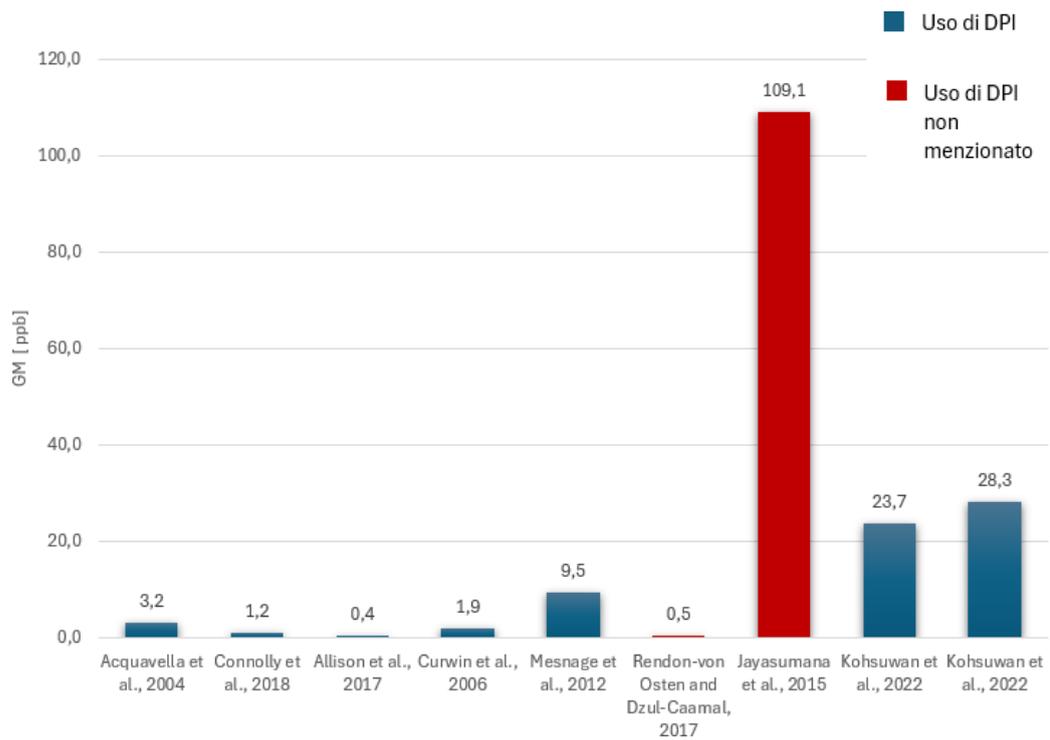


Figura 7: GM massima rilevata per ogni studio presente in tabella 1.

4.2 Sicurezza sul lavoro e uso di DPI

Un altro aspetto cruciale messo in evidenza dai dati della tabella è il ruolo dei dispositivi di protezione individuale (DPI) nel ridurre l'esposizione ai pesticidi. Gli studi mostrano chiaramente che l'uso di DPI come guanti, tute protettive e respiratori può influenzare significativamente i livelli di pesticidi rilevati nelle urine e, di conseguenza, i livelli di pesticidi a cui sono stati esposti i soggetti. Ad esempio, nello studio di Acquavella et al. (2004), in cui i livelli massimi di pesticidi nelle urine raggiungevano 233 ppb (v. tabella lavoratori), solo il 71% dei lavoratori utilizzava guanti di gomma.

Per converso, nello studio di Connolly et al. (2018), dove il 100% degli orticoltori indossava guanti e il 97% utilizzava respiratori, i livelli medi erano significativamente più bassi, con un massimo di 117 ppb, suggerendo una protezione efficace offerta dai DPI (v. tabella lavoratori).

L'importanza dell'uso dei DPI per la prevenzione dell'esposizione ai glifosate è confermata anche dallo studio condotto da Garrigou et al. (2020) che ne evidenzia l'importanza per ridurre l'esposizione ai pesticidi, incluso il glifosate. Lo studio sottolinea che l'uso appropriato dei DPI, come guanti resistenti ai prodotti chimici, tute protettive e occhiali, può ridurre significativamente il rischio di esposizione ai pesticidi (incluso ovviamente il glifosate) fino al 50-80%, a seconda del tipo di attrezzatura utilizzata e della corretta applicazione delle misure di sicurezza. Anche in contesti dove i livelli di esposizione sono inferiori ai limiti di sicurezza, l'adozione di DPI si è rivelata una misura preventiva efficace, specialmente per i lavoratori che maneggiano frequentemente erbicidi come il glifosate (Gillezeau et al., 2019).

Questi dati supportano l'importanza di implementare politiche di sicurezza rigorose nei luoghi di lavoro in cui viene applicato il glifosate. L'adozione obbligatoria di DPI, come guanti, tute protettive e respiratori, può ridurre notevolmente l'esposizione diretta al glifosate, abbassando di conseguenza i livelli escreti nelle urine e, quindi, i rischi per la salute.

4.3 Analisi dei risultati degli studi sulla popolazione dei non lavoratori

Numero di partecipanti allo studio	Metodo di rilevazione	t esposizione iniziale	Rilevazione t1 [ppb]	Rilevazione t2 [ppb]	Rilevazione t3 [ppb]	Articolo di riferimento
48 (coniugi di lavoratori)	HPLC con rilevazione a fluorescenza, LOD 1 ppb	Giorno dell'applicazione da parte del coniuge	Valori non rilevabili a 24h giorno da esposizione	GM: 1.0 ppb Rilevazione a 48h da esposizione	GM: 1.0 ppb Rilevazione a 72h da esposizione	Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. (Acquavella et al., 2004)
79 (figli di lavoratori)	HPLC con rilevazione a fluorescenza, LOD 1 ppb	Giorno dell'applicazione da parte del genitore	Solo il 12% dei bambini aveva livelli rilevabili di glifosato con GM: 24.0 ppb Rilevazione a 24h da esposizione	6% dei bambini aveva livelli rilevabili con GM: 12.0 ppb Rilevazione a 48h da esposizione	5% aveva livelli rilevabili con GM: 6.0 ppb Rilevazione a 72h da esposizione	Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. (Acquavella et al., 2004)
23 (uomini non lavoratori residenti nelle vicinanze delle coltivazioni)	immunoassay a fluorescenza covalente microbead (FCMIA)	Giorno dell'applicazione nella zona di residenza	GM: 1,5 ppb Rilevazione a 24-120h da esposizione	GM: 1,4 ppb Rilevazione a 4 settimane da esposizione	Non rilevata	Urinary Pesticide Concentrations Among Children, Mothers and Fathers Living in Farm and Non-Farm Households in Iowa (Curwin et al., 2006)
24 (donne non lavoratrici residenti nelle vicinanze delle coltivazioni)	immunoassay a fluorescenza covalente su microbead (FCMIA)	Giorno dell'applicazione nella zona di residenza	GM: 1,2 ppb Rilevazione a 24-120h da esposizione	GM: 1,1 ppb Rilevazione a 4 settimane da esposizione	Non rilevata	Urinary Pesticide Concentrations Among Children, Mothers and Fathers Living in Farm and Non-Farm Households in Iowa (Curwin et al., 2006)
3 (moglie e 3 figli di lavoratore)	spettrometria di massa lineare con ion trap accoppiata a cromatografia liquida (LC-MS)	Giorno dell'applicazione da parte del marito/padre	Non ci sono stati livelli rilevabili Rilevazione a 24h da esposizione	Non ci sono stati livelli rilevabili per la moglie e 2 dei figli, mentre per un figlio 2.0 ppb Rilevazione a 48h da esposizione	Non ci sono stati livelli rilevabili Rilevazione a 72h da esposizione	Glyphosate Exposure in a Farmer's Family (Mesnage et al., 2012)

Numero di partecipanti allo studio	Metodo di rilevazione	t esposizione iniziale	Rilevazione t1 [ppb]	Rilevazione t2 [ppb]	Rilevazione t3 [ppb]	Articolo di riferimento
8	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Non specificato	GM: 0,22 ppb	Non rilevata	Non rilevata	Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico (Rendon-von Osten and Dzul-Caamal, 2017)
10 (popolazione di pescatori)	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	Non specificato; si presume che l'esposizione sia avvenuta indirettamente attraverso l'ambiente o altre vie.	GM: 1,87 ppb Max 4,4 ppb	Non rilevata	Non rilevata	Simultaneous exposure to multiple heavy metals and glyphosate may contribute to Sri Lankan agricultural nephropathy (Jayasumana et al., 2015)
2.310 (campioni di urina da una popolazione rappresentativa di persone di età pari o superiore a 6 anni nella popolazione generale degli Stati Uniti)	Cromatografia ionica accoppiata alla spettrometria di massa tandem (IC-MS/MS)	Non specificato; si presume che l'esposizione sia avvenuta indirettamente attraverso l'ambiente o altre vie.	GM: 0,411 ppb	Non rilevata	Non rilevata	Exposure to glyphosate in the United States: Data from the 2013–2014 National Health and Nutrition Examination Survey (Ospina et al., 2023)
41 (bambini)	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	L'esposizione è avvenuta in modo indiretto, principalmente attraverso l'ambiente (bambini che vivevano vicino a campi agricoli o i cui genitori usavano erbicidi nel giardino).	GM: 1,77 ± 0,86 ppb	Non rilevata	Non rilevata	Urine biomonitoring of glyphosate in children: Exposure and risk assessment (Ferreira et al., 2021)

Tabella 2: Studi di rilevazione del glifosato nei non lavoratori.

Dall'analisi dei dati sui non lavoratori emerge che, sebbene vi sia esposizione al glifosate, soprattutto per chi vive in prossimità di aree agricole, i livelli rilevati sono significativamente più bassi rispetto a quelli dei lavoratori esposti professionalmente. Gli studi mostrano che la popolazione non lavorativa è esposta principalmente a fonti ambientali, come la dispersione degli spray – che, però, è molto rara poiché il glifosate non è molto volatile – o l'assunzione di glifosate tramite cibo e acqua. Gli studi mostrano che, in questa popolazione, i livelli di glifosate rilevati nelle urine permettono di stimare un'esposizione ben al di sotto dei limiti di sicurezza stabiliti dalle autorità regolatorie.

Ad esempio, nello studio di Curwin et al. (2006), i non lavoratori residenti nelle vicinanze delle aree agricole avevano un livello medio geometrico (GM) di glifosate pari a 15 ppb per gli uomini e 12 ppb per le donne entro 24-120 ore dall'applicazione di erbicidi nelle aree circostanti. Questi valori sono sensibilmente inferiori a quelli rilevati nei lavoratori e, anche quando misurati a distanza di settimane dall'esposizione, i livelli di glifosate sono rimasti stabili, ma comunque bassi (v. tabella 2). Questo indica che vi è esposizione continua, benchè a dosi molto basse.

Nello studio di Acquavella et al. (2004), i familiari dei lavoratori esposti al glifosate presentavano inizialmente livelli urinari di glifosate non rilevabili, per poi arrivare ad un GM di 1,0 ppb dopo 48 ore dall'applicazione dell'erbicida. Anche tra i figli dei lavoratori, solo il 12% aveva livelli rilevabili entro 24 ore, con un GM di 24 ppb (concentrazione più alta rispetto ai soggetti adulti considerati nello stesso studio poiché i bambini spesso erano coinvolti direttamente nell'applicazione dell'erbicida o si trovavano nelle immediate vicinanze durante le operazioni di miscelazione e spruzzatura) che si riduceva progressivamente a 6,0 ppb dopo 72 ore (v. tabella 2). Questi dati dimostrano che, anche in caso di esposizione indiretta, i livelli urinari di glifosate rimangono molto bassi o addirittura non misurabili.

Un dato interessante proviene dallo studio di Ospina et al. (2023), che ha monitorato una popolazione rappresentativa degli Stati Uniti. In questo caso, i livelli medi di glifosate nelle urine erano di 0,411 ppb, un valore estremamente basso rispetto a quelli rilevati nei lavoratori e che conferma che l'esposizione della popolazione generale è limitata e ben sotto i livelli di preoccupazione (tabella 2).

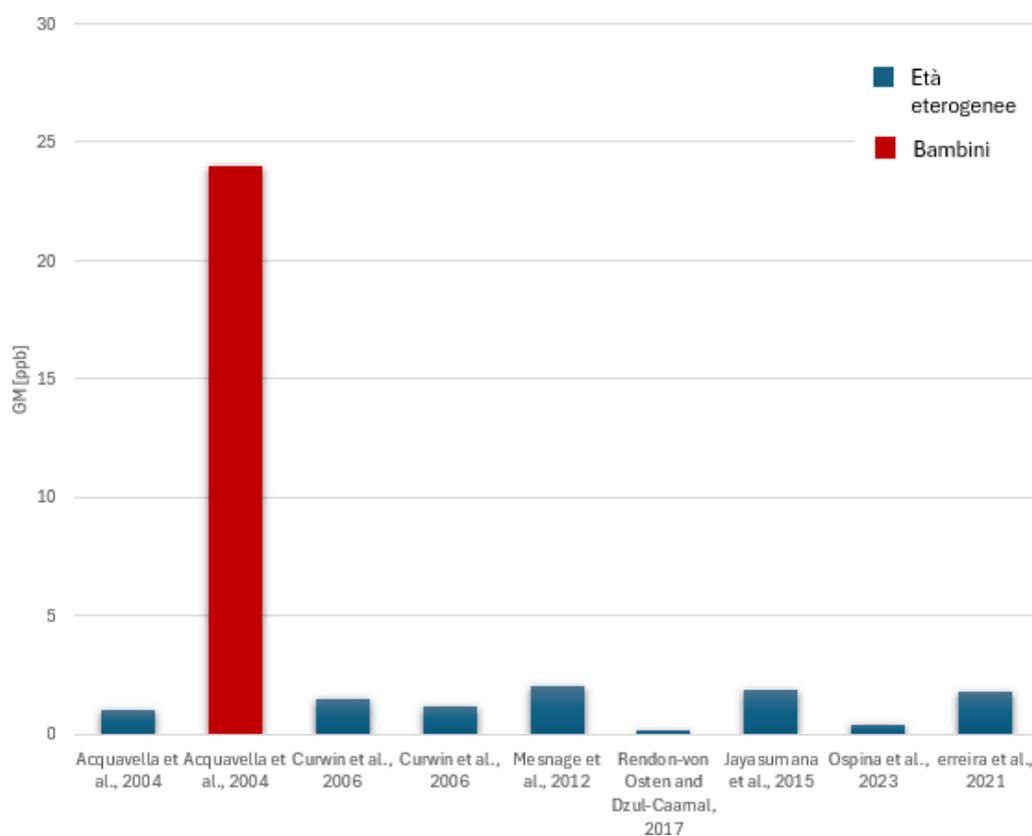


Figura 8: GM massima rilevata per ogni studio presente in tabella 2.

4.4 Confronto della stima di esposizione con i limiti stabiliti da EFSA

La stima dell'entità dell'esposizione a glifosate dei non lavoratori risulta essere significativamente inferiore ai limiti stabiliti dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). L'EFSA, come già proposto precedentemente per i lavoratori ha fissato anche per la popolazione generale un'assunzione giornaliera ammissibile (ADI) di glifosate pari a 0,5 mg per kg di peso corporeo. Per un adulto di circa 70 kg, tale valore corrisponde a un'assunzione giornaliera massima di 35 mg. I valori di glifosate riportati nelle urine dei non lavoratori, espressi in ppb (parti per miliardo), portano a una stima della dose assunta di gran lunga inferiore a questa soglia di sicurezza, confermando che l'esposizione della popolazione non lavorativa non desta preoccupazioni per la salute (Grau et al., 2023).

Ad esempio, nello studio di Acquavella et al. (2004), il livello massimo di glifosate rilevato tra i figli dei lavoratori era di 24 ppb. Se consideriamo una produzione giornaliera di urina di circa 1,5-2 litri, ciò corrisponde a un'escrezione totale giornaliera di 0,048 mg di glifosate.

Utilizzando la formula riportata già in precedenza per calcolare l'esposizione nei lavoratori, per un bambino di 30 kg, questo livello di escrezione urinaria suggerirebbe un'esposizione giornaliera approssimativa di 0,0016 mg/kg di peso corporeo, un valore estremamente inferiore rispetto all'ADI di 0,5 mg/kg stabilita dall'EFSA. Questi calcoli mostrano che l'esposizione al glifosate tra i non lavoratori è molto lontana dal raggiungere i limiti considerati protettivi per la salute (Gillezeau et al., 2019).

Anche i valori medi riportati in altri studi sui non lavoratori, come lo studio di Curwin et al. (2006), mostrano che i livelli medi di glifosate nelle urine di residenti nelle vicinanze delle aree agricole (GM di 12-15 ppb)

corrispondono a un'esposizione giornaliera ampiamente sotto la soglia di sicurezza. Considerando quindi un'assunzione giornaliera massima di 35 mg per un adulto di 70 kg, i dati confermano che, anche in presenza di esposizione ambientale, i livelli di glifosate rimangono all'interno dei parametri di sicurezza stabiliti dalle autorità regolatorie e che, pertanto, non rappresentano un rischio per la salute pubblica.

Tuttavia, rimane essenziale continuare a monitorare l'esposizione nel lungo termine per garantire che le pratiche agricole e l'utilizzo di erbicidi non comportino un aumento dell'esposizione nella popolazione generale.

4.5 Esposizione e protezione della popolazione dei non lavoratori

Sebbene i livelli di glifosate rilevati nella popolazione non lavorativa siano bassi, è comunque cruciale monitorare l'esposizione a lungo termine, specialmente per le persone che vivono vicino a zone agricole o per i bambini, che potrebbero essere più sensibili all'esposizione ambientale. Studi recenti, come quello condotto negli Stati Uniti dal Centers for Disease Control and Prevention (CDC), hanno infatti rilevato livelli di glifosate nelle urine di una vasta parte della popolazione, inclusi i bambini, suggerendo che, nonostante i valori rilevati siano ben al di sotto delle soglie di rischio stabilite dalle autorità sanitari, tuttavia l'esposizione ambientale è reale (Gillezeau et al., 2020).

L'introduzione di misure preventive, come l'istituzione di zone cuscinetto tra aree agricole e residenziali, è stata discussa in vari studi come una soluzione efficace per limitare l'esposizione della popolazione non lavorativa. Questo approccio, assieme al miglioramento delle pratiche agricole volte a ridurre la deriva degli erbicidi, potrebbe ulteriormente ridurre i rischi di esposizione (Gillezeau et al., 2020). Infine, la sorveglianza continua sull'uso dei pesticidi, come evidenziato dai ricercatori, è essenziale per mantenere i livelli di esposizione ben sotto controllo e conformi alle normative sanitarie.

4.6 Confronto tra i livelli di esposizione al glifosate nei lavoratori e non lavoratori

Il confronto tra i dati sulle concentrazioni di glifosate nelle urine di lavoratori esposti professionalmente e non lavoratori evidenzia una netta differenza in termini di esposizione. Come atteso, i livelli di glifosate nei lavoratori sono significativamente superiori a quelli dei non lavoratori, ma entrambi i gruppi mostrano valori che rimangono ampiamente entro i limiti di sicurezza stabiliti dalle principali autorità regolatorie, come l'EFSA.

Dall'altra parte, i non lavoratori, come i familiari dei lavoratori o i residenti vicini alle aree agricole, presentano livelli significativamente più bassi. Ad esempio, nello stesso studio di Acquavella et al. (2004), i coniugi dei lavoratori mostravano concentrazioni medie di 1 ppb, mentre i figli, nonostante un'esposizione indiretta, registravano livelli massimi di 24 ppb (v. tabella 2). Anche nello studio di Curwin et al. (2006), le persone che

vivevano vicino a zone agricole mostravano livelli di glifosate compresi tra 12 e 15 ppb: valori significativamente inferiori rispetto a quelli osservati nei lavoratori (v. tabella 2).

Sulla base dei dati raccolti, è quindi possibile affermare che sia per i lavoratori che per i non lavoratori i livelli di glifosate nelle urine risultano inferiori ai limiti di sicurezza stabiliti dall'EFSA. Anche in contesti di esposizione professionale più intensa, come evidenziato dai livelli rilevati subito dopo l'applicazione dell'erbicida, l'esposizione complessiva rimane ben al di sotto dei 35 mg al giorno per un adulto di 70 kg (corrispondenti a 0,5 mg/kg di peso corporeo) (EFSA, 2015). Questo indica che, se gestita correttamente attraverso l'adozione di misure di sicurezza, come l'uso di DPI, l'esposizione al glifosate nel contesto lavorativo può essere mantenuta a livelli sicuri.

5 CONCLUSIONI

Dai dati e dagli studi analizzati nel presente elaborato emerge che l'esposizione al glifosate, sia nei lavoratori esposti professionalmente che nella popolazione non lavorativa e quindi esposta indirettamente, rimane ampiamente entro i limiti di sicurezza stabiliti dalle autorità regolatorie, come l'EFSA. I dati raccolti mostrano che, nonostante i lavoratori esposti direttamente abbiano livelli più elevati di glifosate nelle urine rispetto ai non lavoratori, l'escrezione della sostanza avviene rapidamente, suggerendo una bassa tendenza all'accumulo. In particolare, la maggior parte del glifosate ingerito viene espulso attraverso le urine entro 24-48 ore dall'esposizione, riducendo i rischi per la salute a breve termine (Niemann et al., 2015).

In sintesi, il confronto tra i lavoratori e i non lavoratori mostra che, pur esistendo una differenza sostanziale nei livelli di esposizione al glifosate, entrambe le categorie rimangono ben al di sotto dei limiti di sicurezza stabiliti dall'EFSA. Questo è un dato rassicurante che conferma la sicurezza dell'uso del glifosate anche in contesti di esposizione professionale. Tuttavia, è fondamentale continuare a monitorare l'esposizione e ampliare gli studi esistenti per includere una maggiore popolazione e comprendere meglio gli effetti a lungo termine dell'esposizione, sia per i lavoratori che per i non lavoratori.

Per i non lavoratori, inclusi i familiari di persone che utilizzano l'erbicida o i residenti in aree vicine a terreni agricoli, i livelli urinari di glifosate risultano significativamente inferiori e ben al di sotto della soglia di sicurezza giornaliera stabilita. Questo suggerisce che l'esposizione ambientale al glifosate, sebbene reale, non rappresenta un rischio immediato per la

salute, come confermato da numerosi studi di biomonitoraggio (Grau et al., 2023).

Poiché dai dati di monitoraggio dei livelli urinari si deriva che l'esposizione è molto bassa, molto inferiore ai livelli considerati sicuri, è possibile concludere che non vi è rischio per la salute umana derivante dall'esposizione a glifosate. Pertanto, gli eccessi di neoplasie in soggetti ritenuti esposti a glifosate descritti in alcuni studi epidemiologici sono da considerare spuri, cioè derivanti dal caso e da confondenti non controllati. Non vi è, quindi, alcun sostegno biologico e tossicologico per un supposto effetto cancerogeno del glifosate sugli agricoltori esposti e, tanto meno, sulla popolazione generale. Tanto più anche gli studi sperimentali di cancerogenesi sugli animali sono negativi o al più dubbi, anche a dosi 1000 e più volte maggiori del limite stabilito da EFSA (FAO/WHO JMPR 2016).

In conclusione, mentre l'uso del glifosate sembra sicuro se gestito correttamente, è importante continuare il monitoraggio dell'esposizione e adottare misure preventive adeguate, come l'uso di dispositivi di protezione individuale (DPI) per i lavoratori al fine di ridurre al minimo i potenziali rischi a lungo termine.

BIBLIOGRAFIA:

1. Acquavella J. F., Alexander B. H., Mandel J. S., Gustin C., Baker B., Chapman P., Bleeke M., "Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study", in *Environmental Health Perspectives*, 2004, n. 3, pp. 321-326.
2. Anadón A., Martínez-Larrañaga M. R., Martínez M. A., Castellano V. J., Martínez M., Martín M. T., Nozal M. J., Bernal J. L., "Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats", in *Toxicology Letters*, 2009, n. 1, pp. 91-95.
3. Biagini R.E., Smith J.P., Sammons D.L., et al., "Development of a sensitivity enhanced multiplexed fluorescence covalent microbead immunosorbent assay (FCMIA) for the measurement of glyphosate, atrazine and metolachlor mercapturate in water and urine", in *Anal Bioanal Chem*, 2004, n. 379, pp. 368–374, doi:10.1007/s00216-004-2628-8.
4. Franz J. E., "Glyphosate: A unique global herbicide", in *ACS Symposium Series*, 1980, n. 2, pp. 17-23, doi:10.1021/bk-1981-0170.ch002;
5. Borggaard O. K., Gimsing A. L., "Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review", in *Pest Management Science*, 2008, n. 4, pp. 441-456, doi:10.1002/ps.1512.
6. Bradberry S. M., Proudfoot A. T., Vale J. A., "Glyphosate poisoning", in *Toxicology Reviews*, 2004, n. 3, pp. 159-167, doi:10.2165/00139709-200423030-00003.
7. Buekers J., Remy S., Bessems J., Govarts E., Rambaud L., Riou M., Halldorsson T. I., Ólafsdóttir K., Probst-Hensch N., Ammann P., Weber T., Kolossa-Gehring M., Esteban-López M., Castaño A., Andersen H. R., Schoeters G., "Glyphosate and AMPA in Human Urine of HBM4EU-Aligned Studies: Part B Adults", in *Toxics*, 2022, n. 10, pp. 552, doi:10.3390/toxics10100552.

8. Connolly A., Basinas I., Jones K., Galea K. S., Kenny L., McGowan P., Coggins M. A., "Characterising glyphosate exposures among amenity horticulturists using multiple spot urine samples", in *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2018, n. 221(7), pp. 1012-1022, doi: 10.1016/j.ijheh.2018.06.007.
9. Connolly A., Coggins M.A., Koch H.M., "Human Biomonitoring of Glyphosate Exposures: State-of-the-Art and Future Research Challenges", in *Toxics*, 2020, n. 8, pp. 60, doi:10.3390/toxics8030060.
10. Connolly A., Jones K., Galea K. S., Basinas I., Kenny L., McGowan P., Coggins M., "Exposure assessment using human biomonitoring for glyphosate and fluroxypyr users in amenity horticulture", in *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2017, n. 220(6), pp. 1064-1073, doi: 10.1016/j.ijheh.2017.06.008.
11. Curwin B. D., Hein M. J., Sanderson W. T., Striley C., Heederik D., Kromhout H., Reynolds S. J., Alavanja M. C., "Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa", in *Annals of Occupational Hygiene*, 2006, n. 51(1), pp. 53-65, doi: 10.1093/annhyg/mel062.
12. Dill G. M., "Glyphosate-resistant crops: history, status and future", in *Pest Management Science*, 2005, n. 3, pp. 219-224, doi:10.1002/ps.1008.
13. Dörr F., "Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment", in *IntechOpen*, 2019, n. 1, pp. 1-25, doi:10.5772/intechopen.87099.
14. Duke S. O., "Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction", in *Pest Management Science*, 2005, n. 3, pp. 211-218, doi:10.1002/ps.1015.
15. Duke S. O., "The history and current status of glyphosate", in *Pest Management Science*, 2018, n. 5, pp. 1027-1034, doi:10.1002/ps.4652.

16. Duke S. O., Powles S. B., "Glyphosate: A once-in-a-century herbicide", in *Pest Management Science*, 2008, n. 4, pp. 319-325, doi:10.1002/ps.1518.
17. EFSA, "Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate", in *EFSA Journal*, 2015, n. 13, pp. 4302, doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302.
18. FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Residues, "Pesticide Residues in Food 2016: Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues", in *FAO Plant Production and Protection Paper*, 2016, n. 229, pp. 1-472.
18. Ferreira C., Duarte S. C., Costa E., Pereira A. M. P. T., Silva L. J. G., Almeida A., Lino C., Pena A., "Urine biomonitoring of glyphosate in children: Exposure and risk assessment", in *Environmental Research*, 2021, n. 198, pp. 111294, doi:10.1016/j.envres.2021.111294.
19. Folmar L. C., Sanders H. O., Julin A. M., "Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates", in *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1979, n. 8, pp. 269-278, doi:10.1007/BF01056243.
20. Franke A. A., Li X., Lai J. F., "Analysis of glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate from human urine by HRAM LC-MS", in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, n. 412, pp. 8313–8324, doi:10.1007/s00216-020-02966-1.
21. Funke T., Han H., Healy-Fried M. L., Fischer M., Schönbrunn E., "Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops", in *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2006, n. 35, pp. 13010-13015, doi:10.1073/pnas.0603638103.
22. Giesy J. P., Dobson S., Solomon K. R., "Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide", in *Reviews of Environmental*

Contamination and Toxicology, 2000, n. 167, pp. 35-120, doi:10.1007/978-1-4612-1156-3_2.

23. Gillezeau C., Lieberman-Cribbin W., Taioli E., "Aggiornamento sull'esposizione umana al glifosate, con una revisione completa dell'esposizione nei bambini", in *Environ Health*, 2020, n. 19, pp. 115, doi:10.1186/s12940-020-00673-z

24. Gillezeau C., van Gerwen M., Shaffer R.M., et al., "The evidence of human exposure to glyphosate: a review", in *Environ Health*, 2019, n. 18, pp. 2, doi:10.1186/s12940-018-0435-5.

25. Glynn A. W., Bignert A., Berg N., Börjesson S., "Persistent organic pollutants and glyphosate residues in the environment and food: health implications", in *Environmental Science & Policy*, 2011, n. 6, pp. 853-862, doi:10.1016/j.envsci.2011.06.002.

26. Grau D., Grau N., Paroissin C., et al., "Underestimation of glyphosate intake by the methods currently used by regulatory agencies", in *Environ Sci Pollut Res*, 2023, n. 30, pp. 100626–100637, doi:10.1007/s11356-023-29463-z.

27. Green J. M., "Current state of herbicides in herbicide-resistant crops", in *Pest Management Science*, 2014, n. 9, pp. 1351-1357, doi:10.1002/ps.3727.

28. Guyton K. Z., Loomis D., Grosse Y., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Straif K., "Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate", in *The Lancet Oncology*, 2015, n. 5, pp. 490-491, doi:10.1016/S1470-2045(15)70134-8.

29. Hale R. C., Smith S. L., Elser J., "Contamination of food and water by glyphosate and other herbicides: implications for human health", in *Journal of Environmental Monitoring*, 2013, n. 6, pp. 1279-1287, doi:10.1039/c3em00220g.

30. Huang Y., Wang X., Tian Y., "Protective measures and safety practices for reducing glyphosate exposure in agricultural settings", in *Journal of Occupational Health*, 2017, n. 4, pp. 333-340, doi:10.1539/joh.16-0330-OA.
31. Huch M., Stoll D. A., Kulling S. E., Soukup S. T., "Metabolism of glyphosate by the human fecal microbiota", in *Toxicology Letters*, 2022, n. 4, pp. 1-5, doi:10.1016/j.toxlet.2021.12.013.
32. IARC (International Agency for Research on Cancer), "Some organophosphate insecticides and herbicides: tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon and glyphosate", in *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2015, vol. 112, pp. 3-10.
33. Jayasumana C., Gunatilake S., Siribaddana S., "Simultaneous exposure to multiple heavy metals and glyphosate may contribute to Sri Lankan agricultural nephropathy", in *BMC Nephrology*, 2015, n. 16, pp. 103, doi: 10.1186/s12882-015-0109-2.
34. Kaundun S. S., Salas M. A., "Respiratory and dermatological health effects of glyphosate exposure in agricultural workers", in *Occupational Medicine*, 2014, n. 3, pp. 182-188, doi:10.1093/occmed/kqt176.
35. Kohsuwan K., Intayoung U., Khacha-Ananda S., Sapbamrer R., Koonrungsesomboon N., Techatoei S., Wunnapuk K., "Urinary glyphosate kinetics after occupational exposure", in *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2022, n. 245, pp. 114021, doi: 10.1016/j.ijheh.2022.114021.
36. Levy-Booth D. J., Gulden R. H., Campbell R. G., Powell J. R., Klironomos J. N., Pauls K. P., Swanton C. J., Trevors J. T., Dunfield K. E., "Roundup Ready® soybean gene concentrations in field soil aggregate size classes", in *FEMS Microbiology Letters*, 2009, n. 291(2), pp. 175-179, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01449.x.
37. Li Z.M., Kannan K., "A Method for the Analysis of Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Human Urine Using

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", in *Int J Environ Res Public Health*, 2022, n. 19, pp. 4966, doi:10.3390/ijerph19094966.

38. Mao Q., Manservigi F., Panzacchi S., Mandrioli D., Menghetti I., Vornoli A., Bua L., Falcioni L., Lesseur C., Chen J., Belpoggi F., Hu J., "The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on the microbiome", in *Environmental Health*, 2018, n. 1, pp. 50, doi:10.1186/s12940-018-0394-x.

39. Mesnage R., Moesch C., Le Grand R., Lauthier G., Spiroux de Vendômois J., Gress S., Séralini G. E., "Glyphosate exposure in a farmer's family", in *Journal of Environmental Protection*, 2012, n. 3(9), pp. 1001-1003, doi:10.4236/jep.2012.39115.

40. Mink P. J., Mandel J. S., Sceurman B. K., Lundin J. I., "Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review", in *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012, n. 3, pp. 440-452, doi:10.1016/j.yrtph.2012.04.002.

41. Montero J., Ruiz J., Figueroa F., "Occurrence and levels of glyphosate in drinking water supplies: a global perspective", in *Environmental Health Perspectives*, 2016, n. 12, pp. 1845-1851, doi:10.1289/ehp.1510358.

42. Niemann L., Sieke C., Pfeil R., et al., "A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers", in *J. Verbr. Lebensm.*, 2015, n. 10, pp. 3–12, doi:10.1007/s00003-014-0927-3.

43. Ospina M., Schütze A., Morales-Agudelo P., Vidal M., Wong L. Y., Calafat A. M., "Exposure to glyphosate in the United States: Data from the 2013-2014 National Health and Nutrition Examination Survey", in *Environmental International*, 2022, n. 170, pp. 107620, doi:10.1016/j.envint.2022.107620.

44. Patterson E. L., Pettinga D. J., Ravet K., Neve P., Gaines T. A., "Glyphosate Resistance and EPSPS Gene Duplication: Convergent

Evolution in Multiple Plant Species", in *Journal of Heredity*, 2018, n. 2, pp. 117-125, doi:10.1093/jhered/esx087.

45. Peillex C., Pelletier M., "The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity", in *Journal of Immunotoxicol*, 2020, n. 1, pp. 163-174, doi:10.1080/1547691X.2020.1804492.

46. Pollegioni L., Schonbrunn E., Siehl D., "Molecular basis of glyphosate resistance – Different approaches through protein engineering", in *FEBS Journal*, 2011, n. 16, pp. 2753-2766, doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x.

47. Powles S. B., Yu Q., "Evolution in action: plants resistant to herbicides", in *Annual Review of Plant Biology*, 2010, n. 1, pp. 317-347, doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112119.

48. Rendon-von Osten J., Dzul-Caamal R., "Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico", in *Int J Environ Res Public Health*, 2017, n. 14, pp. 595, doi:10.3390/ijerph14060595.

49. Rendon-von Osten J., Dzul-Caamal R., "Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico", in *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, n. 14(6), pp. 595, doi: 10.3390/ijerph14060595.

50. Rodríguez-Gil J. L., Prosser R. S., Duke S. O., Solomon K. R., "Ecotoxicology of Glyphosate, Its Formulants, and Environmental Degradation Products", in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2021, n. 255, pp. 129-205, doi:10.1007/398_2020_56.

51. Rueppel M. L., Brightwell B. B., Schaefer J., Marvel J. T., "Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water", in *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1977, n. 3, pp. 517-528.

52. Sammons R. D., Gaines T. A., "Glyphosate resistance: State of knowledge", in *Pest Management Science*, 2014, n. 9, pp. 1367-1377, doi:10.1002/ps.3743.
53. Schütze A., Morales-Agudelo P., Vidal M., et al., "Quantification of glyphosate and other organophosphorus compounds in human urine via ion chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry", in *Chemosphere*, 2021, n. 274, pp. 129427, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129427.
54. Solomon K. R., "Estimated exposure to glyphosate in humans via environmental, occupational, and dietary pathways: an updated review of the scientific literature", in *Pest Management Science*, 2019, n. 12, pp. 5717, doi:10.1002/ps.5717.
55. Solomon K. R., "Glyphosate in the general population and in applicators: a critical review of studies on exposures", in *Critical Reviews in Toxicology*, 2016, n. 9, pp. 21-27.
56. Soukup S.T., Merz B., Bub A., et al., "Glyphosate and AMPA levels in human urine samples and their correlation with food consumption: results of the cross-sectional KarMeN study in Germany", in *Arch Toxicol*, 2020, n. 94, pp. 1575–1584, doi:10.1007/s00204-020-02704-7.
57. Steinrücken H. C., Amrhein N., "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase", in *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1980, n. 4, pp. 1207-1212, doi:10.1016/0006-291X(80)90547-1.
58. Sviridov A. V., Shushkova T. V., Ermakova I. T., Ivanova E. V., Epiktetov D. O., Leontievsky A. A., "Microbial degradation of glyphosate herbicides (review)", in *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2015, n. 2, pp. 188-195.
59. Tarazona J. V., Court-Marques D., Tiramani M., Reich H., Pfeil R., Istace F., Crivellente F., "Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences

with IARC", in Archives of Toxicology, 2017, n. 8, pp. 2723-2743, doi:10.1007/s00204-017-1962-5.

60. Vereecken H., "Mobility and leaching of glyphosate: a review", in Pest Management Science, 2005, n. 12, pp. 1139-1151, doi:10.1002/ps.1122.

61. Wikipedia contributors, "Glifosate", in Wikipedia, L'enciclopedia libera, 2024, n. 21 agosto, <https://it.wikipedia.org/wiki/Glifosate> (accesso 26 agosto 2024).

62. Williams G. M., Kroes R., Munro I. C., "Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans", in Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2000, n. 2, pp. 117-165, doi:10.1006/rtph.1999.1371.

63. Zhang F., Xu Y., Liu X., Pan L., Ding E., Dou J., Zhu B., "Concentration distribution and analysis of urinary glyphosate and its metabolites in occupationally exposed workers in Eastern China", in International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, n. 17, p. 2943, doi:10.3390/ijerph17082943.