

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA

**João Paulo de Andrade Sabbatino Silva**  
**Beatriz Floriano Ornellas**



PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPRODUTO PARA  
BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO

RIO DE JANEIRO

2023

João Paulo de Andrade Sabbatino Silva  
Beatriz Floriano Ornellas

PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPRODUTO PARA  
BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Químico.

Orientador(es): Rodrigo Pires do Nascimento

Rio de Janeiro

2023

#### CIP - Catalogação na Publicação

5586p Silva, João Paulo de Andrade Sabbatino; Ornellas, Beatriz Floriano  
PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPRODUTO PARA BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO / João Paulo de Andrade Sabbatino Silva; Beatriz Floriano Ornellas. -- Rio de Janeiro, 2023.  
50 f.  
Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Bacharel em Engenharia Química, 2023.  
1. Glifosato. 2. Biodegradação. 3. Fungos. 4. Aspergillus oryzae. 5. Aspergillus niger. I. do Nascimento, Rodrigo Pires, orient. II. Título.

João Paulo de Andrade Sabbatino Silva

Beatriz Floriano Ornellas

PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPRODUTO PARA  
BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Escola de Química da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Engenheiro  
Químico.

Aprovado em 20 de julho de 2023.

---

Rodrigo Pires do Nascimento, Doutor, EQ-UFRJ

---

Eliana Flavia Sérvulo Camporese, PhD., DEB-Escola de Química

---

Ana Caroline Barros do Nascimento, MSc., Escola de Química

Rio de Janeiro  
2023

*Dedicamos este trabalho a todos aqueles que tiveram alguma contribuição, por menor que tenha sido, com a nossa trajetória nesses anos na Escola de Química.*

## RESUMO

O uso em larga escala de agrotóxicos na agricultura teve início nos Estados Unidos na década de 1950 com a chamada “Revolução Verde”, que visava modernizar a agricultura e aumentar sua produtividade. No Brasil, o movimento teve início na década de 1960 e ganhou força na década de 1970 com a implantação do Programa Nacional de Defesa Agropecuária (PNDA). A agricultura brasileira vem melhorando os índices de produtividade a cada ano e o país é atualmente um dos maiores produtores agrícolas do mundo e também um dos que mais utilizam agrotóxicos, sendo o glifosato, o mais utilizado no Brasil. O glifosato é um herbicida amplamente utilizado em todo o mundo devido à sua grande eficácia no controle de ervas daninhas, com mais de 150 marcas comercializadas em mais de 119 países, com registros para mais de 100 safras. O glifosato é fortemente adsorvido pela maioria dos solos, logo nas primeiras quatro horas após a aplicação. Uma vez adsorvido, o glifosato pode permanecer no ambiente como um resíduo ligado até sua completa mineralização, que pode durar dias, meses ou até anos, dependendo das propriedades do solo (porosidade, pH, teor de carbono orgânico etc.) e das doses de aplicação. No entanto, seu uso tem gerado grandes preocupações, devido aos potenciais riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Estudos têm demonstrado que o glifosato pode estar associado a diversos problemas, como distúrbios endócrinos, danos ao sistema reprodutivo, efeitos tóxicos em animais e risco de câncer. Devido a esses riscos toxicológicos, pesquisadores do mundo todo têm se dedicado ao desenvolvimento de técnicas de biodegradação do glifosato, visando mitigar seus efeitos negativos. Uma abordagem considerada promissora tem sido o uso de fungos filamentosos para degradar o glifosato, pois possuem a capacidade de metabolizar o herbicida e transformá-lo em compostos de menor toxicidade ou mesmo em compostos atóxicos. Espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma* spp têm sido descritas como promissoras na biodegradação do glifosato, devido ao seu potencial metabólico na produção de enzimas específicas que hidrolisam o glifosato para posterior uso como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e energia para o seu crescimento. A utilização de fungos filamentosos para biodegradação do glifosato apresenta diversas vantagens, sendo ambientalmente amigável, além da facilidade de uso como agente biorremediador de solos contaminados com glifosato. Devido a sua capacidade de degradação, benefícios ao solo e possibilidade de ser um produto inovador, os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* foram escolhidos para o bioproduto proposto em uma composição com ágar extrato de malte, amido de milho e antiespumante, sendo assim uma nova opção para a biorremediação de glifosato em plantações.

**Palavras-chave:** Glifosato; Biodegradação; Fungos; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

The large-scale use of pesticides in agriculture began in the United States in the 1950s with the so-called "Green Revolution," which aimed to modernize agriculture and increase productivity. In Brazil, the movement started in the 1960s and gained momentum in the 1970s with the implementation of the National Agropecuary Defense Program (PNDA). Brazilian agriculture has been improving productivity rates every year, and the country is currently one of the world's largest agricultural producers and also one of the biggest users of pesticides, with glyphosate being the most widely used in Brazil. Glyphosate is a herbicide widely used worldwide due to its high effectiveness in weed control, with over 150 commercial brands available in more than 119 countries and registered for more than 100 crops. Glyphosate is strongly adsorbed by most soils, shortly after application, within the first four hours. Once adsorbed, glyphosate can remain in the environment as a bound residue until its complete mineralization, which can last from days to months or even years, depending on soil properties (porosity, pH, organic carbon content, etc.) and application rates. However, its use has raised significant concerns due to potential risks to human health and the environment. Studies have shown that glyphosate may be associated with various problems such as endocrine disorders, reproductive system damage, toxic effects on animals, and cancer risk. Due to these toxicological risks, researchers worldwide have been dedicated to developing glyphosate biodegradation techniques to mitigate its negative effects. One approach considered promising has been the use of filamentous fungi to degrade glyphosate because they have the ability to metabolize the herbicide and transform it into compounds of lower toxicity or even non-toxic compounds. Filamentous fungi species such as *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma* spp have been described as promising in glyphosate biodegradation due to their metabolic potential in producing specific enzymes that hydrolyze glyphosate for subsequent use as a carbon, nitrogen, phosphorus and energy source for their growth. The use of filamentous fungi for glyphosate biodegradation presents several advantages, including being environmentally friendly and easy to use as a bioremediation agent for glyphosate-contaminated soils. The fungi *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* were chosen due to their capacity of degradation of the glyphosate, their benefits to the soils and the possibility of being an innovative product. The proposed bioproduct would be a composition of the fungi, with malt extract agar, corn starch and an anti-foaming agent, being a new option for the bioremediation of glyphosate on farms.

**Keywords:** Glyphosate; Biodegradation; Fungi; *Aspergillus oryzae*; *Aspergillus niger*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1: Grau de dissociação do glifosato construído a partir dos valores de <math>K_a</math> .....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 2: Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico ....</b>	<b>166</b>
<b>Figura 3: Artigos publicados com a palavra-chave “Glifosato” .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 4: Patentes registradas por ano com a palavra-chave “Glifosato” .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 5: Artigos publicados com as palavras-chave “Biorremediação” + “Glifosato” ..</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6: Patentes publicadas com as palavras-chave “Biorremediação” + “Glifosato” .....</b>	<b>300</b>
<b>Figura 7: Artigos publicados com as palavras-chave “<i>Aspergillus Oryzae</i> e <i>niger</i>” + “Degradação” .....</b>	<b>310</b>
<b>Figura 8: Patentes registradas por ano com as palavras-chave “<i>Aspergillus Oryzae</i> e <i>niger</i>” + “Degradação” .....</b>	<b>311</b>
<b>Figura 9: Imagem ilustrativa de um Biorreator totalmente automatizado, do fabricante YSBIOTECH, capacidade operacional de 500L.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 10: Imagem ilustrativa de uma centrífuga refrigerada, modelo PLUS ULTRA SPEED VITCHLAB .....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 11: Imagem ilustrativa de um liofilizador industrial F-50 .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 12: Representação gráfica de porcentagem de componentes do bioproduto proposto .....</b>	<b>38</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AENDA - Associação Brasileira de Defensivos Agrícolas Pós-Patente

AMPA - Ácido aminometilfosfônico

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil

EPSPs - Enol-piruvil-shiquimato-fosfato-sintase

FDA - *Food And Drug Administration*

ICMS - Imposto sobre a Comercialização de Mercadorias e Serviços

LD50 – Dose letal média

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNDA - Programa Nacional de Defensivos Agrícolas

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS

pK - Constante de Ionização

pH - Potencial hidrogeniônico

## Sumário

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
3.1.	GLIFOSATO .....	13
3.2.	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS .....	14
3.3.	COMPORTAMENTO NO MEIO AMBIENTE .....	16
3.3.1.	<i>Presença no solo .....</i>	<i>17</i>
3.3.2.	<i>Efeito em macro e micro-organismos do solo .....</i>	<i>18</i>
3.3.3.	<i>Efeito sobre organismos terrestres .....</i>	<i>20</i>
3.3.4.	<i>Presença na água.....</i>	<i>21</i>
<b>4.</b>	<b>SAÚDE E USO DE DEFENSIVO AGRÍCOLA NO BRASIL.....</b>	<b>22</b>
4.1.	TOXICIDADE AGUDA .....	23
4.2.	TOXICIDADE CRÔNICA.....	23
<b>5.</b>	<b>BIODEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO .....</b>	<b>24</b>
5.1.	OS MICRORGANISMOS DO SOLO: .....	25
5.2.	POSSÍVEIS CEPAS .....	26
<b>6.</b>	<b>PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA .....</b>	<b>28</b>
<b>7.</b>	<b>MICRORGANISMOS ALVO.....</b>	<b>32</b>
<b>8.</b>	<b>PROPOSTA DE BIOPRODUTO .....</b>	<b>32</b>
8.1.	PROPOSTA DE FÓRMULA DO BIOPRODUTO A BASE DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	32
8.2.	COMPOSIÇÃO .....	33
8.3.	ETAPAS DE PRODUÇÃO.....	34
8.3.1.	<i>Cultivo dos microrganismos Aspergillus oryzae e Aspergillus niger: .....</i>	<i>34</i>
8.3.2.	<i>Produção do produto final .....</i>	<i>37</i>
8.3.3.	<i>Modo de utilização do produto .....</i>	<i>38</i>
<b>9.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização em massa de defensivo agrícola na agricultura se inicia na década de 1950, nos Estados Unidos, com a chamada ‘Revolução Verde’, que teria o intuito de modernizar a agricultura e aumentar sua produtividade. No Brasil, esse movimento chega na década de 1960 e, com a implantação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), ganha impulso na década de 1970. O programa vinculava a utilização dessas substâncias à concessão de créditos agrícolas, sendo o Estado um dos principais incentivadores dessa prática (SIQUEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2011).

O termo agrotóxico foi adotado no Brasil a partir da Lei Federal nº 7.802, de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 2002, e define os compostos de substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção de agentes patogênicos que afetam plantas, animais e pessoas (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Em contramão do que pregam os principais defensores da agricultura orgânica, no Brasil ainda há políticas públicas que promovem o uso e o comércio de defensivos agrícolas, impulsionadas pela influência da bancada ruralista no Congresso Nacional. Exemplos disso são o baixo custo de registro de produtos (variando de R\$ 180,00 a R\$ 1.800,00) na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a isenção de Imposto sobre a Comercialização de Mercadorias e Serviços (ICMS) em muitos estados (SOARES & PORTO, 2012).

Segundo Jobim e colaboradores (2010), essa “modernização agrícola” gera crescimento econômico, mas também apresenta riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Nas últimas décadas, o mercado de defensivos agrícolas no Brasil cresceu 190%, enquanto houve um aumento de 93% no mercado internacional (CORCINO et al. 2019). Apenas dez empresas do setor agropecuário controlam mais de 70% desse mercado no Brasil. Em termos numéricos, por exemplo, na safra de 2010 e 2011, foram consumidas 936 mil toneladas de defensivo agrícola (RIGOTTO et al., 2014).

O uso abusivo dessas substâncias também ocorre em terras indígenas, como no caso da região habitada pelo povo Xukuru do Ororubá, em Pernambuco, onde os defensivos agrícolas foram introduzidos após o processo de industrialização (GONÇALVES, 2008). Em geral, no Brasil, esses produtos são utilizados majoritariamente nas regiões Centro-Oeste (33%), Sul (28%) e Sudeste (23%), com destaque para o estado do Mato Grosso, que utiliza 1,97 toneladas de agrotóxicos por bilhão de produção agrícola, correspondendo a 18,6% do consumo do país (MORAES, 2019).

Segundo a Associação Brasileira de Defensivos Agrícolas Pós-Patente (AENDA), o glifosato é o herbicida mais amplamente utilizado na agropecuária, tanto no Brasil como no Mundo, com mais de 150 marcas comerciais disponíveis em mais de 119 países, com registro para mais de cem culturas diferentes. Apesar das variações em sua formulação, todas as marcas compartilham o mesmo mecanismo de ação, a inibição da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato-sintase (EPSPs).

No Brasil, o glifosato é formulado com diferentes sais, incluindo o sal potássico, sal de isopropilamina e sal de amônio. O glifosato é um herbicida importante devido à sua alta capacidade de translocação nas plantas, eficácia de controle, rápida inativação no solo e baixa toxicidade para animais e pessoas que o manipulam (MARCOLINHO & MIZUKAMI, 2008; CHELINHO et al., 2023). Devido aos potenciais impactos nocivos ao meio ambiente e à saúde humana associados ao uso do glifosato, há um interesse crescente em buscar um melhor entendimento sobre sua degradação por meio biológico, utilizando microrganismos.

Desta forma, o presente estudo visa investigar o potencial uso do glifosato como fonte de carbono por alguns microrganismos, com o intuito de desenvolver um processo de criação de um bioproduto que possa ser aplicado em áreas de grandes plantações. Através da biorremediação, o bioproduto eliminaria o glifosato do ambiente de forma “verde e sustentável”, sem causar impactos adicionais nocivos ao sistema natural. Assim, seria possível a descontaminação de terras agrícolas, lençóis freáticos e até mesmo alimentos contaminados pelo glifosato e outros agrotóxicos.

## 2. OBJETIVOS

- Coletar e analisar informações das últimas décadas sobre o glifosato e sua biodegradação, a fim de obter uma compreensão mais abrangente sobre o seu mecanismo de degradação;
- Pesquisar, de forma aprofundada, sobre os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, focando em sua capacidade de biodegradar o glifosato;
- Apresentar uma proposta de desenvolvimento de um bioproduto formulado especificamente para a biodegradação do glifosato, considerando os resultados prévios sobre os fungos mencionados;
- Propor um método de fabricação eficiente para o bioinoculante, garantindo a sua viabilidade e escalabilidade;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Glifosato

Todos os anos, aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de pesticidas são utilizadas no mundo. No Brasil, cerca de 130 mil toneladas de agrotóxicos são consumidas no país anualmente. Isso representa um aumento de 700% no consumo de pesticidas nos últimos quarenta anos, em comparação com um crescimento de 78% da área agrícola durante esse mesmo período. Assim sendo, o uso de herbicidas não-seletivos, sistêmicos, pós-emergentes, como o glifosato, representaram cerca de 57% do mercado brasileiro de agroquímicos em 2021, com o glifosato sendo o ingrediente ativo mais consumido, com 36% do volume de herbicidas (SOUZA, 2023).

O glifosato é conhecido por sua alta eficiência na eliminação de ervas daninhas. Desde sua descoberta como herbicida em 1971, foram desenvolvidos três tipos principais de glifosato: glifosato-isopropilamônio, glifosato-sesquisódio (comercializado pela Monsanto como Round-up) e glifosato-trimesium (patenteado pela ICI, atual Syngenta) (JUNIOR et al., 2002). O glifosato é classificado como um organofosfato que não afeta o sistema nervoso da mesma maneira que outros pesticidas organofosforados, geralmente inseticidas inibidores da enzima colinesterase. Embora, de acordo com dados na literatura, o glifosato seja considerado pouco tóxico, há evidências de efeitos negativos no meio ambiente, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência por algumas espécies de ervas daninhas após o uso prolongado do herbicida (SIQUEIRA et al., 2013). Portanto, é necessário buscar alternativas e estratégias de manejo mais sustentáveis, a fim de minimizar os efeitos negativos do uso desse herbicida tanto para o meio ambiente quanto para a agricultura.

No manejo agrícola, o glifosato é comumente aplicado através de pulverização, sendo geralmente absorvido pelas folhas e pelos tecidos jovens das plantas. Após a absorção, o herbicida é então transportado para todas as partes da planta, atuando em diferentes sistemas enzimáticos causando a inibição do metabolismo de aminoácidos. Como resultado, as plantas tratadas com glifosato morrem em poucos dias ou semanas, devido à sua ampla distribuição pelo sistema vegetal (SHANER, 2009).

As concentrações mais elevadas de glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), têm sido encontradas em folhas jovens. A aplicação de glifosato pode resultar na presença de resíduos tanto na colheita quanto em animais destinados à alimentação humana (JUNIOR et al., 2002). A aplicação direta do herbicida em corpos

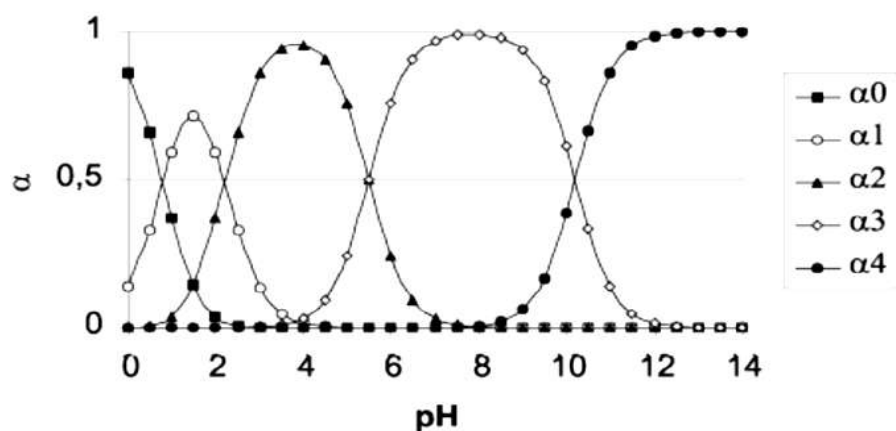
d'água superficiais para tratamento de plantas daninhas aquáticas emergentes pode ser responsável pela presença de glifosato em água potável (SALOMON & THOMPSON, 2003).

Devido à ampla utilização do glifosato em todo o mundo, torna-se importante estudar suas propriedades físico-químicas, interações com os componentes da água e do solo, bem como sua detecção e quantificação em amostras naturais. Desta forma, o presente trabalho irá abordar e discutir as principais características físicas e químicas que conferem ao herbicida um comportamento peculiar e distinto da maioria dos pesticidas normalmente estudados.

### 3.2. Propriedades Físico-químicas

O glifosato, com fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  e massa molecular de 169,1 g/mol, é comercializado na forma de sal de isopropilamônio, que adiciona o grupo  $(CH_3)_2CHNH_3^+$  com massa molecular de 228,2 g/mol (FERREIRA, 2015). Em condições ambientais, tanto o glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos e altamente solúveis em água (12 g/L a 25 °C para o glifosato). Por outro lado, são praticamente insolúveis em solventes orgânicos comuns, como acetona e etanol. O glifosato possui um ponto de fusão de 230 °C e uma densidade aparente de 0,5 g/cm<sup>3</sup>. Além disso, ele é bastante estável mesmo na presença de luz e em temperaturas elevadas, acima de 60 °C (FERREIRA, 2015). Os valores de pK (constantes de dissociação ácida) encontrados na literatura para o glifosato são: pK<sub>1</sub> = 0,8; pK<sub>2</sub> = 2,16; pK<sub>3</sub> = 5,46; pK<sub>4</sub> = 10,14 (JUNIOR et al., 2002). Essas constantes indicam o grau de dissociação do herbicida em função do pH. A Figura 1 ilustra essa relação, mostrando como o glifosato se comporta em diferentes faixas de pH.

Figura 1: Grau de dissociação do glifosato construído a partir dos valores de Ka



Fonte: Junior et al., 2002.

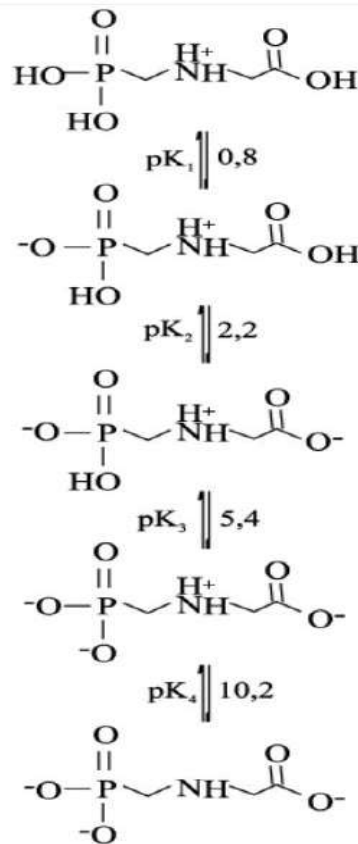
No gráfico, observa-se que em pH abaixo de 0,8, a maioria das moléculas de glifosato se apresenta com uma protonação no sítio da amina. No pH 0,8, que corresponde ao valor da primeira constante de dissociação, metade das moléculas terá essa protonação e as demais terão uma dissociação no grupo fosfato. Entre o pH 0,8 e o pH 2,2, prevalece a forma molecular com uma dissociação ( $-\text{PO}_2\text{H}^-$ ) e uma protonação ( $-\text{NH}_2^+$ ). No pH 2,2, 50% do composto terá duas dissociações, embora a protonação no grupamento amina seja mantida. Entre o pH 2,2 e o pH 5,4, o herbicida se mostra principalmente na forma com duas dissociações, e em pH 5,5, 50% das moléculas apresentam três dissociações. A partir do pH 5,5 até o pH 10,2, ocorrem três dissociações. Nesse intervalo, as formas com três e quatro dissociações estão presentes, e então o glifosato se apresenta totalmente dissociado acima do pH 11,0 (FERREIRA, 2015).

Assim como os aminoácidos, a molécula de glifosato apresenta um comportamento zwitteriônico, ou seja, o grupo carboxílico é mais ácido que o grupo amônio em sua estrutura. No caso do glifosato, os grupos fosfato e carboxílico são mais ácidos que o grupo amônio (JUNIOR et al., 2002).

Junior et al. (2002) descrevem a dissociação do glifosato levando em consideração esse comportamento zwitteriônico. Nas primeiras etapas de dissociação, o glifosato perde os hidrogênios ligados aos átomos de oxigênio, e somente na última etapa ocorre a dissociação do hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio. A Figura 2 ilustra as etapas de dissociação previstas em função do pH.



Figura 2: Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico



Fonte: Junior et al., 2002.

A degradação do glifosato por microrganismos, geralmente, segue duas rotas metabólicas. Em uma delas, a quebra é feita na ligação carbono-nitrogênio, gerando como metabólito principal o AMPA que, posteriormente, é degradado em dióxido de carbono e amônia. Na outra rota catabólica, produz sarcosina como metabólito através da quebra da ligação carbono-fósforo (MORAES & ROSSI, 2010).

### 3.3. Comportamento no meio ambiente

Quando um herbicida é utilizado, espera-se que ele tenha um tempo de ação específico e que desapareça rapidamente do ambiente (GEBLER & SPADOTTO, 2004). Durante a aplicação, uma parte do herbicida não atinge o alvo desejado e é depositada no ambiente, a partir desse momento, ocorrem processos que determinam o seu destino. O glifosato pode formar complexos estáveis com íons metálicos presentes na água, como o cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e o magnésio (Mg<sup>2+</sup>), o que pode reduzir a sua disponibilidade e atividade herbicida, além da absorção dos íons pelas plantas (CAKMAK et al., 2009). Além disso, o glifosato pode ser sorvido por sedimentos ou partículas em suspensão na água e no solo, resultando na sua

remoção do meio líquido e limitando sua movimentação. A absorção e o metabolismo do glifosato por plantas também são processos relevantes (PRATA et al., 2003).

Esses processos de interação do glifosato com o ambiente são importantes para entender o destino e a persistência do herbicida, bem como seus potenciais impactos no ecossistema. Estudar e compreender esses processos é fundamental para desenvolver estratégias de manejo ecologicamente corretas e minimizar os impactos ambientais associados ao uso do glifosato.

### ***3.3.1. Presença no solo***

A interação entre herbicidas, sedimentos e água no solo ocorre por meio de um processo dinâmico físico-químico chamado sorção (MORAES & ROSSI, 2010). Essas informações sobre a sorção e a mobilidade do glifosato no solo são importantes para compreender como esse herbicida interage com o ambiente, permitindo a adoção de práticas de manejo mais adequadas e minimizando o risco de contaminação de águas subterrâneas e outros ecossistemas. Esse processo está relacionado às características dos sólidos presentes no sistema, como tamanho e distribuição de partículas, tipo de solo e matéria orgânica, capacidade de troca de cátions e ânions, bem como às propriedades do herbicida, como solubilidade em água e coeficiente de partição octanol-água (PRATA et al., 2003). A persistência do glifosato no solo pode variar significativamente, pois, quando a molécula do herbicida é aplicada no solo, ela está sujeita a processos de degradação e/ou adsorção (MORAES & ROSSI, 2010, PRATA et al., 2003, TONI et al., 2006).

No caso do glifosato, a sorção no solo ocorre em duas fases. A primeira fase é praticamente instantânea e contribui para a retenção de mais de 90% do herbicida aplicado. A segunda fase é um pouco mais lenta, mas ainda ocorre em um tempo relativamente curto, em torno de 10 minutos, tanto em solos de plantio direto quanto em solos de plantio convencional (MORAES & ROSSI, 2010, PRATA et al., 2003). Devido às suas propriedades físico-químicas específicas, o glifosato é considerado imóvel ou ligeiramente móvel no solo. No entanto, a mobilidade do glifosato pode variar dependendo do pH do solo. Quanto maior o pH da solução solo/água, a adsorção de glifosato diminui, devido a repulsão eletrostática entre as cargas negativas tanto do solo como da superfície do solo (TONI et al., 2006).

Por outro lado, o metabólito do glifosato, o AMPA, decompõe-se rapidamente no solo, resultando em baixo impacto por lixiviação. Isso significa que o AMPA geralmente não se

move significativamente através do perfil do solo, permanecendo próximo à área onde o glifosato foi aplicado (SOLOMON & THOMPSON, 2003).

Estudos realizados por Locke et al. (2008) indicam que a fotodegradação e a degradação química não desempenham um papel significativo na dissipação do glifosato no solo. O glifosato apresenta alta capacidade de adsorção no solo, e essa propriedade tem sido objeto de muitos estudos para entender os mecanismos de ligação entre o glifosato e o solo (HARRIS, 1995). Os mecanismos mais comuns envolvem a troca de ligantes com óxidos de ferro e alumínio presentes no solo, além da formação de pontes de hidrogênio com substâncias húmicas encontradas no solo (SCORZA & FRANCO, 2014). O glifosato também pode se ligar a silicatos, óxidos, materiais não cristalinos e matéria orgânica presente no solo (SEVERINO & SILVA, 2012).

A adsorção do glifosato ocorre de maneira rápida, geralmente nas primeiras quatro horas após a aplicação, e reduz a concentração do herbicida na fase solúvel do solo (FRANZ et al., 1997). Isso resulta em uma diminuição da disponibilidade biológica do glifosato, acelera a velocidade de degradação química do herbicida ou simplesmente retarda seu movimento por lixiviação através do solo (TONI et al., 2006).

Após ser adsorvido, o glifosato pode permanecer no solo como um resíduo ligado, persistindo no ambiente até que seja completamente mineralizado, o que pode levar dias ou meses, dependendo das características do solo, como textura, pH, conteúdo de carbono orgânico, entre outros fatores (TONI et al., 2006). No entanto, é importante ressaltar que a adsorção do glifosato pode ser reversível em certas circunstâncias, o que significa que ainda pode apresentar atividade residual para algumas espécies vegetais, como *Agrostis tenuis*, *Medicago sativa* e *Trifolium pratense* (MORAES & ROSSI, 2010).

Em solos florestais, Veiga e colaboradores (2001), observaram que a concentração de glifosato e AMPA diminuiu ao longo de 8 semanas após o tratamento e, um mês depois, a concentração era muito baixa. Além disso, a concentração do herbicida foi maior nos horizontes mais profundos do solo, enquanto nas camadas mais superficiais a concentração na solução foi menor devido à degradação pelos microrganismos presentes na superfície.

### **3.3.2. Efeito em macro e micro-organismos do solo**

A presença de defensivos agrícolas no solo pode afetar a viabilidade da microbiota, estimulando ou inibindo o crescimento de certas espécies. Repetidas aplicações de glifosato podem causar efeitos negativos no crescimento de populações de bactérias e alteração em

bactérias que participam dos ciclos de carbono e nitrogênio (ANDRIGHETTI et al., 2014; ALLEGRIINI et al., 2017). Além disso, foi identificado, em um estudo de Tejada (2009), que as enzimas beta-glicosidase e fosfatase têm suas atividades reduzidas em solos com presença de glifosato em comparação com solos controle.

Alguns estudos, como os desenvolvidos por Arantes e colaboradores (2007) e Andréa e colaboradores (2003), observaram que o glifosato reduziu a atividade microbiana em diferentes tipos de solo (Neossoloquartzarênico e Latossolo vermelho), independentemente do uso de calagem. Efeitos semelhantes foram encontrados em estudos desenvolvidos por Busse e colaboradores (2001), que avaliaram fungos e bactérias do solo, indicando efeitos tóxicos no crescimento populacional e na diversidade metabólica após o uso contínuo do glifosato por longos períodos (9 a 13 anos).

Em relação a bactérias fixadoras de nitrogênio, que são responsáveis por transformar o nitrogênio em uma forma utilizável pelas plantas, Maly e colaboradores (2006) observaram diferentes comportamentos por estirpes de *Bradyrhizobium* spp., o que leva a crer que não só o glifosato em si, mas também outros componentes da sua formulação podem impactar no impacto a esses microrganismos.

Estudos realizados por Andréa e colaboradores (2003) demonstraram que a presença de minhocas no solo não influencia a dissipação do glifosato no solo, mas ocorre bioacumulação do herbicida nas minhocas com o aumento do tempo em que elas permanecem no solo tratado. No entanto, em outros estudos com minhocas, observou-se que o glifosato não é diretamente tóxico para elas. A maioria dos organismos vivos, exceto as plantas, não possui a via metabólica do ácido chiquímico e, portanto, não são afetados diretamente pelo glifosato (VERREL & VAN, 2004).

Em contrapartida, a atividade microbiana desempenha um papel importante na presença e degradação do glifosato no solo. A degradação do glifosato no solo é rápida e é realizada por uma variedade de microrganismos que utilizam o produto como fonte de energia, fósforo, nitrogênio e carbono (SINGH et al., 2020). Existem duas rotas catabólicas principais para a degradação do glifosato, resultando no AMPA como o principal metabólito, e a sarcosina como um metabólito intermediário na rota alternativa (MORAES & ROSSI, 2010). O AMPA é o produto da biodegradação do glifosato em sistemas naturais antes da mineralização final e da quebra do produto em complexos fosfonados, sendo degradado posteriormente em dióxido de carbono e amônia (BARJA & AFONSO, 2005; RUEPPEL et al., 1977).

Em horizontes superficiais do solo ricos em matéria orgânica, a atividade biológica é mais intensa, o que promove a decomposição rápida do herbicida. Por outro lado, em horizontes mais profundos, a degradação do glifosato é mais lenta devido à menor atividade microbiológica nessas camadas (VEIGA et al., 2001).

O glifosato também pode aumentar a suscetibilidade das plantas a doenças causadas por fitopatógenos, como “*dumping-off*” e antracnose (SALAZAR & APPLIEDY, 1982; LIU et al., 1991). No entanto, é importante mencionar que estudos desenvolvidos por Giesy e colaboradores (2000) afirmaram que o glifosato, quando utilizado nas doses recomendadas (máximo de 6,73 kg/ha de produto final), não causa alterações significativas na microbiologia do solo. Os efeitos do glifosato no solo podem variar dependendo das condições específicas de cada ambiente, incluindo o tipo de solo, as doses aplicadas e a frequência de uso do herbicida.

### 3.3.3. *Efeito sobre organismos terrestres*

Estudos como os reportados de Gomez e Sagardoy (1985) observaram que a aplicação de glifosato em doses acima das recomendadas não apresentou efeitos diretos nos microartrópodes do solo. Porém, as composições e densidades das espécies de plantas daninhas foram diretamente afetadas pelo glifosato, o que teve efeitos indiretos nos microartrópodes.

Em relação aos insetos, Jackson e Pitre (2004) indicaram que certas populações de insetos adultos, como *Cerotoma trifurcata*, *Spissistilus festinus* e larvas de *Plathypena scabra* e *Anticarsia gemmatalis*, não foram afetadas pelo uso de glifosato. Outro estudo verificou que a fecundidade e mortalidade do inseto *Geocoris punctipes* exposto ao glifosato na cultura da soja não mostraram efeitos significativos no período de 10 dias após o tratamento. No entanto, uma redução no número dessa espécie foi observada três semanas após o tratamento, provavelmente devido à remoção das plantas daninhas, o que resultou em uma alteração no habitat. Além disso, estudos indicaram que aplicações de glifosato tiveram efeitos indiretos sobre o habitat de certas espécies, como *Lepthyphantes tenuis*, que foram observados em amostras coletadas no campo 16 meses após a aplicação do herbicida (HAUGHTON et al., 2001; BELL et al., 2002).

Os efeitos do glifosato em animais terrestres, incluindo insetos benéficos, pássaros e minhocas, têm sido objeto de estudo e discussão. Segundo Cox (1995), a exposição ao glifosato pode danificar ou reduzir a população de muitos animais terrestres. Em alguns casos,

o glifosato pode ser diretamente tóxico, mesmo em concentrações baixas, causando a morte de peixes e retardando o desenvolvimento de minhocas. Em outros casos, como mamíferos pequenos e pássaros, o glifosato atua indiretamente, reduzindo a vegetação que serve de alimento e abrigo para esses animais (COX, 1995).

#### 3.3.4. *Presença na água*

Os herbicidas representam um grande risco para o meio ambiente quando são transportados para a superfície da água, visto serem tóxicos para a flora e apresentarem efeitos danosos para a fauna (SIIMES et al., 2006). No caso específico do glifosato, os principais mecanismos de dissipação na água são a degradação microbiológica e a adsorção aos sedimentos. De acordo com Giesy e colaboradores (2000) e Rueppel e colaboradores (1977), embora o glifosato não se degrade rapidamente na água, quando exposto à microbiota presente na água, pode se decompor em outros compostos, como o AMPA. Além disso, pode ocorrer a degradação do AMPA em fosfato inorgânico e  $\text{CH}_3\text{-NH}_3$ , bem como a conversão da sarcosina em glicina.

An e colaboradores (2023) estudaram efeitos da fotodegradação do glifosato em ambientes aquáticos e notaram que a presença de AMPA e fosfato pode estimular o crescimento de algas planctônicas, sinalizando um fator de risco potencial para poluição de corpos d'água.

No ambiente aquático, o glifosato tem uma meia-vida que varia de 7 a 21 dias. Segundo Giesy e colaboradores (2000), a meia-vida do glifosato e do metabólito AMPA em ambientes aquáticos varia de 7 a 14 dias. Em relação à presença de glifosato e do AMPA em águas de irrigação, um estudo realizado por Mattos e colaboradores (2002) constatou que o herbicida ainda estava presente em até 120 dias após a aplicação, concluindo que um nível seguro só seria alcançado 120 dias após a aplicação do glifosato.

Em relação aos efeitos do glifosato em organismos aquáticos, um estudo realizado por Tate e colaboradores (2000) constatou que caramujos aquáticos (*Pseudosuccinae columella*) expostos ao herbicida apresentaram um aumento na frequência de postura de ovos e na concentração de aminoácidos nos tecidos, indicando um efeito estimulante na reprodução. Além disso, outro estudo mostrou que o glifosato não apresentou efeitos adversos em *Daphnia pulex*, um zooplâncton aquático, e em algas *Scenedesmus* spp., e até pareceu estimular o crescimento de algas pela presença de nitrogênio e fósforo do glifosato (BENGTSSON et al., 2004).

Em relação aos anfíbios, um estudo de campo realizado por Relyea (2005) verificou que a aplicação direta de glifosato resultou em altas taxas de mortalidade de larvas e juvenis de anfíbios. Após três semanas da aplicação, houve morte de 96-100% das larvas, e no caso dos juvenis, ocorreu a morte de 68-86% um dia após o tratamento.

É importante ressaltar que os resultados dos estudos podem variar de acordo com as condições específicas de cada ambiente e as espécies estudadas. Portanto, é necessário considerar um conjunto abrangente de evidências científicas para avaliar os efeitos do glifosato em diferentes organismos e ecossistemas.

#### **4. SAÚDE E USO DE DEFENSIVO AGRÍCOLA NO BRASIL**

Assim como a fauna e flora, os seres humanos também podem ser afetados pelo uso de agrotóxicos. A exposição aos defensivos agrícolas é uma realidade cotidiana em nossas vidas, sendo comum o contato com esses produtos tóxicos de alguma forma, e ainda mais comum em atividades ligadas ao processo produtivo: setor agropecuário, saúde pública e trabalhos ligados diretamente com a produção, transporte, comercialização e aplicação dos defensivos agrícolas. (SILVA et al., 2005)

Essa exposição pode ocorrer de três maneiras principais: contaminação ocupacional, contaminação alimentar e contaminação ambiental. (SILVA et al., 2005). A contaminação ocupacional ocorre principalmente entre trabalhadores rurais e agricultores que lidam diariamente com os defensivos agrícolas. Infelizmente, essa contaminação é subestimada e frequentemente negligenciada no Brasil. O número de intoxicações no Brasil ainda é alto e, em alguns estados, tem aumentado anualmente. Por exemplo, no estado de Goiás, o número de casos de intoxicação por defensivos agrícolas aumentou de 116 em 1999 para 547 em 2012, representando um aumento superior a 350% (DUTRA & SOUZA, 2017).

Entre os efeitos agudos e crônicos em seres humanos, destacam-se: dermatite de contato e síndrome tóxica após a ingestão de doses elevadas, que incluem epigastralgia, ulceração ou lesão da mucosa gástrica, hipertermia, anúria, oligúria, hipotensão, conjuntivite, edema orbital, choque cardiogênico, arritmias cardíacas, edema pulmonar não carcinogênico, pneumonite, necrose tubular aguda, elevação de enzimas hepáticas, aumento da quantidade de leucócitos, acidose metabólica e hipercalemia (SEVERINO & SILVA, 2012).

Portanto, a exposição aos defensivos agrícolas é uma preocupação a ser considerada no Brasil, uma vez que, o uso desses compostos muitas vezes tóxicos, podem causar impactos tanto na saúde dos trabalhadores rurais quanto na saúde pública em geral. É essencial que

sejam implementadas medidas de prevenção, fiscalização, segurança e conscientização para reduzir os riscos associados ao uso desses produtos e garantir um ambiente de trabalho seguro para os trabalhadores rurais.

#### 4.1. Toxicidade aguda

A intoxicação aguda ocorre quando uma pessoa é exposta a quantidades significativamente elevadas de substâncias extremamente venenosas por um período de tempo breve, resultando na manifestação rápida de sintomas em apenas algumas horas após a exposição (MELO, 2015).

A toxicidade aguda do glifosato puro é considerada baixa. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dose letal média (LD50) oral do glifosato puro em ratos é de aproximadamente 4.230 mg/kg, enquanto o fabricante (Monsanto) cita uma LD50 de 5.600 mg/kg. Essa baixa toxicidade pode ser atribuída ao mecanismo bioquímico de ação do glifosato em plantas, conhecido como o mecanismo do ácido chiquímico, que não está presente em animais mais complexos. No entanto, o glifosato pode afetar a ação de algumas enzimas em animais. Estudos em ratos mostraram que a injeção de glifosato no abdômen resultou na diminuição da atividade de certas enzimas (JUNIOR et al., 2012).

Apesar disso, alguns componentes das formulações comerciais do herbicida apresentam toxicidade mais elevada do que o ingrediente ativo em si, como o polioxietilenoamina, que pode ser de 2 a 3 vezes mais tóxico que o próprio glifosato. Foi identificada intoxicação aguda em seres humanos devido à ingestão de glifosato, causando prejuízos à saúde gastrointestinal, cardiovascular, pulmonar e renal (ARL, 2021).

#### 4.2. Toxicidade crônica

Já em relação à toxicidade crônica, alguns autores sugerem que o herbicida pode causar defeitos crônicos de nascimento em determinadas espécies de animais quando administrado em doses elevadas e por um período prolongado. A dose diária aceitável por massa corpórea deste composto é relativamente baixa (ADI = 0,05 mg/kg/dia) (JUNIOR et al., 2002). Estudos em ratos mostraram danos ao fígado, inflamação nos rins, diminuição do peso corporal e danos em hepatócitos (BAI & OGBOURNE, 2016). Outrossim, a justiça norte-americana sinalizou uma decisão de que o glifosato é carcinogênico (HODGSON, 2018).



Quanto aos aspectos toxicológicos, o glifosato é irritante dérmico e ocular, podendo causar danos hepáticos e renais quando ingerido. O composto é absorvido por via oral e dérmica, sendo excretado principalmente na urina. No entanto, a excreção biliar é limitada e a eliminação através da respiração é muito baixa (SEVERINO & SILVA, 2012). Outros estudos têm mostrado efeitos do glifosato no sistema endócrino e reprodutivo, afetando a síntese, secreção e ação de hormônios no organismo (DAI et al., 2016).

Em relação ao genoma humano, apesar de serem identificados danos ao DNA em níveis relativamente baixos de glifosato, conforme indicam evidências recentes, foi percebido que esses danos estão associados à citotoxicidade. Portanto, muitos cientistas argumentam que o glifosato não deve ser considerado como uma substância genotóxica, independentemente de a exposição ser direta ou indireta (BAI & OGBOURNE, 2016).

## **5. BIODEGRADAÇÃO DO GLIFOSATO**

O solo é um sistema vivo, dinâmico e heterogêneo, composto por inúmeras associações microbianas em constante transformação. Essas associações são sensíveis a alterações químicas e físicas, como a adição de pesticidas ou substâncias biologicamente ativas, que podem interferir no equilíbrio microbiano (ANDRIGHETTI et al., 2014).

A degradação microbiana é um processo-chave que influencia a dinâmica dos resíduos de pesticidas no ambiente, incluindo sua persistência no solo e sua suscetibilidade à lixiviação (ANDRIGHETTI et al., 2014). O uso intensivo de herbicidas tornou-se uma preocupação ambiental devido aos efeitos prejudiciais desses produtos químicos nos processos biológicos do solo e nos organismos não alvo (AIT BALI et al., 2017).

O termo "biodegradação" refere-se à degradação direta ou indireta de compostos orgânicos por microrganismos, sendo considerada a principal via de decomposição desses produtos no solo. Os microrganismos utilizam esses compostos como substrato por meio de suas enzimas e podem transformá-los em nutrientes e energia para sua sobrevivência (ANDRIGHETTI et al., 2014).

A biodegradação completa ou mineralização envolve a oxidação dos compostos intermediários, que podem ser mais ou menos tóxicos que o composto original, resultando em moléculas mais simples, como água e CO<sub>2</sub>. O catabolismo e o metabolismo microbianos são os principais processos envolvidos na mineralização (ANDRIGHETTI et al., 2014; PRATA et al., 2003).

A rota de degradação mais comum para o glifosato envolve a conversão em ácido aminometilfosfônico (AMPA), que é o principal metabólito, por meio de enzimas como oxidorreduções e transaminases, além do ácido glioxílico, que cliva a molécula do glifosato em ligações diferentes daquela entre o carbono e o fósforo, preservando essa ligação (MORAES & ROSSI, 2010).

Muitos dos métodos descritos na literatura para determinação e separação do glifosato são baseados em técnicas cromatográficas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais comumente utilizada para detectar o glifosato, no entanto, devido à ausência de cromóforos, é necessário derivar o composto para gerar produtos que interajam com a radiação eletromagnética, como radiação colorimétrica UV ou detecção fluorimétrica. Essa técnica apresenta vantagens importantes, como baixos coeficientes de variação, recuperações adequadas e limites de detecção apropriados. (MYERS et al., 2016).

### 5.1. Os microrganismos do solo

Devido à alta diversidade biológica e metabólica, os organismos do solo, principalmente bactérias e fungos, desempenham um papel central na decomposição da matéria orgânica, na produção de húmus, na ciclagem de nutrientes e energia, bem como na produção de compostos complexos que contribuem para a agregação do solo, decomposição de contaminantes (xenobióticos) e controle biológico de pragas e doenças (DICK et al, 2009). Bactérias e fungos são os principais responsáveis pela transformação dos herbicidas no solo, e a taxa de degradação é influenciada pela biomassa microbiana ativa e pela disponibilidade do composto para a biodegradação (AIT BALI et al., 2017).

A biodegradação é o processo biológico de transformação de compostos químicos orgânicos em outras formas. Essa transformação pode envolver alterações estruturais na molécula ou uma série de reações sequenciais que resultam na perda ou alteração da toxicidade da molécula (CARDOSO & ANDREOTE, 2016).

Na biodegradação, os microrganismos apresentam diferentes estratégias de assimilação ou metabolismo do substrato. Essas estratégias incluem o (i) catabolismo, em que o pesticida é utilizado como fonte de energia e nutrientes, resultando no aumento da biomassa microbiana e na redução considerável do resíduo; o (ii) cometabolismo, em que o pesticida não é utilizado como fonte de energia, mas é transformado por reações metabólicas, e o crescimento microbiano requer a presença de um substrato secundário biodegradável como fonte de carbono e energia; a (iii) polimerização ou conjugação, que envolve a combinação de compostos naturais do solo com as moléculas do pesticida ou seus metabólitos; o (v)

acúmulo, que representa a incorporação da molécula original do pesticida pelo microrganismo; e os (iv) efeitos secundários da atividade microbiana, como alterações de pH e potencial redox (ALEXANDER, 1981; MUSUMECI, 1992; ARAÚJO, 2002; DEMICHELLI, 2016).

A gestão da biodegradação de contaminantes, como pesticidas no solo, faz parte de um conjunto de processos e ações chamados de biorremediação, que podem ser utilizados para a transformação biológica de um ambiente contaminado de volta ao seu estado original (THASSITOU & ARVANITOYANNIS, 2001). A biorremediação utiliza organismos (plantas ou microrganismos), especialmente selecionados por suas funções catabólicas, para degradar substâncias tóxicas presentes no solo e na água, transformando o poluente em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes inertes do ponto de vista toxicológico. O objetivo da biorremediação é minimizar o impacto de substâncias persistentes no ambiente, criando condições favoráveis para o crescimento e atividade microbiana (CAPREZ et al., 2002). Existem várias técnicas que podem ser aplicadas, incluindo:

- 1) **Atenuação Natural ou Biorremediação Intrínseca:** Nessa técnica, a microbiota nativa do local é utilizada para realizar a biorremediação. Essa estratégia envolve três eventos principais: (i) a biotransformação dos contaminantes por populações microbianas nativas, (ii) a sorção do contaminante à matriz do solo ou fases minerais, tornando o composto menos biodisponível e, portanto, menos tóxico para os ecossistemas, e (iii) a perda de toxicidade por diluição ou volatilização (FRANKENBERGER & KARLSON, 1991).
- 2) **Bioestimulação:** Essa estratégia é semelhante à Atenuação Natural, mas envolve a adição de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, ao sistema para estabelecer relações adequadas entre carbono, nitrogênio e fósforo. Isso promove o aumento das populações microbianas e, conseqüentemente, aumenta significativamente as taxas de degradação do contaminante (EVANS et al., 2004; TRINDADE et al., 2005).
- 3) **Bioaugmentação:** Essa técnica visa melhorar a capacidade de remoção de contaminantes de uma matriz contaminada por meio da adição de uma linhagem microbiana isolada ou de consórcios de microrganismos potencialmente degradadores. O inóculo utilizado pode ser selecionado do próprio local contaminado (autóctone) ou de outros ambientes impactados (exógeno) (FANTROUSSI & AGATHOS, 2005).

Além da escolha da técnica adequada, o sucesso da biorremediação depende de vários fatores, incluindo a bioquímica e a biodisponibilidade do contaminante, bem como a presença de uma microbiota competente em degradar o poluente (BLACKBURN & HAFKER, 1993).

Estudos têm demonstrado o isolamento de várias espécies de fungos e bactérias, bem como o uso desses microrganismos individualmente ou em associação, para a biorremediação de solos contaminados com defensivos agrícolas.

## 5.2. Possíveis cepas

Ermakova e colaboradores (2010) conduziram um estudo de biorremediação de solos contaminados com glifosato. Inicialmente, eles isolaram cepas bacterianas resistentes ao glifosato de outras amostras de solo contaminado com esse defensivo agrícola. As bactérias isoladas foram *Arthrobacter* sp. e *Ochrobactrum anthropi*. Em seguida, as suspensões microbianas contendo 10<sup>6</sup> UFC/g de cada cepa foram introduzidas no solo, enquanto um grupo de controle não recebeu a adição de microrganismos. Os resultados mostraram que, ao final de 28 dias, *Arthrobacter* sp. reduziu o teor de glifosato em 75,2%, enquanto *O. anthropi* reduziu em 61,5%. Os autores concluíram que a introdução de espécies degradadoras de glifosato e a manutenção de sua alta atividade de degradação podem reduzir a toxicidade de solos contaminados com esse herbicida, desde que as condições adequadas sejam otimizadas.

Em outro estudo, Dellamatrice e colaboradores (2012) utilizaram os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* para remediar um solo agrícola contaminado com os defensivos agrícolas paraquat, clorotalonil e deltametrina. Observou-se a degradação completa do paraquat após 42 dias de incubação com a aplicação do surfactante. O clorotalonil foi degradado majoritariamente por *P. chrysosporium* (85%) a partir de 30 dias de incubação, enquanto a deltametrina não foi significativamente degradada em relação ao grupo controle.

Silva e Rondon (2013) utilizaram o fungo *Fusarium moliniforme* isolado de *Bambusa vulgaris* na biorremediação de Roundup®. Foram inoculados 5x10<sup>5</sup> conídios/ml do fungo em 12 mL de Roundup®, adicionado de solução nutritiva. Após 21 dias de incubação, observou-se um aumento significativo na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em comparação com o grupo controle (Roundup® com acréscimo de água destilada), indicando a importância da bioestimulação inicial por meio do acréscimo de nutrientes no processo. Concluiu-se que o fungo *F. moliniforme* se adaptou bem na presença dos contaminantes e que pode ser uma alternativa de eliminação de glifosato do meio.

Já em outro estudo, Gonçalves (2013) investigou a biorremediação de solo contaminado com terbutilazina por meio da bioadição de *Pseudomonas* sp. O experimento foi realizado em laboratório utilizando solo sem histórico de aplicação de agrotóxico, ao qual foi adicionada terbutilazina (0,10 mg/g de solo). As cepas de *Pseudomonas* sp. foram inoculadas

nesse solo, com concentrações de  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^7$  e  $3 \times 10^8$  UFC/g de solo. Os resultados demonstraram que a mineralização da terbutilazina aumentou proporcionalmente à concentração de *Pseudomonas* sp., atingindo cerca de 20%, 40% e 60% de mineralização para as concentrações de inoculação mencionadas, respectivamente.

O gênero fúngico *Aspergillus* foi estudado devido ao seu potencial na degradação do glifosato através das suas enzimas hidrolíticas em solo amazônico (NOVAKI, 2009). Algumas pesquisas têm demonstrado sua eficácia na degradação do glifosato e seus subprodutos, o que os torna candidatos promissores para aplicação em processos de biorremediação (CORREA et al., 2023). No mais, pensando no contexto da atuação dos microrganismos após a degradação do glifosato, foi verificado com os fungos do gênero *Aspergillus* participam da purificação de solos contaminados com metais pesados, toxinas microbianas e derivados de óleo (NAYAK et al., 2020)

Dentro do gênero *Aspergillus*, foi verificado que as espécies *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* possuem capacidade de degradação do glifosato (SPINELLI et al., 2021; CORREA et al., 2023). Além disso, não há ainda nenhuma patente utilizando exclusivamente esses dois microrganismos, conforme será apresentado na prospecção tecnológica desse trabalho, sendo, então, uma possibilidade de produto inovador para o mercado de biodegradação de glifosato.

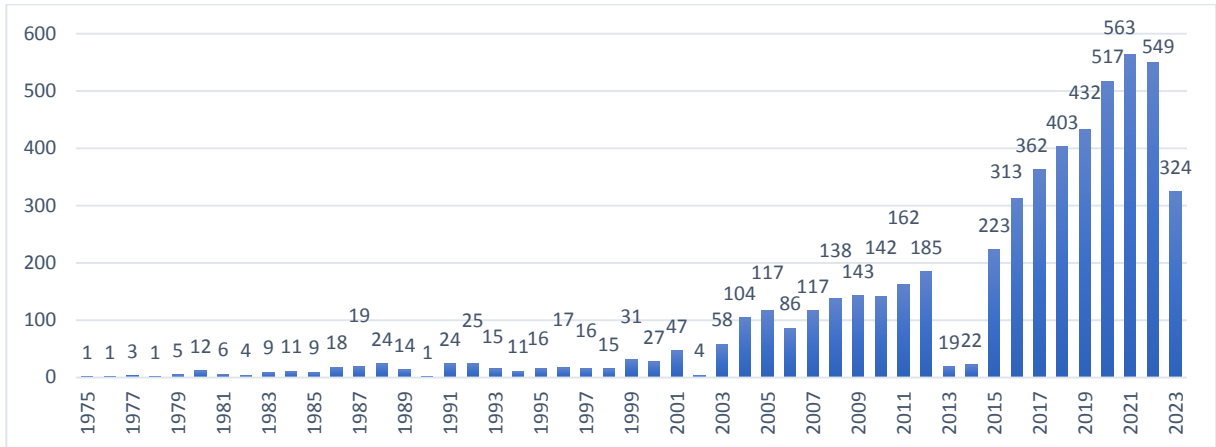
## 6. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

O glifosato, como já discutido amplamente no presente documento, é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura, porém, sua persistência no ambiente e potencial impacto têm despertado preocupações. O uso de enzimas no setor de biotecnologia é amplo, mais especificamente nos seguintes setores: indústria de amido (45%), detergentes (34%), têxteis (11%), polpa e papel (1,2%) (STROH, 1998)

A fim de estudar o volume de publicações de artigos e patentes sobre os temas estudados neste trabalho, utilizou-se as bases Scopus (Elsevier) e PatentScope.

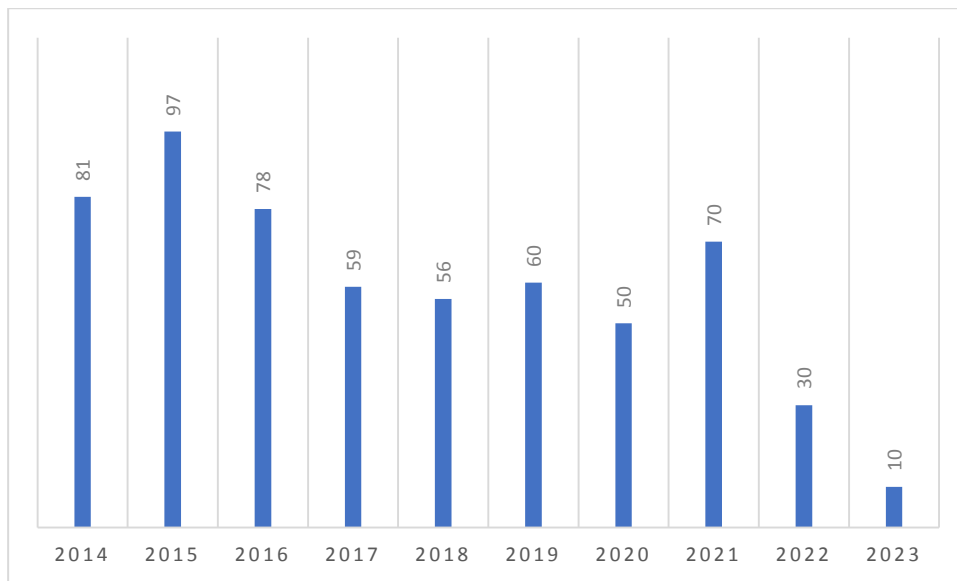
Buscando-se a palavra-chave “glifosato” nos campos resumo, título e palavras-chave, encontrou-se 5.365 artigos e 591 patentes. A repartição anual destes documentos ao longo dos anos, pode ser vista nas figuras 3 e 4.

**Figura 3: Artigos publicados com a palavra-chave “Glifosato”**



Fonte: Scopus, 2023.

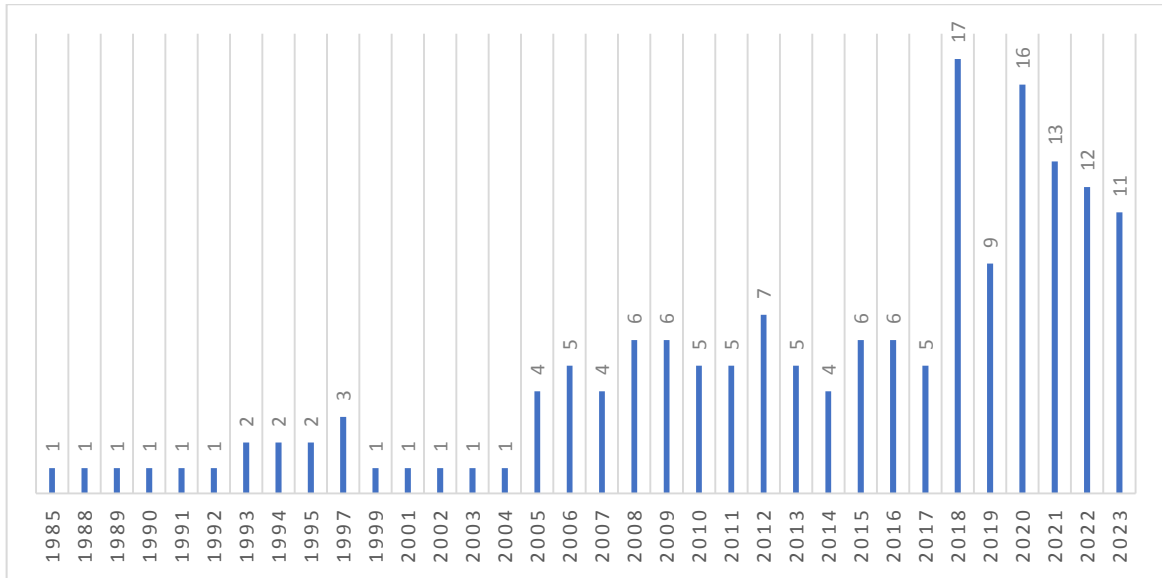
**Figura 4: Patentes registradas por ano com a palavra-chave “Glifosato”**



Fonte: Patentscope, 2023.

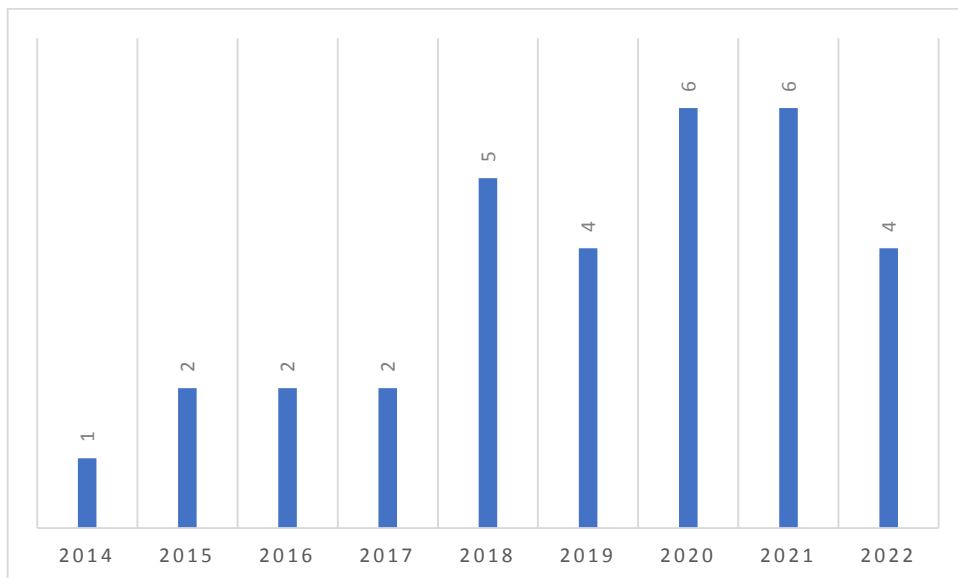
Ao realizar a busca pela palavra-chave “Biorremediação + Glifosato” nos campos resumo, título e palavras-chave, foram encontrados 166 artigos e 32 patentes, distribuídas ao longo dos anos conforme as Figuras 5 e 6.

**Figura 5: Artigos publicados com as palavras-chave “Biorremediação” + “Glifosato”**



Fonte: Scopus, 2023.

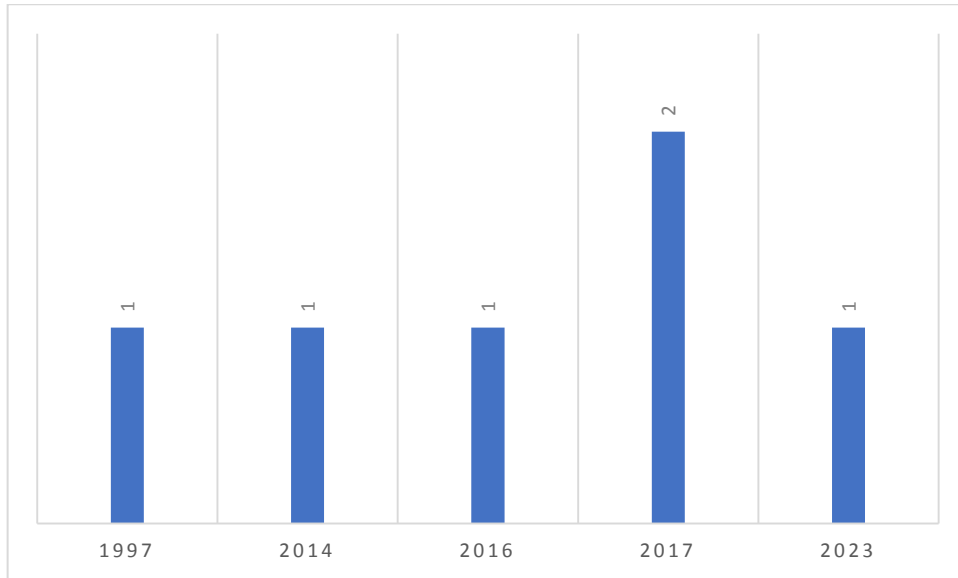
**Figura 6: Patentes publicadas com as palavras-chave “Biorremediação” + “Glifosato”**



Fonte: Patentscope, 2023.

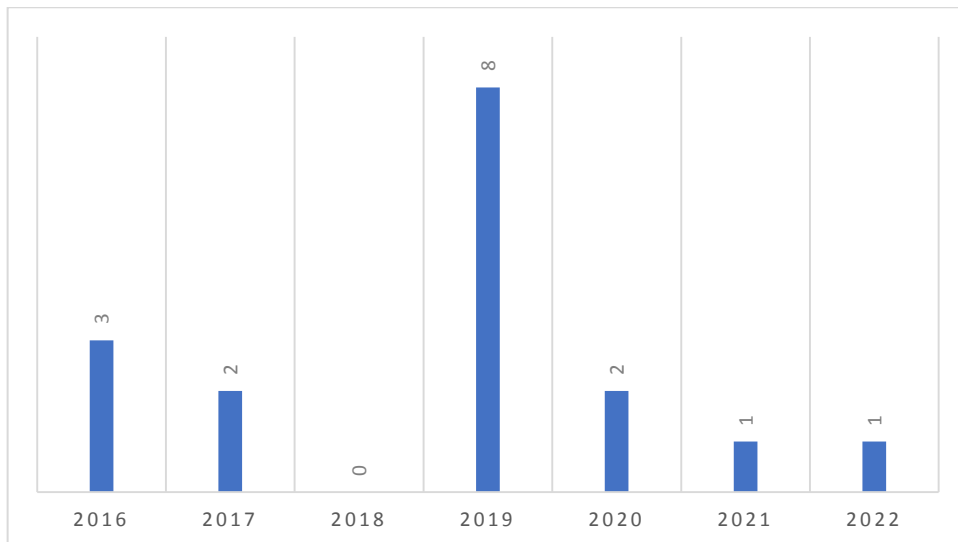
Ao realizar a busca pela palavra-chave “Biorremediação + Glifosato” nos campos resumo, título e palavras-chave, foram encontrados 6 artigos e 17 patentes, distribuídas ao longo dos anos conforme as Figuras 7 e 8.

**Figura 7: Artigos publicados com as palavras-chave “*Aspergillus Oryzae e niger*” + “Degradação”**



Fonte: Scopus, 2023.

**Figura 8: Patentes registradas por ano com palavras-chave “*Aspergillus Oryzae e niger*” + “Degradação”**



Fonte: Patentscope, 2023.

Não foram encontradas patentes contendo as palavras-chave “*Aspergillus oryzae e niger*” + “Degradação” + “Glifosato”.



Foram encontrados 11 artigos científicos nos quais os autores demonstraram o alto potencial dos fungos, não só na degradação do glifosato como também atuante de forma benéfica para raízes das plantas.

## 7. MICRORGANISMOS ALVO

Inicialmente, considerou-se a utilização de fungos pelo seu alto potencial degradativo, capacidade de sorção e alta resistência em condições adversas. Os fungos filamentosos têm seu crescimento direcionado às fontes de carbono, devido ao alongamento das hifas, e, através da emissão de enzimas degradadoras, otimizando seu contato com o contaminante, aumentando sua biodisponibilidade e biodegradação (ROSATO, 1998; PEREIRA & FREITAS, 2012).

Os gêneros mais conhecidos na produção de ácidos orgânicos para solubilização de fósforo são *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., os quais também foram identificados como microrganismos que possuíam não só tolerância ao glifosato, mas também tiveram crescimento estimulado (SAILAJA & SATYAPRASAD, 2006; COUTINHO et al., 2012; CORREA, 2013). Eman e colaboradores (2013) identificaram o gênero *Aspergillus* sp. como o melhor degradador em diferentes concentrações de glifosato (0 a 300 mg/L).

Além dos estudos de Eman e colaboradores, outros estudos foram realizados, focando em espécies isoladas do gênero *Aspergillus* sp., além de outros gêneros (CARRANZA et al., 2017; SPINELLI et al., 2021; CORREA et al., 2023). Dentre as espécies encontradas, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* se destacam pela capacidade de adaptação a diversas condições ambientais e pela alta capacidade de degradação, não só do glifosato, mas também seus metabólitos (ADELOWO et al., 2014; FU et al., 2017; CARRANZA et al., 2017)

O *Aspergillus oryzae*, nomeado desta forma devido a sua associação ao arroz (*Oryza sativa*) possui uma temperatura ótima de 32 a 36°C, não conseguindo crescer acima dos 44°C. Possui um pH ótimo entre 5 e 6, mas pode germinar entre os pH 2 e 8. Seu crescimento em agar geralmente é branco inicialmente, tornando-se amarelo esverdeado após a formação de muitos conídios (BATT & TORTORELLO, 2014).

Já o *Aspergillus niger* destaca-se por crescer em uma larga faixa de temperatura (6°C a 47°C, porém com temperatura ótima entre 35°C e 37°C), tolerante a uma larga faixa de pH (1,5 – 9,8) e em ambientes de baixa ou alta umidade relativa (podendo ser tolerante até em

faixas de 90 a 100%), sendo um ótimo solubilizador de fosfato (BLACKBURN, 2006; SEMOVA et al., 2006).

Por serem espécies de fungos já utilizadas amplamente pela indústria, pela sua capacidade de degradar o glifosato, pela ampla resistência às diferentes condições ambientais e sua simbiose com as plantas, espera-se que um bioproduto composto por estes microrganismos se apresente como uma ótima alternativa para o agronegócio brasileiro.

## 8. PROPOSTA DE BIOPRODUTO

### 8.1. Proposta de fórmula do bioproduto a base de fungos filamentosos

Com base nas informações presentes ao longo dos capítulos da monografia, foi elaborada uma proposta para o desenvolvimento de um produto capaz de degradar o Glifosato e realizar a biorremediação de áreas contaminadas. Esse processo de biorremediação seria conduzido por microrganismos eficientes, como os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, que são capazes de resistir às condições adversas encontradas no campo. Ademais, devido à incerteza das condições ótimas de trabalho, optou-se por incluir ambos os microrganismos, em vez de apenas um deles, a fim de se evitar o risco de ineficiência do bioproduto em função do local de aplicação.

No contexto regulatório, a multiplicação de microrganismos em fazendas é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Decreto nº 6.913/2009. Esse decreto estabelece que produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica, produzidos exclusivamente para uso próprio, estão isentos de registro. No entanto, estão em andamento esforços para a implementação de uma legislação mais específica para biofábricas, incluindo o registro e fiscalização das propriedades que utilizam essa técnica, bem como o apoio à pesquisa e capacitação na área (BRASIL, 2004).

No entanto, devido à natureza dos microrganismos vivos, a logística de transporte desses produtos até as propriedades requer cuidados e recursos significativos para manter sua viabilidade. Esses processos são onerosos e podem inviabilizar o uso em determinadas regiões e locais. Nesse sentido, a aquisição das cepas desses microrganismos e sua multiplicação nas propriedades, conhecido como "on-farm", pode ser uma alternativa eficiente para os produtores (SANTOS et al., 2020).

A composição do meio de produção é um parâmetro de extrema importância para o crescimento celular e a produção de enzimas microbianas, uma vez que pode conter substâncias que afetam os fenômenos de indução, repressão catabólica, inibição da produção e os mecanismos de liberação de proteínas em caso de enzimas extracelulares (BIOKAR, 2017).

Um exemplo de meio de cultura é o Ágar Extrato de Malte acrescido de 2% de Tween 80, no qual as colônias dos fungos apresentam uma coloração escura e uniforme. Nesse meio, o extrato de malte, que é rico em carboidratos, fornece todos os nutrientes necessários para o crescimento e metabolismo dos fungos. Além disso, a acidez do meio inibe o crescimento da maioria dos microrganismos contaminantes (MERK, 2023).

Quanto à concentração mínima de microrganismos, é recomendado que seja de pelo menos  $1,0 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, mantendo a garantia registrada até a data de vencimento. No entanto, é admitida uma tolerância de até 20% em relação à concentração de UFC por grama ou mililitro de produto, conforme os resultados analíticos obtidos (BRASIL, 2004).

Em relação à natureza física do produto proposto, ele será composto principalmente por partículas sólidas que fornecem todas as condições necessárias para a sobrevivência dos microrganismos. O fator de diluição recomendado será o de  $1 \times 10^{-5}$ , conforme estabelecido pelo Decreto n° 4.954/2004, que regulamenta bioinoculantes e biofertilizantes.

## 8.2. Composição

A proposta do produto consiste em um pó preparado liofilizado, com composição contendo 10% de cepas dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, juntamente com outros nutrientes. Os frascos do produto teriam uma capacidade de aproximadamente 1,0 kg.

A composição do bioproduto inclui os seguintes componentes:

- **Ágar Extrato de Malte (com peptona micológica):** O Ágar Extrato de Malte é um meio de crescimento geral rico em nutrientes, adequado para o cultivo de microrganismos sensíveis. Ele possui um pH ácido, sendo utilizado para isolamento, cultivo e manutenção de leveduras e bolores. O extrato de malte fornece polissacarídeos como fonte de energia, enquanto a peptona serve como fonte de nitrogênio. O ágar atua como agente solidificante, permitindo um crescimento eficiente com morfologia e pigmentação típicas. Nesse caso, recomenda-se o uso de um meio de extrato de malte modificado para o cultivo seletivo de espécies de *Aspergillus* (MERK, 2023).

- **Amido de milho:** O amido de milho é uma fonte rica de carbono comprovada por outros estudos para intensificar a atividade das enzimas digestivas fúngicas. Sua adição ao meio fornece nutrientes para o início do crescimento dos fungos, sendo uma opção mais econômica (SACHETTI, 2016).
- **Tween 80:** O Tween 80 é utilizado como antiespumante durante o processo de cultivo em batelada dos fungos. Isso ocorre porque as bolhas podem ser prejudiciais às células microbianas. Além disso, o Tween 80 atua na fase final do processo, facilitando a dispersão dos esporos dos fungos (BIOKAR, 2017).
- **10% de cepas:** O produto proposto deve conter uma concentração mínima de  $1,0 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, de acordo com as diretrizes da legislação de produtos biológicos. Essa concentração garante a viabilidade e eficácia das cepas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* presentes no produto (BRASIL, 2004).

Essa composição visa fornecer as condições adequadas para o crescimento, sobrevivência e atividade enzimática dos fungos responsáveis pela degradação do glifosato. Além disso, as especificações do produto, como concentração mínima de microrganismos e fatores de diluição, são determinadas pela legislação e garantem sua qualidade e efetividade.

### 8.3. Etapas de produção

#### 8.3.1. Cultivo dos microrganismos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*

1. **Preparo do meio de cultura:** O meio de cultura pode ser preparado seguindo os seguintes passos: Adicionar 90 kg de Ágar Extrato de Malte em um recipiente adequado e acrescentar 2% de Tween 80. Em seguida, completar o volume com água destilada até atingir 200 litros. O meio de cultura deve ser autoclavado a 125°C por 20 minutos para garantir a esterilização adequada.
2. **Inóculo de cepas e cultivo:** Para iniciar o cultivo, despeje 100 litros do meio de cultura esterilizado em um biorreator adequado. Em seguida, adicione os 30 litros contendo as cepas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* ao biorreator. Certificar de tampar o reator de forma adequada, permitindo a passagem de oxigênio. Em seguida, ligue a agitação do biorreator a 150 rpm e aqueça-o previamente a 25°C.

Essas etapas garantem a preparação correta do meio de cultura e a inoculação das cepas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* no biorreator. O controle adequado da temperatura, agitação e esterilização são fundamentais para um cultivo eficiente dos microrganismos.

**Figura 9: Imagem ilustrativa de um Biorreator totalmente automatizado, do fabricante SYSBIOTECH, capacidade operacional de 500L**



**Fonte: SYSBIOTECH, 2023.**

- 3. Monitoramento de crescimento:** É recomendado monitorar o crescimento das cepas a cada 2 horas utilizando um espectrofotômetro. Isso permitirá acompanhar a absorbância da cultura ao longo do tempo, o que indica o crescimento dos microrganismos. O monitoramento deve ser realizado até que as cepas parem de crescer devido ao esgotamento dos nutrientes presentes no meio de cultura. Isso indica que a batelada foi finalizada.
- 4. Separação de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* do meio de cultura:** Após o término da batelada, é necessário separar as cepas do meio de cultura. Para isso, recomenda-se realizar uma centrifugação do meio de cultivo em uma centrífuga,

utilizando uma velocidade de 360 rpm por 10 minutos. Essa centrifugação permitirá que a maior parte da massa seja separada do sobrenadante. Em seguida, é recomendado realizar uma etapa de ultrafiltração utilizando membranas com poros de 0.25  $\mu\text{m}$ . Essa etapa auxiliará na separação dos microrganismos do meio de cultura residual.

Essas etapas garantem o monitoramento adequado do crescimento das cepas e a separação eficiente dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* do meio de cultura. A utilização do espectrofotômetro e da centrifugação com subsequente ultrafiltração são técnicas comuns para esses procedimentos.

**Figura 10:** Imagem ilustrativa de uma centrífuga refrigerada, modelo PLUS ULTRA SPEED VITCHLAB



Fonte: VITCHLAB, 2023.

5. **Liofilização/inativação:** Por fim, deve-se realizar a liofilização, para transformar as cepas em um pó, que será misturado com os outros componentes do produto final. Para isso, deve-se estruturar uma curva de congelamento e aquecimento ideal via testes laboratoriais para os microrganismos propostos a fim de que, durante esse processo, as paredes celulares dos micro-organismos se mantenham intactas, evitando sua destruição que ocorreria durante uma evaporação convencional.

A liofilização é uma técnica eficaz para a preservação de microrganismos, pois permite que sejam mantidos viáveis por longos períodos, sem comprometer sua integridade celular. Essa metodologia é amplamente utilizada em diversas áreas, incluindo a indústria farmacêutica, alimentícia e de pesquisa, garantindo a estabilidade e a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento e o transporte.

**Figura 11: Imagem ilustrativa de um liofilizador industrial F-50**



**Fonte:** LABOSISTEMA, 2023

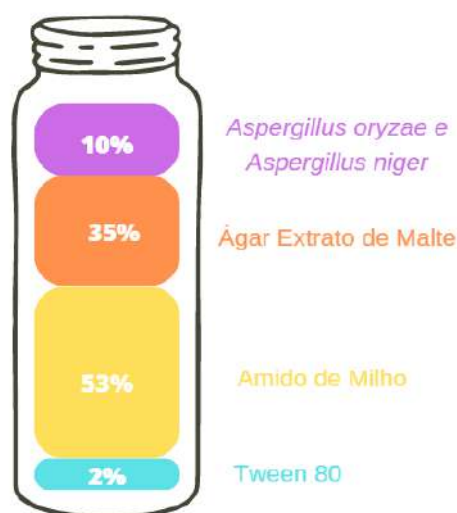
### ***8.3.2. Produção do produto final***

Após a conclusão da batelada e os passos de purificação subsequentes, o próximo passo será a adição dos componentes para a formulação final do produto. Essa formulação consiste em uma base contendo os nutrientes necessários para ativar os esporos adormecidos de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* quando o produto for hidratado no meio ambiente. O pó preparado será uma mistura desses componentes, incluindo 10% de cepas dos fungos, juntamente com outros nutrientes, como 53% de amido de milho, 2% de Tween 80 e 35% de

Ágar Extrato de Malte. A quantidade total do produto será de 1,0 kg, o qual será envasado em frascos de polietileno.

Essa formulação foi cuidadosamente desenvolvida para fornecer os nutrientes essenciais que promoverão a ativação e o crescimento dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, permitindo que eles desempenhem seu papel na degradação do glifosato no meio ambiente. Os frascos de polietileno garantirão a proteção adequada do produto, mantendo sua qualidade e viabilidade durante o armazenamento e o transporte.

**Figura 92: Representação gráfica de porcentagem de componentes do bioproduto proposto**



**Fonte:** Desenvolvido pelos autores, 2023.

### **8.3.3. Modo de utilização do produto**

Para garantir um bom aproveitamento do produto, que é um produto biológico com algumas peculiaridades, é importante fornecer instruções claras ao consumidor para o manuseio e aplicação do produto, pois há riscos biológicos que podem causar aspergilose (PIANETTI FILHO et al., 2005). Seguem as instruções recomendadas:

1. Utilizando luvas e máscara adequadas para risco biológico e em um ambiente fechado, abra o frasco contendo o pó biológico com cuidado, garantindo que não haja contaminação externa;



2. Dilua o pó biológico em água destilada numa proporção de 1g de produto para 20 mL de água e garanta uma solução homogênea para melhor aplicação (FUNGICULTURA, 2023);
3. Espalhe sobre o solo contaminado com glifosato, especialmente nas raízes das plantas. Evite aplicar o produto sobre as folhas. Recomenda-se manter o solo úmido para garantir a atividade dos fungos;
4. Armazene o frasco firmemente fechado em um local fresco, à temperatura ambiente. Evite expor o produto ao calor excessivo, pois isso pode comprometer a viabilidade dos fungos.

Ao seguir essas instruções, o consumidor estará fornecendo as condições adequadas para que os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* realizem a degradação do glifosato no solo contaminado. É importante respeitar as orientações de aplicação e armazenamento para garantir a eficácia do produto.

Certamente, as limitações de que esta atividade seja replicada para grandes superfícies impedem que essas instruções possam ser seguidas completamente. Portanto, a melhor forma de otimizar essa atividade seria através de um pulverizador, para que a aplicação do produto atinja maiores áreas, e, posteriormente, realizar irrigação das plantações a fim de ativar os fungos.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A popularidade e o uso do glifosato têm levado a um potencial aumento na poluição ambiental, devido ao acúmulo dessa substância no solo durante o processo de aplicação. Portanto, é importante conhecer, estudar e divulgar as técnicas de biorremediação de solos contaminados por esse agente.

Na literatura, é conhecido que os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* possuem capacidade de degradação do glifosato, sem acumular seus produtos de degradação no solo. A aplicação de um bioproduto utilizando esses fungos também favorece uma relação simbiótica com as raízes das plantas locais. Portanto, essa abordagem se mostra uma boa opção para a biorremediação de áreas afetadas pelo uso de glifosato.

Apesar disso, não foram encontrados produtos que utilizassem exclusivamente os fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* em sua composição para a biorremediação. Além disso, apenas 11 estudos científicos antigos associaram esses fungos, o glifosato e a biorremediação. Portanto, consideramos que o produto proposto pode se tornar uma nova e promissora opção no mercado, trazendo benefícios não apenas na degradação do glifosato, mas também na promoção da simbiose com as raízes das plantas. Esses benefícios foram comprovados ao longo de pesquisas publicadas por autores que destacaram esse potencial.

Por fim, vale destacar que os materiais propostos, composição e formas de produção são apenas uma sugestão de proposta, onde não foi levado em consideração as especificações de cada local possivelmente afetado, tampouco o custo das matérias primas e processos produtivos envolvidos. Em caso de tentativa de elaboração de um produto com as mesmas características, deve haver uma pesquisa mais detalhada em relação a esses temas, além de definição dos melhores locais e necessidade da degradação do glifosato, visto que foi observado que seu impacto pode não ser grave dependendo do tipo de solo, cultura, concentração de herbicida e condições climáticas no local de aplicação.

## 10. REFERÊNCIAS

- ADELOWO, F.; OLU-AROTIOWA, O.; AMUDA, O. **Biodegradation of Glyphosate by Fungi Species**. Adv. Biosci. Bioeng, v. 2, p. 104-118, 2014.
- AIT BALLI, Y.; BA-MHAMED, S., BENNIS, M. **Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice**. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 11, p. 146, 2017.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation of chemicals of environmental concern**. Science, v. 211, p. 132-138, 1981.
- ALLEGRI, M.; GOMEZ, E. D. V.; ZABALOY, M. C. **Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids**. Soil Biology and Biochemistry, v. 105, p. 206-215, 2017.
- ANDRÉA, M. M. DE; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. **Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 11, p. 1329-1335, 2003.
- ANDRIGHETTI, M. S.; NACHTIGALL G. R.; QUEIROZ S. C. N. D.; FERRACINI V. L.; AYUB M. A. Z. **Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 38, n. 5, p. 1643–1653, 2014.
- ARANTES, S. A. C. M.; LOVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. **Efeito da calagem e do glyphosate na atividade microbiana de diferentes classes de solos**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v.17, n.0, p.19-28, 2007.
- ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- ARL, R. **Toxicidade reprodutiva do glifosato e herbicidas à base de glifosato: uma abordagem bibliográfica**. Dissertação (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.
- ARZANLOU, M.; SAMADI, R.; FRISVAD, J. C.; HOUBRAKEN, J.; GHOSTA, Y. **Two novel Aspergillus species from hypersaline soils of The National Park of Lake Urmia, Iran**. Mycological Progress, v. 15, n. 10-11, p. 1081-1092, 2016.
- BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. **Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination**. Environmental Science and Pollution Research, v. 23, n.19, 2016.
- BARJA, B. C.; AFONSO, M. S. **Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study**. Environmental Science & Technology, v.39, n.2, p.585-592, 2005.

BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. **Encyclopedia of Food Microbiology**, 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, 2014.

BELL, J. R.; JOHNSON, P. J.; HAMBLER, C.; HAUGHTON, A. J.; SMITH, H.; FEBER, R. E.; TATTERSALL, F. H.; HART, B. H.; MANLEY, W.; MACDONALD, D. W. **Manipulating the abundance of *Lepthyphantes tenuis* (Araneae: Linyphiidae) by field margin management**. Agriculture Ecosystems & Environment, v.93, n.1-3, p.295-304, 2002.

BENGTSSON, G.; HANSSON, L. A.; MONTENEGRO, K. **Reduced grazing rates in *Daphnia pulex* caused by contaminants: Implications for trophic cascades**. Environmental Toxicology and Chemistry, v.23, n.11, p.2641-2648, 2004.

BIOKAR DIAGNOSTICS. **Ágar Extrato De Malte**. 2017. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2021/04/172444BK-%C3%81GAR-EXTRATO-DE-MALTE.pdf>. Acesso em 02 de jul. de 2023.

BLACKBURN, C. D. W. **Food spoilage microorganisms**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006.

BLACKBURN, J. W.; HAFKER, W. R. **The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques**. Trends in biotechnology, v. 11, p. 328-333, 1993.

BRASIL. **Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. **Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities**. Soil Biology & Biochemistry, v.33, p.1777-1789, 2001.

CAPREZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G.; PEREIRA, D. **Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo**. Ciência Hoje, v. 30, p. 32-37, 2002.

CAKMAK, I.; YAZICI, A.; TUTUS, Y.; OZTURK, L. **Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean**. European Journal of Agronomy, v. 31, n.3, p. 114–119, 2009.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 221p. 2016.

CARRANZA, C. S.; BARBERIS, C. L.; CHIACCHIERA, S. M.; MAGNOLI, C. E. **Assessment of Growth of *Aspergillus* Spp. from Agricultural Soils in the Presence of Glyphosate**. Rev. Argent. Microbiol. v. 49, p. 384-393, 2017.

CORCINO, C. O.; TELES, R. B. DE A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIRANI, L. S.; ARAÚJO, C. R. M.; GONSALVES, A. DE A.; MAIA, G. L. DE A. **Avaliação do efeito do uso de agrotóxicos sobre a saúde de trabalhadores rurais da fruticultura irrigada**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 24, n. 8, p. 3117–3128, 2019.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. **Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.** Ecological Engineering, Oxford, v. 42, p. 85–89, 2012.

COX, C. **Human exposure and ecological effects.** Journal of Pesticide Reform, v.15, n.4, 1995.

CORREA, L. O.; BEZERRA, A. F. M.; HONORATO, L. R. S.; CORTEZ, A. C. A.; SOUZA, J. V. B.; SOUZA, E. S. **Amazonian soil fungi are efficient degraders of glyphosate herbicide; novel isolates of *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichoderma*.** Brazilian Journal of Biology, v. 83, p. e242830, 2023.

CORREA, L. O. **Degradação de glifosato (n-fosfometil-glicina) por fungos isolados de solo da Floresta Amazônica.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas, Escola de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Manaus, 2013.

DAI, P.; HU, P.; TANG, J.; LI, Y.; LI, C. **Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat.** Acta Histochemica, v. 118, n. 5, p. 519–526, 2016.

DELLAMATRICE, P. M.; COSTA, L. C.; MARQUES, A. S.; VIANA, M. S.; ARAÚJO, R. S. **Degradação de agrotóxicos por fungos basidiomicetos em solo agrícola contendo altos níveis de três produtos diferentes pesticidas.** Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 22, 2012.

DEMICHELLI, F. N. **Isolamento, seleção e avaliação do potencial de biodegradação de glifosato (n-(fosfometil)glicina) por microrganismos isolados de solo de lavoura, em Laranjeiras do Sul, PR.** Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável) - Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2016.

DICK, D. P.; NOVOTNY, E. H.; DIECKOW, J.; BAYER, C. **Química da matéria orgânica do solo.** Química e Mineralogia do Solo, Parte II. Eds. Melo, V. de F. & ALLEONI, R. F., p. 1-67, 2009

DUTRA, R. M. S.; SOUZA, M. M. O. D. **Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana.** Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde, v. 13, n. 24, p. 127–140, 2017.

EMAN, A.; ABDEL-MEGEED, A.; SULIMAN, A. M. A.; SADIK, M. W.; SHOLKAMY, E. N. **Biodegradaditon of Glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted soils in Riyadh area.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 2, p. 359-381, 2013.

ERMAKOVA, I. T.; KISELEVA, N. I.; SHUSHKOVA, T.; ZHARIKOV, M.; ZHARIKOV, G. A.; LEONTIEVSKY, A. A. **Bioremediation of glyphosate-contaminated soils.** Applied microbiology and biotechnology, v. 88, p. 585-594. 2010.

EVANS, F. F.; ROSADO, S.; SEBASTIAN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, P. L. O.

A.; HOLMSTROM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. **Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms.** FEMS Microbiology Ecology, v. 49, p. 295–305, 2004.

FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S. N. **Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?** Current Opinion in Microbiology, v. 8, p. 268–275, 2005.

FERREIRA, M.G. **Hidróxidos duplos lamelares intercalados com o ânion glifosato: preparação, caracterização e estudo de liberação controlada de glifosato em solução aquosa.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

FRANKENBERGER, W. T. J. R.; KARLSON, U. **Bioremediation of seleniferous soils.** In: HINCHEE, R. E.; OLFENBUTTEL, R. F. On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment. Stoneham, MA: Butterworth-Heinemann, p. 239–254, 1991.

FU, G.; CHEN, Y.; LI, R.; YUAN, X.; LIU, C.; LI, B.; WAN, Y. **Pathway and Rate-Limiting Step of Glyphosate Degradation by *Aspergillus Oryzae* A-F02.** Prep. Biochem. Biotechnol, v. 47, p. 782-788, 2017.

FUNGICULTURA. **Ágar extrato de malte em pó.** Disponível em: <https://www.fungicultura.com.br/produto/agar-extrato-de-malte/>. Acesso em 02 de julho de 2023.

GEBLER, L.; SPADOTTO, C. A. **Comportamento ambiental dos herbicidas.** Manual de Manejo e Controle de Plantas Daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 57-87, 2004.

GOMEZ, M. A.; SAGARDOY, M. A. **Effect of glyphosate herbicide on the microflora and mesofauna of a sandy soil in a semiarid region.** Revista Latinoamericana de Microbiologia, v. 27, n. 4, p. 351-357, 1985.

GONÇALVES, G. M. S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente na etnia Xukuru do Ororubá – Pernambuco.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

HAUGHTON, A. J.; BELL, J. R.; WILCOX, A.; BOATMAN, N. D. **The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders: Part I. Direct effects on *Lepthyphantes tenuis* under laboratory conditions.** Pest Management Science, v. 57, n. 11, p.1033- 1036, 2001.

HODGSON, C. **Bayer shares fall 10% after Roundup cancer ruling.** Financial Times, 13 ago, 2018. Disponível em: <https://on.ft.com/328XtZH>. Acesso em 02 de julho de 2023.

JACKSON, R. E.; PITRE, H. N. **Influence of Roundup Ready soybean production systems and glyphosate application on pest and beneficial insects in narrow-row soybean.** Journal of Entomological Science, v. 39, n. 1, p. 62-70, 2004.

JOBIM, P. F. C.; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; Cruz, I. B. M. **Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de defensivo agrícola? Uma contribuição ao debate.** *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 15, n. 1, p. 277-288, 2010.

JUNIOR, O. P. D. A.; SANTOS, T. C. R. D.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L.; **Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação.** *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.

LIU, C. M.; MCLEAN, P. A.; SOOKDEO, C. C. CANNON, F. C. **Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae.** *Applied Environmental Microbiology*, v. 57, n. 6, p. 1799-1840, 1991.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática.** *Saúde em Debate*, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

MALTY, J. D. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. D. S. **Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 2, p. 285–291, 2006.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R; DIAS, S. L. P.; PRATA, F.; CAMARGO, L. **Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado.** *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 12, n. 1, p. 145-154, 2002.

MELO, M. I. A. D. **Estudo dos efeitos tóxicos da formulação comercial do herbicida glifosato sobre células-tronco derivadas de tecido adiposo humano.** Dissertação (mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MERK. **Malt Extract Agar.** 2023. Disponível em: [https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/70145?gclid=CjwKCAjw\\_MqgBhAGEiwAnYOAejJjjBizOxAFOEwu5hqXEnFeWWxAAuFJIPsy4Zfizsc4eKW2AOVynxoCcbAQAvD\\_BwE&gclidsrc=aw.ds](https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/70145?gclid=CjwKCAjw_MqgBhAGEiwAnYOAejJjjBizOxAFOEwu5hqXEnFeWWxAAuFJIPsy4Zfizsc4eKW2AOVynxoCcbAQAvD_BwE&gclidsrc=aw.ds). Acesso em 02 de jul. de 2023.

MORAES, P.V.D.; ROSSI, P. **Comportamento ambiental do glifosato.** *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 9, n. 3, p. 22-35, 2010.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória.** IPEA, Brasília, 2019.

MUSUMECI, M, R. **Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo,** In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. *Microbiologia do solo*. 1. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 341-356, 1992.

MYERS, J. P.; ANTONIOU, M. N.; BLUMBERG, B.; CARROLL, L.; COLBORN, T.; EVERETT, L. G.; HANSEN, M.; LANDRIGAN, P. J.; LANPHEAR, B. P.; MESNAGE, R.; VANDENBERG, L. N.; VOM, SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V.; BENBROOK, C. M. **Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement.** *Environ health global*, v. 15, 2016.

NAYAK, S.; SAMANTA, S.; MUKHERJEE, A. **Beneficial Role of Aspergillus sp. in Agricultural Soil and Environment.** *Frontiers in Soil and Environmental Microbiology*, v. 1, p. 17-36, 2020.

NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com Aspergillus caseiellus.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e Ciências Exatas. Paraná, 2009.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. **Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados.** *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, v. 6, n. 6, p. 995-1006, 2012.

PIANETTI FILHO, G.; PEDROSO, E. R. P.; GIANNETTI, A. V.; DARWICH, R. **Aspergilose cerebral em paciente imunocompetente.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 63, n. 4, p. 1094–1098, 2005.

PRATA, F.; CARDINALI, V. C. D. B.; LAVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J.B. **Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels.** *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 175-180, 2003.

RELYEA, R. A. **The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians.** *Ecological Applications*, v.15, n.4, p.1118-1124, 2005.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E.; ROCHA, M. M. **Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, n. 7, p. 1360–1362, 2014.

ROSATO, Y. B. **Biodegradação do Petróleo.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de, eds. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 307-334, 1997.

RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J. **Metabolism and degradation of glyphosphate in soil and water.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 25, n. 3, p. 517-528, 1977.

SACHETTI, F.; VASCONCELOS, R. **Conhecendo as exigências legais e técnicas aplicáveis às atividades de pesquisa e desenvolvimento de inoculantes.** In: VASCONCELOS, R. M. de (Ed.). *Marcos regulatórios aplicáveis às atividades de pesquisa e desenvolvimento*. Brasília, DF: Embrapa, Cap. 4, 2016.

SAILAJA K. K.; SATYAPRASAD K. **Degradation of Glyphosate in Soil and its Effect on Fungal Population.** *Journals in Environmental Science & Engineering*, v. 48, p. 189-190, 2006.

SALAZAR, L. C.; APPLIEDY, A. P. **Herbicidal activity of glyphosate in soil.** *Weed Science*, v. 30, n. 5, p. 463-466, 1982.



SANTOS, A.; DINNAS, S.; FEITOZA, A. **Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no Vale do São Francisco: dados preliminares.** Enciclopedia Biosfera, v. 17, n. 34, 2020.

SEMOVA, N.; STORMS, R.; JOHN, T.; GAUDET, P.; ULYCZNYJ, P.; MIN, X.; SUN, J.; BUTLER, G.; TSANG, A. **Generation, annotation, and analysis of an extensive *Aspergillus niger* EST collection.** BMC microbiology, v. 6, 2006.

SEVERINO, M. D. R.; SILVA, M. D. **Taxa de degradação de ametrina em quatro solos brasileiros: indicativo do comportamento ambiental.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, n. 3, p. 1023-1030, 2012.

SIIMES, K.; RÄMÖ, S.; WELLING, L.; NIKUNEN, U.; LAITINEN, P. **Comparison of the behaviour of three herbicides in a field experiment under bare soil conditions.** Agricultural Water Management, v.84, n.1-2, p.53-64, 2006.

SILVA, M. B.; RONDON, J. N. **Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado.** Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 10, p. 2175–2184, 2013.

SILVA, J. M. D.; NOVATO-SILVA E.; FARIA H. P.; PINHEIRO T. M. M. **Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 10, n. 4, p. 891–903, 2005.

SINGH, S.; KUMAR, V.; GILL, J. P. K.; DATTA, S.; SINGH, S.; DHAKA, V.; KAPOOR, D.; WANI, A. B.; DHANJAL, D. S.; KUMAR, M.; HARIKUMAR, S. L.; SINGH, J. **Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation.** International journal of environmental research and public health, v. 17, n. 20, 2020.

SIQUEIRA, D. F. DE; MOURA, R. M. DE; LAURENTINO, G. E. C.; ARAÚJO, A. J. DE; CRUZ, S. L. **Análise da exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos.** Revista Brasileira de Promoção da Saúde, v. 26, n. 2, p. 182-191, 2013.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. DE S. **Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde.** Revista de Saúde Pública, v. 46, n. 2, p. 209–217, 2012.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. **Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate.** Journal of Toxicology and Environmental Health B, Philadelphia, v.6, n.3, p.211-246, 2003.

SOUZA, A.; MEDEIROS, A. R.; SOUZA, A. C.; WINK, M.; SIQUEIRA, I. R.; FERREIRA M. M. B. C.; FERNANDES, L.; HIDALGO, M. P. L.; TORRES, I. L. S. **Avaliação do impacto da exposição a defensivos agrícola sobre a saúde de população rural: Vale do Taquari (RS, Brasil).** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 8, p. 3519-3528, 2011.

SPINELLI, V.; CECI, A.; DAL BOSCO, C.; GENTILI, A.; PERSIANI, A. M. **Glyphosate-eating fungi: Study on fungal saprotrophic strains' ability to tolerate and utilise glyphosate as a nutritional source and on the ability of *Purpureocillium lilacinum* to degrade it.** Microorganisms, v. 9, n. 11, 2021.

STROH, W.H. **Industrial enzymes market**. Gen Engineering News, New York, v. 18, n. 5, p. 11-38, 1998.

TATE, T. M.; JACKSON, R. N.; CHRISTIAN, F. A. **Effects of glyphosate and dalpon on total free amino acids profiles of Pseudosuccinea columella snails**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v.64, n.1, p.258-262, 2000.

TEJADA, M. **Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides**. Chemosphere, v. 76, n. 3, 2009.

THASSITOU, P. K.; ARVANITOYANNIS, I. S. **Bioremediation: a novel approach to food waste management**. Trends in Food Science and Technology, v. 12, p. 185-196, 2001.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. **Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study**. Chemosphere, v. 58, p. 515 – 522, 2005.

VEIGA, F.; ZAPATTA, J. M.; MARCOS, F.; ALVAREZ, E. **Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain**. The Science of the Total Environment, v. 271, n.1-3, p.135-144, 2001.

VERRELL, P.; VAN, B. E. **As the worm turns: Eisenia fetida avoids soil contaminated by a glyphosate-based herbicide**. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v.72, n.2, p.219-224, 2004.