



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILAACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO
PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM
ATRAZINA**

EDUARDO AUGUSTO SOARES

Foz do Iguaçu
2024

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO
PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM
ATRAZINA**

EDUARDO AUGUSTO SOARES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nathália Corrêa Chagas de Souza.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Rafaella Costa Bonugli Santos.

Foz do Iguaçu
2024

EDUARDO AUGUSTO SOARES

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO
PARQUE NACIONAL DE IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM
ATRAZINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nathália Corrêa Chagas de Souza.
UNILA

Prof. Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

Me. Suzan Prado Fernandes Bernal
UNILA

Foz do Iguaçu, 16 de outubro de 2024.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Eduardo Augusto Soares.

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO PARQUE NACIONAL DE IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM ATRAZINA.

Nome do orientador(a): Nathália Corrêa Chagas de Souza.

Data da Defesa: 16/10/2024

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a OBRA GRATUITAMENTE e de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 16 de outubro de 2024.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho a meus pais e minha família que sempre me apoiaram nessa jornada da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer às minhas orientadoras Nathália Corrêa Chagas de Souza e Rafaella Costa Bonugli Santos por todo apoio e orientação durante essa jornada de pesquisa. Sem a contribuição de vocês, esse trabalho não teria sido possível. Obrigado por toda a paciência em me guiar, pelas inúmeras reuniões, pelas sugestões valiosas e, acima de tudo, por acreditarem em mim. O conhecimento e a experiência de vocês foram fundamentais para o sucesso deste trabalho, e sou imensamente grato por toda dedicação e suporte ao longo desse processo.

Aos meus pais, Mari e Alex, não tenho palavras suficientes para agradecer por tudo o que fizeram por mim. Obrigado por me darem todo o apoio necessário para continuar meus estudos, por sempre me incentivarem a crescer, e por estarem ao meu lado em cada momento, seja nas dificuldades ou nas conquistas. Vocês são minha inspiração, e sei que não teria chegado até aqui sem o amor, o incentivo e os sacrifícios que fizeram por mim. Este diploma é tanto de vocês quanto meu. Obrigado por tudo, de coração.

À minha avó Angélica, minha eterna apoiadora, que sempre esteve ao meu lado desde a infância. Obrigado por todo o carinho e suporte, por cada palavra de incentivo e por acreditar em mim mesmo quando eu duvidava. As suas histórias, os conselhos, e a sua presença constante me deram forças para seguir em frente. Sou muito sortudo por ter você na minha vida, e jamais esquecerei o quanto você me ajudou a chegar até aqui.

Às minhas colegas de laboratório, Adrieli e Quemili, meu agradecimento especial por toda a paciência em me ensinar a dinâmica do laboratório e por me ajudarem a entender as práticas tão importantes para minha pesquisa. Obrigado por cada ensinamento, por estarem dispostas a compartilhar conhecimento e tornar o ambiente de trabalho mais leve e divertido. As discussões, os aprendizados e até os desafios enfrentados juntos foram fundamentais para o meu crescimento técnico e pessoal.

Aos meus amigos de coração, Gustavo, Isabela, Luiz, Kauanny e Yara, que estiveram ao meu lado durante os cinco anos de universidade, muito obrigado por tornarem essa jornada muito mais leve e especial. Vocês foram meu porto seguro em meio ao caos de provas, trabalhos e prazos. As risadas, os momentos de descontração, os surtos coletivos com os desafios da universidade – tudo isso só foi possível porque estávamos juntos. Obrigado por cada palavra de apoio, por cada abraço e por simplesmente estarem lá. Vocês são uma parte essencial dessa caminhada, e sei que nossa amizade vai muito

além desses anos de faculdade.

Um agradecimento especial ao meu amigo Bruno, que me auxiliou em vários momentos com a escrita do TCC e foi um grande parceiro em todos os desafios. Obrigado pelas revisões, pelos conselhos e por sempre estar disposto a ajudar, mesmo nos momentos mais complicados. Sua amizade foi um verdadeiro suporte, e sou extremamente grato pela sua generosidade e dedicação. Você fez toda a diferença nessa etapa.

Agradeço a mim mesmo, por ter tido força e determinação para seguir em frente, mesmo quando tudo parecia difícil. Sei o quanto foi desafiador: as noites mal dormidas, o estresse, as dúvidas e as dificuldades que enfrentei. Cada pequena vitória é fruto do meu esforço e da minha resiliência. Estou orgulhoso de quem me tornei e agradecido por não ter desistido. Essa conquista é, acima de tudo, uma celebração da minha vontade de seguir adiante, apesar de tudo.

Por fim, agradeço à Universidade da Integração Latino-Americana (UNILA) por ter sido meu local de estudos e por ter proporcionado todas essas conquistas. A UNILA não foi apenas um espaço acadêmico, mas um ambiente onde pude me desenvolver como pessoa, entrar em contato com diferentes culturas e viver experiências únicas que contribuíram para minha formação. Durante esses anos, tive a oportunidade de aprender com professores dedicados, acessar uma infraestrutura adequada e participar de atividades que enriqueceram minha trajetória. Sou profundamente grato por cada oportunidade e por todo o suporte que a universidade me ofereceu, tornando possível a realização desse sonho.

A confiança em si mesmo é o primeiro segredo do sucesso.

Ralph Waldo Emerson

SOARES, EDUARDO AUGUSTO. **ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO PARQUE NACIONAL DE IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM ATRAZINA.** 2024. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2024.

RESUMO

O crescimento populacional tem gerado uma alta demanda por alimentos em escala global, resultando na necessidade de expandir a produção. Para garantir a segurança alimentar, há um aumento na área cultivada, o que, por consequência, leva ao uso intensificado de agrotóxicos. O Brasil, um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, enfrenta desafios decorrentes do uso intensivo desses produtos, como o esgotamento do solo, desmatamento e impactos na biodiversidade. Dentre eles está a atrazina, um agrotóxico altamente tóxico para o meio ambiente e com alta capacidade de acumulação no solo. Este cenário leva à necessidade de se desenvolver produtos e processos que diminuam os impactos ambientais. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial dos fungos do Parque Nacional do Iguaçu no processo de biorremediação, de forma *ex situ*, de solo contaminado com atrazina, através da variação final do herbicida em relação a concentração inicial, isso em diferentes dias de inoculação dos fungos para as avaliações de cromatografia, já em relação a avaliação do crescimento em extrato de solo ocorreu em sete dias. O estudo envolveu a coleta e preparo de solo do Parque Nacional do Iguaçu, com a obtenção de cinco amostras de solo de três locais distintos. No laboratório, elas foram homogeneizadas, peneiradas para remover materiais estranhos e combinadas em uma única amostra composta. Os fungos *Fusarium* sp._GU e *Fusarium* sp._GW, pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) da UNILA, caracterizados anteriormente e obtidos dos mesmos locais da presente coleta, foram usados no estudo de degradação da atrazina. Sete tratamentos foram realizados, incluindo cultivos com e sem atrazina e controles abióticos, com adição de atrazina nas concentrações de 10 e 100 mg/L. Posteriormente, os resíduos de atrazina no solo foram extraídos com acetona e analisados por HPLC. Além disso, para avaliar o potencial de biorremediação, a biomassa fúngica foi interagida com meio líquido com solo e atrazina, por sete dias, sendo medida após filtração e secagem do material, para comparação do crescimento entre os tratamentos. Porém, após esse período, não houve indicação de crescimento usando solo como única fonte de carbono, isto, tanto em meio líquido, contendo solo, quanto nas avaliações feitas diretamente no solo contaminado com o agroquímico. Sendo que, neste segundo caso, houve a observação do crescimento dos fungos em tratamentos contendo atrazina quando aumentou-se o tempo de incubação, porém, não foi possível avaliar a degradação, devido as cromatografias não terem mostrado o padrão do agrotóxico somente o do solvente utilizado, isto é, a acetona. Foi possível observar, desta forma, que a eficiência da biodegradação fúngica parece depender amplamente das condições ambientais, sendo mais eficaz em meios sólidos, e que, para otimizar o processo, é necessário adicionar nutrientes, pois a atrazina sozinha não sustenta o crescimento fúngico. Estudos *in situ* são importantes para confirmar a eficiência dos fungos em ambientes reais, possibilitando a recuperação mais rápida de solos contaminados e beneficiando os agricultores e o próprio meio ambiente.

Palavras-chave: Agrotóxicos, Biomassa, *Fusarium*, Biomassa, Degradação.

SOARES, EDUARDO AUGUSTO. **ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO PARQUE NACIONAL DE IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM ATRAZINA.** 2024. 46 p. Trabajo de Conclusión de Curso (Bacharelado en Biotecnología) - Universidad Federal da Integración Latinoamericana, Foz do Iguazú, 2024.

RESUMEN

El crecimiento poblacional ha generado una alta demanda de alimentos a escala global, resultando en la necesidad de expandir la producción. Para garantizar la seguridad alimentaria, se ha incrementado el área cultivada, lo cual, por consecuencia, lleva al uso intensificado de pesticidas. Brasil, uno de los mayores consumidores de pesticidas en el mundo, enfrenta desafíos derivados del uso intensivo de estos productos, tales como el agotamiento del suelo, la deforestación y los impactos en la biodiversidad. Entre ellos se encuentra la atrazina, un pesticida altamente tóxico para el medio ambiente y con alta capacidad de acumulación en el suelo. Este escenario conlleva a la necesidad de desarrollar productos y procesos que disminuyan los impactos ambientales. De esta forma, el objetivo del presente trabajo es evaluar el potencial de los hongos del Parque Nacional de Iguazú en el proceso de biorremediación, de forma *ex situ*, de suelos contaminados con atrazina, a través de la variación final del herbicida en relación con la concentración inicial, en diferentes días de inoculación de los hongos para las evaluaciones cromatográficas, mientras que la evaluación del crecimiento en extracto de suelo se realizó en siete días. El estudio incluyó la recolección y preparación del suelo del Parque Nacional de Iguazú, obteniendo cinco muestras de suelo de tres lugares distintos. En el laboratorio, se homogeneizaron, tamizaron para remover materiales extraños y se combinaron en una única muestra compuesta. Los hongos *Fusarium* sp._GU y *Fusarium* sp._GW, pertenecientes a la Colección de Cultivos de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA) de UNILA, caracterizados previamente y obtenidos de los mismos lugares de la presente recolección, fueron usados en el estudio de degradación de atrazina. Se realizaron siete tratamientos, incluyendo cultivos con y sin atrazina y controles abióticos, con la adición de atrazina en concentraciones de 10 y 100 mg/L. Posteriormente, los residuos de atrazina en el suelo fueron extraídos con acetona y analizados por HPLC. Además, para evaluar el potencial de biorremediación, la biomasa fúngica fue interactuada con un medio líquido con suelo y atrazina, durante siete días. La biomasa se midió después de la filtración y secado del material, para comparar el crecimiento entre los tratamientos. Sin embargo, después de siete días de cultivo, no hubo indicación de crecimiento usando el suelo como única fuente de carbono, tanto en medio líquido, que contenía suelo, como en las evaluaciones realizadas directamente en el suelo contaminado con el agroquímico. En este segundo caso, se observó el crecimiento de los hongos en tratamientos que contenían atrazina, pero no fue posible evaluar la degradación, ya que las cromatografías no mostraron el patrón del pesticida, solo se observó acetona. La eficiencia de la biodegradación fúngica parece depender en gran medida de las condiciones del ambiente, siendo más eficaz en medios sólidos. Para optimizar el proceso, es necesario agregar nutrientes, ya que la atrazina por sí sola no sostiene el crecimiento fúngico. Los estudios *in situ* son importantes para confirmar la eficacia de los hongos en ambientes reales, permitiendo una recuperación más rápida de suelos contaminados y beneficiando tanto a los agricultores como al medio ambiente.

Palabras clave: Plaguicidas, *Fusarium*, Biorremediación, Biomasa, Degradación.

SOARES, EDUARDO AUGUSTO. **ANÁLISE DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DO PARQUE NACIONAL DE IGUAÇU FRENTE A SOLOS CONTAMINADOS COM ATRAZINA**. 2024. 46 p. Undergraduate thesis (Bachelor degree in Biotechnology) - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2024.

ABSTRACT

Population growth has generated a high demand for food on a global scale, resulting in the need to expand production. To ensure food security, cultivated areas have increased, which, consequently, leads to intensified pesticide use. Brazil, one of the largest pesticide consumers in the world, faces challenges resulting from the intensive use of these products, such as soil depletion, deforestation, and impacts on biodiversity. Among them is atrazine, a pesticide highly toxic to the environment and with a high capacity for soil accumulation. This scenario highlights the need to develop products and processes that reduce environmental impacts. Thus, the objective of the present work is to evaluate the potential of fungi from Iguaçu National Park in the ex situ bioremediation process of soil contaminated with atrazine, by assessing the final variation of the herbicide in relation to the initial concentration at different days of fungal inoculation for chromatographic evaluations, while the growth assessment in soil extract occurred over seven days. The study involved the collection and preparation of soil from Iguaçu National Park, obtaining five soil samples from three distinct locations. In the laboratory, they were homogenized, sieved to remove foreign materials, and combined into a single composite sample. The fungi *Fusarium* sp._GU and *Fusarium* sp._GW, belonging to the UNILA Culture Collection of Biotechnological and Environmental Microorganisms (CCMIBA), previously characterized and obtained from the same collection locations, were used in the atrazine degradation study. Seven treatments were carried out, including cultures with and without atrazine and abiotic controls, with the addition of atrazine at concentrations of 10 and 100 mg/L. Subsequently, atrazine residues in the soil were extracted with acetone and analyzed by HPLC. Additionally, to evaluate the bioremediation potential, fungal biomass was interacted with a liquid medium containing soil and atrazine for seven days. Biomass was measured after filtration and drying of the material to compare growth between treatments. However, after seven days of cultivation, no growth was indicated using soil as the sole carbon source, both in liquid medium containing soil and in the assessments conducted directly on soil contaminated with the agrochemical. In this second case, fungal growth was observed in treatments containing atrazine; however, it was not possible to evaluate degradation as the chromatographs did not show the pesticide pattern, only acetone was observed. The efficiency of fungal biodegradation appears to largely depend on environmental conditions, being more effective in solid media. To optimize the process, adding nutrients is necessary, as atrazine alone does not support fungal growth. In situ studies are important to confirm the effectiveness of fungi in real environments, allowing for faster recovery of contaminated soils and benefiting both farmers and the environment.

Keywords: Pesticide, *Fusarium*, Bioremediation, Biomass, Degradation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZ	Atrazina
CFE	Extrato celular livre
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
DEA	Desetilatrazina
DIA	Deisopropilatrazina
IBAMA	Instituto brasileiro de meio ambiente e dos recursos naturais
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
P.A.	Princípios ativos
PNMA	Política nacional do meio ambiente
POPS	Poluentes orgânicos persistentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 O USO DE AGROTÓXICOS: CONSUMO, IMPACTOS E REGULAMENTAÇÃO AMBIENTAL	14
2.2 A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROQUÍMICOS.....	16
2.2.1 O impacto do herbicida atrazina	17
2.3 O PAPEL DA BIORREMEDIAÇÃO.....	21
2.3.1 O emprego de fungos na biorremediação.....	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 COLETA E PREPARO DO SOLO.....	26
4.2 MICRORGANISMOS.....	27
4.2.1 Ativação e crescimento dos fungos.....	27
4.3 MONTAGEM DO EXPERIMENTO.....	28
4.3.1 Interação <i>ex situ</i> do solo com os fungos isolados <i>Fusarium sp._GW</i> e <i>Fusarium sp._GU</i>	29
4.4 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO SOLO.....	30
4.5 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA A PARTIR DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM MEIO SOLO.....	32
4.5.1 Preparo do meio solo líquido.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 ADAPTAÇÃO E CRESCIMENTO DE FUSARIUM SP. EM SOLO CONTAMINADO COM ATRAZINA: POTENCIAL DEGRADATIVO.....	34
5.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E ENZIMAS NA BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA POR FUNGOS.....	35
6 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A intensificação dos problemas ambientais nas últimas décadas, em grande parte impulsionada pelo aumento populacional e a expansão da industrialização, tem gerado uma demanda crescente por alimentos. Nesse contexto, o Brasil se destaca como um dos maiores consumidores de agrotóxicos na América Latina e no mundo, desde a instauração da revolução verde nos anos 60, que prometia erradicar a fome e transformar o país em uma nação desenvolvida (Lazzari e Souza, 2017; Bombardi, 2017).

Visando aumentar o rendimento das culturas e garantir colheitas mais robustas, intensificou-se a utilização de pesticidas, acarretando graves problemas como esgotamento do solo, desmatamento, alterações no ecossistema e um monopólio industrial, levando a transformações longe de serem sustentáveis. O acúmulo de agrotóxicos no ambiente representa graves problemas, afetando toda a biosfera e causando impactos significativos na qualidade de vida dos seres humanos e animais (Naranjo, 2018).

A atrazina, é um exemplo de agrotóxico com alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações. Utilizado como herbicida na agricultura para o controle de ervas daninhas (Singh, 2016). Diante disso, a biorremediação surge como uma solução promissora, envolvendo a utilização de organismos vivos para reciclar resíduos tóxicos do ambiente e restaurar níveis aceitáveis de poluentes, de acordo com as agências reguladoras ambientais (Souza, 2021; Rodrigues, 2021).

Existem duas abordagens principais na biorremediação: a *ex situ*, que envolve a remoção do solo contaminado e a sua posterior limpeza em laboratório, e a *in situ*, que trata os poluentes no próprio local (Azubuike *et al.*, 2016). Um exemplo de sucesso da aplicação da biorremediação ocorreu após o derramamento de petróleo da Exxon Valdez no Alasca, em 1989, onde foram usados microrganismos para eliminar contaminantes do solo de forma eficaz e acessível (Boopathy, 2000). Destacando a importância de novas abordagens envolvendo a utilização de microrganismos para fins de mitigação de impactos relacionados à poluição ambiental.

Os fungos são microrganismos reconhecidos por sua versatilidade e eficiência na biorremediação, são eficazes em ambientes de solo devido ao seu crescimento micelial extenso. Uma de suas principais características é a capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas extracelulares, fundamentais para promover a degradação de compostos xenobióticos nos ambientes contaminados (Guerrero Ramírez

et al, 2023). Porém, para garantir que os processos degradativos ocorram de maneira eficiente, é crucial o controle de fatores ambientais como pH, concentração de minerais e umidade.

Dentre os grupos de fungos utilizados na biorremediação, os basidiomicetos se destacam como principais agentes na degradação de compostos xenobióticos. Esses fungos apresentam alta capacidade de degradar substâncias tóxicas e complexas, utilizando estratégias de biorremediação baseadas na produção de enzimas ligninolíticas, como lacases e peroxidases (Guerrero Ramírez *et al*, 2023). As enzimas ligninolíticas são capazes de degradar compostos tóxicos em formas mais simples, sendo utilizado pelos fungos como fonte de energia e nutrientes. Em trabalhos anteriores, Esperanza-Naranjo e colaboradores (2020), destacaram a utilização de fungos do gênero *Fusarium* na descontaminação de xenobióticos como a atrazina. Dessa maneira, os fungos são capazes de degradar poluentes e transformar esses compostos em substâncias que favorecem o seu crescimento e sobrevivência tornando-os ferramentas eficientes para a recuperação de ambientes contaminados.

Pode se dizer assim que a biorremediação demonstra uma alternativa sustentável, em comparação com métodos tradicionais, como a remoção mecânica de poluentes, e abre caminho para novas descobertas e avanços no campo da biotecnologia e microbiologia ambiental. Desta forma, este trabalho propôs a utilização de fungos com capacidade de degradação da atrazina em um estudo *ex situ*, contribuindo para a preservação da biodiversidade e promoção da sustentabilidade ambiental.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 O USO DE AGROTÓXICOS: CONSUMO, IMPACTOS E REGULAMENTAÇÃO AMBIENTAL

Segundo a EPA (*United States environmental protection agency*), um pesticida pode ser definido como qualquer substância ou mistura de substância que tem como principal objetivo prevenir, destruir, repelir ou mitigar pragas que atacam lavouras, como insetos, ratos e outros animais, plantas daninhas ou microrganismos (Morillo, Villaverde. 2017; Baldissarelli *et al.*, 2018).

No entanto, essa alta dependência de agrotóxicos, também levanta preocupações significativas em relação aos impactos ambientais e à saúde pública, tornando crucial a busca por práticas agrícolas mais sustentáveis e seguras (Campos *et al.*, 2020). Assim, desde 1960, há discussões em torno do uso excessivo de pesticidas ao redor do mundo. No mesmo ano o Conselho de Administração da Assembleia das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEA) reconheceu que doze Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) deveriam ter seu uso suspenso globalmente, além de medidas para diminuir a liberação de pops no ambiente, isto devido à capacidade de causar efeitos adversos no meio ambiente e na saúde humana. Oito desses POPs eram inseticidas (endrina, heptacloro, mirex, toxafeno, aldrin, clordano, dieldrin e dicloro-difenil-tricloroetano - DDT), um deles era fungicida (hexaclorobenzeno - HCB), e o restante eram dioxinas, algumas delas subprodutos na produção de pesticidas (bifenilos policlorados e dibenzofuranos policlorados). Em 2009, ocorreu a convenção de Estocolmo, onde a lista de agrotóxicos pôde ser ampliada para incluir novos POPs, sendo cinco deles outros organoclorados inseticidas: clordecona, lindano, α - e β -hexaclorociclohexano e pentaclorobenzeno. Os endossulfanos foram incluídos em 2011 (Morillo & Villaverde, 2017).

O Brasil é um dos países que mais consome agrotóxicos no mundo, o que é intensificado principalmente por ser um dos maiores produtores de grãos do planeta (MMA, 2023). Nos anos de 1960, houve um avanço significativo na produção e no uso de substâncias químicas para a agricultura, com o objetivo de aumentar a produtividade e garantir a segurança alimentar, sendo considerado em 2008 o maior consumidor de produtos químicos do mundo (Baldissarelli *et al.*, 2018). Já em 2020, foram 685.745,68 toneladas de princípios ativos comercializados, um aumento de 78,3% em relação a 2010 (Hess, 2022).

Porém, a distribuição do consumo de agrotóxicos pelo país não é uniforme, as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste são as que mais utilizam esses produtos, representando aproximadamente 38%, 30% e 29% do consumo total, respectivamente. Em contraste, a região Norte tem um uso muito mais limitado, representando pouco mais de 1% do total, até o ano de 2019 (Rocha & Alvarez, 2023). A maior parte dos agrotóxicos é aplicada no Cerrado, uma vasta área que se estende pelas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Norte e Sudeste, onde mais de 70% dos agrotóxicos do país são utilizados (Luz, 2014). Tais números podem ser justificados em função do aumento populacional, no Brasil e no mundo, o que gerou uma necessidade crescente por produzir mais alimentos. Isso foi conquistado através da aplicação de técnicas para o aumento da produção agrícola, como o emprego de agroquímicos.

Os principais órgãos que realizam o registro e avaliação toxicológica de agrotóxicos no Brasil são: o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). A avaliação ambiental é realizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (MMA) (Campos *et al.*, 2021). Ao mesmo tempo, é evidente o progresso da legislação ambiental brasileira ao longo dos anos, refletindo uma crescente preocupação com o impacto das atividades agrícolas, que afetam diretamente a qualidade do meio ambiente. Desta forma, a política ambiental brasileira apresentou avanços com a promulgação da Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA), através da Lei nº 6.938, de 31/08/1981, um marco histórico de extrema importância para a gestão ambiental no Brasil, que estabeleceu diretrizes e instrumentos fundamentais para conciliar o desenvolvimento econômico com a preservação ambiental, visando garantir o direito difuso a um meio ambiente ecologicamente equilibrado (Monteiro *et al.*, 2022), sinalizando um movimento em direção à conciliação entre o desenvolvimento econômico e a preservação dos recursos naturais.

Um elemento chave da PNMA foi a criação do Sistema Nacional de Meio Ambiente (SISNAMA), que serviu como uma estrutura reguladora para implementar os princípios da PNMA. O SISNAMA é composto, em seu nível mais alto, pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), que tem a responsabilidade de propor diretrizes para as políticas ambientais e deliberar sobre normas e padrões, visando assegurar a qualidade do meio ambiente (Campanhola & Bettioli, 2003).

2.2 A CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROQUÍMICOS

Apesar dos benefícios em relação à produtividade, ao minimizar o ataque de pragas, o uso indiscriminado de agroquímicos gera sérios impactos ao meio ambiente e à saúde da população local, que inclui animais, seres humanos e a microbiota presente (Ribeiro *et al.*, 2011; Baldissarelli *et al.*, 2018).

Um aspecto crucial é que grande parte dos pesticidas utilizados na agricultura sequer atinge os organismos-alvo (Moreira *et al.*, 2013; Morillo & Villaverde, 2017). Esses contaminantes frequentemente se dispersam no ambiente, sendo metabolizados e acumulados ao longo das cadeias alimentares, com concentrações crescentes nos níveis tróficos superiores, até alcançarem os vertebrados predadores, onde se verificam os maiores índices de acumulação. Esse fenômeno, conhecido como "biomagnificação", descreve o processo em que substâncias tóxicas se concentram progressivamente em cada nível trófico. Animais situados nos patamares superiores da pirâmide trófica acumulam esses compostos em maiores quantidades. Como o ser humano ocupa o topo da cadeia alimentar, ele tende a acumular uma quantidade significativa desses resíduos tóxicos (Mello, 1999).

A preocupação com essa prática é ampliada quando se analisa de perto a maneira como ela é realizada. Um exemplo evidente disso é a utilização de aviões para a aplicação de agrotóxicos, especialmente em áreas abertas de lavouras e pastagens (Campos *et al.*, 2021). Essa abordagem pode ter sérias consequências em termos de contaminação ambiental, pois as névoas de agrotóxicos não se restringem apenas ao alvo pretendido, ou seja, plantas e pragas, elas também afetam os trabalhadores que realizam a aplicação e, de forma indireta, impactam o ambiente contaminando o solo com resíduos tóxicos que podem persistir por longos períodos, poluindo corpos d'água e afetando a qualidade do ar, assim como os residentes, animais e outras plantas que se encontram nas proximidades das áreas onde esses agrotóxicos são aplicados (Campos *et al.*, 2021; Francolino, 2022).

A disseminação generalizada de substâncias químicas tóxicas pode causar sérios impactos na saúde humana, biodiversidade e no meio ambiente em geral (Pignati *et al.*, 2007). Isso pode resultar em efeitos agudos, sendo eles: irritação na pele, problemas respiratórios, irritação da boca e garganta, além de sintomas como ardência, tosse, náuseas, vômitos e diarreia (ANVISA, 2018). Além disso, exposições crônicas à pequenas quantidades de agrotóxicos, por um período prolongado, podem levar a sintomas crônicos, tais como dificuldade para dormir, esquecimento, aborto, impotência, depressão, problemas

respiratórios graves, alterações no funcionamento do fígado e dos rins, anormalidades na produção de hormônios da tireoide, dos ovários e da próstata, incapacidade de gerar filhos, malformações e problemas no desenvolvimento intelectual e físico das crianças (ANVISA, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022), estudos também apontam que alguns grupos de agrotóxicos são considerados possíveis carcinogênicos.

A contaminação do solo ocorre principalmente devido aos resíduos de agrotóxicos que se espalham por processos como lixiviação, escoamento superficial e infiltração, atingindo camadas mais profundas e podendo poluir lençóis freáticos, rios e áreas agrícolas adjacentes (Fonseca, 2019). As chuvas intensificam esses processos, acelerando a dispersão dos contaminantes e provocando reações químicas e bioquímicas que degradam a qualidade do solo (De Souza, 2022).

Herbicidas usados na agricultura também apresentam riscos devido ao seu período residual, que pode durar de meses a anos, causando fitotoxicidade em culturas sensíveis cultivadas posteriormente, o chamado efeito "carry over", além de contribuir para a contaminação de águas subterrâneas e corpos hídricos atuando no processo de bioacumulação e tornando-se nociva aos seres presente na cadeia alimentar (Novello *et al.*, 2023; De Souza, 2022). Estes processos estão diretamente relacionados às características do agroquímico, mas também do solo, em função de sua granulidade e composição, por exemplo, que permitem uma maior ou menor absorção destes produtos (Brady, Weil, 1996).

2.2.1 O impacto do herbicida atrazina

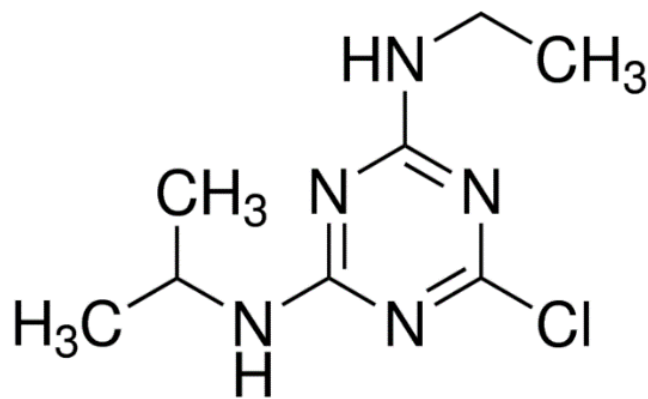
As triazinas constituem um conjunto de herbicidas que foram registrados pela primeira vez em 1955 e que incluem substâncias como atrazina, cianazina, propazina, ametrina e simazina. Esses compostos químicos apresentam uma notável capacidade de contaminação, devido às suas propriedades de elevado potencial de lixiviação e escoamento, persistência prolongada no solo, hidrólise lenta, baixa solubilidade em água e absorção moderada por matéria orgânica (Souza, 2013).

A atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (figura 1), tem caráter seletivo e é usada para combater plantas daninhas e gramíneas em diversas culturas (Singh *et al.*, 2017). Esse agente químico desempenha um papel fundamental na gestão de cultivos, principalmente em plantações de milho e trigo, mas

também sendo usado em plantações de sorgo, cana-de-açúcar e diversos tipos de pastagens (Péres *et al.*, 2022; Hansen *et al.*, 2013).

Dentre as propriedades deste agrotóxico no ambiente, pode-se citar a baixa adsorção no solo e a baixa solubilidade, sendo esses fatores agravantes para o meio ambiente, uma vez que já é comprovada a sua capacidade de contaminação de campos agrícolas, além de águas subterrâneas e superficiais (Singh *et al.*, 2017).

Figura 1: Representação da molécula de atrazina.



Fonte: (Hansen *et al.*, 2013).

Este herbicida atua inibindo o processo fotossintético II nas plantas-alvo, atuam na membrana do cloroplasto, local de transporte de elétrons na fase luminosa (Souza, 2013), o que resulta na interrupção de seu crescimento e, conseqüentemente, em seu controle eficaz (Naranjo, 2018; Hansen *et al.*, 2013). Os mecanismos de ação deste herbicida dependem da resistência observada na própria planta, ou seja, na espécie alvo (Souza, 2013).

Dados de comercialização disponibilizados pelo IBAMA (2022) revelaram que a ATZ faz parte dos 10 princípios ativos (P.A.) mais vendidos no Brasil. Durante o ano de 2021, aproximadamente 37 mil toneladas de ATZ foram vendidas, ocupando a quinta posição na lista dos mais vendidos. Segundo a classificação da ANVISA, a ATZ é definida como um composto moderadamente tóxico, essa classificação é determinada de acordo com o grau de toxicidade que o agroquímico apresenta, caso seja ingerido, inalado ou entre em contato com a pele, o que significa que quanto maior o nível de toxicidade, maiores são os perigos de intoxicação, sendo necessário se atentar ainda mais às práticas de manuseio

e segurança com o químico (ANVISA, 2022). Os parâmetros para definir a toxicidade dos agrotóxicos estão associados às concentrações dos seus componentes, das suas impurezas ou em outros produtos similares (Kruger, 2009).

Tabela 1: Ingredientes ativos mais vendidos em 2021.

<i>Unidade de medida: toneladas de Ingredientes ativos</i>		
Ingrediente ativo	Vendas (ton. IA)	Ranking
Glifosato e seus sais	219.585,51	1°
2,4-d	62.165,70	2°
Mancozebe	50.340,24	3°
Clorotalonil	38.320,40	4°
Atrazina	37.298,57	5°
Acefato	35.856,00	6°
Malationa	13.291,23	7°
Cletodim	9.750,70	8°
Enxofre	9.434,95	9°
S-metolacloro	9.374,02	10°

Fonte: IBAMA/ Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2022.

Desta forma, a exposição à atrazina pode causar reações de irritação, bem como alterações nas funções de alguns órgãos, problemas de reprodução e alterações nos níveis hormonais, bem como defeitos de nascimento em seres humanos. Além disso, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) determinou que há evidências de carcinogenicidade desse herbicida em animais, mas não em seres humanos (Hansen *et al.*, 2013).

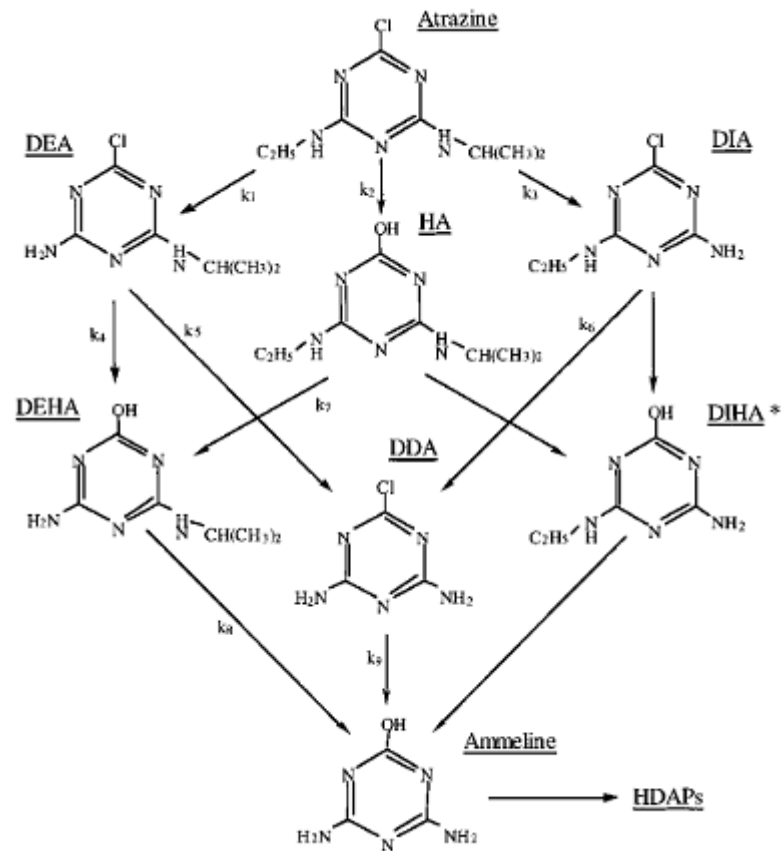
A persistência do agrotóxico no solo é principalmente determinada pela atividade dos organismos degradadores, embora também seja influenciada por fatores como a disponibilidade de oxigênio, nível de umidade, tipo de solo, profundidade, temperatura, concentração de ATZ, histórico de aplicação e práticas agrícolas (Naranjo, 2018). Um estudo aponta que a meia-vida da ATZ no ambiente, ou seja, o período

necessário para que a concentração deste herbicida se reduza pela metade, varia conforme as condições ambientais e as características específicas do solo, onde degradação deste pesticida pode variar entre 20 e 100 dias (Mendonça, 2015). Gaynor, Mactovish e Findlay (1992) relataram que, em temperaturas mais baixas (aproximadamente 7°C), sua degradação é muito reduzida. No entanto, quando as temperaturas estão acima de 15°C, a degradação é consideravelmente maior. Em um solo Latossolo Vermelho-Escuro (3,6% matéria orgânica, 44,9% argila, 40,2% areia) submetido a 18,75 µg/mL de atrazina, 25°C, a meia vida da atrazina foi de 54 dias (Nakagawa, *et al.* 1995). Esses estudos demonstram que a temperatura ideal para a degradação está na faixa em que os microrganismos atingem sua atividade metabólica máxima (Mendonça, 2015), o que pode indicar a capacidade microbiana de contribuir na mitigação de contaminações do solo.

Um dos problemas associados à biodegradação da ATZ é a formação de metabólitos que, frequentemente, podem ser ainda mais tóxicos, resultando em novos desafios ambientais e de saúde (WHO, 2010). As principais rotas de degradação podem ser observadas na Figura 2.

A degradação da ATZ por fungos ainda não é completamente compreendida, principalmente devido à sua complexidade, envolvendo múltiplas rotas metabólicas. As principais rotas descritas até agora incluem hidrólise, desalquilação, descloração e desaminação (Burken & Schnoor, 1997). Entre os principais metabólitos produzidos durante a degradação fúngica estão: desetilatrizona (DEA), deisopropilatrizona (DIA), hidroxiatrizona (HA) e deetildeisopropilatrizona (DEDIA) (Burken & Schnoor, 1997; Loss, Niessner, 1999; Coelho, 2017).

Figura 2: Rotas de degradação da Atrazina e resíduos da sua degradação.



Fonte: (Burken & Schnoor, 1997)

2.3 O PAPEL DA BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é um processo no qual utilizam-se organismos e microrganismos para remover ou reduzir contaminantes do ambiente onde são inseridos (Azubuike *et al.*, 2016). O desenvolvimento desta técnica visa a exploração da genética e a capacidade metabólica de microrganismos, que irão transformar contaminantes em subprodutos menos tóxicos, através da redução, transformação ou mineralização do contaminante (Souza, 2021).

Pode-se classificar os processos que envolvem a realização da biorremediação de acordo com o tratamento que melhor se adequa em relação ao local contaminado, isto é, no tratamento *in-situ*, a biorremediação irá ocorrer no local que apresenta a contaminação, e o tratamento *ex-situ*, que será realizado fora do local contaminado (Tomassoni *et al.*, 2014; Aquino, 2021). Na atenuação natural, a técnica de

biorremediação *in situ* ocorre de forma natural, sem a intervenção humana direta, seguindo processos físico-químicos e biológicos de origem natural (Souza, 2021). A técnica de bioestimulação, também *in situ*, se baseia em estimular as atividades dos microrganismos presentes no ambiente, através da adição de compostos nutrientes como, por exemplo, nitrogênio, fósforo, potássio e demais substratos, como açúcares (Atashgahi *et al.*, 2018).

Métodos de biorremediação *ex situ*, abrangem biopilhas, biorreatores e *landfarming*. Já as técnicas de biorremediação *in situ* podem ser categorizadas em atenuação natural e atenuação aprimorada. Nas estratégias de atenuação aprimorada, destacam-se *bioslurping*, *biosparging*, bioventilação, fitorremediação e barreira de membrana reativa. As técnicas mais frequentemente utilizadas incluem a atenuação natural, a bioestimulação e a bioaumentação (Souza, 2021; Azubuiké *et al.*, 2016).

O processo de introduzir microrganismos em determinado local contaminado, é conhecido como bioaumentação, a fim de estimular a microbiota local e potencializar a ação de degradação do contaminante. Sua principal vantagem é a degradação rápida devido a adaptação do microrganismo com o poluente em questão (Dal'pizol Novello *et al.* 2023). A desvantagem se dá por ser um processo complexo que pode sofrer interferências ambientais através de interações ecológicas, como competição por recursos, vetores físico-químicos, dentre outros (Atashgahi *et al.*, 2018).

A biodegradação está intrinsecamente ligada à biorremediação, um processo essencial para a descontaminação ambiental, que ocorre por meio da transformação de compostos químicos pelo metabolismo de microrganismos. Esses microrganismos atuam como decompositores ou degradadores de matéria orgânica, contribuindo significativamente para a degradação e remoção de poluentes (Leonel *et al.*, 2018). A biodegradação envolve uma série de etapas enzimáticas complexas, onde várias enzimas específicas desempenham papéis cruciais na decomposição dos compostos químicos. Estas enzimas trabalham em conjunto para quebrar as substâncias contaminantes em produtos menos nocivos ou inertes, culminando na biorremediação, que é o estágio final desse processo (Dellamatrice *et al.*, 2012).

Neste contexto, os fungos desempenham um papel crucial na mitigação dos impactos ambientais causados pelo uso de agrotóxicos. Eles têm a capacidade de se aclimatar ao ambiente e se adaptar na presença de compostos xenobióticos, conseguindo degradá-los. Muitas vezes, esses compostos são utilizados pelos microrganismos como fontes de nutrientes essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento (Wahla; Shukla, 2022. Datta; Parkhey; Bhatnagar, 2024).

2.3.1 O emprego de fungos na biorremediação

Os fungos possuem papel fundamental para o meio ambiente, atuando na degradação de diversas substâncias, inclusive de agrotóxicos, pois têm a capacidade de se adaptar na presença destes compostos e degradá-los (Madigam, 2016).

Estudos demonstram que a capacidade de degradar compostos xenobióticos é aumentada em indivíduos que foram isolados de habitats contaminados, em contrapartida aos que são oriundos de áreas não contaminadas (Braun, 2019). Quando expostos a um contaminante, os fungos são submetidos a uma evolução de seus fenótipos resistentes. Assim, quando uma comunidade de fungos é exposta ao contaminante, isso pode promover a seleção natural, causando a morte dos organismos não tolerantes em relação aos resistentes (Atashgahi *et al.*, 2018; Souza, 2021). Desta forma, o metabolismo desses organismos os permite criar tolerância que os ajudam a sobreviverem, alterações essas que podem ocorrer, por exemplo, na membrana plasmática, levando à manutenção de maior rigidez ou fluidez; pode levar à liberação de vesículas, que irão aumentar a hidrofobicidade ou à alteração morfológica, com o aumento ou diminuição da célula, dentre outros mecanismos para defesa e adaptação (Melo, 2008).

Ao longo do processo evolutivo, foram favorecidos e selecionados mecanismos genéticos que permitem aos microrganismos degradar compostos naturais complexos, como lignina, celulose e terpenos. Desta forma, para que a degradação de compostos sintéticos ocorra de maneira eficiente, é necessário um período de adaptação biológica através da evolução das vias metabólicas necessárias para a degradação desses compostos sintéticos de forma induzida (Ferreira, 2012. Siqueira, 1994).

O processo de secreção de enzimas é uma estratégia fundamental que os fungos utilizam para decompor e metabolizar moléculas de maior complexidade, facilitando a absorção de nutrientes essenciais. Essas enzimas atuam na quebra de macromoléculas em compostos menores, que podem ser facilmente absorvidos pelas células fúngicas. Entre essas enzimas, destacam-se as ligninolíticas, como lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase, que são especialmente eficientes na degradação de lignina e outros compostos complexos. Esse processo é vital para o ciclo do carbono, pois contribui para a decomposição de matéria orgânica, liberando carbono para o ambiente e facilitando a reciclagem de nutrientes essenciais para a manutenção dos ecossistemas (Sampaio, 2005).

Além disso, a enzima citocromo P450 mono-oxigenase desempenha um papel importante no metabolismo de substâncias estranhas ao organismo, incluindo pesticidas, herbicidas e outros compostos sintéticos que podem ser tóxicos. Essa enzima é capaz de adicionar átomos de oxigênio a essas moléculas, tornando-as mais solúveis em água e facilitando sua degradação e eliminação pelo organismo. Nos fungos, o citocromo P450 é crucial para a tolerância e degradação de xenobióticos, contribuindo para o potencial desses organismos em processos de biorremediação (Sampaio, 2005).

A presença e atividade da microbiota desempenham um papel fundamental na promoção da degradação de poluentes na natureza. Isso é crucial para evitar que os poluentes liberados por atividades humanas se tornem persistentes no ambiente e causem danos aos organismos vivos (Gaylard; Bellinaso; Manfio, 2005). Assim, para que o processo de biodegradação de um composto xenobiótico ocorra de forma eficiente é necessário que enzimas específicas dos microrganismos atuem, porém, elas podem se encontrar latentes no metabolismo desses seres ou suas atividades se encontrem inativas ou reduzidas. Nesse contexto, a colaboração desses organismos com a microbiota do solo pode ser altamente eficaz na biodegradação, pois um único organismo não teria capacidade de produzir todas as enzimas necessárias para degradar o poluente. Portanto, os consórcios fúngicos desempenham um papel crucial ao auxiliarem na produção dessas enzimas, o que uma única linhagem não conseguiria fazer sozinha, aumentando a eficiência do processo de biodegradação (Pinhati *et al.* 2014, Souza 2021).

Em função do exposto, é possível afirmar que a biorremediação fúngica é um método econômico e ecologicamente correto em comparação com as técnicas convencionais de remediação, pois utiliza processos naturais para transformar poluentes em produtos benignos, tornando-se uma abordagem sustentável para a limpeza de locais contaminados (Tomer *et al.*, 2021). Uma vez que os fungos são essenciais para a biorremediação, devido à sua versatilidade metabólica, vantagens ecológicas, diversos mecanismos de biorremediação e apresentam a capacidade de remediar poluentes emergentes de uma forma rentável e sustentável, fica claro que explorar o potencial destes organismos pode levar a melhores estratégias de biorremediação para restaurar ambientes contaminados (Tomer *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial dos fungos *Fusarium* sp._GW e *Fusarium* sp._GU de promoverem a biodegradação da atrazina, a partir de solos diretamente contaminados com o herbicida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as concentrações de atrazina a serem utilizadas nos ensaios;
- Definir a variação das concentrações finais de atrazina;
- Observar a degradação do agrotóxico em diferentes períodos de ação dos fungos;
- Avaliar a capacidade de degradação da atrazina no solo *ex situ* pelos fungos especificados;
- Observar se os fungos irão crescer utilizando a atrazina como fonte de carbono.

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA E PREPARO DO SOLO

A coleta do solo foi realizada na borda do Parque Nacional do Iguaçu, segundo as coordenadas geográficas 25°32'42.5"S e 54°24'58.1"W presentes no trabalho "Efecto de borde em hongos de un bosque atlántico semidecidual" (Duque, 2016), no qual os fungos foram coletados e caracterizados. Desta forma, foi promovida a continuação das avaliações, neste caso, através da análise *ex situ* dos solos, a partir dos quais os fungos foram isolados.

Figura 3: Proximidade da lavoura (à direita) com a borda do Parque Nacional do Iguaçu.



Fonte: Autoria própria.

Foram realizadas coletas em sete locais, separados entre si por 200m. Os materiais utilizados, como pás e enxadas, foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio (20%) e álcool (70%), por cerca de 5 minutos (Souza, 2021).

Ao selecionar o local, foi necessário remover a serrapilheira com uma enxada e, após isso, com o auxílio de uma cavadeira, realizou-se buracos com 10 cm de profundidade. Após, foi feita a coleta de 5 amostras de cada local, que foram depositadas em sacos estéreis (Souza, 2021; Duque, 2016).

No laboratório, foi feita a homogeneização das amostras e a retirada de corpos estranhos do material como pedras, galhos e folhas. O material precisou ser peneirado, em uma cabine de segurança biológica, com uma peneira granulométrica. Após isso, as amostras de cada local coletado foram unidas em uma única amostra de solo (amostra composta) (Souza, 2021).

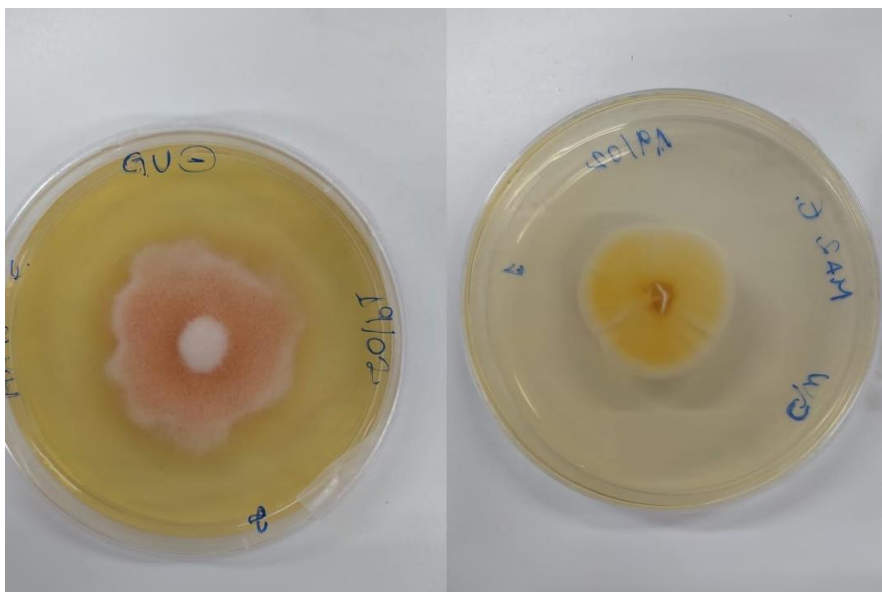
4.2 MICRORGANISMOS

Neste estudo, foram selecionados os fungos que apresentaram melhor desempenho na fase inicial de pesquisa sobre a capacidade de degradação da atrazina, conforme investigado por Esperanza-Naranjo, *et al.* (2020), no trabalho “Potential for the Biodegradation of Atrazine Using Leaf Litter Fungi from a Subtropical Protection Area”. Entre os nove fungos originalmente avaliados, foram escolhidos, para o presente estudo de biorremediação, dois que apresentaram o melhor desempenho: *Fusarium* sp._GW e *Fusarium* sp._GU. Os 2 fungos pertencem a Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA), localizada na Universidade Federal da Integração Latino Americana (UNILA).

4.2.1 Ativação e crescimento dos fungos

Os fungos foram reativados em Meio Sólido de Malte (2%) Enriquecido (20 g/L de Malte, 10 g/L de Peptona, 5 g/L de Extrato de levedura e 20 g/L de Agar), tendo sido incubados durante 7 dias em uma incubadora BOD a 28 °C (Figura 4). Em seguida, foi feita a transferência de 3 fragmentos do micélio fúngico (0,5 mm de diâmetro cada micélio) para o Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio líquido de Malte (2%) Enriquecido. Os fungos presentes nos Erlenmeyer foram submetidos a crescimento em agitação durante 7 dias a 28 °C, a 150 rpm (Figura 3).

Figura 4: Fotos do crescimento fúngico na etapa de ativação.



Fonte: Autoria própria.

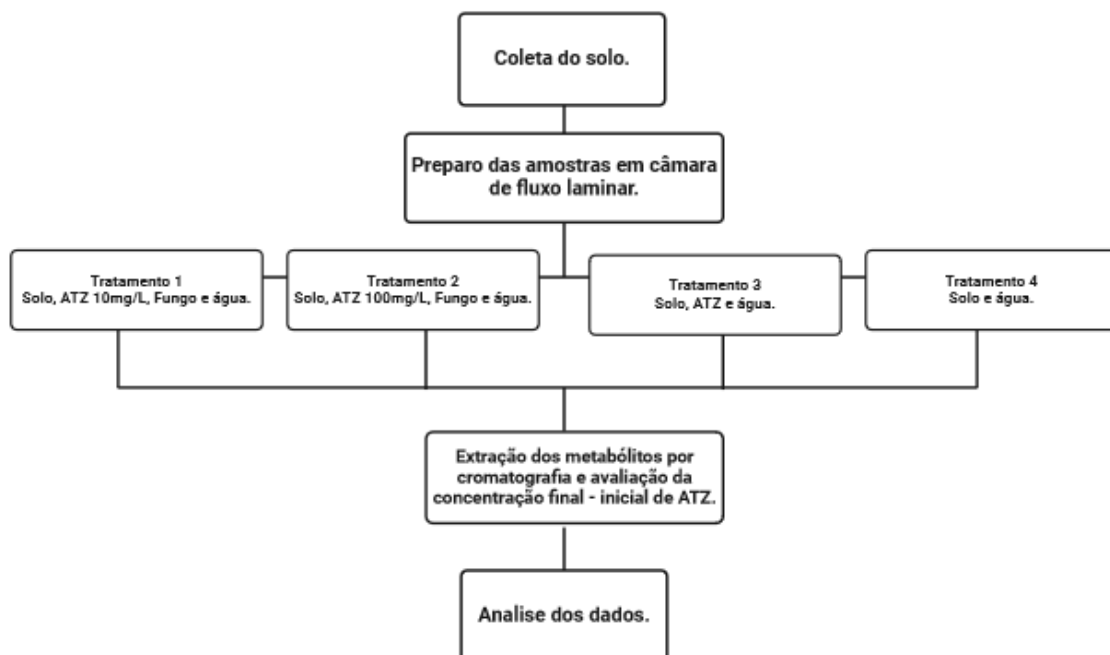
4.2.2 Determinação de contagem de esporos

A quantidade de fungos utilizada nos ensaios foi padronizada através da contagem de esporos em câmara de Neubauer (Lucarini, Silva, Bianchi; 2004). Foi realizada a transferência dos micélios para 50 mL de meio Malte 2% enriquecido em um tubo do tipo Falcon. Após a contagem a concentração foi ajustada para 10^4 esporos por mL, que posteriormente foram transferidos para os Erlenmeyer (Miranda, Spala, Rodrigues, 2016). Em cada ensaio foram inoculados 5 mL da solução de esporos na concentração média de 12×10^4 esporos/mL.

4.3 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

Foram feitos sete tratamentos para a avaliação dos dois fungos isolados (GU e GW). Todos os tratamentos ocorreram em solo não-autoclavado - ATZ e Fungo, e os controles (solo com ATZ e sem fungo; solo sem ATZ e solo sem fungo) como observado na figura 5.

Figura 5: Esquema metodológico de avaliação de biorremediação *ex situ*.



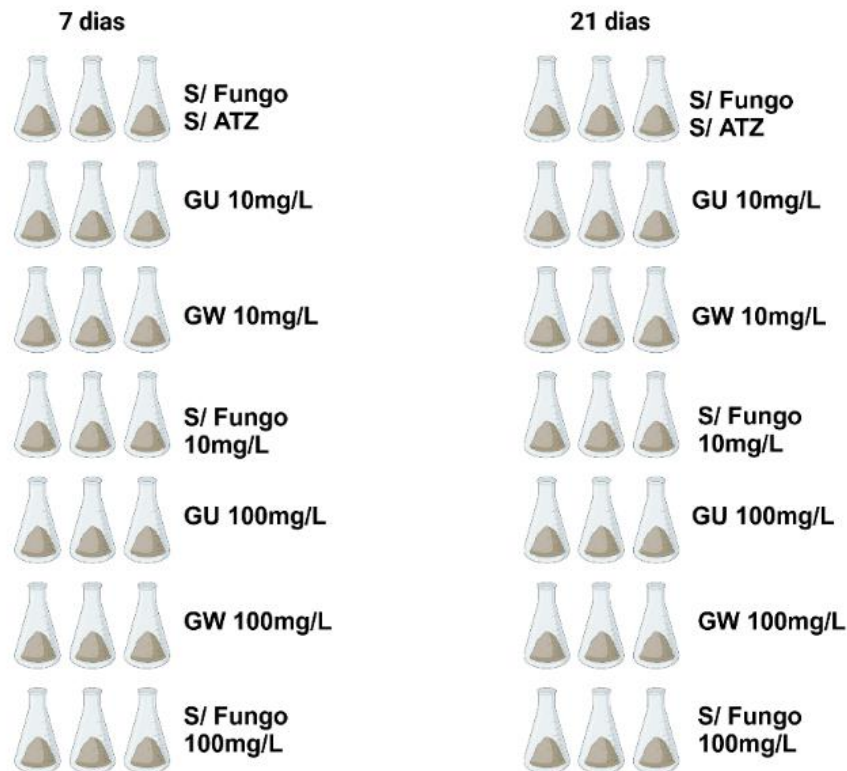
Fonte: Autoral, realizado no Biorender (Biorender, 2024).

Segundo a metodologia adaptada de Souza 2021 e Shashi B. Singh *et al.* 2008, os experimentos realizados diretamente no solo coletado, visando a biodegradação do herbicida, foram realizados no período de reação de 7 e 21 dias, a 32°C e em modo estático, para avaliar a degradação de 10 mg. L⁻¹ e 100 mg. L⁻¹ do herbicida ATZ. Foi necessário repor a água evaporada a cada 2 dias, desta forma, os Erlenmeyer foram previamente pesados em uma balança analítica para acrescentar a quantidade de água destilada estéril (± 2 mL), através da diferença do peso inicial menos o final de cada frasco Erlenmeyer e, assim, garantir a umidade do solo para que os microrganismos pudessem crescer.

4.3.1 Interação *ex situ* do solo com os fungos isolados *Fusarium* sp._GW e *Fusarium* sp._GU.

Para este experimento, foram realizados dois tratamentos – adicionando-se duas diferentes concentrações de ATZ ao solo juntamente com cada fungo avaliado, previamente ativados e crescidos, como detalhado anteriormente. Para tanto, pesou-se 20g da amostra do solo que foi coletada e preparada dentro da cabine de Segurança Biológica com fluxo laminar. Em seguida, adicionou-se 8 mL de meio de cultivo (Malte a 2%), homogeneizou-se a amostra e inoculou-se o fungo através da transferência de esporos que foram previamente contados, conforme descrito em 4.2.2, realizando a técnica de suspensão fúngica. Em seguida adicionou-se 200 μ L do herbicida atrazina nas amostras, para uma concentração final de 10 mg. L⁻¹, e 2000 μ L nas amostras, para a obtenção de uma concentração final de 100 mg. L⁻¹. As reações foram realizadas em triplicata, como indicado na Figura 6.

Figura 6: Desenho experimental dos tratamentos realizados.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (Biorender, 2024).

Foram conduzidos dois tratamentos controle sem a inoculação dos fungos GU e GW, utilizando apenas solo com ATZ nas concentrações de 10 mg.L^{-1} e 100 mg.L^{-1} , além de água destilada estéril, seguindo o mesmo procedimento dos tratamentos anteriores. As reações foram realizadas em triplicata.

Ao final, um controle abiótico foi utilizado, contendo apenas solo, meio de cultura e água destilada estéril, sem a presença de ATZ ou dos fungos experimentais.

4.4 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO SOLO

Resíduos de atrazina presentes no solo das amostras, após os tratamentos descritos anteriormente, foram extraídos com acetona (50mL) agitando a suspensão em agitador orbital por 30min (figura 7).

Figura 7: Agitador orbital utilizado para homogeneizar as amostras.



Fonte: Autoria própria.

A suspensão do solo foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um frasco cônico (figura 8). O solo foi reextraído uma segunda vez em um total de duas extrações.

Figura 8: Conteúdo extraído do solo.



Fonte: Autoria própria.

As amostras foram evaporadas em rotaevaporador para *secura* (Shing, *et al.* 2007). O conteúdo foi coletado em frascos de vidro (figura 9) com o auxílio de uma seringa com filtro de PTFE Hidrofílico 25mm X 0.45µm. As amostras dos frascos foram dissolvidas em metanol antes da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Figura 9: Amostra do material extraído para análise em cromatografia.



Fonte: Autoria própria.

4.5 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA A PARTIR DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM MEIO SOLO

4.5.1 Preparo do meio solo líquido

O preparo do meio solo foi realizado utilizando o mesmo solo empregado no experimento anterior. Inicialmente, o solo foi retirado do freezer e deixado secar ao ar livre por um período de 2 dias (Instituto Leibniz DSMZ – coleção alemã de microrganismos e culturas celulares GmbH, 2024). Após a secagem, 400g de solo foram pesados e misturados com 1000mL de água destilada em um frasco reagente de vidro do tipo Schott. Essa mistura foi então esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos, em seguida, o frasco foi deixado em repouso para permitir a sedimentação completa do solo.

Após a decantação, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro frasco, eliminando as partículas maiores de solo com o auxílio de um filtro adequado.

O volume da solução foi ajustado com água destilada, e o pH foi previamente ajustado para uma faixa de 6,8 a 7,0, garantindo condições adequadas para o crescimento fúngico. Em seguida, o novo frasco foi submetido a uma segunda esterilização para assegurar a eliminação de contaminantes (Instituto Leibniz DSMZ – coleção alemã de microrganismos e culturas celulares GmbH, 2024) (figura 10).

Figura 10: Extrato de solo líquido.



Fonte: Autoria própria.

Ao final do preparo, o meio líquido estéril foi distribuído em frascos de Erlenmeyer, e a inoculação dos fungos foi realizada nos respectivos frascos para dar início aos experimentos de crescimento e biodegradação. Foram adicionados 3 fragmentos de micélio de cada fungo nos tratamentos, seguindo o mesmo padrão do experimento anterior realizado no solo.

Para a avaliação da produção de biomassa, os fungos foram cultivados em uma incubadora “shaker” a uma temperatura controlada de $\pm 28^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante de 150 rpm. O período de incubação foi de 7 dias, garantindo condições adequadas para o crescimento fúngico.

Após esse período de crescimento, o conteúdo presente nos Erlenmeyer foi filtrado e cada filtro levado para a estufa onde ficaram 42h para secagem e posterior pesagem do material seco, em balança analítica, para a determinação das comparações de peso com os controles (Da Costa *et al.*, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ADAPTAÇÃO E CRESCIMENTO DE FUSARIUM SP. EM SOLO CONTAMINADO COM ATRAZINA: POTENCIAL DEGRADATIVO

Após a inoculação dos fungos *Fusarium* sp._GW e *Fusarium* sp._GU em solo contaminado com atrazina, nos primeiros 7 dias, não houve alterações visíveis no crescimento até o momento da extração inicial. Porém, nos dias subsequentes, até o 21º dia, foi possível observar o desenvolvimento de micélios em alguns frascos de Erlenmeyer, tanto no solo quanto nas paredes internas dos frascos, o que sugere uma adaptação gradual dos organismos ao ambiente contaminado e às condições térmicas (Figura 6). Esse crescimento aponta para uma possível atividade degradativa da atrazina, mediada pelas estruturas filamentosas dos fungos, que desempenham um papel crucial na interação com os compostos presentes no solo (Singh & Singh, 2016), uma vez que o solo estava livre de outras formas de vida e, mesmo com a presença do agroquímico, o desenvolvimento dos fungos foi possível.

Foi possível observar ainda que o crescimento nos frascos de Erlenmeyer não ocorreu de forma uniforme, sendo observado apenas em alguns deles como mostrado na figura 11 (Erlenmeyer com fungo GW 100 mg. L⁻¹ e GU 10 mg. L⁻¹) possivelmente devido a uma maior biodisponibilidade de nutrientes. Embora o solo tenha sido homogeneizado, é possível que alguns frascos tenham contido algum tipo de substrato secundário (Souza, 2021).

Os resultados decorrentes das cromatografias não foram condizentes com o perfil esperado para a ATZ ou aos produtos associados à sua degradação. Foram observados picos relativos apenas à acetona, isto é, ao solvente utilizado para a extração, sendo necessárias novas repetições do experimento. Os fatores que podem ter contribuído para o ocorrido podem estar relacionados: à degradação prévia do agroquímico; à absorção total do pesticida no processo de extração ou ao tempo de meia vida do pesticida que pode ter interferido na sua degradação, devido à utilização de concentrações muito pequenas (Queiroz, 2000).

Um estudo realizado por Singh *et al.* (2004) investigou a ação de *Acinetobacter* no processo de mineralização da atrazina e verificou que esses microrganismos foram capazes de crescer em concentrações de 250 mg/L de ATZ. Isso sugere que os fungos também poderiam ter a capacidade de se desenvolver em

concentrações menores, como 10 mg/L e 100 mg/L. Comparativamente, os fungos usados no presente trabalho são do gênero *Fusarium spp.*, desta forma, pertencem ao grupo dos ascomicetos, e suas principais características são hifas bem desenvolvidas, septadas e não pigmentadas, que podem variar em forma, tamanho e número de uma espécie para outra (HOF, 2020).

Figura 11: Crescimento fúngico em Erlenmeyer.



Fonte: (Autoria própria)

5.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E ENZIMAS NA BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA POR FUNGOS

Os fungos submetidos ao extrato de solo (meio líquido) não apresentaram sinais de crescimento significativo em sete dias, independentemente das condições experimentais. Tanto nos tratamentos contendo o ATZ quanto nos tratamentos controle, não foi observada a formação de biomassa fúngica. Estudos apontam que a degradação da ATZ por fungos é influenciada por uma série de fatores, como a temperatura, o pH, o tipo de meio de cultivo, a concentração do contaminante e o período de incubação (Andretta, 2022). A ausência de crescimento indica que, sob essas condições específicas, o meio não forneceu os nutrientes ou ambiente adequados para a proliferação dos fungos (Madigam, 2016), sugerindo uma possível limitação na adaptação ou no processo de assimilação de nutrientes disponíveis no meio líquido. Desta forma, a ausência de biomassa sugere uma limitação significativa no uso desse meio de cultura para o desenvolvimento microbiano em sete. Porém, como observado no ensaio anterior, o crescimento, mesmo em condições

mais favoráveis só foi observado com mais de 14 dias, indicando que para o ensaio em condições semissólidas também seja necessário mais tempo de incubação (Souza, 2021).

Estudos com outros fungos, como *Pleurotus ostreatus*, indicam que a biodegradação de atrazina depende de enzimas específicas como hidrolases capazes de realizar hidrólise de compostos triazínicos. Além disso, foram observadas peroxidases extracelulares, como a peroxidase do tipo DyP, que pode ter desempenhado um papel importante na degradação. Outro destaque foi a provável participação do complexo citocromo P450 monoxigenase, uma classe de enzimas intracelulares responsáveis por reações de desintoxicação celular, ela está acoplada ao NADPH-redutase e tem função de ser uma fonte de elétrons para as principais reações de oxidação nos fungos, atuando no processo de N-desalquilação dos compostos (Lopes *et al.* 2020). Em alguns casos, a atrazina pode não ser uma fonte de carbono eficiente para o crescimento em meio líquido, especialmente na ausência de outras fontes de carbono que sejam mais prontamente utilizáveis. Além disso, as enzimas envolvidas na degradação da atrazina, como lacases e peroxidases, frequentemente têm maior eficiência em ambientes sólidos, onde a interação entre os fungos e o substrato é facilitada (El-Ramady *et al.*, 2022).

No experimento realizado em solo, o desenvolvimento visível de micélio sugere uma possível adaptação ao ambiente contaminado e indica a capacidade dos fungos de crescer em ambiente com a atrazina, uma vez que eles foram capazes de degradar ATZ no meio líquido, conforme o artigo “Potential for the Biodegradation of Atrazine Using Leaf Litter Fungi from a Subtropical Protection Area” (Esperanza-Naranjo, *et al.*, 2020). Isso pode ser explicado pela capacidade de alguns fungos de realizar transformações químicas na molécula de atrazina, como oxidação e hidrólise, que resultam em metabólitos secundários como a desetilatrazina (DEA) e a deisopropilatrazina (DIA) (Lopes *et al.* 2020).

Estudos prévios com o gênero *Penicillium*, por exemplo, mostraram que esses fungos são capazes de mineralizar a atrazina, além de seus metabólitos utilizando-os como fonte de nitrogênio (Li, *et al.*, 2019) ou em meio suplementado com carbono (Sampaio, 2005). Nesses estudos, quatro metabólitos diferentes foram detectados, tanto no filtrado de cultura quanto no extrato celular livre (CFE), corroborando a hipótese de que fungos podem atuar na degradação parcial da atrazina em condições adequadas (Li, *et al.*, 2019). A adaptação observada em solo contaminado reforça a ideia de que os fungos selecionados podem ter utilizado a atrazina como fonte de nitrogênio, ainda que outros fatores, como a presença de carbono exógeno, possam ser necessários para o crescimento

mais robusto da biomassa fúngica (Esperanza-Naranjo, *et al.*, 2020).

Os resultados dos experimentos, tanto em solo contaminado com atrazina quanto em meio, fornecem dados sobre a capacidade desses microrganismos de utilizar a atrazina como fonte de carbono e nitrogênio, além de demonstrar a complexidade da biodegradação fúngica de herbicidas como a atrazina e sugerem que o sucesso desse processo depende amplamente das condições ambientais e experimentais. A capacidade dos fungos de crescer em solos contaminados pode estar ligada à maior disponibilidade de nutrientes e à formação de sistemas enzimáticos mais eficazes em ambientes sólidos, enquanto o meio solo líquido pode limitar o desenvolvimento da biomassa e a eficiência da degradação. Isso reforça a importância de ajustar as condições de cultivo e de buscar fontes suplementares de carbono para otimizar a biodegradação em diferentes ambientes (El-Ramady *et al.*, 2022; Sampaio, 2005).

6 CONCLUSÃO

A seleção de microrganismos com potencial para biodegradação é essencial, já que nem todos conseguem crescer e degradar xenobióticos de forma eficiente. Com base nisso, dois fungos foram selecionados por apresentarem bom desempenho no estudo de degradação de atrazina em meio líquido. Os fungos *Fusarium* _GU e *Fusarium* _GW mostraram maior capacidade de adaptação e eficiência na biodegradação do herbicida. Através do estudo de biodegradação *ex situ* realizado em solo foi indicado uma possível viabilidade do fungo em se desenvolver em ambientes contaminados com o agroquímico ATZ, pois, mesmo na presença de vários fatores, trazidos pelo uso do solo, os fungos do estudo conseguiram se desenvolver.

As análises cromatográficas deverão ser repetidas, considerando um novo processo de extração mais eficiente para o herbicida em questão. Para minimizar a degradação ambiental, recomenda-se o uso de reagentes recém-preparados no momento da preparação das amostras. Com a confirmação das cromatografias poderá ser possível avaliar se os fungos tiveram a capacidade de degradar realmente a atrazina do meio sólido.

No entanto, para otimizar o processo de biodegradação em experimentos futuros, especialmente em meios líquidos, é fundamental incluir fontes adicionais de nutrientes além da atrazina. O herbicida, por si só, pode não ser suficiente para sustentar o crescimento fúngico adequado, exigindo a presença de nutrientes que suportem a proliferação e o metabolismo desses microrganismos.

A continuidade de pesquisas de biorremediação *in situ* é igualmente importante para avaliar se esses fungos conseguem decompor o contaminante diretamente no ambiente poluído. Se comprovada sua eficiência em condições reais, os fungos poderão ser aplicados tanto na restauração de áreas contaminadas quanto na redução do tempo necessário para que o solo possa ser reutilizado. Isso seria vantajoso para os agricultores, que enfrentam o desafio de esperar a recuperação do solo após a contaminação, permitindo um replantio mais rápido e eficiente.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Monografias autorizadas. Brasília, DF: ANVISA, 2018.

ANDRETTA, Alessandra *et al.* **Análise da fitotoxicidade da atrazina após biodegradação fúngica**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/anvisa-aprova-novo-marco-regulatorio-para-agrotoxicos> . Acesso em: 01 de novembro de 2023;

AQUINO, R. V. Biorremediação de solos contaminados por agrotóxicos organoclorados: uma revisão cienciométrica. Trabalho de conclusão de curso em Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados - **Faculdade de ciências biológicas e ambientais curso de biotecnologia**, 2021 – Dourados, p. 45.

ATASHGAHI, S. *et al.* Prospects for harnessing biocide resistance for bioremediation and detoxification. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 743-746, 2018;

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 1-18, 2016.

BALDISSARELLI, D. P. *et al.* Remediação de Solos Contaminados por Agrotóxicos Utilizando Processos Físico-Químicos: Breve Revisão. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. The nature and properties of soils. 1996

Braun, A. B., Trentin, A. W. da S., Visentin, C., & Thomé, A. (2019). BIORREMEDIAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS TÓXICOS. *Revista CIATEC-UPF*, 11(2), 73-87. <https://doi.org/10.5335/ciatec.v11i2.8971> BURKEN, Joel G.; SCHNOOR, Jerald L. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. **Environmental science & technology**, v. 31, n. 5, p. 1399-1406, 1997.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariuna: **EMBRAPA Meio Ambiente**, p. 13-51, 2003;

COELHO, E. R. C.; BERNARDO, L. D.. Presença e remoção de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina e desetilhidroxiatrazina em instalação piloto de ozonização e filtração lenta. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 04, p. 789-796, 2017.

DA COSTA, A. M. *et al.* avaliação de modelos semi-empíricos para estimativa remota

da concentração de sólidos suspensos totais em um sistema estuarino lagunar tropical. **Universidade Federal de Alagoas**. 2019.

DATTA, A.; PARKHEY, P.; BHATNAGAR, T. Bioremediation Studies on Pesticides in Soil by Novel Microorganisms Isolated from Agricultural Fields. **International Research Journal on Advanced Engineering and Management (IRJAEM)**, v. 2, n. 03, p. 317-325, 2024.

DAL'PIZOL NOVELLO, B. *et al.* Bioremediation, drought tolerance and biofortification in biotechnological uses. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 45, 2023.

DE CAMPOS, A. L. *et al.* O avanço do agrotóxico no Brasil e seus impactos na saúde e no ambiente. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2021;

DELLAMATRICE, P. M. *et al.* Degradação de agrotóxicos por fungos Basidiomicetos em solo agrícola contendo altos níveis de três produtos diferentes Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente. **Curitiba**, v. 22, p. 7-16, 2012.

DE SOUZA, H. J. Resíduos de agrotóxicos proveniente de cultivos de hortaliças: uma perspectiva ambiental. **Engineering Sciences**, v. 10, n. 2, p. 39-45, 2022.

DIAS, A. C. L. *et al.* Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. **Revista Internacional de Ciências**, v. 8, n. 2, p. 234-253, 2018.

DUQUE, C. D. C. Efeito de borda em fungos da Mata Atlântica Semidecidual. 2016. 52 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – **Universidade Federal da Integração Latino-Americana**, Foz do Iguaçu, 2016. 49 p.;

EL-RAMADY, HASSAN, NEAMA ABDALLA, ZAKARIA FAWZY, KHANDSUREN BADGAR, XHENSILA LLANAJ, GRÉTA TÖRÖS, PETER HAJDÚ, YAHYA EID, AND JÓZSEF PROKISCH. "Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation". **Sustainability** **14**, no. 6: 3667. <https://doi.org/10.3390/su14063667>, 2022.

ESPARZA-NARANJO, S. B. *et al.* Potential for the biodegradation of atrazine using leaf litter fungi from a subtropical protection area. **Current Microbiology**, v. 78, p. 358-368, 2021.

FRANCOLINO, B. Y. Avaliação de curto prazo dos efeitos letais e subletais da Atrazina sobre o nematoide marinho de vida-livre *Litoditis marina* (BASTIAN, 1865) Sudhaus, 2011 (Rhabditida: Rhabditiidae). **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco**. 2022.

GAYNOR, J. D.; MACTAVISH, D. C.; FINDLAY, W. I. Surface and sub-surface transport of atrazine and alachlor from a Brookston clay loam under continuous corn production. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, p. 240-245, 1992.

GUERRERO RAMÍREZ, J. R. *et al.* Microbiology and biochemistry of pesticides biodegradation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15969, 2023.

HANSEN, A. M. *et al.* Atrazina: Un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 29, n. SPEC.ISSUE, p. 65–84, 2013.

HESS, Sonia Corina; NODARI, Rubens O. Agrotóxicos no Brasil: Panorama dos produtos aprovados entre 2019 e 2022. **Ambientes em Movimento**, v. 2, n. 2, 2022.

HOF, Herbert. The medical relevance of *Fusarium* spp. **Journal of fungi**, v. 6, n. 3, p. 117, 2020.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 29 nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 23 de outubro de 2023;

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>. Acesso em 01 de novembro de 2023;

LEONEL, L. V. *et al.* Biorremediação do solo. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 26, n. 51, p. 37-52, 2018.

LI, X. *et al.* Restructured fungal community diversity and biological interactions promote metolachlor biodegradation in soil microbial fuel cells. **Chemosphere**, v. 221, p. 735-749, 2019.

LIU, J. *et al.* Physicochemical assessment of environmental behaviors of herbicide atrazine in soils associated with its degradation and bioavailability to weeds. **Chemosphere**, v. 262, p. 127830, 2021.

LOOS, R. & NIESSNER, R. (1999) Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 835, p. 217-229.

LOPES, R. O. *et al.* Atrazine, desethylatrazine (DEA) and desisopropylatrazine (DIA) degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 6, p. 415-430, 2020.

LUZ, V. G. (In) segurança alimentar e nutricional em agricultores familiares e o uso da terra no município de Ibiúna, SP. 2014. Tese de Doutorado. [sn].

MADIGAM, M. Microbiologia de Brock. 14. ed. São Paulo: **Pearson Education do Brasil**, 2016. ISBN 8587918516;

MELO, I. S. E. Importância da rizosfera na biodegradação de xenobióticos. In.: [S.l.: s.n.]: **Embrapa Meio Ambiente**, 2008. p. 589–607.

MELLO, J. L. de. *et al.* Avaliação da contaminação por HCH e DDT dos leites de vaca e humano provenientes da Cidade dos Meninos, **Duque de Caxias-RJ**. 1999. Tese de

Doutorado.

MENDES, C. R. A. *et al.* Agrotóxicos: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira-uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, n. 17, p. 95-107, 2019.

MENDONÇA, J. dos S. *et al.* Influência da exposição à atrazina e glifosato no desenvolvimento ósseo de *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). 2015.

MORILLO, E. VILLAVARDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils, **Science of The Total Environment**, Volume 586, 2017, Pages 576 597, ISSN 0048-9697.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em 01 de novembro de 2023.

MONTEIRO, R. R. *et al.* Direito e Política Nacional Do Meio Ambiente: Os desafios enfrentados na atualidade no Brasil (2019-2021). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e20611729766-e20611729766, 2022.

MOREIRA, R. A.; DA SILVA MANSANO, A.; ROCHA, O. O efeito da toxicidade aguda do herbicida atrazina para o Cladóceros *Moina minuta* Hansen, 1899. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, 2013.

NAKAGAWA, L. E. *et al.* Comportamento da atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 471-476, 1995.

NARANJO, S. B. E. BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA MEDIANTE HONGOS DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU. 2018. 65 páginas. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2018.

PIGNATI, W. A.; MACHADO, J. MH; CABRAL, J. F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde-MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 105-114, 2007.

Pinhati, F.R., Del Aguila, E.M., Torres, A.P.R., De Sousa, M.P., Santiago, V.M.J., Silva, J. T., Paschoalin, V.M.F., 2014. Evaluation of the efficiency of deterioration of aromatic hydrocarbons by bacteria from wastewater treatment plant of oil refinery. **Quim Nova** **37**, 1269–1274. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140221>.

POTTER, T. L.; BOSCH, D. D.; DIEPPA, A.; WHITALL, D. R.; STRICKLAND, T. C. Atrazine fate and transport within the coastal zone in southeastern Puerto Rico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 36–44, 2013.

QUEIROZ, B. P. V. de; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de ¹⁴C-atrazina em solo sob condições semicontroladas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 849-856, 2000.

ROCHA, R. R. O.; ALVAREZ, V. M. P. Fiscalização Ambiental De Agrotóxicos No Brasil.

Ambiente & Sociedade, v. 26, p. e02012, 2023.

RIBEIRO, A. B. *et al.* Removal of organic contaminants from soils by an electrokinetic process: the case of atrazine.: **Experimental and modeling. Chemosphere**, v. 59, n. 9, p. 1229-1239, 2005.

SAMPAIO, G. M. M. S. Remoção de Metil paration e Atrazina em reatores de bancada com fungos. 2005.

SHASHI B. SINGS, SHASHI P. LAL, SHASHI PANT E GITA KULSHRESTHA (2008) Degradation of atrazine by an acclimatized soil fungal isolate, **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, 43:1, 27-33.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.

SINGH, P.; SURI, C. R.; CAMEOTRA, S. S. Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 317, n. 3, p. 697-702, 2004.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; BASIT WANI, A.; SINGH, N. & SINGH, J. (2018). Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, 16(1), 211–237. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0665-8>;

SIQUEIRA, J. O. *et al.* Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. 1994.

SOUZA, R. R. de *et al.* Efeitos da atrazina na composição química e morfologia de cascas de ovos de Podocnemis Expansa (Testudines, Podocnemididae) incubados artificialmente. 2013.

SOUZA, J. Al. P. de *et al.* O gerenciamento de riscos na cidade dos meninos: um sítio contaminado por pesticidas organoclorados, no Estado do Rio de Janeiro. 2003. Tese de Doutorado.

SOUZA, L. I. de. Biodegradação e biorremediação *ex situ* do pesticida esfenvalerato mediado por microrganismos isolados do solo. 2021. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) - **Instituto de Química de São Carlos, University of São Paulo**, São Carlos, 2021. doi:10.11606/D.75.2021.tde-02022022-130716.

TOMER, A. *et al.* Role of fungi in bioremediation and environmental sustainability. **Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 3**, p. 187-200, 2021.
WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010) Atrazine and its metabolites in drinking-water - background document for development of WHO. In: WHO. Guidelines for Drinking-water Quality: recommendations. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf. Acesso em: 9 out. 2024.

WAHLA, V.; SHUKLA, S. Role of microorganisms in bioremediation of pesticides. In: Research Anthology on Emerging Techniques in Environmental Remediation. **IGI Global**, 2022. p. 150-176