



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**



**MESSIAS SANTOS PASSOS**

**BIORREMEDIAÇÃO, PERFILAMENTO QUÍMICO E BIOTECNOLÓGICO DE  
FUNGOS FILAMENTOSOS RESISTENTES A CÁDMIO**

**SALVADOR  
2020**

**MESSIAS SANTOS PASSOS**

**BIORREMEDIAÇÃO, PERFILAMENTO QUÍMICO E BIOTECNOLÓGICO DE  
FUNGOS FILAMENTOSOS RESISTENTES A CÁDMIO**

Tese de doutorado, apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química Orgânica.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Regina M Geris dos Santos

Coorientador: Dr. Madson de Godoi Pereira

**SALVADOR**

**2020**

TERMO DE APROVAÇÃO  
MESSIAS SANTOS PASSOS

BIORREMEDIAÇÃO, PERFILAMENTO QUÍMICO E BIOTECNOLÓGICO DE  
FUNGOS FILAMENTOSOS RESISTENTES A CÁDMIO

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química Orgânica, Instituto de Química, da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2020.

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria dos Santos Geris (Orientadora)  
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira (Coorientador)  
Doutorado em Ciências, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)  
Universidade do Estado da Bahia

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Débora de Andrade Santana  
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)  
Universidade do Estado da Bahia

---

Prof. Dr. Fernando Faustino de Oliveira  
Doutorado em Química, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)  
Universidade Estadual de Santa Cruz

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Elisângela Fabiana Boffo  
Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Ribeiro de Jesus  
Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas, Wageningen University  
Universidade Federal da Bahia

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

P289    Passos, Messias Santos  
          Biorremediação, perfilamento químico e biotecnológico de  
          fungos filamentosos resistentes à cádmio / Messias Santos  
          Passos. – Salvador, 2020.  
          285 f.  
          Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Maria Geris dos Santos  
          Co-orientador Prof. Dr. Madson de Godoi Pereira  
  
          Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
          Instituto de Química, 2020.  
  
          1. Biorremediação. 2. Metais tóxicos. 3. Fungos. I. Santos,  
          Regina Maria Geris dos. II. Pereira, Madson de Godoi III.  
          Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 550.4

*Às minhas amadas irmãs e porto seguro Luzinete, Luziene, Luzinalva e Cleide, à minha sobrinha Maria Alice, ao meu Pai Nicolau (in memoriam), e, em especial à minha Mãe Benedita (in memoriam), a quem devo o melhor de mim e a quem dedico não só este trabalho, mas tudo de bom que souber fazer.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por toda cumplicidade, incentivo e apoio.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Regina Geris, pela orientação, cuidado e inestimável contribuição à minha formação enquanto pesquisador e também enquanto docente.

Ao Professor Dr. Madson de Godoi Pereira, pela orientação, disponibilidade e apoio técnico e científico.

À Gabriela Mascarenhas com quem dividi os orientadores, e quem foi essencial em ensinamentos, apoio e ajuda na realização deste trabalho.

À Grande Família LBQM, liderada pela Professora Regina e o Professor Marcos Malta, e aos irmãos científicos que levo para vida: Camila Carvalho, Cristian Lins, Ícaro Abreu, Jeferson Rosário, Leonardo Teles, Letícia Dela Porte, Maurício Brandão e Verônica Maciel. Obrigado pela interação de extremo aprendizado, superação de dificuldades e celebração da vida.

Aos alunos de Iniciação Científica que passaram pelo LBQM e aos quais tive a oportunidade e privilégio de tutorear, em especial à Ingrid, Raiana e Auriane, por todo aprendizado compartilhado.

Aos Professores Frederico Guaré e Elisangela Boffo e a Heiter Bones, que através do LABAREM, deram grande contribuição ao trabalho.

À Professora Lourdes Cardoso de Souza Neta e alunos do Laboratório de Bioensaios da UNEB

À Tâmara Reis pela amizade, troca de experiências, apoio técnico e por toda ajuda nesta jornada.

Aos colegas do GESNAT pela grande parceria.

Ao Professor Paulo Ribeiro e aos alunos do “Metabolomics Research Group”

Aos amigos João Loroza, Conce Almeida, Juliana Machado, Josilãna, Karen, Jeferson, Luciana, Raimundo, Esmeralda e Juliana Maia, que, de perto ou mesmo de longe, me fortaleceram nesta caminhada

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba, nas pessoas do Professor Josean Fechine Tavares e Lucas Silva Abreu.

À Universidade Federal da Bahia, ao Instituto de Química, ao Programa de Pós-Graduação em Química, à CAPES e demais agências de fomento, por viabilizarem a realização do trabalho.

“Agora aprendi por que o mundo dá volta  
quanto mais a gente se solta  
mais fica no mesmo lugar”

*(Paulo César Pinheiro)*

PASSOS, M. S. **Biorremediação, Perfilamento Químico e Biotecnológico de Fungos Filamentosos Resistentes a cádmio**. 283 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

## RESUMO

Fungos filamentosos estão amplamente difundidos nos mais diversos habitats como decompositores da matéria orgânica, dentre os quais, encontram-se espécies causadores de doenças em vegetais e animais, incluindo os humanos. Por outro lado, microrganismos pertencentes ao Reino *Fungi* também apresentam um conjunto de qualidades que são de extremo interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica dentre outras aplicações. Nesse trabalho, foi realizado o isolamento de fungos do solo para investigação do seu potencial biotecnológico, sua capacidade de resistência à estresse por metal tóxico e sua possível aplicação em processos de biorremediação, bem como a avaliação do efeito desse estresse na produção de substâncias do metabolismo secundário. Empregou-se a técnica de diluição seriada de suspensão de solo, e os isolados foram identificados em nível de gênero por microscopia óptica. Os isolados foram submetidos à ensaios de averiguação da produção de enzimas e de agentes fungicidas e antibacterianos, por desenvolvimento em placa. Foram também submetidos a testes de tolerância, resistência e bioacumulação dos cátions metálicos Cd (II) com análise através da espectroscopia de absorção atômica de chama (EAAC). Em complementação, foram obtidos os extratos brutos, do micélio com solvente orgânico em banho ultrassônico, e do caldo fermentado, por partição líquido/líquido com solvente orgânico, das espécies que demonstraram maior resistência ao estresse metálico, tanto dos fungos desenvolvidos em meio contendo os cátions, quanto em meio livre destes. Os extratos foram analisados por espectrômetro de massas por ionização por eletrospray com analisador “ion trap” (EM-ESI-Ion Trap) para a presença ou supressão de derivados sorbicilinoídeos. De um total de 51 isolados, foram detectadas espécies pertencentes à quatro diferentes gêneros. Nos testes de antagonismo, aproximadamente metade dos isolados apresentou um grau de inibição crescimento dos microrganismos testados com destaque para atividade antifúngica. Mais de 70% dos isolados apresentou alta atividade proteolítica, amilolítica e lipolítica. Muitos isolados demonstraram tolerância aos cátions Cd (II) na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, mas apenas quatro isolados, pertencentes ao gênero *Penicillium*, demonstraram alta resistência ao estresse metálico se desenvolvendo em concentrações que variaram entre 500 mg L<sup>-1</sup> e 9.000 mg L<sup>-1</sup>. O *Penicillium* sp. M04 apresentou o maior potencial de bioacumulação (*in vivo*) com capacidade de remover do meio de crescimento o equivalente a 79,48 mg g<sup>-1</sup> dos cátions Cd (II). No teste de bioadsorção, o isolado *Penicillium* sp. M04 também apresentou os maiores valores de massa de Cd (II) adsorvida por grama de biomassa do seu micélio (inativo). Os quatro isolados apresentaram perfis químicos afetados pelo estresse metálico. O fracionamento do extrato do caldo fermentado do *Penicillium* sp. M01 levou ao isolamento do policetídeo sorbicilinoídeo *trichodimerol*. O trabalho reforçou o grande potencial dos fungos, sobretudo para o emprego em processos de biorremediação, tendo em vista a apreciável resistência e a capacidade de bioacumulação e bioadsorção dos cátions Cd (II).

**Palavras chave:** Biorremediação; metais tóxicos; perfilamento químico; fungos filamentosos; cádmio

PASSOS, M. S. **Biorremediação, Perfilamento Químico e Biotecnológico de Fungos Filamentosos Resistentes a cádmio**. 283 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

## ABSTRACT

Filamentous fungi are widely disseminated in various habitats as decomposers of organic matter, among which are disease-causing species in plants and animals, including humans. On the other hand, microorganisms belonging to the Fungi Kingdom also present a set of qualities that are of extreme interest to the food and pharmaceutical industries and, more recently for employment in environmental recovery processes. In this work, the isolation of soil fungi was performed to investigate its biotechnological potential, its ability to resist toxic metal stress and its possible application in bioremediation processes, as well as the evaluation of the effect of this stress on the production of substances of special metabolism. In the isolation of the species, the technique of serial dilution of soil suspension was used, and the isolates were identified at the genus level by optical microscopy. The isolates were submitted to tests of investigation of the production of enzymes and fungicide and antibacterial agents, by development in Petri dish. They were also submitted to tolerance, resistance and bioaccumulation tests of Cd (II) metal cations with analysis by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS). Crude extracts from mycelium with organic solvent in an ultrasonic bath and from fermented broth were obtained by liquid/liquid partition with organic solvent from the species that showed greater resistance to metallic stress, both of the fungi developed in cation containing the cations and in a free medium. The extracts were studied in a mass spectrometer by electrospray ionization with an ion trap analyzer (EM-ESI-Ion Trap) for the presence or suppression of sorbicillinoid derivatives. From a total of 51 isolates, species belonging to 4 different genera were detected. In the antagonism tests, approximately half of the isolates presented a degree of growth inhibition of the microorganisms tested, with emphasis on antifungal activity. More than 70% of the isolates presented high proteolytic, amylolytic and lipolytic activity. Many isolates showed tolerance to Cd (II) at concentration  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , but only four isolates, of the genus *Penicillium*, showed high resistance to metallic stress developing in concentrations between  $500 \text{ mg L}^{-1}$  and  $9,000 \text{ mg L}^{-1}$ . The *Penicillium* sp. M04 presented the highest bioaccumulation potential (*in vivo*) with the ability to remove  $79.48 \text{ mg g}^{-1}$  of Cd (II) from the growth medium. In the biosorption test, the isolate *Penicillium* sp. M04 also presented the highest Cd (II) mass values adsorbed by gram of biomass of its mycelium (inactive). The four species had their chemical profiles affected by metallic stress. The extract fractionation of the fermented broth of *Penicillium* sp. M01 led to the isolation of the polyketide sorbicillinoid *trichodimerol*. The study showed the great potential of fungi to perform bioremediation processes, because they were highly resistant and performed bioaccumulation and biosorption of Cd (II).

Keywords: bioremediation; toxic metals, chemical profile, filamentous fungi, cadmium

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1 - Esquema de diluição sucessiva da suspensão de solo .....	38
Figura 2. 2 - Representação da câmara para microcultivo de fungos filamentosos ..	40
Figura 2. 3 - Quadro com a caracterização macro e micromorfológica do Isolado M12 .....	50
Figura 2. 4 - Classificação dos microrganismos frente a ação dos isolados fúngicos de acordo com os padrões de desempenho para teste de suscetibilidade definidos pela CLSI.....	52
Figura 2. 5 - Fotografia do isolado M12 <i>Aspergillus</i> sp. em BDA ( <b>A</b> ) e dos co-cultivos em AN com <i>C. albicans</i> ( <b>B</b> ), <i>P. aeruginosa</i> ( <b>C</b> ), <i>S. choleraesius</i> ( <b>D</b> ), <i>B. cereus</i> ( <b>E</b> ) e <i>S.aureus</i> ( <b>F</b> ) .....	53
Figura 2. 6 - Atividade proteolítica do Isolado M06 <i>Fusarium</i> sp. ( <b>A</b> ), atividade amilolítica do Isolado M22 <i>Penicillium</i> sp. ( <b>B</b> ) e atividade lipolítica do Isolado M14 <i>Fusarium</i> sp. ( <b>C</b> ).....	57
Figura 2. 7 - Distribuição percentual dos isolados fúngicos nas categorias de atividade enzimática.....	60
Figura 3. 1 - Mecanismos de biorremediação de metais de acordo com o metabolismo celular.            90	
Figura 3. 2 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos de biorremediação por células ativas ou inativas.....	91
Figura 3. 3 - Comparação entre os aspectos macroscópicos do desenvolvimento da colônia do fungo M01 no meio controle (A) e no meio estressado com Cd(II). .....	112
Figura 3. 4 - Imagens dos fungos resistentes a Cd(II). Colônias em meio controle (A; C; E; G) e colônias em meio estressado com o metal (B; D; F; H).....	113
Figura 3. 5 - Bioacumulação de Cd(II) por diferentes espécies de <i>Penicillium</i> .....	114
Figura 3. 6 - Classificação das isotermas de adsorção segundo Giles e colaboradores (1960). .....	116
Figura 3. 7 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre <i>Penicillium</i> sp. M01. ....	118
Figura 3. 8 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre <i>Penicillium</i> sp. M02. ....	118
Figura 3. 9 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre <i>Penicillium</i> sp. M03. ....	119
Figura 3. 10 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre <i>Penicillium</i> sp. M04. ....	119

Figura 3. 11 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para <i>Penicillium</i> sp. M01 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.....	120
Figura 3. 12 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para <i>Penicillium</i> sp. M02 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.....	120
Figura 3. 13 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para <i>Penicillium</i> sp. M03 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.....	121
Figura 3. 14 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para <i>Penicillium</i> sp. M04 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.....	121
Figura 4. 1 - Metabólitos isolados de fungos de importância farmacológica.	141
Figura 4. 2 - Procedimento de separação da fração M01C3 e obtenção de de M01C3-SP4.3.2.3.....	148
Figura 4. 3 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos dos meios cultura por CLAE-DAD analítico.....	150
Figura 4. 4 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium</i> sp. M01, por CLAE-DAD analítico.....	151
Figura 4. 5 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium</i> sp. M02, por CLAE-DAD analítico.....	152
Figura 4. 6 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium</i> sp. M03, por CLAE-DAD analítico.....	153
Figura 4. 7 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium</i> sp. M04, por CLAE-DAD analítico.....	154
Figura 4. 8 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CD <sub>3</sub> OD dos extratos dos caldos fermentados do fungo <i>Penicillium</i> sp. M01.....	155
Figura 4. 9 - Figura 4. 9 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e CD <sub>3</sub> OD dos extratos dos micélios do fungo <i>Penicillium</i> sp. M01. ....	156
Figura 4. 10 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e CD <sub>3</sub> OD dos extratos dos caldos fermentados do fungo <i>Penicillium</i> sp. M02. ....	157
Figura 4. 11- Espectros de RMN-1H (500 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e CD <sub>3</sub> OD dos extratos dos micélios do fungo <i>Penicillium</i> sp. M02.....	158
Figura 4. 12 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e CD <sub>3</sub> OD dos extratos dos caldos fermentados do fungo <i>Penicillium</i> sp. M03. ....	159
Figura 4. 13 - Espectros de RMN-1H (500 MHz) em CDCl <sub>3</sub> e CD <sub>3</sub> OD dos extratos dos micélios do fungo <i>Penicillium</i> sp. M03.....	160

Figura 4. 14 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em DMSO-D6 e dos extratos dos caldos fermentados do fungo <i>Penicillium</i> sp. M04. ....	161
Figura 4. 15 - Espectros de RMN-1H (500 MHz) em DMSO-D6 dos extratos dos micélios do fungo <i>Penicillium</i> sp. M03.....	162
Figura 4. 16 - Espectro de massas da substância trichodimerol (M01C3-SP4.3.2.3). .....	164
Figura 4. 17 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CD <sub>3</sub> OD da fração M01C3-SP4.3.2.3.....	166
Figura 4. 18 - Espectro de RMN-13C (500 MHz) em CD <sub>3</sub> OD da fração M01C3-SP4.3.2.3.....	168
Figura 4. 19 - Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC para o composto presente na fração M01C3-SP4.3.2.3.....	169
Figura 4. 20 - Trichodimerol - (C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub> ) (MM = 496).....	170
Figura 4. 21 - Substâncias relacionados à sorbicilina isoladas de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	172
Figura 4. 22 - Espectros de massas de derivados da sorbicilina produzidos pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. M01.....	174
Figura 5. 1 - Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração M01C3-SP4.3.2.3.	277
Figura 5. 2 - Ampliações do Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração M01C3-SP4.3.2.3. ....	278
Figura 5. 3 - Figura 5. 3 - Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração M01C3-SP4.3.2.3.....	279
Figura 5. 4 - Mapa de contorno gCOSY da fração M01C3-SP4.3.2.3.....	280
Figura 5. 5 - Ampliação do mapa de contorno gCOSY da fração M01C3-SP4.3.2.3 .....	281
Figura 5. 6 - Mapa de contorno gHSQC da fração M01C3-SP4.3.2.3.....	282
Figura 5. 7 – Ampliações do mapa de contorno gHSQC da fração M01C3-SP4.3.2.3. .....	283
Figura 5. 8 - Mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3. ....	284
Figura 5. 9 – Ampliações do mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3 (Parte 1). ....	285
Figura 5. 10 - Ampliações do mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3 (Parte 2). ....	286

Figura 5. 11 - Ampliações do mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3 (Parte 3). .....	287
--	-----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Descrição dos equipamentos e reagentes utilizados .....	36
Tabela 2. 2 - Microrganismos utilizados no ensaio antifúngico e antibacteriano .....	41
Tabela 2. 3 - Padrões de desempenho para teste de Suscetibilidade antimicrobiana de acordo com a CLSI.....	43
Tabela 2. 4 - Classificação da Atividade Enzimática (AE) a partir da relação entre o desenvolvimento da colônia e o halo de precipitação .....	44
Tabela 2. 5 - Resultados para o cálculo de UFC/g nas diferentes diluições dos Solos A e B .....	47
Tabela 2. 6 - Ocorrência média e relativa de dos gêneros de fungos isolados na amostra de solo .....	48
Tabela 2. 7 - Medidas do halo de inibição (mm) promovido pelos fungos isolados do solo no teste de atividade antifúngica e antibacteriana. ....	54
Tabela 2. 8 - Atividade Enzimática (AE) dos fungos isolados do solo.....	58
Tabela 3. 1 - Classificação e diretrizes para águas superficiais e subterrâneas, lançamento de efluentes, qualidade do solo e fabricação de pilhas e baterias quanto à presença de cádmio e chumbo.       78	
Tabela 3. 2 - Vantagens e desvantagens das modalidades abióticas de remediação de metais tóxicos do solo. ....	81
Tabela 3. 3 - Vantagens e desvantagens no uso de modalidades abióticas de remediação de metais tóxicos de ambientes aquáticos. ....	83
Tabela 3. 4 - Classificação das isotermas com relação aos Valores de RL.....	93
Tabela 3. 5 - Biossorção de cádmio e chumbo por células viáveis de diversas espécies fúngicas (continua) .....	99
Tabela 3. 6 - Biossorção de cádmio e chumbo por células inativas de diversas espécies fúngicas (continua) .....	103
Tabela 3. 7 - Descrição dos equipamentos e reagentes utilizados .....	105
Tabela 3. 8 - Influência do Cd (II) nas características macromorfológicas de fungos filamentosos. (continua) .....	110
Tabela 3. 9 - Concentração Inibitória Mínima de Cd <sup>2+</sup> às espécies de fungos resistentes.....	113

Tabela 3. 10 - Valores de $C_e$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e $Q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ ) para construção das isotermas de adsorção de Cd(II) pela biomassa das espécies de <i>Penicillium</i> , isolados M01, M02, M03 e M04, $n=3$ . .....	117
Tabela 3. 11 - Valores estimados dos parâmetros obtidos da isoterma de Langmuir. ....	122
Tabela 3. 12 - Valores estimados dos parâmetros obtidos da isoterma de Freundlich .....	122
Tabela 4. 1 - Descrição dos equipamentos e reagentes utilizados	144
Tabela 4. 2 - Atribuições de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ e comparação com os dados da literatura para a substância trichodimerol.....	170
Tabela 4. 3 - Atribuições de pico de metabólitos pesquisados no espectro CL/EM dos extratos do fungo <i>Penicillium</i> sp. M01 .....	173

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AN</b>	Ágar Nutriente
<b>AE</b>	Atividade Enzimática
<b>BDA</b>	Batata-Dextrose-Ágar
<b>BD</b>	Batata-Dextrose
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CC</b>	Coluna Cromatográfica
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CCDP</b>	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiências
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>COSY</b>	<i>Correlatio Spectroscopy</i>
<b>DAD</b>	Detector por Arranjo de Diodos
<b>DRX</b>	Difração de Raio-X
<b>EAAC</b>	Espectroscopia de Absorção Atômica com Chamas
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>EDX</b>	Espectroscopia Dispersiva de Raio-X
<b>F AAS</b>	Flame Atomic Absorption Spectrometry
<b>G6PDH</b>	Glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
<b>HMBC</b>	<i>Homonuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy</i>
<b>ILZSG</b>	“International Lead and Zinc Study Group”
<b>IV-TF</b>	Infravermelho com transformada de Fourier
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MS</b>	Mass Spectrometry
<b>SOD</b>	Superóxido Desmutase
<b>TR</b>	Tempo de Retenção
<b>UV</b>	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
1.3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>
<b>2 FUNGOS DO SOLO: ISOLAMENTO E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO</b> .....	<b>31</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DE FUNGOS DO SOLO</b> .....	<b>36</b>
2.2.1.1 Inoculação de suspensão de solo empregando a técnica “spread-plate” .....	36
<b>2.2.2 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA DOS FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO</b> .....	<b>41</b>
2.2.4.1 Inoculação das placas de teste .....	41
2.2.4.2 Leitura das Placas .....	42
<b>2.2.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES POR FUNGOS FILAMENTOSOS</b> .....	<b>43</b>
2.2.5.1 Avaliação da produção de lipase.....	44
2.2.5.2 Avaliação da produção de protease .....	45
2.2.5.3 Avaliação da produção de amilase.....	45
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>2.3.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DE FUNGOS DO SOLO</b> .....	<b>46</b>
2.3.1.1 Inoculação de suspensão de solo empregando a técnica “spread-plate” .....	46
2.3.1.2 Contagem de unidades formadoras de colônias .....	46
2.3.1.3 Caracterização morfológica dos isolados fúngicos.....	47
<b>2.3.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO</b> .....	<b>51</b>
<b>2.3.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO</b> .....	<b>56</b>
<b>2.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>
<b>3 RESISTÊNCIA E POTENCIAL DE BIODISSORÇÃO E BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO APRESENTADOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO</b> .....	<b>69</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>69</b>

<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>3.2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>72</b>
<b>3.2.1 CÁDMIO E CHUMBO: PROPRIEDADES, USOS E IMPACTOS AMBIENTAIS .....</b>	<b>72</b>
3.2.1.1 Cádmio.....	72
3.2.1.2 Chumbo.....	74
3.2.1.3 Regulamentação ambiental para cádmio e chumbo .....	77
<b>3.2.2 MODALIDADES DE REMEDIAÇÃO DE METAIS TÓXICOS EM ÁGUA E NO SOLO.....</b>	<b>79</b>
3.2.2.1 Remediação Abiótica.....	80
3.2.2.2 Remediação Biótica.....	84
3.2.2.2.1 Uso de plantas - Fitorremediação.....	85
3.2.2.2.2 Uso de microrganismos - Biorremediação.....	86
3.2.2.2.3 Classificação da remediação biótica de acordo com os processos metabólicos .....	88
3.2.2.2.4 Modelos de isotermas de adsorção.....	92
<b>3.2.3 MICORREMEDIAÇÃO: OS FUNGOS E SUA APLICAÇÃO NA REMEDIAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO .....</b>	<b>94</b>
3.2.3.1 Biorremediação de Cádmio e Chumbo por Fungos Ativos.....	94
3.2.3.2 Biorremediação de Cádmio e Chumbo por Fungos Inativos .....	100
<b>3.3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>105</b>
<b>3.3.1 FUNGOS FILAMENTOSOS TOLERANTES À CÁDMIO.....</b>	<b>105</b>
<b>3.3.2 FUNGOS FILAMENTOSOS RESISTENTES A CÁDMIO .....</b>	<b>106</b>
<b>3.3.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BIOACUMULATIVA DE CÁDMIO POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM MEIO LÍQUIDO .....</b>	<b>106</b>
<b>3.3.4 ADSORÇÃO DE CÁDMIO POR BIOMASSA FÚNGICA.....</b>	<b>107</b>
3.3.4.1 Obtenção da biomassa fúngica.....	107
3.3.4.2 Construção das isotermas de adsorção .....	108
<b>3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>3.4.1 FUNGOS FILAMENTOSOS TOLERANTES A CÁDMIO.....</b>	<b>109</b>
<b>3.4.3 BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO POR FUNGOS ATIVOS EM MEIO LÍQUIDO.....</b>	<b>114</b>
<b>3.4.4 ADSORÇÃO DE CÁDMIO POR BIOMASSA FÚNGICA .....</b>	<b>116</b>
<b>3.5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>124</b>
<b>3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>125</b>

<b><u>4 PERFIL QUÍMICO DE FUNGOS RESISTENTES A CÁDMIO.....</u></b>	<b><u>140</u></b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>140</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>141</b>
<b>4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>144</b>
<b>4.2.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS RESISTENTES À CÁDMIO .....</b>	<b>145</b>
<b>4.2.2 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E RMN-<sup>1</sup>H.....</b>	<b>145</b>
<b>4.2.3 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE <i>TRICHODIMEROL</i> .....</b>	<b>146</b>
<b>4.2.4 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....</b>	<b>149</b>
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>150</b>
<b>4.3.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS RESISTENTES À CÁDMIO .....</b>	<b>150</b>

4.3.2 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E RMN- <sup>1</sup> H .....	150
4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DE <i>TRICHODIMEROL</i> .....	164
4.3.4 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	171
4.4 CONCLUSÃO .....	175
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
<b><u>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u></b>	<b>181</b>
<b><u>APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICAS DAS LINHAGENS ISOLADAS DO SOLO PARA DEPÓSITO NA COLEÇÃO DE CULTURAS DE MICROORGANISMOS DO LBQM.....</u></b>	<b>184</b>
<b><u>APÊNDICE B – REGISTRO FOTOGRÁFICO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS ISOLADOS.....</u></b>	<b>235</b>
<b><u>APÊNDICE C – REGISTRO FOTOGRÁFICO DO TESTE DE TOLERÂNCIA A CÁDMIO.....</u></b>	<b>249</b>
<b><u>APÊNDICE D: DADOS ESPECTROSCÓPICOS DA FRAÇÃO M01C3-SP4.3.2.3 .....</u></b>	<b>277</b>

# Apresentação



## 1 APRESENTAÇÃO

### 1.1 INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um reino de microrganismos eucariotos, que utilizam a matéria orgânica como fonte de energia. Apresentam-se na Natureza como predadores, decompositores da matéria orgânica, e parasitas patogênicos ou mutualísticos. Em sua maioria realiza respiração na presença de oxigênio, existe a ocorrência de espécies anaeróbias e facultativas. Se reproduzem tanto sexuada como assexuadamente, e podem crescer sobre os mais diversificados substratos como a madeira, o solo, água, plantas e animais (JESUS, 2013; JORGE, 2012).

No contexto atual, a pesquisa na área da micologia tem tomado proporções consideráveis devido à importância das descobertas e as diversificadas aplicações dos fungos e seus produtos em processos industriais, farmacêuticos, agrícolas e químicos, a saber: os fungos endofíticos são de grande interesse para a agricultura, pois, participam da fixação do nitrogênio pelas plantas (SOUZA et al, 2004); na indústria alimentícia pode ser destacada a utilização para produção de fermentos, bebidas, queijos, além da comercialização de cogumelos comestíveis; na indústria farmacêutica os fungos têm sido fonte de produtos naturais usados como modelos de novos medicamentos, além disso, os fungos estão envolvidos na produção de eficientes catalisadores biológicos em processos químicos.

Neste cenário, destaca-se a diversidade química oriunda do metabolismo secundário destes organismos. Os metabólitos secundários são a resultante da constante interação destes organismos com o ecossistema em que estão inseridos e são utilizados principalmente como mecanismo de defesa química, o que faz com que estes produtos apresentem um grande espectro de atividades biológicas. Sendo o reino Fungi o segundo maior grupo de organismos vivos sobre a Terra, com a estimativa de que existam cerca de 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2001), é previsível que estes organismos, apesar da baixa diferenciação celular, possam expressar metabolismos complexos que resultam em uma variedade de produtos naturais e enzimas extracelulares (SMEDSGAARD, NIELSEN, 2005).

Decerto, os Produtos Naturais tem sido as principais fontes de fármacos, tanto na obtenção de modelos para o desenvolvimento de agentes sintéticos quanto na produção de substâncias utilizadas na terapêutica de doenças infecciosas (cerca de

75%) e o câncer (cerca de 60%), por exemplo (COSTA-LOTUFO et al, 2010; PUPO et al, 2006) e muitos deles foram isolados a partir de fungos os quais vêm sendo empregados como agentes antimicrobianos, antitumorais, imunossupressores e redutores de colesterol (SMEDSGAARD, NIELSEN, 2005).

Além de fornecer uma gama de substâncias bioativas, comprovadamente eficazes, inclusive já comercializadas em forma de fármacos de ação sobre diversas doenças, os fungos também estão sendo empregados, com cada vez mais frequência, em processos biotecnológicos, seja por atividade enzimática em pesquisas e processos químicos industriais, ou em atividades de biorremediação de sistemas perturbados por diferentes tipos de contaminantes.

Uma das ações de biorremediação em que os fungos podem ser empregados é em caso envolvendo a contaminação de solos por metais tóxicos, um problema resultante, da exploração desordenada de recursos minerais e, principalmente, da aplicação de fertilizantes, pesticidas e de resíduos urbanos e industriais na agricultura. Nestes casos, ações de remediação devem ser executadas, uma vez que teores elevados de tais contaminantes no solo promovem um desequilíbrio no ecossistema com a baixa na produtividade e o que é mais preocupante é a oferecendo riscos à saúde humana (MELO, NASCIMENTO e SANTOS, 2006; SUN et al, 2001).

Alternativamente aos usuais meios de recuperação de áreas degradadas pela contaminação através de metais pesados, técnicas pouco utilizadas por serem muitas vezes desvantajosas ou inacessíveis (SILVA, 2009), a biorremediação por meio de fungos tem sido relatada na literatura como medida mais eficaz e economicamente viável, uma vez que estes microrganismos apresentam uma marcante capacidade adaptativa (LACONI et al, 2007; SILVA, 2007; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ et al, 1999).

A biorremediação é o conjunto de tecnologias, que utilizam processos biológicos na recuperação de áreas contaminadas, bem como no tratamento de compostos orgânicos voláteis tóxicos ou efluentes, contendo resíduos, que devam ser eliminados antes da descarga no ambiente. Esta técnica tem por objetivo o aumento da velocidade do processo natural de degradação. A grande maioria dos compostos orgânicos conhecidos, de origem animal ou vegetal, bem como muitos agentes químicos tóxicos, podem ser biodegradados através de técnicas de biorremediação.

Neste sentido, a utilização de biomassa fúngica torna-se interessante devido à sua capacidade de fixar metais, através de processos como bioabsorção e bioacumulação (LEITÃO, 2009), auxiliando as técnicas convencionais de remoção.

Consta neste material, a descrição dos resultados obtidos no trabalho desenvolvido, nos três capítulos seguintes. O Capítulo 2 apresenta um estudo sobre o isolamento de fungos filamentosos a partir de amostra de solo não contaminado. Os isolados foram parcialmente identificados e submetidos a ensaios de antagonismo frente a bactérias e *C. albicans*. Foi avaliada também as suas atividades enzimáticas.

O Capítulo 3 descreve um conjunto de experimentos que avaliaram a tolerância, resistência e potencial de bioacumulação e bioabsorção de cádmio por fungos filamentosos isolados do solo.

Por fim, o efeito do cádmio no perfil químico, sobretudo do metabolismo secundário, foi estudado e está relatado no Capítulo 4.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Considerando o expressivo percentual (60%) de fármacos atualmente comercializados oriundos de fontes naturais ou inspirados nestas, somado ao fato de que linhagens fúngicas têm mostrado grande capacidade de fornecerem produtos naturais com inúmeras atividades biológicas, a prospecção química e biológica destes microrganismos apresenta-se como atividades promissoras e com grande contribuição para o incremento da pesquisa nas áreas de química orgânica e biológica e da biotecnologia.

Adicionalmente, a presente proposta mostra-se especialmente relevante na medida em que, além da análise do perfil bioquímico de fungos, se propõe a investigar o potencial biotecnológico destes organismos para possível emprego na recuperação de solos e matrizes aquosas contaminados por metais tóxicos em processo de biorremediação. Assim, este trabalho vem consolidar a linha de pesquisa iniciada pelo Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos (LBQM) do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFBA, além de enriquecer o conhecimento sobre a diversidade e as habilidades próprias deste conjunto de microrganismos.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo geral

O objetivo central deste trabalho foi realizar o estudo químico e biológico de espécies fúngicas isoladas a partir de amostra de solo não contaminado especialmente para avaliação do potencial de bioacumulação e biossorção de íons Cd(II) bem como, realizar a investigação do potencial biotecnológico e análise do perfil químico após contato dos isolados com o metal.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar (em nível de gênero) fungos em amostras de solos;
- Avaliar o potencial biotecnológico dos fungos isolados quanto à capacidade de produção de enzimas e de agentes antibacterianos e antifúngicos;
- Avaliar a capacidade destes fungos para o emprego em processos de biorremediação de cádmio
- Investigar o efeito do estresse por fungo sobre o metabolismo secundário dos fungos resistente a este metal;
- Avaliar o perfil químico através do estudo do metabolismo secundário do fungo visando o isolamento de produtos naturais e suas identificações através dos métodos espectroscópicos usuais;

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTA-LOTUFO, L. V., MONTENEGRO, R. C., ALVES, Ana Paula N. N., MADEIRA, S. V. F., PESSOA, C., MORAES, M. E. A., MORAES, M. O. A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** 2010. v. 2, n.1, pp 47-58.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revisited. **Mycological Research**, 105, 1422-1431, 2001.
- JESUS, K. **Investigação de Metabólitos Secundários Bioativos de Microorganismos do Ambiente Marinhos**. 2012. 163 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012.
- JORGE, A. O. C. **Microbiologia e imunologia oral**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 352 p.
- LACONI, S.; MOLLE, G.; CABIDDU, A.; POMPEI, R. Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass. **Biodegradation**, v.18, p.559–566, 2007
- Leitão, A. L.; Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 6, 1393-1417, 2009
- MELO, E. E. C., NASCIMENTO, C. W. A., SANTOS, A. C. Q. Solubilidade, fracionamento e fitoextração de metais pesados após aplicação de agentes quelantes. **R. Bras. Ci. Solo**, 2006, v.30, pp 1051-1060.
- RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; CRUZ-CÓRDOVA, T.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J.M.; ROLDÁN-CARRILO, T.; MENDOZA-CANTÚ, A.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; TOMASINI-CAMPOCOSIO, A. Use of Sugarcane Bagasse Pith as Solid Substrate for *P. chrysosporium* Growth. *Folia Microbiol*, v.44, n.2, pp. 213-218, 1999.
- SILVA, R.R. **Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. 186 p. Doutorado (Tese). Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente. Área de Plantas Avasculares e Fungos. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo-SP, 2009
- SILVA, T.M.; STETS, M.I.; MAZZETTO, A.M.; ANDRADE, F.D.; PILEGGI, S.A.V.; FÁVERO, P.R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P.I.B.; PILEGGI, M. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.522-525, 2007.
- SMERDSGAARD, J.; NIELSEN, J. **Journal of experimental botany**, v.56, n.410, p.273-286, 2005.
- SOUZA, Q. L., SOUZA, A. D. L., ASTOLFI FILHO, S., PINHEIRO, M. L. B., SARQUIS, M. I. M., PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34(2), 2004: pp 185-195.

SUN, B.; ZHAO, F.J.; LOMBI, E., McGRATH, S.P. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. **Environ. Pollut**, 2001, pp 113:111-120.

# Capítulo 2



Fungos do solo: isolamento e investigação do potencial biotecnológico

## 2 FUNGOS DO SOLO: ISOLAMENTO E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

### RESUMO

O solo é um ecossistema que abriga diversas espécies de seres vivos, dentre estes, os fungos ocupam um papel de destaque, quantitativamente, por serem junto com as bactérias os maiores grupos habitando o solo, e qualitativamente, por estarem envolvidos em processos biogeoquímicos de extrema importância interferindo na textura, fixação e disponibilidades de nutrientes. Além do seu papel no solo e nos demais habitats, os fungos são microrganismos com habilidades extraordinárias que são aproveitadas pela indústria química, farmacêutica e alimentícia, através da utilização do seu arsenal enzimático e da diversidade estrutural e biológica de substância do seu metabolismo secundário. O presente estudo teve por objetivo realizar a identificação, avaliação da atividade enzimática e potencial antifúngico e antibacteriano de fungos isolado do solo coletado no campus Ondina-Federação da Universidade Federal da Bahia. Os fungos foram isolados de amostra de um solo, em condições ambientais normais, através da técnica de diluição seriada de suspensão de solo. Após obtenção das culturas isoladas, foram investigadas as habilidades para inibição do crescimento fúngico contra *Candida albicans* e bacteriano contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Choleraesuis* e realizada a mensuração de produção das enzimas extracelulares amilase, lipase e protease. Foram obtidos 51 isolados fúngicos distribuídos nos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium*, além de cinco linhagens que não tiveram seu gênero identificados. Cerca de 47% dos isolados desenvolveram halos de inibição contra, pelo menos um microrganismo que foram em sua maioria classificados como resistentes. Isoladamente, os microrganismos foram não sensíveis à grande maioria dos fungos. Apenas *B. cereus* foi sensível a um dos isolados que apresentou halo de inibição de 20 mm. *C. albicans* foi afetado, por uma quantidade maior, demonstrado sensibilidade intermediária e resistência à cerca de 32% dos isolados. Atividades enzimáticas foram detectadas em 74% dos isolados que, exibiram principalmente ação proteolítica, seguida de amilolítica e lipolítica. Os resultados demonstraram em pequena escala o potencial dos fungos para desenvolvimento de investigações científicas, bem como, que através de técnicas de rápidas execuções é possível obter valiosas informações a acerca destes organismos tão numerosos e ainda tão pouco conhecidos.

Palavras-chave: atividade antifúngica, antimicrobiana, enzimática, fungos do solo

## 2.1 INTRODUÇÃO

Pensar no solo como uma pilha de rocha e detritos é uma concepção muito simplista a respeito deste rico ecossistema, uma vez que uma porção muito pequena é capaz de abrigar um número muito grande de organismos que estão distribuídos nas mais diversas espécies e intimamente relacionados com importantes funções, das quais, a vida humana é dependente ou negativamente afetada. Entre estes organismos, os microscópicos são os mais abundantes, pois, como nos demais habitats, a predominância de espécies é inversamente proporcional ao tamanho. Sendo assim, fungos, bactérias e archaeas são os grupos mais populosos, de maior massa e capacidade metabólica no solo (WEIL; BRADY, 2017).

Voltando a atenção para os microrganismos do *reino fungi* (os fungos), que é o maior grupo de organismos existente, assinala-se que, de acordo com a classificação taxonômica, estão inclusos no domínio *Eucharya* (que comporta os seres vivos que apresentam células organizadas em citoplasma e núcleo) e atualmente nos Filos *Basidomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota*, *Blastocladiomycota*, *Chitridiomycota* e *Neocallimastigomycota*, além dos fungos aquáticos do gênero *Rozella* e dos fungos *Zigomycetos* que não se encaixam em nenhum dos filis (WATKINSON; BODDY; MONEY, 2016). No entanto, a divisão no reino *fungi* é um tema muito dinâmico e controverso, e novas propostas são frequentemente descritas como a apresentada no trabalho de Choi e Kim (2017) baseada nas informações genômicas que geram apenas três grupos, *Fungos Monocarióticos*, *Basidomycota* e *Ascomycota*, em oposição aos seis grupos do modelo gênico.

No seu ciclo de vida, o fungo pode se desenvolver nos mais diversos substratos partindo da germinação de seus esporos formando longas células cilíndricas, as hifas, que se ramificam dando origem ao micélio. Sendo heterotrófico, seu crescimento se dá, a partir da captura da matéria orgânica presente no substrato após exsudação de enzimas capazes de catalisar a quebra de carboidratos e proteínas em peptídeos, aminoácidos e monossacarídeos, moléculas menores o suficiente para serem absorvidas por difusão na parede celular. À medida que o micélio cresce, ele pode desenvolver corpos de frutificação que estão envolvidos na reprodução sexuada para produção e dispersão de novos esporos (CARLILI; WATKINSON, S; GOODAY, 2001; PETERSEN, 2013).

Além de formar o maior dos grupos de seres vivos distribuídos em todos habitats e de estarem envolvidos em imprescindíveis processos biogeoquímicos no solo, os fungos apresentam diversas características interessantes do ponto de vista biotecnológico que estão fortemente correlacionadas à sua forma de nutrição e aos diferentes mecanismos de ataque e defesa contra predadores e invasores (MAGAN; ALDRED, 2007; WATKINSON; BODDY; MONEY, 2016). Assim, a excreção de enzimas envolvidas no processo de captura da matéria orgânica e produção de toxinas e metabólitos secundários como agentes de defesa química, formam um grupo especial de características exibidas por estes organismos que os tornam ainda mais promissores para a prospecção, inovação e desenvolvimento científico (JONGH; NIELSEN, 2007).

Ao pensarmos na capacidade enzimática de fungos envolvidos em processos industriais, sobretudo as fermentações alimentícias, imediatamente lembramos da utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de pães, cervejas e outras bebidas alcoólicas como o vinho, além de álcool combustível (BAUTISTA; UNPAPROM; RAMARAJ, 2018; WEBSTER; WEBER, 2007). No entanto, inúmeras espécies de fungos, incluindo os filamentosos, são empregadas em diversos seguimentos industriais que aproveitam suas habilidades de produção de enzimas extracelulares. Um bom exemplo é a hidrólise do amido do arroz através de amilases, proteases e outras enzimas excretadas por *Aspergillus oryzae*, empregada na fabricação do saquê. Em uma segunda etapa, o amido hidrolisado é posto em contato com cultura de *Saccharomyces cerevisiae* para proceder a fermentação e produção da bebida (WEBSTER; WEBER, 2007).

Exemplos como esses, aliados às evidências que têm vinculado a atividade enzimática à processos infecciosos causados por fungos, podem explicar o movimento atual de intensa busca por novas espécies e a investigação desta habilidade em fungos já conhecidos, tornando-o um dos campos de grande interesse na micologia (ABE et al., 2015; ABOUL-NASR; ZOHRI; AMER, 2013; SANTOS et al., 2018).

A atividade celulolítica, lipolítica e proteolítica de *Mucor corticolus*, *Rhizomucor miehei*, *Gilbertella persicaria* e *Rhizopus niveus*, foi avaliada utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato. Os pesquisadores observaram que os resíduos do pedúnculo e das folhas de milho podem ser utilizados na indução da

produção de lipases e celulasas por fungos mucoromicotínicos (TAKÓ et al., 2015). O fungo *Aspergillus niger*, um dos mais estudados nos diferentes aspectos, teve sua capacidade de produção de lipases otimizada a partir da variação das condições de cultivo. A melhor resposta foi obtida através da agitação em 200 rpm, pH 7,0, após 72 horas de incubação sob a temperatura de 24 °C, tendo como fontes de carbono e nitrogênio, óleo de oliva a 5% e extrato de levedura 1%, respectivamente (EL-BATAL et al., 2016).

Na digestão enzimática da matéria orgânica, os fungos obtêm carboidratos que são usados como fonte de energia, bem como na produção de substâncias dos metabolismos primário e secundário, utilizados em competições físicas e químicas. As micotoxinas, por exemplo, extremamente nocivas às células animais e vegetais, são largamente produzidas e relacionadas à contaminação de alimentos, principalmente de grãos, chegando a afetar cerca de 25% da produção agrícola (HIDALGO-RUIZ et al., 2019; MARIN et al., 2013). Em contrapartida, esses microrganismos sintetizam também, inúmeras substâncias com apreciáveis atividades biológicas e importância comercial, como a penicilina, e o ácido cítrico, metabólitos hiperproduzidos por *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger*, respectivamente, que são os primeiros exemplos de aplicação de fungos em processos biotecnológicos em escala industrial, responsáveis ainda hoje por uma receita anual de bilhões de dólares (JONGH; NIELSEN, 2007).

Entre as características apresentadas pelos metabólitos fúngicos, a de agir contra diferentes doenças, é, sem dúvida a mais valorizada, de tal modo que essa capacidade especial de produção de substâncias bioativas, faz dos fungos, um dos alvos preferenciais em estudos bioguiados do perfil químico de organismos vivos (ADPRESSA; LOESGEN, 2016; BASHYAL et al., 2014; IÓCA et al., 2016; KAMAL et al., 2017; LEE et al., 2017; REIS et al., 2019; TAWFIKE et al., 2018, 2019). Dentro deste espectro, é possível destacar as atividades antibacteriana e antifúngica, devido à grande demanda por novas drogas, sobretudo com ação contra as bactérias gram-negativas multirresistentes e com ação antifúngica que são atualmente disponíveis em número muito inferior comparados aos antibacterianos (BAIDEN et al., 2010; PAUW, 2000).

O metabólito hiporientalina A, isolado a partir do extrato do micélio de *Trichoderma orientale*, foi fungicida contra cepas de *C. albicans* em concentrações

inibitórias mínimas de até 2,49  $\mu\text{M}$ , que é comparável à ação do antifúngico comercial anfotericina B, e pode ser considerada como uma substância promissora para o tratamento da candidíase devido ao controle da toxicidade exibido em teste específico. O extrato bruto também apresentou potencial de inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* e espécies de *Staphylococcus*, incluindo *Staphylococcus aureus* (TOUATI et al., 2018).

O fungo marinho *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, forneceu um conjunto de alcaloide inéditos, dentre os quais a didimelamida A, que apresentou atividade antifúngica contra cepa de *C. albicans* resistentes à azóis (HAGA et al., 2013). Já a benzofurana, penicifurana A, isolada a partir do extrato de uma espécie de *Aspergillus*, também proveniente do mar, foi eficiente na inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus albus* (QI et al., 2013).

Pelo exposto, evidencia-se a necessidade e a importância do isolamento e avaliação do potencial biotecnológico de fungos filamentosos do solo. A obtenção de amostra de solo a partir de uma região em condições ambientalmente normais foi motivada pelo fato de que o conhecimento sobre a diversidade fungica ainda é muito restrita comparado às estimativas, além disso, novas espécies têm sido relatadas pelo isolamento a partir dos mais diversos e comuns espaços como a poeira doméstica, o solo de jardim e até de unha humana (NISKANEN et al., 2018).

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção e identificação de fungos do solo potencialmente aplicáveis e processos biotecnológicos, por meio da avaliação de suas capacidades de excreção enzimática, bem como pelo estudo de suas ações antagonicas frente a bactérias gram-positiva, gram-negativas e um fungo leveduriforme, patógenos humanos

## 2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os equipamentos e reagentes utilizados nesse trabalho estão descritos na tabela 2.1.

Tabela 2. 1 - Descrição dos equipamentos e reagentes utilizados

EQUIPAMENTO/REAGENTES	MARCA/MODELO
Ágar	Himedia
Agitador de tubo	Tecnal
Amido de Milho	Maizena
Autoclave vertical	Phoenix
Balança analítica	Shimadzu (AY220)
Batata inglesa	
BDA	MERCK
Capela de fluxo laminar	LABCONCO - 36210
Cloranfenicol	INILAB
Cloreto de sódio PA	Synth
Dihidrogenofosfato de potássio	MERCK
Estufa	FABBE (119)
Estufa Incubadora BOD	TECNAL TE-371
Estufa Incubadora BOD	Nova Ética BOD 411D
Extrato de levedura	Sigma-Aldrich
Extrato de malte	Acumedia
Forno de microondas doméstico	BRASTEMP (maxi)
Fosfato de potássio dibásico	MERCK
Glicose Anidra (Dextrose)	Synth
Leite em pó desnatado	Itambé
Microscópio ótico	ZEISS (Primo Star)
Óleo de Oliva	Gallo
Sulfato de bário	Synth
Sulfato de magnésio heptahidratado	Synth

### 2.2.1 Obtenção e identificação parcial de fungos do solo

#### 2.2.1.1 Inoculação de suspensão de solo empregando a técnica “spread-plate”

A amostra de solo utilizada neste estudo foi coletada em março de 2015, nas dependências da Universidade Federal da Bahia (UFBA), próximo ao prédio do Instituto de Química, na cidade de Salvador - BA, cuja localização está centrada no mapa com latitude de -12.99981304 (12° 59' 59" S) e longitude de (38° 30' 26" W). A

amostra foi composta por solo coletado em seis pontos distintos com o auxílio de um testemunhador a uma profundidade de 20 cm da superfície.

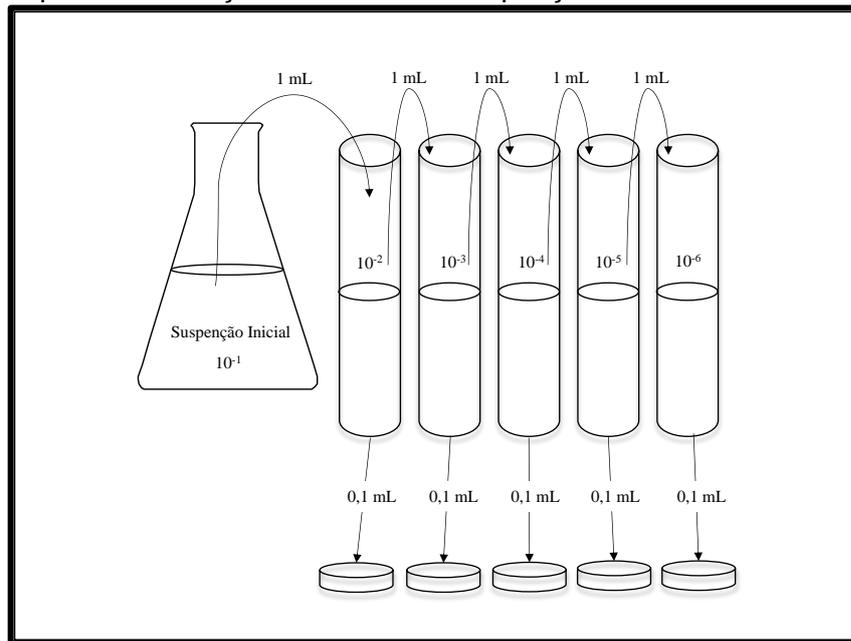
O solo foi encaminhado para o Laboratório de Biotecnologia e Química de Microrganismos (LBQM) da UFBA. Após completa homogeneização, foi dividido em duas partes iguais em massa, as quais foram denominadas de solo A e solo B. O solo A foi peneirado em malha tamis obtendo-se granulometria final de 0,2 mm. Já o solo B foi peneirado para obtenção de granulometria final de 1,2 mm.

O isolamento de fungos a partir do solo coletado (solo A e solo B) foi realizado por meio das técnicas de diluição sucessiva e de espalhamento em superfície (spread-plate) (CLARK, 1965; BORGES et al., 2011).

Foram utilizados dois frascos Erlenmeyer com 90 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) cada. Para preparação da suspensão, adicionou-se 10 g do solo A em um dos recipientes contendo a solução salina e 10 g do solo B no outro. Os frascos foram submetidos a agitação por 20 minutos a 100 rpm em incubadora shaker (BORGES et al., 2011) e, em seguida um volume de 1mL de cada uma das suspensões foi transferido para seus respectivos tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina, e agitados com auxílio do agitador Vortex estabelecendo, portanto, uma diluição da ordem de  $10^{-2}$  (1:100).

Para obtenção das demais diluições, o procedimento descrito foi repetido até a ordem de  $10^{-6}$  (1:100000). A Figura 2.1 apresenta um esquema do procedimento realizado para obtenção das diluições da suspensão dos solos.

Figura 2. 1 - Esquema de diluição sucessiva da suspensão de solo



Fonte: elaborada pelo autor

Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo aproximadamente 20 mL de meio de crescimento BDA (batata, dextrose, ágar) suplementado com cloranfenicol ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ), com o objetivo de evitar o crescimento bacteriano, tornando-o seletivo para crescimento de fungos.

Com uma micropipeta, transferiu-se 0,1 mL de cada uma das diluições para as placas espalhando-as pela superfície do ágar com auxílio de uma alça de Drigalski (método spread-plate). O procedimento foi realizado em triplicata para todas as diluições. As placas foram incubadas a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por um período médio de sete dias.

Todo o BDA utilizado neste trabalho foi produzido de modo artesanal através do caldo do cozimento de 300 gramas de batatas para obtenção de 1L de meio com 2% de dextrose e 1,5% de ágar.

### 2.2.2 Contagem de unidades formadoras de colônias

Após três dias de incubação, foi realizada a contagem visual do número de colônias de fungos que se desenvolveram nas placas de Petri contendo as diferentes diluições da suspensão de solo. Para obtenção do número total de fungos no solo através da determinação das UFC (Unidade Formadora de Colônias) por grama de

solo) foi realizado um cálculo com base na média de colônias encontradas em placas da mesma diluição, utilizando a Equação 2.1.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{g}} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias}}{\text{diluição}} \quad \text{Equação 2.1}$$

### 2.2.3 Isolamento e caracterização morfológica dos fungos

A partir do quinto dia de incubação, um fragmento de cada colônia desenvolvida foi repicado em placas distintas contendo BDA. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de espécies isoladas.

Após o crescimento das espécies isoladas nos meios BDA e EMA (Extrato de Malte Ágar) os fungos foram preservados em água destilada esterilizada, segundo o método descrito por Castellani (1939) e integrados a Coleção de Microrganismos (micoteca) do LBQM. Além disso, foi procedido o agrupamento dos isolados com base nas semelhanças macroscópicas das colônias desenvolvidas em BDA.

As culturas isoladas foram fotografadas para o registro das características macroscópicas. Além disso, foi realizado o microcultivo, de acordo com a metodologia descrita por Weber e Pitt (2000), para cada um dos isolados para observação sob microscópio ótico e obtenção de imagens das estruturas de reprodução.

Para o cultivo de fungos em lamínulas (microcultivo), foi montada uma câmara de crescimento utilizando-se uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro forrada com papel de filtro. Sobre o papel, acondicionou-se dois pedaços de palito de churrasco no formato de “V” que serviram como suporte para uma lâmina de vidro (os palitos foram cortados com tamanho suficiente para que suas extremidades tocassem as paredes da placa, para obter uma melhor fixação). Por fim adicionou-se um chumaço de algodão dentro da placa que foi tampada para realização do procedimento de rotina de autoclavagem. Com exceção das lamínulas<sup>1</sup>, os demais materiais (água destilada, pinça e alça de platina), bem como o meio BDA, também foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos

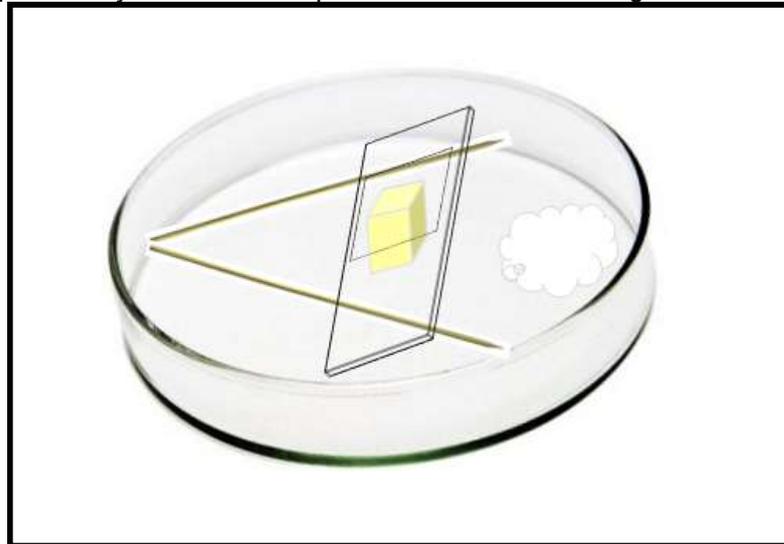
---

<sup>1</sup> As lamínulas devem ser conservadas em recipiente com tampa contendo álcool etílico absoluto. No procedimento de microcultivo, esse recipiente deve ser levado à capela de fluxo laminar onde será realizada a inoculação. Elas devem ser retiradas do recipiente com o auxílio de uma pinça e seca ao calor da chama antes de ser acondicionada na câmara de microcultivo.

Após o processo de esterilização da câmara e dos demais materiais, colocou-se sobre a lâmina, um fragmento de BDA de aproximadamente 1 cm.

O repique foi feito a partir de uma colônia nova (com aproximadamente sete dias de crescimento). Com o auxílio de uma agulha de platina em “L”, retirou-se pequenas amostras do micélio e inoculou-os nos quatro lados do cubo de ágar, que, em seguida, foi recoberto por uma lamínula. Foram adicionados cerca 3 mL de água destilada esterilizada ao chumaço de algodão para manter a umidade e evitar o ressecamento do meio de cultura. A placa então, foi tampada e incubada à 28 °C por cinco dias. A ilustração na Figura 2.2, faz a representação da câmara depois da inoculação.

Figura 2. 2 - Representação da câmara para microcultivo de fungos filamentosos



Fonte: elaborado pelo autor

O crescimento do fungo foi acompanhado diariamente para a observação do desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação, adicionando água esterilizada sempre que necessário.

Ao finalizar o crescimento, foi realizada a inativação da esporulação do fungo, para isso, adicionou-se cerca de 1 mL de solução de formaldeído ao chumaço de algodão presente na câmara e vedando-a com “parafilm”. A placa foi reservada em temperatura ambiente por 24 horas, para que o vapor de formol inativasse o fungo e agisse como fixador das estruturas microscópicas.

Após o período de fixação, procedeu-se a observação das estruturas em microscópio óptico. Para isso, a lamínula sob o ágar foi retirada cuidadosamente com auxílio de uma pinça, de modo a preservar as hifas e esporos nela aderidos, e

colocada sobre uma lâmina limpa contendo uma gota de solução de azul de algodão (Lactofenol - corante para visualização de fungos hialinos). A lâmina preparada foi observada com objetiva de 40x em microscópio óptico binocular da marca ZEISS modelo Primo Star equipado com câmera do modelo AxioCam ERC5s.

#### 2.2.4 Avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana dos fungos filamentosos isolados do solo

Um teste de antagonismo foi realizado com os fungos isolados do solo para avaliação da atividade antifúngica frente a um fungo leveduriforme e antibacteriana sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, apresentados na Tabela 2.2, de acordo com a metodologia descrita por Bezerra e colaboradores (2015). Os microrganismos utilizados neste estudo foram obtidos junto à coleção do Laboratório de Bioensaios da UNEB (Universidade do Estado da Bahia).

Tabela 2. 2 - Microrganismos utilizados no ensaio antifúngico e antibacteriano

Bactérias		Fungo
Gram-positiva	Gram-negativa	Leveduriforme
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Nº CCT 0090); (ATCC 27853)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 18804)
<i>Bacillus cereus</i> Frankland & Frankland (Nº CCT 0096)	<i>Salmonella Choleraesius</i> (ATCC 14028)	

Fonte: dados da pesquisador

##### 2.2.4.1 Inoculação das placas de teste

Inicialmente, os microrganismos (*Staphylococcus aureus*; *Bacillus cereus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella Choleraesius* e *Candida albicans*) foram reativados em meio de ágar nutriente (AN) e utilizados no teste após 24 horas de crescimento à 35° C.

Após o crescimento, foram preparadas, separadamente, suspensões dos microrganismos através da transferência de uma colônia isolada para um tubo de ensaio com tampa rosqueável contendo solução salina esterilizada (NaCl 0,9%). O tubo foi colocado em agitador tipo vórtex para promoção da suspensão das células na solução e, em seguida, as mesmas tiveram sua turbidez ajustada para que coincidissem

com a da solução padrão de McFarland 0,5, de modo a evitar densidades extremas de inóculo. Estas suspensões foram utilizadas imediatamente após o preparo.

A inoculação do microrganismo se deu pela transferência de 100 µL da suspensão para uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo AN, seguida do espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski por toda superfície do ágar.

As placas inoculadas com os microrganismos foram deixadas com a tampa entreaberta por alguns minutos para diminuição da humidade e posteriormente receberem seis cubos de ágar com cerca de 5 mm contendo micélio de fungo filamentosos isolado do solo, obtidos de colônias novas (com aproximadamente 7 dias de crescimento). Os seis cubos foram distribuídos de modo a não exceder 24 mm de distância entre si. Um total de cinquenta e dois fungos foram testados para os 5 microrganismos e cada teste foi realizado em duplicata.

As placas foram invertidas e despostas em estufa, a 35 °C, após 15 minutos da aplicação dos cubos. Todo material utilizado foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C e os procedimentos de inoculação foram realizados em capela de fluxo laminar na presença de chama.

#### 2.2.4.2 Leitura das Placas

Após 24 e 48 horas de incubação, examinou-se cada placa quanto a presença de halos de inibição do crescimento dos microrganismos. Foram consideradas placas satisfatoriamente semeadas, aquelas cujos halos de inibição resultantes foram uniformemente circulares.

Os halos foram medidos em milímetros usando um paquímetro encostado no reverso da placa de Petri invertida, colocando-a contra a luz. O halo de inibição foi considerado como a área sem crescimento detectável a olho nu. O crescimento de pequenas colônias, detectáveis apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento foi ignorado.

Os microrganismos foram classificados de acordo com os parâmetros definidos pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI) (CLSI, 2017), mostrados na Tabela 2.3.

Tabela 2. 3 - Padrões de desempenho para teste de Suscetibilidade antimicrobiana de acordo com a CLSI.

CATEGORIAS	PONTO DE INTERRUPÇÃO	
	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diâmetro do halo (mm)
Sensível	$\leq 4$	$\geq 20$
Intermediária	8-16	15-19
Resistente	$\geq 32$	$\leq 14$
Não-sensível	$> 4$	$< 20$

Fonte: (CLSI, 2017)

Nesta classificação, os testados inibidos por halo maior ou igual a 20 milímetros de diâmetro, são considerados Sensíveis (S) no tratamento com concentrações recomendáveis do agente antimicrobiano e, portanto, este agente, provavelmente apresentará eficácia clínica.

A categoria Intermediária (I), abriga os testados com halos de inibição entre 15 e 19 milímetros. Nestes casos, a sensibilidade do testado ao agente está relacionada à administração de doses mais altas e/ou mais frequentes, ou ainda à existência de alvos específicos. Já os testados com halo menor ou igual a 14 milímetros de diâmetro são classificados como Resistentes (R) ao agente antimicrobiano.

Os testados referenciados nas categorias SDD, I e R, também podem ser designadas como Não-sensíveis (NS), uma vez que esta abrange todos os testados com halo inferior a 20 milímetros de diâmetro (CLSI, 2017).

### 2.2.5 Avaliação da produção de enzimas extracelulares por fungos filamentosos

Um total de 51 isolados foram também submetidos à avaliação da produção de enzimas extracelulares (BEZERRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012, 2013; RODRIGUES et al., 2015). Utilizou-se meios de crescimento específicos para detecção da produção de “lipase; protease e amilase”.

Os fungos foram reativados e inoculados em meio BDA pelo período de sete dias antes de serem submetidos ao teste. Após esse período, quatro cubos de ágar contendo o micélio foram transferidos para os meios, cujo preparo está de acordo com a descrição nos itens subsequentes. Todos os meios de cultivo e materiais utilizados

neste experimento foram esterilizados em autoclave à 121 °C por 20 minutos. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

A Atividade Enzimática (AE) foi avaliada e calculada seguindo a metodologia descrita no trabalho realizado por Price e colaboradores (1982) através da medida do halo de degradação promovida pelo isolado nos meios de cultivo e foi agrupada de acordo com as categorias (Tabela 2.4) propostas por Kantarcioglu e Yucel (2002), no qual, valores altos de AE correspondem à baixa ou nenhuma atividade enzimática e, conseqüentemente baixos valores correspondem à alta atividade. Assim, foram tomadas a medida média do diâmetro das colônias e a medida dos halos (diâmetro total da colônia somado ao diâmetro do halo) e, através da relação entre estas medidas, obteve-se valor da AE e foi possível categorizar do isolados.

Tabela 2. 4 - Classificação da Atividade Enzimática (AE) a partir da relação entre o desenvolvimento da colônia e o halo de precipitação

<b>AE</b>	<b>Classificação</b>
<b>0,90 - 1,00</b>	Muito baixa
<b>0,80 - 0,89</b>	Baixa
<b>0,70 - 0,79</b>	Alta
<b>≤ 0,69</b>	Muito alta

Fonte: Kantarcioglu e Yucel (2002)

#### 2.2.5.1 Avaliação da produção de lipase

Quatro blocos de ágar de aproximadamente 5 mm com o micélio da linhagem fúngica foram inoculados em placa de Petri contendo meio de crescimento constituído por óleo de oliva 1% como única fonte de carbono, sulfato de magnésio heptahidratado 0,2 g/L; fosfato de potássio dibásico 0,4 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L; Tween 80 0,01%, corante rodamina B 0,001%, água destilada e ágar 1,5%. A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados fosforescentes ao UV quando observado à luz de 350 nm, após 72 h de incubação em estufa a 27°C (OLIVEIRA et al., 2013).

### 2.2.5.2 Avaliação da produção de protease

O meio de crescimento para avaliação da produção de protease foi preparado através da adição de sulfato de magnésio heptahidratado 0,2 g/L, cloreto de sódio 0,1 g/L, fosfato de potássio dibásico 0,1 g/L, dihidrogenofosfato de potássio 0,4 g/L, extrato de levedura 0,4 g/L, água destilada, ágar 1,5% e 2% de leite em pó desnatado.

O meio foi esterilizado sem o leite, que foi adicionado posteriormente na capela de fluxo laminar. De modo similar ao teste para lipase, foram dispostos quatro cubos do micélio fungico na placa contendo o meio suplementado com leite em pó que foi incubada por 72 horas. Após este período, a placa foi revelada com solução de ácido acético 5%, para verificação da presença de halos transparentes.

### 2.2.5.3 Avaliação da produção de amilase

O mesmo meio utilizado na avaliação da produção de protease foi utilizado para avaliar a produção de amilase, contudo o leite em pó, do primeiro caso foi substituído por 1% de amido de milho, além disso, o amido foi autoclavado juntamente com os demais componentes do meio. Os Procedimento de inoculação foram semelhantes aos já descritos. Após o período de incubação a placa foi revelada com solução de lugol para verificação da presença de halos transparentes.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Obtenção e identificação parcial de fungos do solo

#### 2.3.1.1 Inoculação de suspensão de solo empregando a técnica “spread-plate”

A técnica utilizada mostrou-se adequada para o crescimento de fungos presentes no solo. Contudo, observou-se uma incidência mais baixa no desenvolvimento de colônias fúngicas a partir da suspensão do solo A de granulometria de 0,2 mm, apesar de os números absolutos serem relativamente similares. Esse desenvolvimento também foi mais demorado e, macroscopicamente, menos diversificado em comparação com os resultados obtidos a partir da suspensão do solo B, de granulometria maior (1,2 mm).

Foi observada ainda a combinação dos dois fatores, lentidão no desenvolvimento e baixo número de colônias nas diluições finais, uma vez que até o 21º dia de incubação, para o solo B, registrou-se o crescimento de cinco colônias na diluição  $10^{-5}$ , apenas uma nas diluições de  $10^{-6}$ , e nenhuma colônia foi observada nessas diluições do solo A. Nos dois casos, as placas contendo a diluição  $10^{-1}$  apresentaram um número muito alto de colônias, não permitindo a perfeita distinção entre as mesmas. Assim, as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , do solo B foram priorizadas para realização do isolamento das colônias.

Esses resultados mostraram que não há expressiva discrepância na utilização de solos de diferentes texturas, porém, admitindo que as condições de cultivo foram iguais, sugerem vantagens no peneiramento do solo para a obtenção de uma granulometria final de 1,2 mm, em detrimento de uma textura mais fina, e ainda que, procedimentos com diluições acima de  $10^{-6}$  podem não ser necessárias.

#### 2.3.1.2 Contagem de unidades formadoras de colônias

Após a inoculação e incubação, as placas foram observadas para averiguação do número de colônias e determinar a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo (UFC/g).

A média das quantidades de colônias observadas nas triplicatas das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , tanto para o solo A quanto para o solo B são apresentadas na Tabela 2.5. Foram desconsideradas para o cálculo, as placas com as diluições que

apresentaram um número muito alto de colônias ( $10^{-1}$ ), bem como aquelas com número muito baixo ( $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ).

Tabela 2. 5 - Resultados para o cálculo de UFC/g nas diferentes diluições dos Solos A e B

Solo A			Solo B		
Diluição	Colônias	UFC/g	Diluição	Colônias	UFC/g
$10^{-2}$	35	3.500	$10^{-2}$	42	4.200
$10^{-3}$	14	14.000	$10^{-3}$	25	25.000
$10^{-4}$	2	20.000	$10^{-4}$	13	130.000

Fonte: dados da pesquisa, 2018

Tomando-se por base as concentração de propágulos que foram capazes de desenvolver colônias nas diluições de 1:1000 ( $10^{-3}$ ), por exemplo, nota-se que os resultados aqui apresentados se assemelham ao esperado para solos em condições ambientais normais, uma vez que, em média os fungos podem ser encontrados no solo em uma variação de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g (MARTIN, 1977).

A contagem de UFC exerce uma grande importância em teste de controle, nas amostra de solo em particular, o número de UFC/g além de apresentar um panorama da sua diversidade microbiana, é importante também para apontar sua qualidade, já que esses organismos encontram-se relacionados com funções tais como as assinaladas por Cardoso e Freitas (1992): de agregação do solo, imobilização da matéria orgânica, solubilização de nutrientes e ação predatória contra amebas e nematoides.

### 2.3.1.3 Caracterização morfológica dos isolados fúngicos

Foram isolados um total de 51 fungos do solo. A partir das características macromorfológicas, tais como textura, coloração da colônia e do reverso, foi criado um agrupamento inicial. Outras observações como o tamanho da colônia (medida em cm), a topografia da superfície, morfologias do centro, da borda e a classificação quanto a presença ou ausência de pigmentos, sulcos e exsudatos foram anotadas para uma descrição mais detalhada de cada isolado baseadas nas características descritas por Nobles (1965).

Após o cultivo em lamínulas (microcultivo), na observação sob microscópio ótico foram anotadas as condições das hifas e das estruturas de reprodução quanto à coloração e a ausência ou presença de septos, bem como a forma e a coloração dos conídios, segundo as chaves de identificação de gêneros propostas por Barnett e Hunter (1987). Os dados obtidos a partir da observação em microscópio ótico foram somados às características macroscópicas, permitiu a identificação do gênero de 46 dos isolados distribuídos como mostrado na Tabela 2.6. Os demais (5 isolados) não puderam ser identificados devido à não produção de estruturas reprodutivas detectáveis em repetidos testes de microcultivo.

Tabela 2. 6 - Ocorrência média e relativa de dos gêneros de fungos isolados na amostra de solo

Fungo do solo (Gênero)	UFC/ diluição do solo					Total de UFC	Média	Ocorrência (%)
	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$			
<i>Aspergillus</i>	4	17	7			28	5,60	54,90
<i>Fusarium</i>	1	5	1	1		8	1,60	15,70
<i>Paecilomyces</i>			1			1	0,20	1,96
<i>Penicillium</i>		3	4	2		9	1,80	17,64
Não identificado		2		2	1	5	1,00	9,80
Total	5	27	13	5	1	51	10,20	

Fonte: dados da pesquisa, 2018

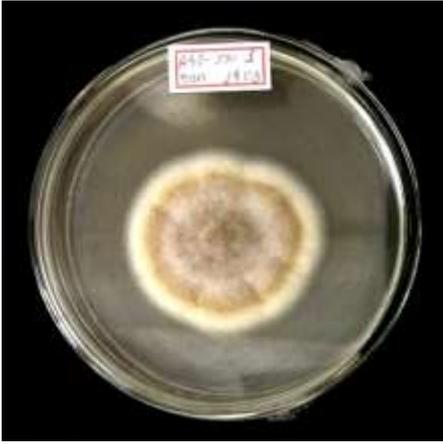
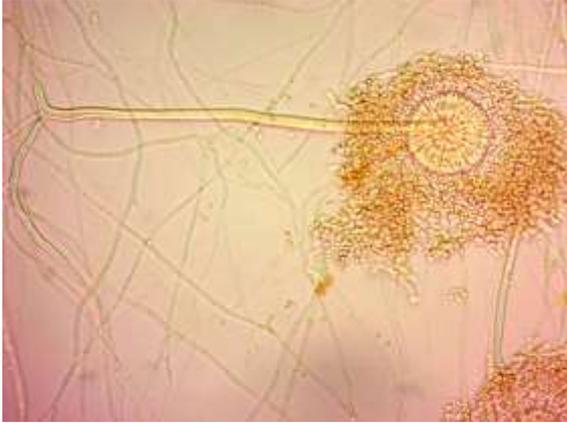
Apenas quatro gêneros comportam os fungos isolados do solo neste trabalho. No entanto os gêneros observados, estão entre os mais referenciados na literatura como habitantes do solo. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* estão entre aqueles com maiores números de espécies que tem o solo como habitat original (STAMFORD et al., 2005).

O gênero *Aspergillus* ao lado do gênero *Penicillium* forma os dois grupos mais populosos do solo. Assim como neste estudo, há vários exemplos na literatura que corroboram com essa proposição, da presença dos gêneros em solos diversos (BORGES et al., 2011; GADDEYYA et al., 2012; NAYAK; SIVAGAMI; NANDA, 2018), bem como em regiões mais áridas (CAVALCANTI et al., 2006; COSTA et al., 2006; GIOVANELLA et al., 2017). O fator ambiental tem papel importante sobre esse predomínio, e esses gêneros, sobretudo *Aspergillus*, têm demonstrado alto potencial

de colonização em ambientes com baixa disponibilidade hídrica (GOCHENAUR, 1975)

A caracterização do isolado M12 apresentada na Figura 2.3, uma síntese da ficha catalográfica utilizada para registro e depósito dos isolados na coleção de culturas de microrganismos do LBQM, levou à identificação de um fungo pertencente ao gênero *Aspergillus*, gênero de maior ocorrência, entre os isolados. As fichas com a caracterização dos demais isolados podem ser acessadas no Apêndice A (p. 179).

Figura 2. 3 - Quadro com a caracterização macro e micromorfológica do Isolado M12

<p>Número da Cultura: 12                      <b>LBQM-M12</b></p>	<p>Data de Depósito: 20/ 10/ 2015</p>
<p><b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.</p>	<p><b>Procedência da Linhagem:</b></p>
<p><b>Características Macromorfológicas</b></p> <p>Meio BDA; 5 dias de incubação; 4,85 cm de diâmetro                  Micélio: filamentososo/rasteiro                  Coloração da colônia: amarela                  Reverso: amarelado                  Textura de glabra feltrada; superfície elevada; centro crateriforme; borda ondulada                  Produção de pigmento: não</p>	<p>Código da linhagem: A4b Isolado 1                  Fonte de Isolamento: solo                  Método de preservação: Castellani                  Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido</p> <p><b>Características Micromorfológicas:</b></p> <p><b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas  <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa</p>
<p><b>Fotografias da linhagem</b></p>	
<p>a) Frente</p> 	<p>b) Reverso da placa</p> 
<p>c) Estruturas de reprodução</p> 	<p>d) Conídios</p> 

Fonte: elaborado pelo autor, 2018

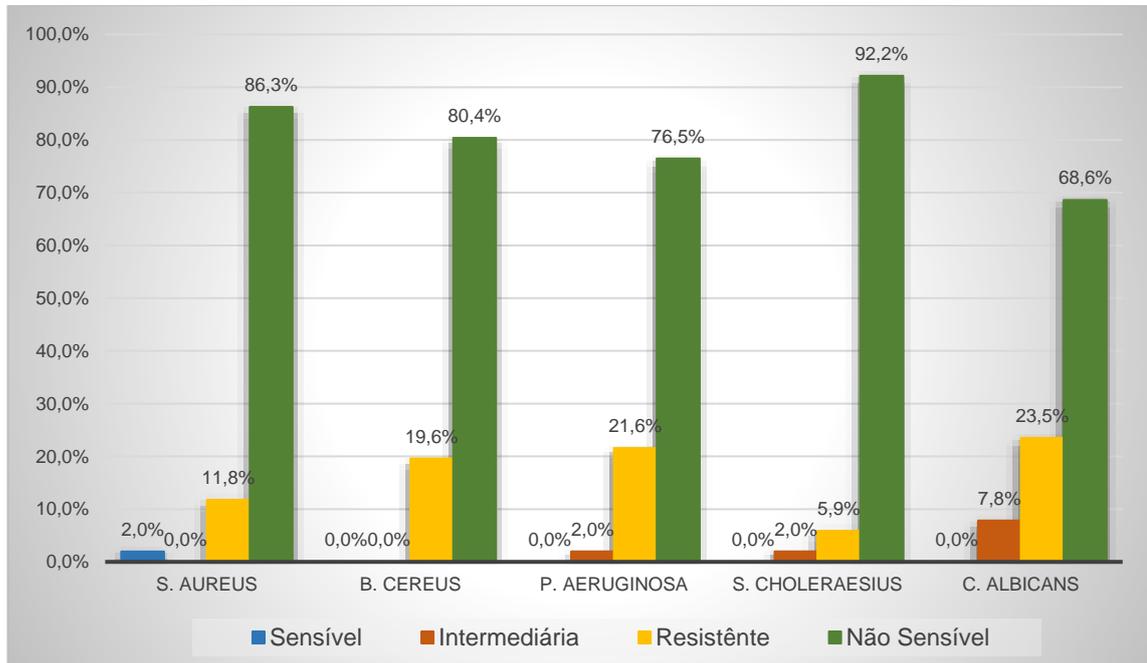
Além da comprovada abundância no solo, essa frequência dos gêneros *Aspergillus* (59,40%) e *Penicillium* (17,64%), e aparente baixa diversidade de gêneros, pode ser explicada pelas condições nutricionais do meio de cultivo que podem favorecer alguns fungos, além da existência de espécies que não possuem a habilidade de crescimento em meio sintético (LIU et al., 2006a). Kirk e colaboradores (2004) também assinalam que, para além dos eventuais problemas metodológicos, o estudo de fungos e populações microbianas do solo torna-se mais difícil pela falta de conhecimento taxonômico.

### **2.3.2 Avaliação da capacidade de produção enzimática de fungos isolados do solo**

Fungos são conhecidos por apresentar habilidades na biossíntese de uma grande variedade de classes estruturais de metabólitos secundários (DEWICK, 1997; TURNER, 1971) muitos dos quais são atualmente utilizados ou serviram de inspiração para produção de medicamentos imunossupressores, redutores do colesterol, bem como aqueles com atividade antibacteriana como a penicilina e atividade antifúngica como a equinocandina B (EVIDENTE et al., 2014). Neste sentido, foi indispensável neste estudo, a utilização de metodologias que possibilitem investigar o potencial biológico dos isolados.

Os 51 fungos isolados do solo, foram então submetidos a uma triagem para verificação de suas possíveis ações antibacterianas e antifúngicas. Os resultados apontaram que 47% dos isolados foram capazes de desenvolver halos de inibição do crescimento de pelo menos um microrganismo no teste de difusão em ágar. Contudo, após categorização de acordo com os padrões de desempenho em teste de suscetibilidade (CLSI, 2017). O gráfico na Figura 2.4, expõe os resultados do teste de modo a categorizar a sensibilidade dos microrganismos testados frente à ação dos isolados fúngicos.

Figura 2. 4 - Classificação dos microrganismos frente a ação dos isolados fúngicos de acordo com os padrões de desempenho para teste de suscetibilidade definidos pela CLSI.

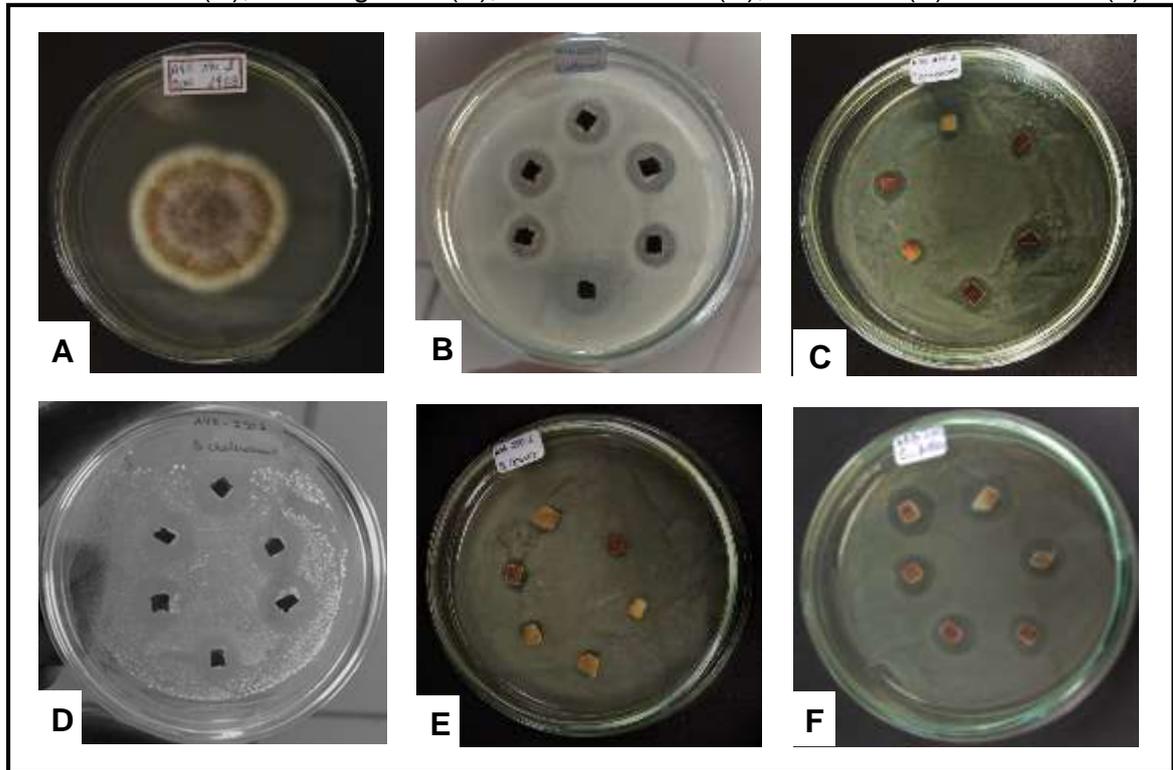


Fonte: dados da pesquisa, 2018

Eles demonstram que os microrganismos não foram sensíveis (NS) à maioria dos isolados, com percentuais variando de 68,2% da *C. albicans* a 92,2% *S. choleraesius*, percentuais que correspondem ao número de isolados que não desenvolveram halos nas placas de teste. Na maioria dos casos em que os isolados desenvolveram halos de inibição, estes ficaram abaixo de 14 mm, o que significa resistência dos microrganismos testados. Na categoria de sensibilidade intermediária (I), quatro isolados, cerca de 8%, conseguiram vencer a barreira de resistência dos microrganismos testados apresentando halos de inibição que variaram entre 15 e 17 mm. Apenas *S. aureus* demonstrou sensibilidade (S) a um dos isolados.

O isolado M12 *Aspergillus* sp. (Figura 2.5) conseguiu desenvolver halos de inibição para todos dos microrganismos testados variando de 6 mm para *B. cereus* e 16 mm para *S. choleraesius*.

Figura 2. 5 - Fotografia do isolado M12 *Aspergillus* sp. em BDA (A) e dos co-cultivos em AN com *C. albicans* (B), *P. aeruginosa* (C), *S. choleraesius* (D), *B. cereus* (E) e *S.aureus* (F)



Fonte: elaborado pelo autor, 2018

Na Tabela 2.7, podem ser verificados os resultados das medidas aferidas para todos os isolados que desenvolveram halos de inibição do crescimento microbiano.

Tabela 2. 7 - Medidas do halo de inibição (mm) promovido pelos fungos isolados do solo no teste de atividade antifúngica e antibacteriana.

Isolado	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. choleraesius</i>	<i>C. albicans</i>
M01 <i>Penicillium</i> sp.	11	9	9		7
M02 <i>Penicillium</i> sp.		12	15		17
M05 Não identificado			8		9
M07 <i>Fusarium</i> sp.		9	7		12
M08 <i>Penicillium</i> sp.		7	9		14
M09 Não identificado				11	
M11 <i>Fusarium</i> sp.		7	9		12
M12 <i>Aspergillus</i> sp.	11	6	9	16	15
M14 <i>Fusarium</i> sp.	20	13	9		
M18 <i>Penicillium</i> sp.	11		12	11	
M20 <i>Penicillium</i> sp.				7	
M22 <i>Penicillium</i> sp.		9	11		
M23 <i>Penicillium</i> sp.	6				
M24 Não identificado		7	8		
M26 <i>Fusarium</i> sp.	11				
M27 <i>Aspergillus</i> sp.	8	8	8		9
M42 <i>Aspergillus</i> sp.					12
M44 <i>Aspergillus</i> sp.					12
M45 <i>Aspergillus</i> sp.					15
M46 <i>Aspergillus</i> sp.					11
M47 <i>Aspergillus</i> sp.					9
M48 <i>Aspergillus</i> sp.					8
M50 <i>Aspergillus</i> sp.					16
M51 <i>Aspergillus</i> sp.					13

Fonte: dados da pesquisa, 2018

Cerca de 25% (13 isolados) apresentaram, separadamente ou em concomitância, halos de inibição contra as bactérias gram-negativas, *S. aureus* e *B. cereus*. Dentre estes resultados destaca-se a atividade do Isolado M14 uma espécie do gênero *Fusarium*, com halos de 20 mm e 13 mm para *S. aureus* e *B. cereus*, respectivamente. Halos iguais ou maiores que 20 mm refletem sensibilidade dos testados ao agente de inibição. M14, foi o único isolado entre todos estudados que desenvolveu halo neste nível, assim, torna-se um candidato preferencial para estudos da atividade biológica e da composição química do seu metabolismo secundário.

*S. aureus* é colonizadora da pele humana e *B. cereus* é normalmente encontrada no solo, contudo ambas são frequentemente relacionadas às doenças transmitidas por alimentos (PASSOS et al., 2012), além disso, *S. aureus* é considerada a mais perigosa entre as bactérias cocos, e está relacionada com

diversas doenças de pele, respiratórias, cardiovascular e gastrointestinal (TALARO; CHESS, 2018), por isso é comum as investigações que visam a descoberta de agentes capazes de inibir suas ações. Assim como o observado neste estudo, a literatura também traz exemplos de espécies de *Fusarium* produzindo agentes com atividade contra estas bactérias. Recentemente, Ibrahim e colaboradores (2018) relataram que a fusarithioamida B, uma benzamida com estrutura ainda não descrita, isolada do fungo endofítico *Fusarium chlamydosporium*, apresentou um alto potencial antibacteriano contra *S. aureus*, *B. cereus* e outras bactérias, que pode ser comparado com a atividade da ciprofloxacina. Outras espécies também têm sido relatadas como produtoras de metabólitos ativos contra *S. aureus*, como é o caso de dois derivados da citrinina isolados de *Penicillium citrinum* (WANG et al., 2019) e o efeito moderado de duas novas  $\alpha$ -furanonas isoladas do fungo *Cephalotrichum microsporum* (AN et al., 2019).

As bactérias gram-negativas apresentam grande risco em casos de infecções sanguíneas, sobretudo o choque séptico (TALARO; CHESS, 2018). Neste estudo foram avaliados o potencial dos isolados contra *P. aeruginosa* e *S. choleraesius*. Um total de 12 isolados (23,5%) desenvolveram halo de inibição para *P. aeruginosa*, com destaque para o isolado M02 do gênero *Penicillium*, atingindo 15 mm. Já para *S. choleraesius*, apenas 4 (7,8%) desenvolveram halos, dentre os quais, uma espécie de *Aspergillus*, o isolado M12, apresentou o melhor resultado com diâmetro de inibição de 16 mm. Os diâmetros exibidos nestes casos são classificados como atividade intermediária, no entanto são resultados consideráveis uma vez que, por apresentarem diferenças na constituição de suas paredes celulares, as bactérias gram-negativas, tendem a ser mais resistentes em comparação com as gram-positivas.

Fungos do gênero *Aspergillus* também tem apresentado atividade contra *P. aeruginosa*, como no trabalho de Pinheiro e colaboradores (2018) que descreve a ação dos metabólitos de uma espécie não identificada oriunda do solo, bem como o exemplo de duas novas  $\gamma$ -butirolactonas, aspernolidas L e M, isoladas de *Aspergillus versicolor* que apresentaram, respectivamente, IC<sub>50</sub> de 2,78 mM e 4,60 mM, considerados como atividade moderada contra *P. aeruginosa* (IBRAHIM; ASFOUR, 2018).

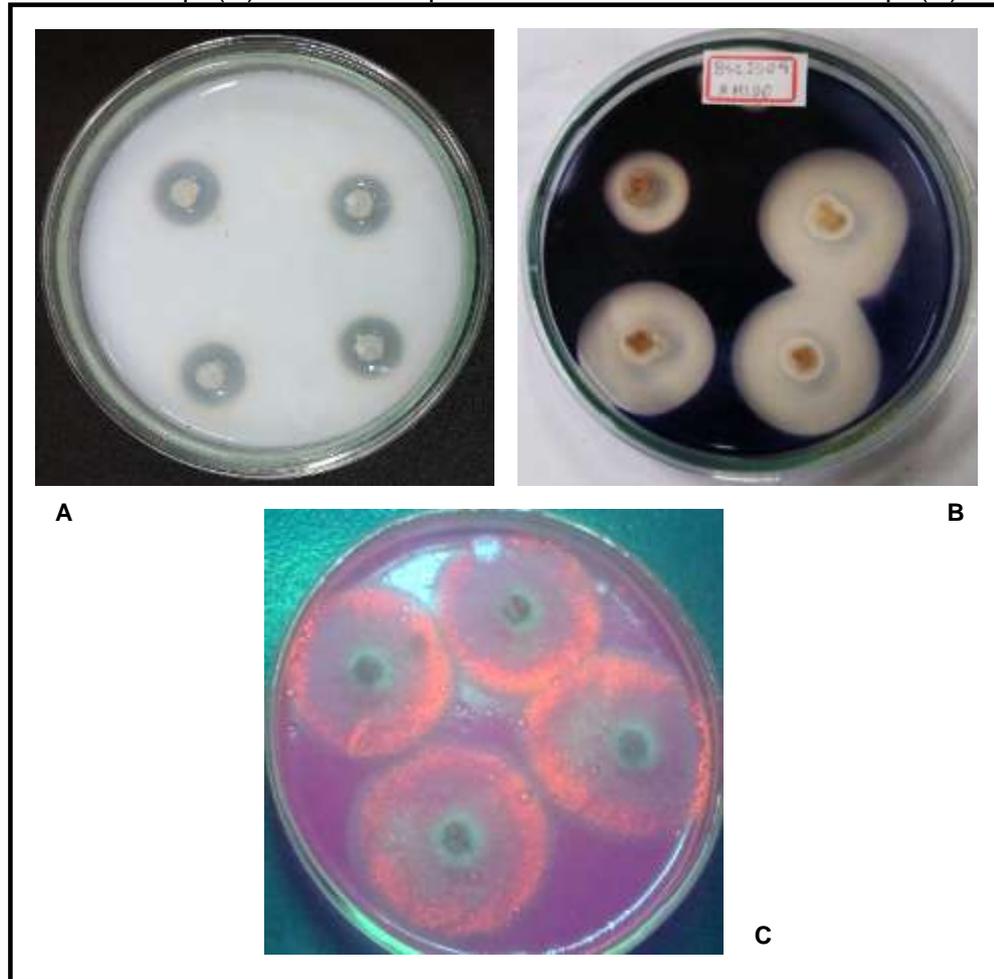
A *Candida albicans* é um fungo leveduriforme causadora de doenças na pele, no sistema gastrointestinal e urogenital. Além disso, juntamente com algumas espécies de dermatófitos, forma o único grupo de fungos agentes de infecções transmissíveis (TALARO; CHESS, 2018). A avaliação da atividade antifúngica dos isolados contra *C. albicans* mostrou que 31,4% deles apresentou algum grau de inibição. Requer atenção a atividade de todos os *Aspergillus* do grupo do *niger* que não apresentaram halos contra nenhuma bactéria, sobretudo o isolado M50, que produziu uma inibição intermediária (16 mm). Outros isolados, incluindo *Penicillium* sp. M02 (17 mm) e o *Aspergillus* M12 (15 mm) também apresentaram atividade intermediária. A busca por compostos bioativos contra *C. albicans* e outros fungos patógenos é de fundamental importância tendo em vista a quantidade reduzida de drogas disponíveis na terapêutica quando comparadas com o arsenal antibacteriano, problema que está relacionado à alta toxicidade dos agentes devido à semelhança entre a célula fúngica e a humana (SCORZONI et al., 2017).

A de fusarithioamida B, isolada de *Fusarium chlamydosporium* também teve sua atividade antifúngica avaliada e demonstrou seletividade contra *C. albicans* com concentração inibitória mínima comparada ao fármaco clotrimazol (IBRAHIM et al., 2018). As aspernolidas L e M isoladas do fungo *Aspergillus versicolor* apresentaram IC<sub>50</sub> de 4,31 mM e 5,41 mM, respectivamente, uma atividade moderada contra *C. albicans*.

### **2.3.3 Avaliação da capacidade de produção enzimática de fungos isolados do solo**

A partir da técnica utilizada, verificou-se, que dos 51 isolados envolvidos na triagem, cerca de 74% apresentou resultado positivo para a produção de pelo menos uma das enzimas. A Figura 2.6 apresenta uma amostra com diferentes isolados desenvolvidos nos meios para detecção da atividade proteolítica, amilolítica e lipolítica. O registro fotográfico com todos os isolados testados, pode ser acessado no Apêndice B (p. 230).

Figura 2. 6 - Atividade proteolítica do Isolado M06 *Fusarium* sp. (A), atividade amilolítica do Isolado M22 *Penicillium* sp. (B) e atividade lipolítica do Isolado M14 *Fusarium* sp. (C)



Fonte: elaborado pelo autor, 2018

Dos resultados apresentados na Tabela 2.8, extrai-se um percentual inferior ao anteriormente citado. Isso se explica pelo fato de na tabela estarem relacionados apenas os casos em que foi possível observar e medir colônias e halos de precipitação. Portanto, aqueles que deram testes positivos para a produção das enzimas, mas que não foi possível mensurar os diâmetros das colônias e halos, principalmente por se tratar de espécies com crescimento acelerado e com colônias dispersas em toda a placa, foram contabilizados, mas não estão relacionados na tabela.

Tabela 2. 8 - Atividade Enzimática (AE) dos fungos isolados do solo.

	Isolados	AE		
		Protease	Lipase	Amilase
M01	<i>Penicillium</i> sp.		0,58	
M02	<i>Penicillium</i> sp.	0,74	0,70	
M03	<i>Penicillium</i> sp.	0,89		
M04	<i>Penicillium</i> sp.			0,69
M06	<i>Fusarium</i> sp.	0,48		
M07	<i>Fusarium</i> sp.	0,77		0,83
M08	<i>Penicillium</i> sp.	0,79		
M10	Não identificado	0,63		
M11	<i>Fusarium</i> sp.			0,83
M12	<i>Aspergillus</i> sp.		0,65	0,64
M13	<i>Fusarium</i> sp.	0,89	0,70	
M14	<i>Fusarium</i> sp.		0,79	
M15	<i>Fusarium</i> sp.	0,82	0,77	
M19	<i>Penicillium</i> sp.	0,94		
M20	Não identificado		0,81	0,88
M21	<i>Penicillium</i> sp.	0,84		
M22	<i>Penicillium</i> sp.	0,64	0,84	0,34
M23	<i>Penicillium</i> sp.	0,58		0,65
M24	Não identificado			0,79
M25	<i>Fusarium</i> sp.	0,37	0,79	0,99
M26	<i>Fusarium</i> sp.	0,95		0,99
M27	<i>Aspergillus</i> sp.			0,83
M34	<i>Aspergillus</i> sp.			0,80
M35	<i>Aspergillus</i> sp.			0,75
M49	<i>Aspergillus</i> sp.			0,84

Fonte: dados da pesquisa, 2018

AE = 0,90 -100: muito baixa; de 0,80 - 0,89: baixa; de 0,70 -0,79: alta; ≤ 0,69: muito alta

Analisando apenas os resultados da Tabela 2.8, nota-se que protease e amilase foram produzidas por um número maior de fungos correspondente a 27% em comparação com a lipase produzida por 17 % dos isolados. Além disso, é possível ressaltar alguns resultados devido à relevância do potencial demonstrado neste teste por alguns dos isolados.

Inicialmente, é sensato destacar a habilidade do isolado M22, uma espécie pertencente ao gênero *Penicillium* que, além de apresentar resultado positivo para as três enzimas, teve a AE classificada como muito alta para protease (0,64) e amilase (0,34) sendo que esta última foi o melhor resultado, ou seja, a mais alta atividade observada dentre todos os fungos usados no teste. Um outro fungo do gênero *Penicillium*, o isolado M01, foi o responsável por apresentar a mais alta AE (0,58)

dentre os fungos produtores de lipase. Dentre os produtores de protease o destaque fica com os isolados do gênero *Fusarium*, M25 e M06 com surpreendentes 0,37 e 0,48 valores de AE respectivamente. No entanto o isolado M25 e o isolado M26, duas espécies de *Fusarium*, foram os que apresentaram, de modo geral os mais baixos valores de AE (0,99) ambos para a amilase, além disso, o isolado M26 também foi classificado como muito baixo produtor de protease com valor de AE de 0,95.

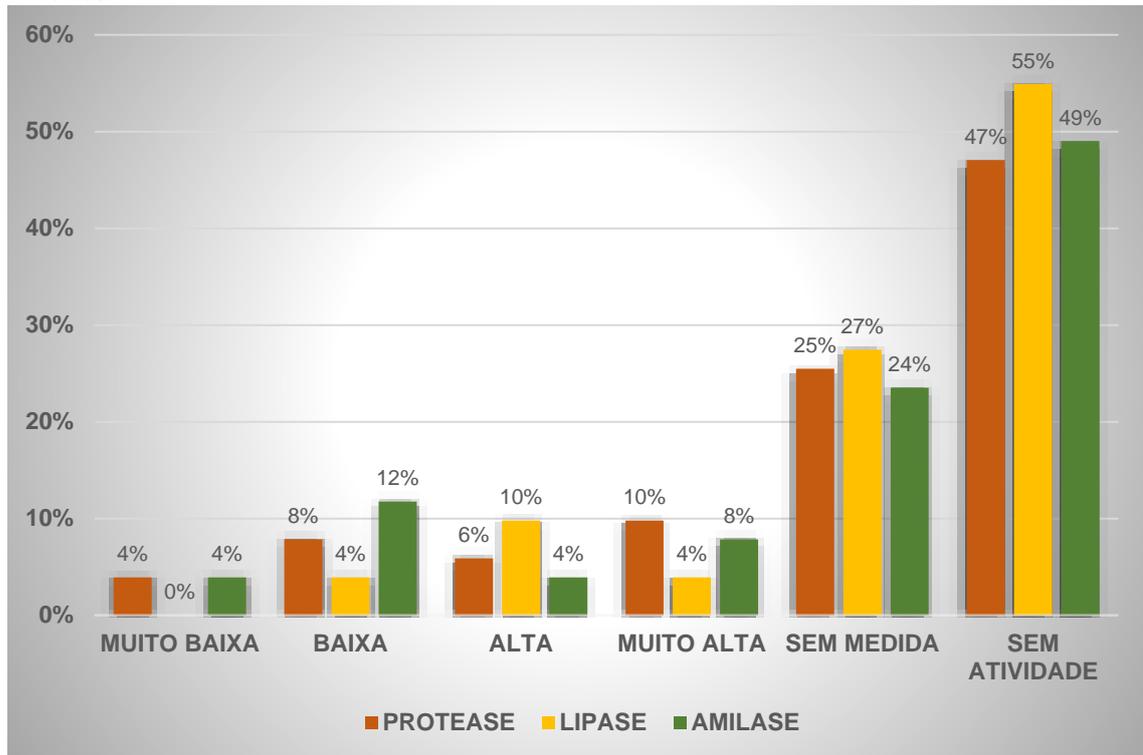
No grupo de linhagens representantes do gênero *Aspergillus*, destaca-se o isolado M12, atividade proteolítica e amilolítica classificadas como muito altas com valores de 0,65 e 0,64, respectivamente.

Ainda com relação ao gênero *Aspergillus*, alguns fungos produtores de colônias pretas e, por isso, aqui designados como pertencentes ao grupo *niger*, que representam 20% dos isolados neste estudo, se mostraram como linhagens não ideais para produção das enzimas investigadas, de modo que apenas duas destas apresentaram resultado positivo para lipase e apenas uma para amilase, apesar de *Aspergillus niger* aparecer em diversos relatos da literatura que estudam a sua atividade e sua utilização em processos de otimização da produção destas enzimas (ABDEL WAHAB; AHMED, 2018; ALIYAH et al., 2017; CASTRO et al., 2015; COSTA et al., 2017; EL-BATAL et al., 2016; SPERB et al., 2018; WANG; LI; LU, 2018). Em contrapartida, outros isolados atribuídos ao gênero *Aspergillus*, do grupo *flavus*, equivalentes a 24% dos estudados, demonstraram capacidades variadas de produção das três enzimas.

Três linhagens ainda sem identificação do gênero demonstraram potencial produção enzimática sobretudo o isolado M10, que apresentou atividade proteolítica muito alta de 0,63. O isolado M24 apresentou atividade amilolítica considerada alta de 0,79, já o isolado M20 apresentou atividade lipolítica e amilolítica igualmente baixas de 0,81 e 0,88 respectivamente.

O gráfico da Figura 2.7 apresenta a categorização dos isolados de acordo com os valores de AE baseado no agrupamento parametrizado pela Tabela Y (Procedimento experimental), mostra uma compilação de todos os números que puderam ser extraídos do experimento, além de elencar os percentuais de isolados que não apresentaram atividade, bem como aqueles que apresentaram, mas que não foi possível mensurar, estes últimos são principalmente isolados do gênero *Aspergillus* pertencentes ao grupo *flavus*.

Figura 2. 7 - Distribuição percentual dos isolados fúngicos nas categorias de atividade enzimática.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

A partir destes dados mais completos, observa-se que 53% dos isolados apresentaram capacidade de produção de protease, sendo que 28% foi distribuído em todas as categorias, de muito baixa a muito alta, e os demais 25% não puderam ser categorizados. A amilase foi produzida por 51% dos isolados, divididos entre aqueles categorizados e outros 24% não categorizados. A atividade lipolítica foi detectada em 45% dos isolados que não teve representante apenas na categoria muito baixa e, para a maioria dos produtores (27%) não foi possível determinar a AE.

Como observado, a atividade proteolítica foi a mais frequente e também a mais promissora, uma vez que, dentre os isolados para os quais foi possível mensurar a AE, as categorias alta e muita alta concentraram a maioria. Esses dados estão em desacordo com aqueles apresentados por Bezerra e colaboradores (2015) em que se verificou a predominância de atividade proteolítica considerada baixa e por Silva e colaboradores (SILVA et al., 2006) cujo estudo identificou que 82% dos isolados não produziu protease. Esse resultado vem corroborar com a necessidade de estudos como o presente, uma vez que, como demonstrado na literatura, não há uma

distribuição homogênea da atividade enzimática nos gêneros sendo muito variável entre as espécies.

Com um número próximo de isolados exibindo capacidade amilolítica em comparação com aqueles que apresentaram atividade proteolítica, a grande diferença entre elas é o fato de que estes se concentraram majoritariamente nas categorias de atividade baixa e muito baixa. A atividade amilolítica foi descrita por Toghueo (2017) como a mais frequente dentre os seus isolados de diversos gêneros, alcançando cerca de 78%, como os isolados são endofíticos, os autores justificam essa alta frequência à eventual necessidade de degradação do amido após a morte da planta. Traçando um paralelo com essa afirmação, é possível imaginar que a menor frequência e a baixa atividade amilolítica apresentada pelos isolados estejam relacionadas com as questões adaptativas, uma vez que, neste estudo foram avaliados fungos isolados do solo.

A atividade lipolítica foi a que apresentou a mais baixa frequência, porém, dentre os categorizados a maioria apresentou alta ou muito alta AE. *Aspergillus* do grupo *flavus* para os quais não foi possível determinar a AE, foram todos produtores de lipases, observação que encontra apoio no trabalho de Monod e colaboradores (1993), que relataram a atividade lipolítica de diversas espécies de *Aspergillus*, incluindo *Aspergillus flavus*. Bezerra e colaboradores (2015) elencaram diversas espécies patogênicas como produtoras de lipases, o fato não foi tomado como surpresa pelos pesquisadores, uma vez que estudos tem levado a acreditar na relação da produção de lipases, bem como de outras enzimas hidrolíticas degradadoras da parede celular como as proteases, com as infecções causadas por fungos patogênicos, essas enzimas extracelulares teriam o papel digestão de lipídios onde estão são única fonte de carbono durante o processo infeccioso (RIVERA-ORDUÑA et al., 2011; STEHR et al., 2003).

## 2.4 CONCLUSÃO

O isolamento de solo utilizando a técnica “*spread plate*” forneceu resultados consideráveis em número de Unidades Formadoras de Colônia, no entanto, como é comum entre as técnicas disponíveis para o isolamento de fungos do solo, observou-se uma baixa diversidade de gêneros, já que os 51 isolados foram identificados como espécies de quatro gêneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*. Apesar disso, esses resultados estão condizentes com a população fúngica do solo descrita na literatura. A baixa diversidade de gêneros também está relacionada com a condição de cultivo. Neste trabalho foi utilizado BDA, um meio geral para microrganismos, o qual favoreceu o desenvolvimento de espécies que notadamente estão no topo da competição física. Neste sentido, é possível que adoção de meios com diferentes composições possam levar a uma maior diversidade de gêneros.

O procedimento adotado para comparação entre o desenvolvimento de colônias a partir da mesma amostra de solo, mas com texturas variadas foi eficaz, uma vez que, apesar dos resultados não terem apontado diferenças significativas com relação ao número de UFC, a partir de outros fatores observados, conclui-se que não há vantagens na obtenção de uma textura com granulometria final menor que 1,2 mm.

A avaliação da atividade enzimática através de uma triagem rápida apontou candidatos promissores para produção de amilases, lipases e proteases. Foi satisfatório o emprego de uma metodologia simples comparada às significantes informações colhidas.

De modo análogo, a investigação acerca da atividade metabólica, em teste de antagonismo frente a patógenos humanos, mostrou-se altamente satisfatória, pois, permitiu através de um experimento de baixo custo e fácil execução, identificar o comportamento geral e ainda verificar habilidades de alguns dos isolados em promover a inibição do crescimento dos microrganismos testado, resultados que podem ser aproveitados em trabalhos subsequentes.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL WAHAB, W. A.; AHMED, S. A. Response surface methodology for production, characterization and application of solvent, salt and alkali-tolerant alkaline protease from isolated fungal strain *Aspergillus niger* WA 2017. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 447–458, 2018.
- ABE, C. A. L. et al. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15328–15346, 2015.
- ABOUL-NASR, M. B.; ZOHRI, A. N. A.; AMER, E. M. Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2013.
- ADPRESSA, D. A.; LOESGEN, S. Bioprospecting Chemical Diversity and Bioactivity in a Marine Derived *Aspergillus terreus*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 2, p. 253–259, 2016.
- ALIYAH, A. et al. Production of  $\alpha$ -Amylase and  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus Niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. **Energy Procedia**, v. 136, p. 418–423, 2017.
- AN, Y. et al.  $\alpha$ -Furanones, secondary metabolites from the fungus *Cephalotrichum microsporum* and their antibacterial activities. **Phytochemistry Letters**, v. 30, n. January, p. 58–61, 2019.
- BAIDEN, F. et al. The need for new antibiotics. **The Lancet**, v. 375, p. 637–637, 2010.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. New York: Macmillan Publishing, 1987.
- BASHYAL, B. P. et al. Alertoxins with potent anti-HIV activity from *Alternaria tenuissima* QUE1Se, a fungal endophyte of *Quercus emoryi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6112–6116, 2014.
- BAUTISTA, K.; UNPAPROM, Y.; RAMARAJ, R. Bioethanol production from corn stalk juice using *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 41, n. 13, p. 1615–1621, 2018.
- BEZERRA, J. D. P. et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 49–57, 2015.
- BORGES, L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 9, n. 2, p. 185, 2011.
- CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds.). **Microbiologia do Solo**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 1992. p. 41–57.
- CARLILI, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. ed. London:

Academic Press, 2001.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225–226, 1939.

CASTRO, R. J. S. DE et al. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 678–684, 2015.

CAVALCANTI, M. A. DE Q. et al. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 831–837, 2006.

CHOI, J.; KIM, S.-H. A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 35, p. 9391–9396, 2017.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27. ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

COSTA, I. P. M. W. et al. Hyphomycetes from soil of an area affected by copper mining activities in the State of Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 290–295, 2006.

COSTA, T. M. et al. LIPASE PRODUCTION BY *Aspergillus niger* GROWN IN DIFFERENT AGRO-INDUSTRIAL WASTES BY SOLID-STATE FERMENTATION. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 419–427, 2017.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1997.

EL-BATAL, A. I. et al. Effect of Environmental and Nutritional Parameters on the Extracellular Lipase Production by *Aspergillus niger*. **International Letters of Natural Sciences**, v. 60, p. 18–29, 2016.

EVIDENTE, A. et al. Fungal metabolites with anticancer activity. **Natural Product Report**, p. 617–627, 2014.

GADDEYYA, G. et al. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. **Pelagia Research Library**, v. 3, n. 4, p. 2020–2026, 2012.

GIOVANELLA, P. et al. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, n. February, p. 162–169, 2017.

GOCHENAUR, S. E. Distributionla patens of mesophilous and thermophilous microfungi in two bahamian soils. v. 57, n. 3, p. 155–164, 1975.

HAGA, A. et al. Pyridone alkaloids from a marine-derived fungus, stagonosporopsis cucurbitacearum, and their activities against azole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 750–754, 2013.

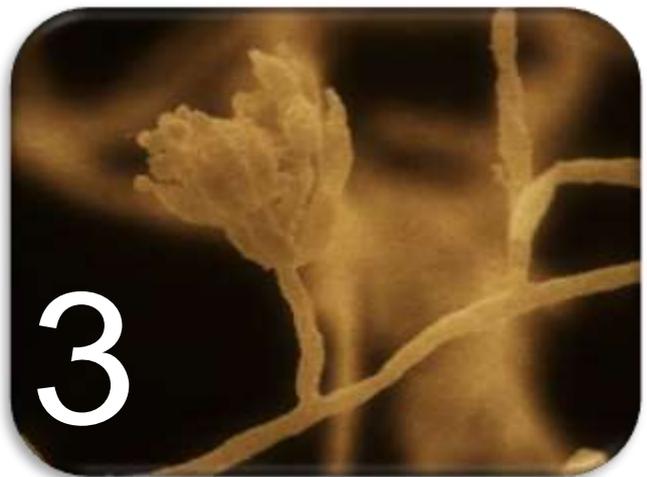
HIDALGO-RUIZ, J. L. et al. A rapid method for the determination of mycotoxins in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 288, n. November 2018, p. 22–28, 2019.

- IBRAHIM, S. R. M. et al. Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 786–790, 2018.
- IBRAHIM, S. R. M.; ASFOUR, H. Z. Bioactive  $\gamma$ -butyrolactones from endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Pharmacology**, v. 14, n. 3, p. 437–443, 2018.
- IÓCA, L. P. et al. A strategy for the rapid identification of fungal metabolites and the discovery of the antiviral activity of pyrenocine A and harzianopyridone. **Quimica Nova**, v. 39, n. 6, 2016.
- JONGH, W. A.; NIELSEN, J. Filamentous fungi as cell factories for metabolite production. In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. A. (Eds.). **Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food**. New York: CRC Press, 2007. p. 163–183.
- KAMAL, N. et al. Metabolomics-Guided Isolation of Anti-trypanosomal Metabolites from the Endophytic Fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Planta Medica**, v. 83, n. 6, p. 565–573, 2017.
- KANTARCIOGLU, A. S.; YUCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Phospholipase- and Protease-Aktivitat bei klinischen *Candida*-Isolaten mit Bezug zur Herkunft der Stamme. **Mycoses**, v. 45, n. 5–6, p. 160–165, 2002.
- KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169–188, 2004.
- LEE, S. et al. Anti-inflammatory phenolic metabolites from the edible fungus *Phellinus baumii* in I $\kappa$ B-stimulated RAW264.7 Cells. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1583–1593, 2017.
- LIU, B. et al. A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils \*. **Pedosphere**, v. 16, n. 2002, p. 18–24, 2006.
- MAGAN, N.; ALDRED, D. Why do fungi produce mycotoxins? In: DIJKSTERHUIS, J.; SAMSON, R. A. (Eds.). **Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food**. New York: CRC Press, 2007. p. 121–133.
- MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218–237, 2013.
- MARTIN, A. **Introduction to Soil Microbiology**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons Ltd, 1977.
- MONOD, M. et al. Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, n. 1, p. 39–46, 1993.
- NAYAK, B. K.; SIVAGAMI, D.; NANDA, A. Fungal Biodiversity Study of Varied Soil Samples Collected From Two College Campus of Puducherry City. v. 10, n. 5, p. 84–88, 2018.
- NISKANEN, T. et al. New discoveries: Species of fungi described in 2017. **Royal Botanic Gardens Kew**, p. 17–25, 2018.

- NOBLES, M. K. Identification of Cultures of Wood-Inhabiting Hymenomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 43, n. 9, p. 1097–1139, 1965.
- OLIVEIRA, A. C. D. et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, p. 822–831, 2012.
- OLIVEIRA, A. C. D. et al. Lipase production by endophytic yeast through factorial design. **Academia Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 16–21, 2013.
- PASSOS, E. C. et al. aureus e Escherichia coli em surto de toxinfecção alimentar ocorrido na região do Vale do Ribeira. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 713–717, 2012.
- PAUW, B. DE. Is there a need for new antifungal agents. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. SUPPL. 2, p. 23–28, 2000.
- PETERSEN, J. H. **The kingdom of fungi**. 1. ed. Oxford: Princeton University Press, 2013.
- PINHEIRO, E. A. A. et al. Chemical constituents and antimicrobial activity of soil fungus aspergillus sp. FRIZ12. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 5, p. 1438–1445, 2018.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, A. N. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase e activity in Candida albicans. n. April 1981, p. 7–14, 1982.
- QI, J. et al. Isocoumarin derivatives and benzofurans from a sponge-derived Penicillium sp. fungus. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 571–579, 2013.
- REIS, C. M. et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from Diaporthe schini. **Journal of Biotechnology**, v. 294, n. August 2018, p. 30–37, 2019.
- RIVERA-ORDUÑA, F. N. et al. Diversity of endophytic fungi of Taxus globosa (Mexican yew). **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 65–74, 2011.
- RODRIGUES, L. M. F. et al. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico Penicillium sp. isolado das folhas de Ricinus communis L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p. 129–145, 2015.
- SANTOS, T. C. DOS et al. Production, Optimisation and Partial Characterisation of Enzymes from Filamentous Fungi Using Dried Forage Cactus Pear as Substrate. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 4, p. 571–579, 2018.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 08, n. January, p. 1–23, 2017.
- SILVA, R. L. DE O. et al. Fungos endofíticos em Annona spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (Annona squamosa L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 649–655, 2006.
- SPERB, J. G. C. et al. Simultaneous production of biosurfactants and lipases from Aspergillus Niger and optimization by response surface methodology and desirability functions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 857–868, 2018.

- STAMFORD, N. P. et al. Microbiota dos solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). . **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 61–92.
- STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5–6, p. 347–355, 2003.
- TAKÓ, M. et al. Enhanced production of industrial enzymes in Mucoromycotina fungi during solid-state fermentation of agricultural wastes/by-products. **Acta Biologica Hungarica**, v. 66, n. 3, p. 348–360, 2015.
- TALARO, K.; CHESS, B. **Foundations in microbiology**. 10. ed. New York: Mc Graw Hill Education, 2018.
- TAWFIKE, A. F. et al. Metabolomic-Guided Isolation of Bioactive Natural Products from *Curvularia* sp, an Endophytic Fungus of *Terminalia laxiflora*. **Planta Medica**, v. 84, n. 3, p. 182–190, 2018.
- TAWFIKE, A. F. et al. Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1106–1107, p. 71–83, 2019.
- TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146–153, 2017.
- TOUATI, I. et al. Hyporientalin A, an anti-*Candida* peptaibol from a marine *Trichoderma orientale*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 1–12, 2018.
- TURNER, W. B. **Fungal Metabolites**. London: [s.n.].
- WANG, J.; LI, Y.; LU, F. Molecular cloning and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase family from *Aspergillus niger*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 32, p. 55–62, 2018.
- WANG, W. et al. Citrinin Monomer and Dimer Derivatives with Antibacterial and Cytotoxic Activities Isolated from the Deep Sea-Derived Fungus *Penicillium citrinum* NLG-S01-P1. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 46, 2019.
- WATKINSON, S. C.; BODDY, L.; MONEY, N. P. **The fungi**. 3. ed. London: Academic Press, 2016.
- WEBER, R. W. S.; PITT, D. Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. **Mycologist**, v. 14, n. 3, p. 118–120, 2000.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- WEIL, R. R.; BRADY, N. C. **The nature and properties of soils**. 15. ed. Harlow: Pearson, 2017.

# Capítulo 3



Resistência e potencial de bioabsorção e bioacumulação de cádmio apresentados por fungos filamentosos isolados do solo

### 3 RESISTÊNCIA E POTENCIAL DE BIOSSORÇÃO E BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO APRESENTADOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO

#### RESUMO

A crescente atividade industrial e a contínua utilização de metais tóxicos como cádmio e chumbo representam um grande problema ambiental com consequências danosas à saúde humana devido à capacidade acentuada de bioacumulação e biomagnificação desses metais, fazendo-se necessária a utilização de estratégias de remediação destes contaminantes de modo a diminuir seus efeitos tóxicos. Desta forma, ao longo dos anos, foram desenvolvidas estratégias que empregam princípios físico-químicos, mas essas estratégias têm mostrado ineficiência, notadamente no que diz respeito ao grande volume de recursos financeiros despendidos. Uma alternativa, que tem se mostrado muito eficiente, é o uso de biomassa em metodologias de detoxificação de metais, em especial cádmio e chumbo por apresentarem um alto grau de toxicidade. Esse contexto motivou inúmeros estudos com diversas matrizes biológicas como plantas e microrganismos, sendo a microrremediação, ou seja, o uso de fungos em processos de remediação destes metais, umas das áreas que têm ganhado grande destaque, sobretudo pelo alto potencial biotecnológico desses microrganismos. Portanto, o presente trabalho apresenta, de modo abrangente, um levantamento das técnicas empregadas na remediação de metais tóxicos e uma síntese de publicações com foco no emprego de fungos filamentosos para biorremediação de cádmio e chumbo. Além disso, buscou-se avaliar o potencial de fungos filamentosos isolados de solo não contaminado, para o possível emprego em métodos de remoção de cádmio de meios aquosos e sólidos. Foram identificados quatro fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* que mostrou grande capacidade de resistir à presença de cádmio no meio de cultivo. Os quatro fungos também foram submetidos a ensaios adsorptivos. O *Penicillium* M04 apresentou o maior potencial de bioacumulação de cádmio (*in vivo*). As biomassas dos quatro fungos apresentaram processos favoráveis para adsorção de cádmio melhor explicada pelo modelo de Langmuir.

Palavras chave: bioissorção; *Penicillium* sp.; cádmio;

### 3.1 INTRODUÇÃO

Alguns metais como o sódio e o cálcio produzem sais que, em proporções adequadas, não representam nenhum risco e são essenciais para o desenvolvimento de muitos organismos; por outro lado, o contato com concentrações pequenas dos elementos tais como chumbo, mercúrio e cádmio, ou de seus compostos, por vezes denominados de “metais pesados”, e aqui descritos como “elementos tóxicos”, pode ser extremamente danoso à saúde e à vida dos mais diversos sistemas biológicos, incluindo os humanos (DUFFUS, 2002).

Diante disso, a contaminação do solo, de águas superficiais e reservatórios subterrâneos por esses elementos tóxicos, decorrente principalmente do crescimento da atividade industrial, bem como a conseqüente urbanização e do uso indiscriminado de fertilizantes e pesticidas na agricultura, configuram-se como um dos principais problemas ambientais da atualidade (AKCIL et al., 2015; FAZLI et al., 2015; QURESHI et al., 2016; SYUKOR et al., 2016).

Apesar dos efeitos ainda não serem totalmente conhecidos, a esses elementos, tem sido atribuída a causa, em casos específicos, de doenças degenerativas dos sistemas gastrointestinal, cardiovascular e respiratório, do aumento da incidência de câncer, de casos de deficiência mental, desnutrição, baixo crescimento e da deficiência imunológica (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; KHAN et al., 2008; LAKHERWAL, 2014; TURKDOGAN et al., 2002).

Contudo, mesmo existindo parâmetros normativos para o tratamento de efluentes, bem como regulamentação quanto aos níveis desses elementos em produtos industrializados, a fiscalização deficitária continua contribuindo para que os resíduos sejam lançados nos compartimentos ambientais sem passar por qualquer tipo de processo de descontaminação. Por outro lado, as técnicas normalmente empregadas na remediação destes agentes tóxicos costumam ser altamente dispendiosas e/ou geram grande impacto ambiental.

De acordo com o levantamento realizado por Mulligan, Yong e Gibbs (2001), as técnicas mais utilizadas na remediação de solos e lençóis freáticos podem ser divididas nas categorias de *contenção*, tratamento *in situ* e tratamento *ex situ*. A contenção física é apontada como a técnica menos dispendiosa, mas com a desvantagem de não reduzir os níveis de contaminantes no local tratado.

Em alternativa, é crescente o número de estudos que visam resolver a questão econômica e a geração de resíduos dos métodos físico-químicos de remediação através do uso de biomassa ativa e inativa de plantas e de microrganismos (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; GIOVANELLA et al., 2017; HUANG et al., 2016; IRAM et al., 2015a), demonstrando a viabilidade de utilização de material biológico em processos de remediação de elementos tóxicos.

Neste contexto, os fungos, organismos muito conhecidos por sua vasta distribuição ambiental e por sua grande capacidade de adaptação e decomposição, se destacam em volume de estudos, bem como em resultados de alto poder de resistência e de acumulação desses metais.

Pelo exposto, justifica-se a importância da realização do presente levantamento, como ferramenta de apresentação do estado da arte das principais metodologias que estão sendo empregadas, visando conciliar o potencial biotecnológico de fungos às técnicas de remediação de cádmio e chumbo como contaminantes ambientais, bem como contribuir para o repertório de espécies fúngicas reconhecidas por seu potencial de acumulação e biorremediação de metal tóxico.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos filamentosos isolados do solo não contaminado próximo ao Instituto de Química para o possível emprego em métodos de remoção de cádmio de meios aquosos e sólidos. Adicionalmente, propõe-se revisar termos, conceitos e possíveis mecanismos envolvidos nos processos de biorremediação, utilizando fungos de amostras de solos contaminados por cádmio e chumbo, através da descrição dos principais conceitos relacionados aos métodos de remoção e detoxificação de cádmio e chumbo com ênfase no emprego de microrganismos, bem como, esquematizar o provável mecanismo celular no processo de biorremediação desses metais por organismos vivos ou inativos.

## 3.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.2.1 Cádmio e chumbo: propriedades, usos e impactos ambientais

#### 3.2.1.1 Cádmio

O cádmio é um metal macio de coloração branca prateada com estrutura cristalina hexagonal, de número atômico 48 e massa de 112,411 u (unidade de massa atômica), cujas propriedades o definem como um metal de transição (bloco d), localizando-o no grupo 12 da classificação periódica dos elementos. Tem uma abundância relativa muito baixa na crosta terrestre, podendo ser encontrado em algumas formas isotópicas estáveis, sendo os de massa atômica 112 (24.07%) e 114 (28.86%) as mais conhecidas. O metal pode apresentar os estados de oxidação +2 e +1, embora cádmio +2 seja a espécie mais comum de ocorrência natural e, praticamente, a única do elemento (BAES; MESMER, 1976; TRAINA, 1999). A descoberta do cádmio, em 1817, é creditada ao químico Friedrich Strohmeyer, que assim o denominou em virtude de tê-lo identificado como impureza da calamina ( $ZnCO_3$  carbonato de zinco).

Cádmio e zinco pertencem ao mesmo grupo na classificação periódica; portanto, como é de se esperar, algumas de suas aplicações, decorrem da aparência e de propriedades semelhantes às do zinco (NORDBERG; NORDBERG, 2002; THORNTON, 1986). Além disso, é muito comum a obtenção do cádmio como subproduto da extração do zinco e a separação é feita, principalmente, por processo de destilação. Porém, o metal pode ser encontrado também em outros minerais, como na esfarelita ( $ZnS$ ) em substituição ao zinco, na forma de sulfeto de cádmio ( $CdS$ ). (MATSUMOTO; FUWA, 1986).

O emprego do cádmio em ligas metálicas e como revestimento em processos de galvanização, em substituição ao níquel e ao zinco, bem como a produção de baterias recarregáveis de níquel/cádmio, compreendem as principais utilizações do metal. Contudo, é possível destacar seu papel na fabricação de equipamentos eletrônicos, de tintas e pigmentos e na proteção do termoplástico PVC (policloreto de vinila) como agente estabilizante (AYRES, 1992).

Apesar da sua importância econômica, o cádmio é um metal extremamente tóxico e o aumento contínuo em sua produção e conseqüente eliminação, tem significado um grande risco à Natureza, pois, aliado a isto, sua capacidade de

subsistência no solo e acumulação em culturas alimentícias tem amplificado seu potencial nocivo (MARET; MOULIS, 2013; PAGE; EL-AMAMY; CHANG, 1986). Por efeito, observa-se que as principais fontes de exposição e contaminação humana são o ar atmosférico, o consumo de água e de alimentos, principalmente mariscos, sementes e grãos como a soja, o arroz e o trigo. No entanto, o consumo de cigarro pode representar um considerável acréscimo aos riscos de exposição ao cádmio, pois, estima-se que cerca de 10% do CdO (óxido de cádmio) produzido na queima do tabaco sejam inalados, fazendo com que indivíduos fumantes possuam concentração de Cd até cinco vezes maior no sangue e até três vezes maior nos rins, comparados aos não fumantes (JÄRUP et al., 2001; MARET; MOULIS, 2013; THÉVENOD; LEE, 2013).

A toxicidade do cádmio é preocupante em virtude do fato de que o organismo humano não desenvolveu mecanismos para metabolizar e eliminar o metal. Além disso, por apresentar meia-vida muito longa, de até 30 anos, se acumula, sobretudo nos rins, interferindo intensamente nos sistemas biológicos (BERNARD; LAUWERYS, 1986). A exposição acidental ao metal em altas concentrações leva a complicações como náuseas, vômitos, dor de cabeça e irritação pulmonar (MARET; MOULIS, 2013). Ademais, o acúmulo de cádmio já se encontra associado, em casos específicos, à ocorrência de diversos tipos de câncer, onde se incluem o câncer de pulmão, de próstata e pâncreas (NAWROT et al., 2010).

Como já exposto, as semelhanças de propriedades químicas entre o zinco e o cádmio favorece a ação deste último nos meios biológicos. Assim, mesmo não sendo possível precisar todos os mecanismos e modo real de ação do cádmio nos organismos vivos, uma vez que sua toxicidade é relativa à uma série de parâmetros que ainda inspiram maiores e aprofundados estudos, acredita-se que a forma catiônica possua uma grande afinidade por metaloproteínas e diversas espécies nucleofílicas. Um exemplo da sua ação é a inibição do equilíbrio redox (óxido-redução) no processo de crescimento e atividade celular. A espécie  $Cd^{2+}$  tem a capacidade de se ligar a resíduos de cisteína formando complexos com proteínas como as tioredoxinas e as peroxiredoxinas, cujas funções é atuar contra o estresse oxidativo das células. Outras ações tóxicas do cádmio têm relação com a interferência na homeostase de cátions essenciais como o  $Ca^{2+}$  (cálcio) e  $Mg^{2+}$  (magnésio), bem como no equilíbrio de ferro, zinco e manganês (MARET; MOULIS, 2013).

Os efeitos tóxicos apresentados pelo cádmio sugerem um grande cuidado quanto ao seu processamento, utilização e, sobretudo, o seu descarte. Na atmosfera, a poluição por Cd é causada por fatores antropogênicos e naturais, cujos impactos são controlados pela especiação química e a distribuição do tamanho da partícula (CREA et al., 2013). Em pesquisa realizada na cidade de Sevilha, na Espanha, constatou-se que a maior parte do cádmio disperso na atmosfera (29,7%) foi referente às partículas finas de 0,6 a 1,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, faixa em que também se encontram os maiores níveis de emissão do metal. Estima-se que as concentrações máximas de cádmio no ar possam variar por diversos tipos de fatores, passando de 5  $\text{ng m}^{-3}$ , em áreas rurais, até 150  $\text{ng m}^{-3}$  em áreas urbanas industrializadas (ÁLVAREZ et al., 2004; HLAVAY et al., 2001).

A concentração natural de cádmio em ambientes aquáticos varia de 0,01 a 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ . Contudo, a espécie  $\text{Cd}^{2+}$  chega a níveis insignificantes, pois apresenta grande habilidade de interação com as principais espécies inorgânicas como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{F}^-$ , apresentando-se, em águas salgadas, sobretudo como sais de cloreto ( $\text{CdCl}$  e  $\text{CdCl}_2$ ). Ainda, o cádmio pode, também, formar uma mistura de complexos com a matéria orgânica dissolvida (aminoácidos, ácidos carboxílicos, carboidratos e hidrocarbonetos). Nos solos e sedimentos, no entanto, a especiação por métodos diretos é pouco confiável, sendo mais adequada a especiação por métodos de extração, o que compreende uma estratégia de extrema importância para avaliar a biodisponibilidade desse metal, que, por sua vez, influencia o desenvolvimento de plantas e a contaminação dos humanos (CREA et al., 2013).

### 3.2.1.2 Chumbo

O chumbo (Pb) apresenta massa atômica de 207,2 u e número atômico 82, o qual se localiza no grupo 14 da tabela periódica. Esse metal detém um importante papel histórico na prática da metalurgia, visto que foi um dos primeiros a serem manipulados há cerca de sete milênios (CASAS; SORDO, 2006; NRIAGU, 1998). Contudo, ainda na atualidade, o chumbo e seus derivados são muito utilizados e apresentam um alto valor agregado. Evidências desta crescente utilização do metal foram apresentadas pelo “*ILZSG - International Lead and Zinc Study Group*” (2017), indicando que a produção e utilização mundial de chumbo atingiram, em 2016, um

total de 11 milhões de toneladas, o que representa um acréscimo de mais de 100% em quatro décadas.

O metal puro é encontrado em pequenas quantidades, apresentando-se mais comumente na forma  $Pb^{2+}$  como em diversos minerais, sobretudo na galena ( $PbS$ ), bem como em outros compostos em que adquire o estado de oxidação +4; assim, esses minérios são geralmente utilizados para obtenção de chumbo metálico. Seus isótopos,  $^{204}Pb$ ,  $^{206}Pb$ ,  $^{207}Pb$ ,  $^{208}Pb$ , com abundâncias relativas de 1,4%, 24,1%, 22,1% e 52,4%, respectivamente, são estáveis e de ocorrência natural (CASAS; SORDO, 2006; GREENWOOD; EARNSHAW, 1997).

A concentração do chumbo no ar atmosférico sofre muita variação e está ligada ao nível de atividade com o metal, derivados e seus rejeitos, em cada região. Na crosta terrestre, estima-se que a concentração média seja próxima de  $15 \mu g g^{-1}$ , em diferentes proporções nas variadas formações rochosas e no sedimento marinho. Os ambientes aquáticos também apresentam valores de concentração variados, sendo nos rios, onde são encontrados os maiores níveis (até  $100 \mu g L^{-1}$ ), seguido dos lagos (até  $50 \mu g L^{-1}$ ) e as águas do mar com os menores níveis (até  $10 \mu g L^{-1}$ ). A concentração de chumbo na água também depende da variação do pH, uma vez que a formação de compostos insolúveis com os ânions sulfato, carbonato e hidróxido, em pH mais elevado, diminuem a concentração do metal, sendo, normalmente inferiores a  $10 \mu g L^{-1}$  (BERMEJO, 1982 apud (BERMEJO; JUAN, 2006).

Características como o baixo ponto de fusão, maleabilidade e resistência à corrosão tornam o chumbo um dos metais mais utilizados, tendo, na produção de baterias automotivas de chumbo-ácido, sua principal aplicação (cerca de 80%), as quais podem ser usadas também como fonte de energia de emergência em edifícios, rede de telefonia móvel e hospitais. Além disso, o chumbo também é utilizado como aditivo em fertilizantes, em proteção contra radiação, em compostos nas indústrias de vidro, cristais e plástico e como componente na fabricação de tubos, tintas e brinquedos (DAVIDSON; BINKS; GEDIGA, 2016; ROY et al., 2014).

Em contrapartida à sua ampla aplicação, encontra-se seu alto efeito nocivo à sistemas biológicos. A adição de compostos de chumbo tetraalquílicos como o tetraetilchumbo ( $Pb(C_2H_5)_4$ ) na gasolina foi, até o final do século XX, uma das principais formas de contaminação ambiental, pois, sua combustão libera compostos de chumbo menos voláteis e mais solúveis em água, tornando-se, portanto, uma

grande ameaça, visto que o envenenamento por chumbo, conhecido como plumbismo ou saturnismo já relatado desde a antiguidade, representa sério risco à saúde humana, sobretudo para crianças, nas quais afeta o desenvolvimento físico e cognitivo, prejudicando o funcionamento de diferentes órgãos e tecidos (FLORA; FLORA; SAXENA, 2006).

As fontes naturais de chumbo representam um menor risco à contaminação ambiental em comparação às causadas pela ação humana na manufatura do metal, como no caso da adição em combustíveis. Assim, são diversas as fontes, sendo as principais o consumo de alimentos e água, agravado em populações próximas aos locais contendo resíduos do metal, onde a contaminação é permanente também pelo ar. Outra forma de intoxicação ocasional é a exposição e permanência periódica em locais que contenham objetos em que foram utilizados solda de chumbo e peças de vidro contendo compostos do metal, ambientes com pinturas desgastadas à base de chumbo, entre outros (ABADIN; LLADOS, 1999).

Além disso, apesar da baixa intensidade, é relevante a contaminação do chumbo em produtos de beleza. Soares (2012) relata a detecção de chumbo em amostras de batons, sombras e tinturas capilares devido à utilização de pigmentos contendo compostos do metal e relaciona a concentração com a intensidade da coloração dos produtos. Neste sentido, produtos de tonalidades mais escuras apresentaram maiores níveis do metal.

O chumbo apresenta grande habilidade de interação com grupos amidas e sulfidrilas presentes nas enzimas, daí sua capacidade de distribuição em todas as células humanas e a interferência nos processos bioquímicos, provocando significativa diminuição da rota metabólica normal. Um exemplo disso, está ligado à formação de células sanguíneas, a qual é afetada pelo chumbo através da inibição da síntese da hemoglobina e da diminuição da vida útil de eritrócitos levando ao quadro de anemia. Além disso, a intoxicação por chumbo pode ocasionar os seguintes distúrbios aos seres humanos: gota, resultante da insuficiência renal crônica, lesões irreversíveis ao Sistema Nervoso Central em crianças, prejuízos à resposta imune por danos aos linfócitos e citocinas, agravos fisiológicos ao sistema reprodutivo e interferência no desenvolvimento do feto, já no início da gestação, falhas no metabolismo ósseo e o aumento da incidência de adenocarcinoma renal e doenças

cardiorrespiratórias (DYATLOV; LAWRENCE, 2002; FLORA; FLORA; SAXENA, 2006; GOYER, 1993; KOSNETT et al., 1994; RONIS et al., 1998).

Em termos bioquímicos, a toxicidade do chumbo envolve os mecanismos de estresse oxidativo, de troca iônica e de apoptose celular. O chumbo induz a geração de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o ânion hidroxílico ( $HO^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), levando ao estresse oxidativo quando essas espécies alcançam concentrações superiores às suportadas pelo sistema de defesa antioxidante (HALLIWELL; CROSS, 1994; LOPES et al., 2015). Em reações como as de transporte iônico e regulação enzimática dependentes de  $Na^+$  e de cátions bivalentes como  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , o chumbo apresenta grande habilidade de substituí-los, sobretudo o  $Ca^{2+}$ , levando, por exemplo às deficiências neurológicas (GARZA; VEGA; SOTO, 2006; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003). Por fim, a toxicidade do chumbo apresenta-se, também, pelo mecanismo de apoptose celular, a morte celular programada, que é a autodestruição da célula em resposta a perturbações internas ou do meio. A presença do chumbo provoca a disfunção mitocondrial através do bloqueio da homeostase do  $Ca^{2+}$ , aumentando o acúmulo deste cátion na célula, levando-a à morte (FLORA; FLORA; SAXENA, 2006).

### 3.2.1.3 Regulamentação ambiental para cádmio e chumbo

No Brasil, o colegiado responsável pela implementação de políticas para o meio ambiente, o Conama (Conselho Nacional do Meio Ambiente), fixou diretrizes e estabeleceu parâmetros de controle de qualidade, para diversos fins, quanto à presença de cádmio e chumbo. Uma síntese da legislação em vigor atualmente é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 - Classificação e diretrizes para águas superficiais e subterrâneas, lançamento de efluentes, qualidade do solo e fabricação de pilhas e baterias quanto à presença de cádmio e chumbo.

FINALIDADE/CLASSIFICAÇÃO		CÁDMIO	CHUMBO	LEGISLAÇÃO
<b>Baterias e pilhas</b>	Pilhas e baterias portáteis	0,002% em massa	0,1% em massa	Resolução 401 (2008a) e alterações da Resolução 424 (2010)
	Baterias de chumbo-ácido	0,010% em massa		
<b>Águas superficiais</b>	Água doce – classe 1 e 2 e atividade de pesca	0,001 mg L <sup>-1</sup>	0,01 mg L <sup>-1</sup>	Resolução 357 (2005) alterada pela Resolução 410 (2009a) e complementada pela Resolução 430 (2011)
	Água doce – classe 3	0,01 mg L <sup>-1</sup>	0,033 mg L <sup>-1</sup>	
	Água salobra – classe 1 e atividade de pesca	0,005 mg L <sup>-1</sup>	0,01 mg L <sup>-1</sup>	
	Água salobra – classe 2	0,04 mg L <sup>-1</sup>	0,21 mg L <sup>-1</sup>	
	Água salgada – classe 1 e atividade de pesca	0,005 mg L <sup>-1</sup>	0,01 mg L <sup>-1</sup>	
	Água salgada – classe 2	0,04 mg L <sup>-1</sup>	0,21 mg L <sup>-1</sup>	
	Efluentes	0,2 mg L <sup>-1</sup>	0,5 mg L <sup>-1</sup>	
<b>Solo (massa seca)</b>	Agrícola	3 mg kg <sup>-1</sup>	180 mg kg <sup>-1</sup>	Resolução 420 (2009b) e alterações dadas pela Resolução 460 (2013)
	Residencial	8 mg kg <sup>-1</sup>	300 mg kg <sup>-1</sup>	
	Industrial	20 mg kg <sup>-1</sup>	900 mg kg <sup>-1</sup>	
<b>Ar</b>	Emissão de poluente atmosférico	0,28 mg m <sup>-3</sup>	0,28 mg m <sup>-3</sup>	Resolução 316 (2002) e alterações dadas pela Resolução 386 (2006)
<b>Águas subterrâneas</b>	Consumo Humano	5 µg L <sup>-1</sup>	10 µg L <sup>-1</sup>	Resolução 396 (2008b) Resolução 420 (2009b)
	Dessedentação animal	50 µg L <sup>-1</sup>	100 µg L <sup>-1</sup>	
	Irrigação	10 µg L <sup>-1</sup>	5.000 µg L <sup>-1</sup>	
	Recreação	5 µg L <sup>-1</sup>	50 µg L <sup>-1</sup>	

Fonte: Resoluções CONAMA. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/>. Acesso em 05 dez 2020.

Considerando os valores expostos, fica evidente a relação entre o efeito tóxico do cádmio e do chumbo para humanos e demais sistemas biológicos, e os limites toleráveis pelo meio ambiente. Os parâmetros apresentados pelo Conama, estabelecendo os percentuais em pilhas e baterias (BRASIL, 2008a), a classificação de águas subterrâneas e corpos de água e lançamento de efluentes (BRASIL, 2005, 2008b, 2011), a fixação de valores indicadores da qualidade do solo (BRASIL, 2009b)

e procedimentos e limites de emissão destes poluentes na atmosfera (BRASIL, 2002), acentuam o potencial nocivo desses metais e destacam a necessidade de estudos e desenvolvimento de tecnologias capazes de promover a remoção desses agentes tóxicos, sobretudo do solo e de sistemas aquáticos.

### **3.2.2 Modalidades de remediação de metais tóxicos em água e no solo**

Algumas comodidades geradas pela industrialização infelizmente não são os únicos efeitos do processo de modernização dos meios de produção. Na verdade, o crescimento da atividade industrial gerou sérios riscos à saúde humana ocasionados pelo lançamento de contaminantes orgânicos e inorgânicos nos diferentes ecossistemas. Os dejetos inorgânicos, onde se incluem metais, a exemplo de cádmio e chumbo, não são degradáveis e se acumulam no meio ambiente e contaminam a população pela cadeia alimentar, além de afetar milhares de pessoas no mundo inteiro, através do consumo de água e a inalação de altos níveis de gases tóxicos todos os dias (GLIMUN, 2009 Apud. (KUPPUSAMY et al., 2016); (HANSDA; KUMAR; ANSHUMALI, 2016).

O estudo e emprego de procedimentos, que objetivem minimizar os danos desses poluentes no meio ambiente, torna-se cada vez mais crucial. Atualmente, existe uma variedade de modalidades de remediação disponíveis e, portanto, é imprescindível ter o conhecimento sobretudo dos riscos do contaminante, considerar o local a ser remediado, como solo, águas residuais e outros ambientes aquáticos, bem como as vantagens e desvantagens de cada modalidade, para fazer a escolha da mais adequada. Neste levantamento serão destacadas aquelas empregadas para remediação de água e solo contaminados por metais tóxicos.

As modalidades classificadas como de remediação, observadas suas características e finalidades, podem ser categorizadas em modalidades de remoção, quando são empregados a fim de remover os contaminantes do ambiente; modalidade de tratamento, quando se pretende alterar os danos e transformar os contaminantes em espécies químicas menos prejudiciais e modalidade de contenção, a qual, objetiva-se a isolar os contaminantes em determinado local, de modo a evitar seu contato com o meio ambiente e, conseqüentemente, com os seres humanos (KUPPUSAMY et al., 2016).

Estas modalidades de remediação, por sua vez, podem ser classificadas em bióticas e abióticas, de acordo com a natureza do agente responsável pela transformação ou contensão do contaminante. As modalidades abióticas compreendem processos físicos e químicos, que são essencialmente utilizados para diminuição da mobilidade do metal. As modalidades bióticas ou biorremediação ocorrem pelo emprego de biomassa para a transformação ou remoção de contaminantes. Ambos os métodos podem ser aplicados em tratamentos “*in situ*”, no local da contaminação, ou “*ex situ*”, em local à parte ou através de alterações na área a ser recuperada (HANSDA; KUMAR; ANSHUMALI, 2016).

### 3.2.2.1 Remediação Abiótica

As modalidades, em que se empregam processos químicos e físicos para o tratamento de contaminações por metais tóxicos, podem ser designadas como um conjunto de remediação abiótica. Para o tratamento de solos contaminados, por exemplo, os processos físicos compreendem as técnicas de substituição do solo e a dessorção térmica, e os processos químicos mais comuns são a lixiviação química, a fixação química, o tratamento eletrocínético e a vitrificação (SIDHU, 2016; YAO et al., 2012).

Na remediação por processos físicos, a substituição do solo contaminado, de modo parcial, por solo limpo, destina-se à diluição e diminuição dos efeitos do contaminante. No uso da técnica de dessorção térmica o metal é volatilizado através do aquecimento do solo contaminado por meio de radiação infravermelha, micro-ondas e vapor na faixa de temperatura de 90 a 560 °C (LI; ZHANG; LI, 2010; SIDHU, 2016).

Entre os processos químicos empregados na remediação de metais tóxicos, a lixiviação química caracteriza-se pela lavagem do solo com água e reagentes, seguida do tratamento da fase líquida com agentes quelantes e surfactantes para recuperação do metal (TAMPOURIS; PAPASSIOPI; PASPALIARIS, 2001). A fixação química consiste na adição de reagentes como óxidos metálicos ou argila e biomateriais, formando espécies insolúveis para diminuição da toxicidade e dificultar a mobilidade do metal (YAO et al., 2012; ZHOU; HAO; XUE, 2004). Na modalidade, que emprega a vitrificação, é possível utilizar combustíveis fósseis ou forno de arco elétrico, plasma e micro-ondas no tratamento “*ex situ*”, ou eletrodos diretamente no solo no tratamento

“in situ”, os quais fornecem temperaturas que vão de 1400 a 2000 °C, promovendo a obtenção do metal na forma de rocha vítrea, diminuindo sua mobilidade (YAO et al., 2012). No tratamento eletrocinético, as partículas ou íons metálicos são mobilizados por eletromigração, fluxo eletro-osmótico ou eletroforese, em face da aplicação de uma corrente direta ou de potencial entre eletrodos pelo solo, favorecendo o isolamento dessas espécies (ACAR; ALSHAWABKEH, 1993; GUARACHO, 2005).

Yao e colaboradores (2012) realizaram um levantamento a respeito dessas tecnologias empregadas na remediação de solos contaminados por metais tóxicos e assinalaram suas principais vantagens e desvantagens. Para efeito comparativo, esses dados foram sintetizados na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2 - Vantagens e desvantagens das modalidades abióticas de remediação de metais tóxicos do solo.

<b>Técnica</b>	<b>Descrição</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Substituição do solo	Substituição parcial do solo contaminando por solo limpo	Isolamento e diminuição do efeito contaminante	Envolve grande volume de trabalho, custo elevado, aplicável apenas em pequenas áreas
Dessorção térmica	Volatilização do metal por micro-ondas, infravermelho e vapor (90 a 560 °C)	Simple aplicação e possibilidade de reutilização do solo	Uso de dispositivos com custo elevado, demanda muito tempo
Lixiviação química	Lavagem do solo com água e reagentes, agentes quelantes e surfactantes	Alta eficiência	Reagentes de custo elevado e baixa biodegradabilidade
Fixação química	Adição de reagentes ou materiais baixando a mobilidade do metal	Possível remediar áreas com baixa concentração de contaminantes	Alteração na estrutura do solo e efeitos sobre a microbiota
Vitrificação	Exposição do solo à altas temperaturas (1400 a 2000 °C) para obtenção de rochas vítreas	Alta eficiência	Aplicação limitada; Custos elevados
Tratamento eletrocinético	Adição de potencial, direto ou por eletrodos para isolamento de partículas e íons metálicos	Baixo custo, fácil aplicação, preservação do ecossistema natural	Baixa eficiência

Fonte: Yao e colaboradores (2012)

Para a remediação de metais tóxicos em águas residuais e corpos d'água, por modalidades abióticas, estão disponíveis uma série de estratégias, dentre as quais é

possível destacar a adsorção, a coagulação/floculação, a osmose reversa, a oxidação/redução, a precipitação química, o tratamento eletroquímico e a troca iônica.

A adsorção pode ser entendida como um fenômeno superficial no qual um sólido, usado como adsorvente, é empregado para a retenção superficial de substâncias – adsorbatos – em solução por interações físico-químicas. De acordo com Crini (CRINI, 2005), a adsorção já é considerada muito eficiente e econômica para uso na remediação de metais tóxicos. A coagulação e a floculação ocorrem mediante ajuste de pH e adição de um agente coagulante para desestabilização de partículas em suspensão e a posterior floculação resulta na sedimentação de tais colóides.

A osmose reversa é um processo dependente da aplicação de uma pressão que seja superior à pressão osmótica da solução, fazendo com que o solvente (neste caso a água) flua do meio hipertônico (mais concentrado) para o meio hipotônico (mais diluído), sendo assim, o inverso de um processo normal de osmose. As membranas de osmose reversa possuem capacidade de reter os metais em sua totalidade (BAKER, 2012). A oxidação e a redução química são utilizadas para conversão dos metais tóxicos em espécies menos danosas por imobilização ou diminuição da sua reatividade e/ou mobilidade. Nestes processos, são necessários o emprego de reagentes químicos tais como o permanganato de potássio e o peróxido de hidrogênio como agentes oxidantes e dióxido de enxofre e sulfato ferroso como agentes redutores (PEDROSO, 2003).

A precipitação química apresenta-se como a estratégia química mais utilizada na remoção de metais tóxicos de ambientes aquáticos. Normalmente, os hidróxidos de metais tóxicos são insolúveis, assim, a utilização de reagentes como os hidróxidos de sódio, cálcio e potássio, aliado ao controle do pH, promovem a remoção do metal por separação do precipitado através de uma filtração. O tratamento eletroquímico é baseado no princípio das células de eletrólise, pelas quais se faz passar uma corrente elétrica entre o ânodo e o cátodo. Este processo eletroquímico promove a adsorção e precipitação dos metais tóxicos (KONGSRICHAROERN; POLPRASERT, 1996). A troca iônica consiste no emprego de resinas, que capturam os íons em solução, as quais necessitam ser tratadas periodicamente, devido à saturação, e podem ser reutilizadas (ADERHOLD; WILLIAMS; EDYVEAN, 1996).

A Tabela 3.3 apresenta um resumo das principais modalidades abióticas empregadas na remediação de ambientes aquáticos contaminados por metais tóxicos,

demonstrando as vantagens e desvantagens de cada uma, em uma adaptação dos dados sobre o assunto levantados por O'Connell e colaboradores (2008) e por Hansda, Kumar e Anshumali (2016).

Tabela 3. 3 - Vantagens e desvantagens no uso de modalidades abióticas de remediação de metais tóxicos de ambientes aquáticos.

<b>Técnica</b>	<b>Descrição</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Adsorção	Interações físico-químicas de um adsorvato na superfície de um adsorvente	Técnica adequada para a maioria dos metais, apresentando alta eficiência (99%)	O desempenho depende do adsorvente e a impossibilidade de regeneração elevam seus custos
Coagulação/floculação	Desestabilização de partículas pelo ajuste de pH e adição de um agente coagulante para sedimentação de coloides	Boa lavagem Desidratação	O controle do pH e o grande consumo de reagentes químicos elevam muito os custos do processo. Além disso, só pode ser aplicada em concentrações que variam entre 100 e 1000 mg L <sup>-1</sup> do metal
Osiose reversa	Aplicação de pressão superior à pressão osmótica de uma solução, fazendo o solvente fluir para o meio mais hipotônico	Recuperação do metal puro	A demanda por elevadas pressões e a utilização de material na escala de membrana elevam muito o custo do processo
Oxidação ou redução química	Utilização de agentes redutores e/ou oxidantes para mobilizar/detoxificar os metais	Mineralização	Reagentes químicos necessários não aplicáveis a todos metais/ sensível ao clima
Precipitação química/filtração	Utilização de reagentes químicos, normalmente hidróxidos alcalinos para precipitação dos hidróxidos dos metais sob controle do pH	Simple, econômico e adequado para vários metais	É aplicável apenas à altas concentrações de metal. A grande produção de sedimentos gera problemas de disposição dos resíduos.
Tratamento eletroquímico	Semelhante ao princípio das células de reações eletroquímicas contendo o ânodo e o cátodo e a aplicação de energia elétrica de uma fonte externa	Possibilidade de obtenção de metais puros sem demandar reagentes químicos	Aplicável apenas em concentrações altas do metal e com custo muito elevado
Troca iônica	Emprego de resinas para captura de íons em solução	Eficiência na recuperação do metal puro e alta regeneração de materiais sem produção de resíduos	Ineficaz na recuperação de íons metálicos. A dependência do ajuste do pH; necessidade de pré-tratamento e o uso de resinas elevam os custos do tratamento

Fonte: O'Connell e colaboradores (2008) e por Hansda, Kumar e Anshumali (2016).

Pelo exposto, fica claro que as modalidades abióticas de remediação de metais tóxicos do solo e de ambientes aquáticos, em sua maioria, mostram-se desvantajosas, sobretudo por serem financeiramente dispendiosas e por apresentarem uma série de problemas, tais como: elevado consumo de energia, recuperação/tratamento incompleto dos metais, possibilidade de geração de mais resíduos com demanda por armazenamento ou ainda outros tratamentos (SEKHAR et al., 2003; WANG; CHEN, 2009)

### 3.2.2.2 Remediação Biótica

Nas últimas décadas, houve um significativo crescimento de estudos e aplicações de agentes biológicos, a exemplo de plantas (LIANG et al., 2016; SILVA et al., 2017; WANG et al., 2017), algas (AMMARI et al., 2016; YE et al., 2015a; ZERAATKAR et al., 2016), bactérias (ALENCAR; NAVONI; AMARAL, 2017; GIOVANELLA et al., 2017; LI et al., 2017b; YI et al., 2017), e fungos (BISHNOI; GARIMA, 2005; GOLA et al., 2016a; IRAM et al., 2015b; LEITÃO, 2009; MOHAMMADIAN et al., 2017; SIOKWU; ANYANWU, 2012), como promotores da remoção de metais tóxicos de ecossistemas terrestres e aquáticos, uma vez que tal método tem se mostrado como uma alternativa operacional fácil e economicamente viável frente às estratégias tradicionais de remediação.

Alguns autores (BOOPATHY, 2000; WU et al., 2014) tendem a designar biorremediação como a remoção de poluentes ambientais pelo emprego de microrganismos, principalmente fungos e bactérias, excluindo do conceito aqueles processos em que são utilizadas outras formas de vida. No entanto, em uma definição mais ampla e que nos parece, semanticamente, mais apropriada, entende-se que o termo abrange um conjunto de tecnologias complexas, através das quais, agentes biológicos como animais, plantas, fungos, bactérias e outros organismos, de modo natural, adaptados ou modificados, têm suas capacidades bioquímicas direcionadas para remoção ou transformação/atenuação de poluentes do meio ambiente (SHINDE et al., 2016; WILD; VARFOLOMEYEV; SCOZZAFAVA, 1997).

De modo análogo às estratégias abióticas de remediação, a biorremediação integra técnicas diversificadas que podem ser empregadas de acordo com as propriedades ambientais e os tipos de contaminantes; contudo, sua grande vantagem

pode ser evidenciada, de modo geral, através do seu baixo custo financeiro e por se caracterizar como uma solução ecológica e socialmente aceitável (VOLESKY, 2001).

Apesar da vasta possibilidade do emprego de agentes biológicos em processos de remediação de metais e outros poluentes, é incontestável que as plantas e os microrganismos são mais amplamente estudados e aplicados. Desta forma, é normal em trabalhos científicos, para efeito de categorização, o uso do termo “fitorremediação” para designar os processos em que plantas são empregadas, ainda que, em muitos casos, esteja envolvendo também sua microbiota associada, e o termo “biorremediação” para aqueles processos em que estão envolvidos apenas os microrganismos. Neste sentido, faz-se necessário um detalhamento destas que são as principais vertentes da remediação biótica.

#### 3.2.2.2.1 Uso de plantas - Fitorremediação

Fitorremediação é um termo utilizado para designar processos de remediação de poluentes, orgânicos ou inorgânicos, do ambiente através do emprego de plantas (CUNNINGHAM; BERTI, 1993). As plantas podem apresentar formas variadas para remoção de poluentes, contudo, especificamente para os metais, Tangahu e seus colaboradores (TANGAHU et al., 2011) assinalam que os principais mecanismos de remoção e detoxificação são a fitoextração, a fitoestabilização, rizofiltração e a fitovolatilização.

A fitoextração é um processo em que as raízes da planta absorvem os contaminantes do substrato e realizam sua translocação para as partes aéreas que, posteriormente, são colhidas e queimadas com a possibilidade de reciclagem do metal (TANGAHU et al., 2011). O estudo realizado por Vashegyi e colaboradores (VASHEGYI et al., 2005) mostrou a capacidade de plantas do gênero *Salix* em acumular metais como cádmio, zinco e cromo, no qual, as espécie *Salix alba* (salgueiro-branco) e *Salix viminalis*, demonstraram, respectivamente, a maior capacidade de absorção de zinco pelas raízes e de translocação de zinco para as folhas.

Algumas espécies de planta apresentam capacidade de impedir a migração de íons metálicos no ambiente, utilizando o mecanismo da fitoestabilização, através da absorção e acumulação destes íons em seus tecidos, bem como pelas adsorções ou a precipitação em suas raízes (TANGAHU et al., 2011). O uso de *Festuca arundinacea*

mostrou-se viável no emprego das técnicas de fitoestabilização para remediação de solo contaminado por Zn e Pb (RIZZI et al., 2004).

Outras espécies têm a capacidade de adsorver, absorver ou precipitar os contaminantes metálicos, quase que exclusivamente em suas raízes sem realizar sua translocação; esse é um mecanismo denominado de rizofiltração e é observado principalmente para o chumbo, que, possivelmente, acumula-se nas raízes por encontrar barreiras fisiológicas (DUSHENKOV et al., 1995; KUMAR; SMITA; CUMBAL FLORES, 2013; TANGAHU et al., 2011). A *Brassica napus*, uma das espécies que compõem o óleo da canola, foi apontada como hiperacumuladora de chumbo, que, na presença do agente quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), teve seu potencial adsorptivo aumentado em experimento realizado “*in situ*” (ZAIER et al., 2010).

A fitovolatilização é o mecanismo em que as plantas, no processo de crescimento, realizam a absorção do contaminante juntamente com a água, seguida da liberação desse contaminante para atmosfera em uma forma modificada e em baixas concentrações, através da folhagem pela evapotranspiração. Essas plantas podem ser usadas, também, para remoção de poluentes do ar. Os elementos mais comuns a sofrerem esse processo são o mercúrio e o selênio (KUMAR; SMITA; CUMBAL FLORES, 2013; TANGAHU et al., 2011). As espécies *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Brassica oleracea* (brócolis), *Festuca arudinacae* (festuca-alta), *Medicago sativa* (alfafa) e *Astragalus bisulcatus* (ervilhaca de leite), foram estudadas e observou-se que *Astragalus bisulcatus* apresentou a maior absorção nos tecidos e a mais alta taxa de volatilização de selênio (DUCKART; WALDRON; DONNER, 1992).

#### 3.2.2.2.2 Uso de microrganismos - Biorremediação

Ao menos dois fatores positivos podem ser apontados para justificar o uso de estratégias que empregam microrganismos na remediação de metais e outros contaminantes ambientais em contraposição aos processos físico-químicos tradicionais, a saber: o seu baixo custo e o fato de ser ambientalmente aceitável devido à sua mínima perturbação aos sítios tratados (KARPOUZAS; SINGH, 2010; MIYASAKA; ASAMI; WATANABE, 2006). Neste contexto, as principais estratégias utilizadas são a bioestimulação e a bioaugmentação que se baseiam, respectivamente, na otimização do metabolismo da microbiota local; e na inoculação de microrganismos com conhecido potencial para realizar biorremediação (KARPOUZAS; SINGH, 2010).

No entanto, o uso de estratégias de biorremediação intrínseca, compostagem e a lavagem de sedimentos em reatores também se mostram como opções viáveis na remediação de metais (RAMASAMY; KAMALUDEEN; BANU, 2007).

A bioestimulação aproveita a capacidade que microrganismos autóctones<sup>2</sup> apresentam de se desenvolverem em ambientes contaminados, desde que sejam oferecidas condições adequadas de disponibilidade de nutrientes (carbono, fósforo, nitrogênio entre outros), além de temperatura e pH (CARLOS et al., 2016). Estas condições são necessárias para estimular a biotransformação dos poluentes por meio da proliferação e o aumento da atividade destes microrganismos. De acordo com Carlos e colaboradores (2016), o uso da estratégia de bioestimulação para o tratamento de efluente contaminado por Cr (VI) mostrou-se muito eficaz, uma vez que duas espécies de bactérias Gram-negativas isoladas deste efluente, *Alcaligenes faecalis* e *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, quando expostas à solução de Cr (VI) na concentração de 10 mg L<sup>-1</sup>, reduziram 100% da espécie a Cr(III) no intervalo de 48 horas.

A bioaugmentação é uma técnica caracterizada pela utilização de microrganismos, com ou sem modificação genética, que demonstraram alto potencial de resistência e capacidade de biotransformação de contaminante em estudos científicos, portanto, nesta técnica, a área a ser tratada é inoculada com microrganismos não indígenas. Geralmente, a bioaugmentação é indicada em detrimento da bioestimulação nos casos em que microrganismos autóctones não apresentem células suficientes ou não possuem o metabolismo especializado para biotransformação do poluente (MIYASAKA; ASAMI; WATANABE, 2006; RAMASAMY; KAMALUDEEN; BANU, 2007; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2011). De acordo com Wang e colaboradores (2014), uma cepa mutante de *Bacillus subtilis*, obtida por irradiação UV, demonstrou alta tolerância a cádmio e testes comprovaram sua eficiência como bio sorvente de outros metais como crômio, mercúrio e chumbo. Além disso, sua inoculação em área de cultivo de rabanete confluiu com a redução em até 96,0% da concentração desses metais nas hortaliças.

A biorremediação intrínseca é um processo de atenuação natural realizado *in situ*, que envolve a remediação de poluentes por microrganismos indígenas sem a

---

<sup>2</sup>Referente aos microrganismos que são colonizadores naturais do ambiente em que são encontrados, podem ser designados também como *residentes* ou *indígenas*.

necessidade de intervenção humana. É uma estratégia mais econômica, mas que requer o monitoramento de todo processo, sendo a avaliação laboratorial da capacidade de resistência e de biotransformação dos poluentes pelos microrganismos, uma das etapas mais importantes (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; KULSHRESHTHA et al., 2014).

O uso da compostagem ou biopilhas, na remediação de metais do solo e de sedimentos, é aliado à estratégia de bioaumentação, com o controle de alguns parâmetros como umidade e adição de nutrientes. É uma técnica *ex situ* em que o solo é acondicionado em pilhas de modo a permitir o controle da lixiviação de líquidos delas originado (AHTIAINEN et al., 2002). Huang e colaboradores (2017) estudaram o efeito da inoculação do fungo *Phanerochaete chrysosporium* na biodisponibilidade de Pb e na diversidade da comunidade bacteriana em uma compostagem de resíduos agrícolas contaminada por este metal. Os resultados mostraram que o fungo agiu na estabilização do Pb e no aumento da população bacteriana.

Os biorreatores de lavagem de solo também compreendem uma estratégia de biorremediação *ex situ* (RAMASAMY; KAMALUDEEN; BANU, 2007). Semelhantemente aos processos de bioaumentação, os microrganismos utilizados têm capacidade conhecida de resistência aos poluentes. Além disso, exigem o controle das condições de pH, temperatura, aeração e disponibilidade de nutrientes para a efetividade do processo de biotransformação dos metais (RAMASAMY; KAMALUDEEN; BANU, 2007). Uma cepa da bactéria *Pseudoalteromonas sp.* foi inoculada em biorreator para remediação de águas residuais contendo Cd e mostrou-se promissora na acumulação desse metal e no aumento da população bacteriana resistente ao mesmo.

### 3.2.2.2.3 Classificação da remediação biótica de acordo com os processos metabólicos

A remediação de metais por agentes biológicos pode envolver formas específicas de interações entre os íons metálicos e a parede celular dos organismos: assim, é possível a ocorrência de apenas uma ligação desses íons na parede celular ou o seu transporte metabólico através da membrana. Esses processos são designados, respectivamente de bio sorção e bioacumulação (HANSDA; KUMAR; ANSHUMALI, 2016).

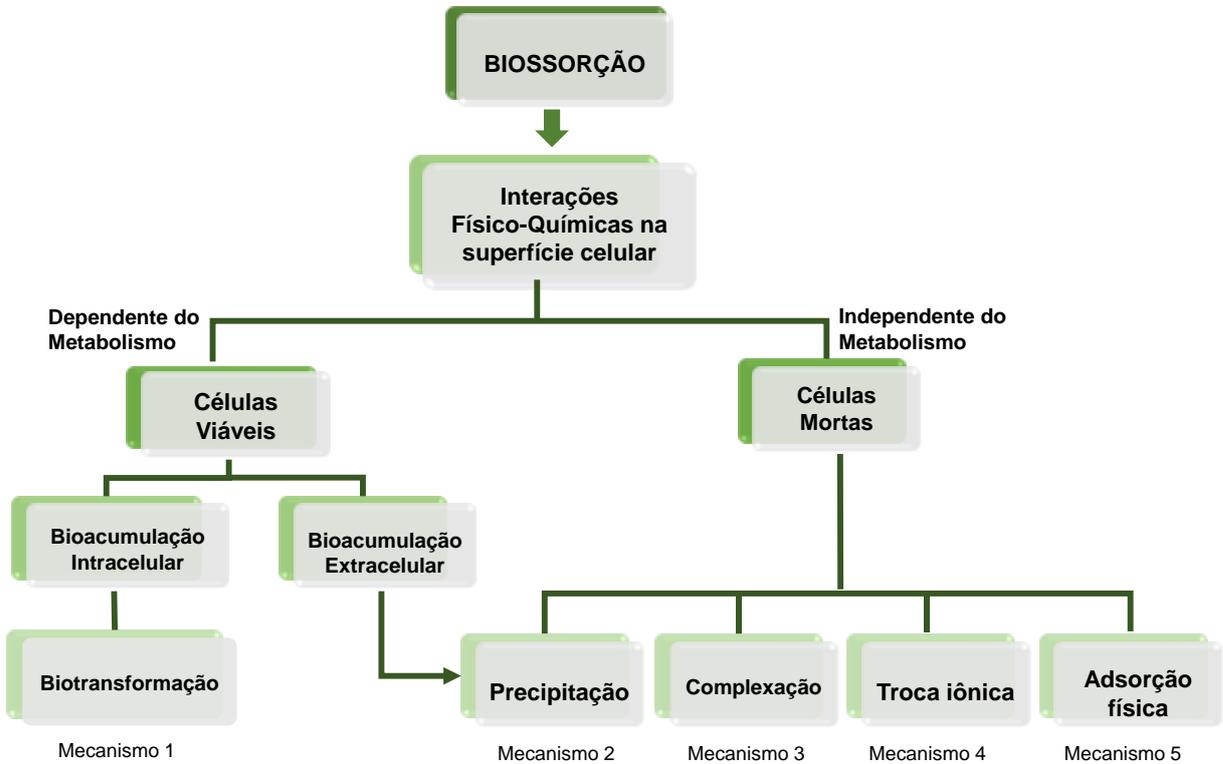
Não há uma definição única para o termo bioissorção, contudo, de acordo com Gadd (1993) e Volesky (2001), é mais frequente descrevê-lo como um processo em que biomassas de diferentes origens são empregadas com o objetivo de reter, remover ou recuperar metais.

Apesar de organismos vivos na presença de íons metálicos, invariavelmente, realizarem a bioissorção, uma vez que a bioacumulação tem início com o processo de adsorção, o termo é basicamente empregado para designar a biorremediação de metais pelo uso de biomassa morta/inativa. Neste sentido, ela é descrita como um evento físico-químico caracterizado por um processo passivo e metabolicamente independente que ocorre de forma muito rápida podendo ser comparada a métodos adsorptivos ou de troca iônica convencionais (WANG; CHEN, 2009). De fato, o processo de bioissorção por biomassa inativa pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos tais como: a troca iônica, a complexação, a adsorção física e a precipitação (HANSDA; KUMAR; ANSHUMALI, 2016).

A bioacumulação por sua vez, pode ser entendida como um processo de biotransformação através da retenção e concentração de uma substância/metal por um organismo ativo. No caso dos metais, a bioacumulação ocorre pelo seu transporte através da membrana para o interior do citoplasma celular, assim, o metal sequestrado fica imóvel dentro da célula. Este é um processo complexo que é dividido em duas etapas. Na primeira etapa, como já assinalado, acontece a bioissorção – uma rápida quelatação do metal na parede celular, que é independente do metabolismo – Já a segunda etapa ocorre lentamente mediada pelo consumo de energia metabólica e é caracterizada pelo transporte dos íons metálicos através da membrana celular até as estruturas intracelulares (CHOJNACKA, 2010). Além disso, a bioacumulação pode ocorrer de forma extracelular através da precipitação do metal na parede celular, porém dependente do metabolismo. O organismo utiliza do seu sistema de defesa para produção de substância que favorece a precipitação do metal (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997).

A Figura 3.1 apresenta um esquema com os mecanismos derivados das interações físico-químicas entre metais e a parede celular de organismos ativos e/ou inativos.

Figura 3. 1 - Mecanismos de biorremediação de metais de acordo com o metabolismo celular.



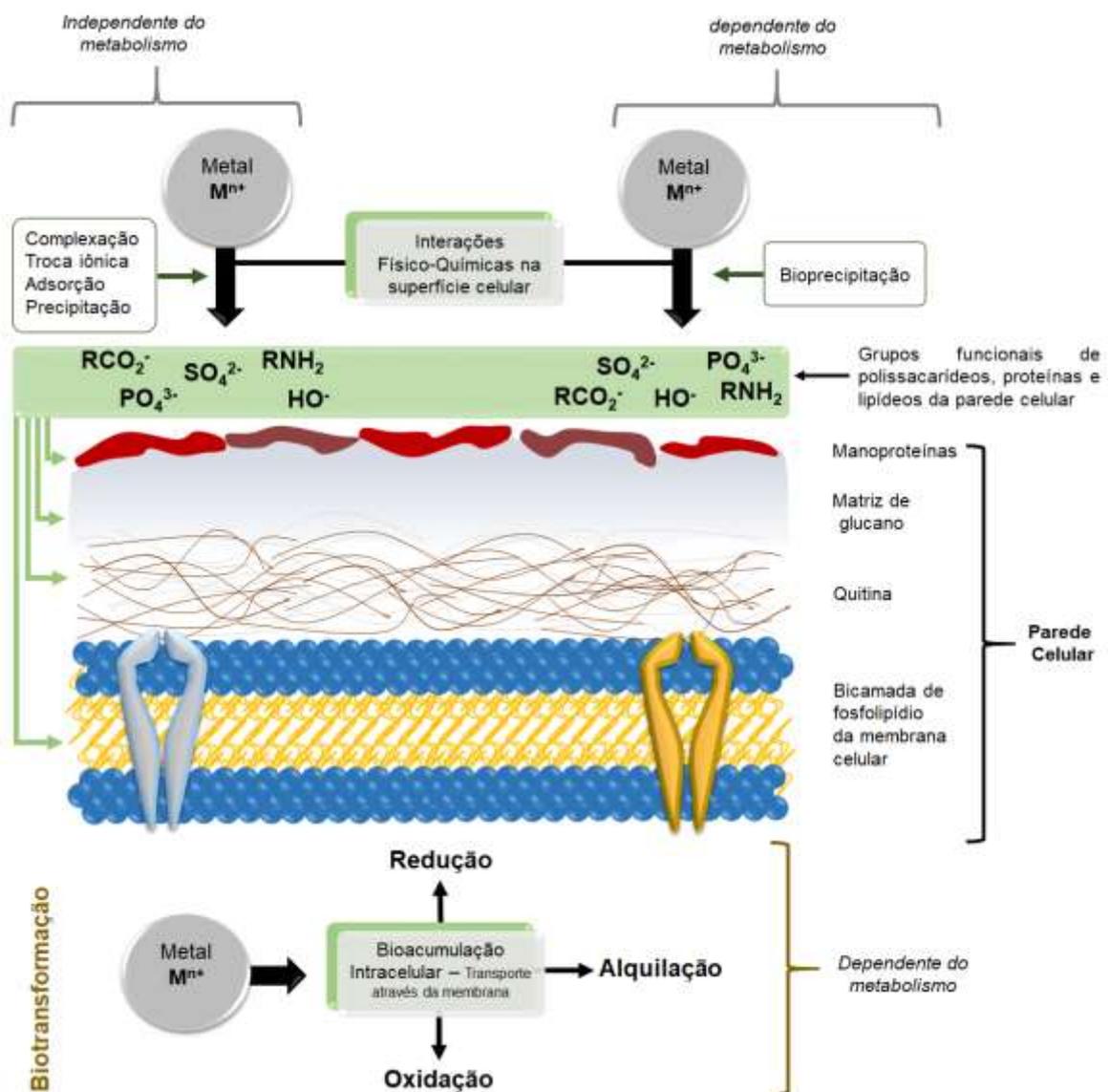
Fonte: elaborada pelo autor, 2017

Na bioacumulação, as espécies metálicas podem se ligar a proteínas, o que leva à precipitação e à inserção no interior de estruturas ou organelas celulares específicas (ECCLES, 1995; GADD, 1992, 2004). As células formam complexo com o metal indesejado e sequestram-no em organelas intracelulares para eventual exportação por sistemas de efluxo. Podem ocorrer efeitos tóxicos, como a deterioração das biomoléculas que levam a alterações das propriedades celulares. Os organismos também podem excretar os compostos responsáveis pela formação de complexo com os íons metálicos no meio extracelular, para reduzir sua biodisponibilidade e sua bioacumulação (HASSLER; SLAVEYKOVA; WILKINSON, 2004).

A bioacumulação/absorção intracelular de metais é obrigatoriamente dependente de células viáveis, uma vez que a interiorização ocorre por meio do transporte ativo mediado pelo consumo de ATP, ou, ainda, por bioprecipitação de íons envolvidos nas funções metabólicas, como os íons fosfatos e pela biotransformação, a exemplo da oxirredução, metilação e desmetilação (DHANKHAR; HOODA, 2011; YILMAZER; SARACOGLU, 2009).

A Figura 2 apresenta um esquema geral com a representação do mecanismo de bioissorção, independente do metabolismo, através das interações dos íons metálicos com os grupos funcionais presentes na parede celular, bem como o mecanismo de bioacumulação, o qual é também iniciado com as interações físico-químicas na parede celular, seguido da interiorização destes íons através da atividade metabólica.

Figura 3. 2 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos de biorremediação por células ativas ou inativas.



Fonte: elaborada pelo autor, 2017

#### 3.2.2.2.4 Modelos de isothermas de adsorção

A eficiência de uma determinada biomassa, empregada como um bioadsorbente pode ser calculada experimentalmente e expressa por modelos matemáticos: ao colocar a biomassa em contato com uma solução de um determinado adsorbato (como um íon metálico), este tende a fluir para sua superfície até atingir uma condição de equilíbrio, na qual a concentração do adsorbato na fase líquida ( $C_e$ ) permaneça constante, e assim, seja possível determinar a capacidade de adsorção do bioadsorbente ( $q_e$ ) (MELO et al., 2014).

No entanto, esse equilíbrio está condicionado à concentração de íons metálicos (ou outro soluto), bem como a condições constantes de pH e temperatura. As isothermas de Langmuir e Freundlich são comumente utilizadas nos trabalhos de equilíbrios de bioadsorção, devido à sua capacidade de descrever o comportamento dos dados experimentais e a máxima adsorção do material, bem como por serem mais simples por apresentarem apenas dois parâmetros. Outras isothermas também utilizadas são: Redlich-Peterson, Temkin e Dubinin–Radushkevich (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995; MELO et al., 2014).

O modelo matemático de Langmuir admite que há uma saturação da superfície do adsorbente por uma monocamada de moléculas/íons/átomos do soluto, quando o sistema atinge a adsorção máxima e, assim, a energia de adsorção é constante (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995). O modelo da isoterma de Langmuir é representado pela Equação 3.1.

$$q_e = \frac{Q_0 \times b \times C_e}{1 + Q_0 \times C_e} \quad \text{Equação 3.1}$$

Na expressão:

- $C_e$  é a concentração do adsorbato no equilíbrio ( $\text{mg L}^{-1}$ );
- $q_e$  é a quantidade adsorvida por grama do adsorbente ( $\text{mg g}^{-1}$ );
- $b$  é a constante relacionada com a energia de adsorção ( $\text{L mg}^{-1}$ );
- $Q_0$  é a constante que fornece a capacidade de adsorção máxima teórica na monocamada ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

A partir da linearização da equação de Langmuir (Equação 3.2) é possível determinar os parâmetros  $Q_0$  e  $b$ , que irão expressar a razão  $C_e/q_e$  em função de  $C_e$ . A representação gráfica dessa função é uma reta onde o coeficiente angular será igual a  $1/Q_0$  e o coeficiente linear será  $1/(Q_0b)$ .

$$\left(\frac{C_e}{q_e}\right) = \left(\frac{1}{Q_0b}\right) + \left(\frac{1}{Q_0}\right) C_e \tag{Equação 3.2}$$

Para o modelo de Langmuir, é possível expressar as características importantes de sua equação por meio de parâmetro de equilíbrio,  $R_L$ , o qual indica a natureza da isoterma de acordo com o padrão descrito na Tabela 3.4 e pode ser calculado pela Equação 3.3.

$$R_L = \left(\frac{1}{1+bC_0}\right) \tag{Equação 3.3}$$

Tabela 3. 4 - Classificação das isotermas com relação aos Valores de  $R_L$ .

Valor de $R_L$	Tipo de isoterma
$R_L = 1$	Linear
$R_L = 0$	Irreversível
$0 < R_L < 1$	Favorável
$R_L > 1$	Desfavorável

Fonte: Foo, Hameed 2010

O modelo matemático de Freundlich não admite a obrigatoriedade da formação da monocamada para que o sistema atinja um valor constante, e, ainda, assume que a energia de adsorção pode aumentar com o aumento da concentração do soluto (MELO et al., 2014). Esse modelo é representado pela Equação 3.4.

$$q_e = K_F x C_e^{\frac{1}{n}} \tag{Equação 3.4}$$

Na expressão:

- $K_F$  é a constante de Freundlich ( $mg\ g^{-1}$ );

- $n$  é um parâmetro empírico

A constante  $K_F$  e o parâmetro  $n$  podem ser obtidos através da linearização da equação de Equação 3.5. O coeficiente angular da reta corresponde a  $1/n$  e o coeficiente linear a  $\log(K_F)$ . Processos adsorptivos favoráveis apresentarão valores de  $n$  entre 1 e 10.

$$\log(q_e) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \log(C_e) \quad \text{Equação 3.5}$$

De acordo com Kapoor e Viraraghavan (1995), esses modelos foram desenvolvidos para adsorção de gás e que, de tal modo, podem não ser tão eficientes na explicação de adsorção por material biológico, assim, eles devem ser apenas uma representação matemática da bioadsorção. Contudo, mesmo com essas limitações, os modelos podem fornecer informações a respeito do desempenho do material biológico na adsorção de íons metálicos e outros solutos.

### **3.2.3 Micorremediação: os fungos e sua aplicação na remediação de cádmio e chumbo**

#### **3.2.3.1 Biorremediação de Cádmio e Chumbo por Fungos Ativos**

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de fungos de diversas espécies em resistirem e se desenvolverem na presença de metais tóxicos como o cádmio e chumbo (ALI et al., 2017; DEY et al., 2016; DING et al., 2016; JAYARAMAN; ARUMUGAM, 2014; KAEWDOUNG et al., 2016; MOHAMED; ABO-AMER, 2012). Esses estudos ressaltam a viabilidade da aplicação destes organismos em processos de biorremediação de metais, tanto no solo quanto em sistemas aquosos.

Estudos com objetivos de remediação de cádmio por células ativas de fungo são muito frequentes devido à alta toxicidade deste metal. Em um desses estudos, as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. apresentaram bons resultados para bioadsorção de cádmio na investigação da variação de parâmetros como o pH, a temperatura e o tempo de incubação. Neste estudo, o pH de 5,5, a temperatura de 35 °C e o período de incubação de 35 dias mostraram-se como as condições ótimas, com as quais, *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* foram capazes de bioadsorver, respectivamente, 56,34%, 44,74% e 42,04% da concentração dos íons metálicos. De acordo com os autores, apesar de o mecanismo

de absorção de metais por fungos ainda não ser totalmente entendido, é explícita a contribuição de polissacarídeos, proteínas e outras moléculas da parede celular, uma vez que testes confirmaram a participação dos diferentes grupos funcionais em ligações com os cátions metálicos (AWASTHI; PANDEY; KHAN, 2017).

As espécies *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma tomentosum* também tiveram seus potenciais de acumulação avaliados durante o crescimento celular na presença de cádmio. Os resultados ressaltaram que as capacidades bioabsorptivas são diferentes para cada espécie de fungo mesmo em comparação de indivíduos de um mesmo gênero, tendo em vista que *Trichoderma asperellum* apresentou a melhor capacidade de remoção de cádmio do meio, reduzindo a concentração em 76,17% equivalente a 10,15 mg de cádmio para cada grama de biomassa seca do fungo. Por sua vez, a espécie *Trichoderma tomentosum* apresentou a mais baixa capacidade de bioabsorção de Cd, reduzindo a concentração em 66,19%, o que representou 5,23 mg g<sup>-1</sup> (MOHSENZADEH; SHAHROKHI, 2014).

Em um estudo realizado por Xie e colaboradores (XIE et al., 2017), observou-se que *Coprinus atramentarius* foi capaz de remover 76% do cádmio presente no meio de crescimento. Além disso, os autores investigaram a regulação de proteínas à exposição do metal e observaram que a proteína 14-3-3 é altamente induzida na presença de cádmio e testes adicionais demonstraram que esta exposição tem relação direta com a regulação transcricional desta proteína, bem como com o papel da proteína 14-3-3 na regulação do ciclo celular. Os autores sugerem, neste experimento, que a proteína pode ser um indicador da necrose celular.

O micélio ativo do fungo *Trametes versicolor* apresentou crescente desempenho de bioabsorção de acordo com o aumento da concentração de cádmio no meio de cultivo, demonstrando uma capacidade de acumulação que chegou a 124 mg g<sup>-1</sup>, em 1h, considerando um pH ótimo de 6,0. Os testes foram feitos sem alteração na faixa de temperatura entre 15 e 45 °C, observando-se que o equilíbrio de bioabsorção foi bem representado pela equação de Langmuir (YALÇINKAYA et al., 2002).

*Paecilomyces lilacinus* foi inoculado em meio de cultivo contendo cádmio a 100 mg L<sup>-1</sup> e foi observado que essa concentração foi reduzida a 28,97 mg L<sup>-1</sup> passados quatro dias da inoculação, com um potencial de acumulação de 24,23 mg g<sup>-1</sup>. Análises por Energia Dispersiva de Raio-x (EDX) confirmaram que o metal foi adsorvido pela biomassa do fungo, uma vez que sugeriu a presença do metal nas células (ZENG et

al., 2010). Considerando que, em sítios contaminados, normalmente é frequente a presença de vários metais tóxicos, em trabalho posterior, Zeng e colaboradores (ZENG et al., 2013) avaliaram o efeito da presença de outros metais sobre a bioabsorção de cádmio por *Paecilomyces lilacinus*. Os pesquisadores constataram que todos os metais testados (zinco, manganês, cobre e chumbo) provocaram uma diminuição na capacidade de bioabsorção de cádmio, contudo esse efeito foi mais pronunciado para cobre e chumbo, indicando que há uma competição entre os íons metálicos para se ligarem aos sítios ativos da parede celular e que a afinidade seria maior para o cobre e chumbo com relação aos outros metais.

O estudo de Xu e colaboradores (2015) seguiu no sentido de entender melhor o modelo mecanístico da desintoxicação de cádmio por fungos, o que ainda é pouco entendido. Para isso, os pesquisadores investigaram a morfologia celular e o sistema antioxidante de *Penicillium chrysogenum*. A espécie demonstrou um bom nível de absorção de cádmio, o qual foi de 63,02 mg g<sup>-1</sup>, observada, inclusive, em testes “*in situ*”. Utilizando diferentes metodologias, os autores determinaram que o maior percentual de cádmio se encontrava fortemente ligado à parede celular (86,21%), seguido da concentração de cádmio intracelular (8,46%) e, em menor proporção, de cádmio levemente ligado à parede celular (5,33%). Os dados foram confirmados por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (MEV-EDX). A alta porcentagem de cádmio ligado à parede celular, e consequente diminuição no conteúdo intracelular, indica mecanismo de defesa primário para as funções vitais. A avaliação, no entanto, da atividade das enzimas superóxido desmutase (SOD), glutatona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e catalase (CAT) sugeriu que o mecanismo de desintoxicação de cádmio por *Penicillium chrysogenum* compreendia a bioabsorção, o sequestro celular e a defesa antioxidante. Resultados semelhantes, quanto à importância do sistema de defesa antioxidante foram descritos para o fungo *Pleurotus ostreatus* (LI et al., 2017a).

A espécie *Lentinus edodes* foi relatada por Bayramoglu e Arica (2008) como acumuladora de cádmio; os autores reforçaram a influência de parâmetros como pH, concentração do metal e temperatura na capacidade de bioabsorção do fungo. Os resultados demonstraram que, para *Lentinus edodes*, a variação da temperatura entre 15 e 45 °C não representou efeitos significativos e que o máximo de absorção pelos

fungos ativos foi de 78,5 mg g<sup>-1</sup> em pH 6,0. De acordo com os resultados, os dados experimentais puderam ser representados pelos modelos de equilíbrio de Langmuir e Freundlich.

De modo semelhante aos estudos com cádmio, as investigações da capacidade de fungos em biossorver chumbo durante o crescimento celular, ou após o crescimento, e com as células ainda ativas, também têm ganhado destaque como uma alternativa para biorremediação, sobretudo “*in situ*”.

O fungo *Aspergillus foetidus* foi apresentado por Chakraborty e colaboradores (2013a) como um grande candidato à biorremediação de chumbo em sistemas aquáticos, uma vez que, nas condições ótimas, promoveu redução de 94.57% de chumbo da solução. Nestas condições (200 mg L<sup>-1</sup> de chumbo), observou-se, também, um maior crescimento micelial em comparação com o controle. Essas observações podem ser explicadas a partir dos resultados da caracterização bioquímica do fungo. De acordo com os autores, a instabilidade na membrana celular causada pela dose não letal do metal provocou maior permeabilidade e fluxo livre de nutrientes, aumentando a atividade metabólica. Essa explicação encontra suporte, também, no observado acréscimo da síntese proteica nas concentrações mais baixas do metal usada como uma estratégia de sobrevivência. Os dados do estudo bioquímico também demonstraram que a espécie utiliza um mecanismo contra o estresse oxidativo pelo incremento dos níveis de prolina e enzimas antioxidantes para detoxificação de espécies estimuladas pela presença de chumbo, como o malonaldeído e do peróxido de hidrogênio.

A produção de oxalatos micogênicos já foi alvo de vários estudos e é um grande exemplo da formação de biominerais por fungos. Esse fenômeno foi alvo de levantamento realizado por Gadd e colaboradores (2014), que demonstraram que essa produção de oxalatos é bem distribuída entre os fungos que utilizam a capacidade deste ânion em complexar e precipitar metais, atuando, assim, na especiação, mobilidade e na sua toxicidade. A formação de cristais de oxalato de chumbo, extra micelial, em culturas de espécies dos gêneros *Fomitopsis* e *Ganoderma*, crescidos na presença de nitrato de chumbo, foi identificada por MEV-EDX e Difração de Raio-X (DRX) como descreveu Kaewdoug e colaboradores (2016). Essa constatação reforça o potencial do emprego de fungos em processos de biotransformação, bem como a capacidade que esses microrganismos apresentam

em utilizar seu metabolismo para promover a bioacumulação extracelular de metais, através da precipitação de espécies menos tóxicas como um mecanismo de defesa, que lhe assegura a sobrevivência.

Rhee, Hillier e Gadd (2016) descreveram pela primeira vez a formação de um hidroxicarbonato de chumbo mediado por *Paecilomyces javanicus*, revelando uma nova etapa de mineralização do chumbo por fungos. As vias principais de carbonatação do chumbo, a cerussite (carbonato de chumbo -  $\text{PbCO}_3$ ), o oxalato de chumbo ( $\text{PbC}_2\text{O}_4$ ) e o plumbonacrito ( $\text{Pb}_{10}(\text{CO}_3)_6\text{O}(\text{OH})_6$ ) foram identificadas por DRX. No entanto, a presença de uma outra fase mineral não identificada pelo DRX foi investigada através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) que revelou uma constituição rica em grupos carbonatos e hidroxílicos, chegando, então, a um quarto produto de mineralização do chumbo por fungos, a hidrocerussite ( $\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$ ). Mais uma vez, destaca-se a habilidade de desintoxicação de metais por espécies fúngicas.

Um estudo a partir de quinze isolados fúngicos destacou o potencial de uma cepa de *Aspergillus niger* em realizar a biorremediação de chumbo. A variação de parâmetros de crescimento levou às condições ótimas em pH 5,0 e a concentração do metal em  $200 \text{ mg L}^{-1}$  com acumulação de cerca de 90% do metal. Os dados de adsorção foram comparados com modelos matemáticos e puderam ser representados pela isoterma de Freundlich.

Vários exemplos de investigação sobre a biorremediação de cádmio e chumbo, a partir de células vivas de fungo, podem ser citadas para demonstrar como é bem sucedido o emprego desses organismos em processos de biotransformação de metais tóxicos. Assim, a Tabela 3.5 apresenta um resumo das publicações explicitando a diversidade de espécies fúngicas estudadas e que demonstraram potencial para emprego em estudos de bioacumulação via metabolismo ativo.

Tabela 3. 5 - Bio sorção de cádmio e chumbo por células viáveis de diversas espécies fúngicas (continua)

Espécie fúngica	Metal e detalhes do experimento	Bioacumulação (mg g <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Agaricus macrosporus</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 20 h	76,64	(MELGAR; ALONSO; GARCÍA, 2007)
<i>Agaricus bitorquis</i>	Pb, 800 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	208,5	Hanif e Bhatti (2013)
<i>Agaricus macrosporus</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 20 h	72,78	(MELGAR; ALONSO; GARCÍA, 2007)
<i>Aspergillus foetidus</i>	Pb, 200 mg L <sup>-1</sup> , 96 h	430	Chakraborty, Mukherjee e Das (2013b)
<i>Aspergillus niger</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 72 h	34,4	Dursun et al. (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	Pb, 250 mg L <sup>-1</sup> , 178 h	54,05	Iskandar, Zainudin e Tan (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Cd, 75 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	15,50	Liu et al. (LIU et al., 2006b)
<i>Aspergillus niger</i>	Cd, 70 mg L <sup>-1</sup> , 18 h	2,65	(TODOROVA et al., 2008)
<i>Aspergillus terreus</i>	Cd, 10 mg L <sup>-1</sup> , 13 d	125,0	(MASSACCESI et al., 2002)
<i>Curvularia lunata</i>	Cd, 10 mM, 48 h	64,62	(PARASZKIEWICZ et al., 2007)
<i>Curvularia lunata</i>	Pb, 10 mM, 48 h	169,57	(PARASZKIEWICZ et al., 2007)
<i>Curvularia tuberculata</i>	Cd, 10 mM, 48 h	20,63	(PARASZKIEWICZ et al., 2007)
<i>Curvularia tuberculata</i>	Pb, 10 mM, 48 h	144,05	(PARASZKIEWICZ et al., 2007)
<i>Fusarium phyllophilum</i>	Cd, 10 mg L <sup>-1</sup> , 48 h	0,84	(RASPANTI et al., 2009)
<i>Fusarium phyllophilum</i>	Pb, 10 mg L <sup>-1</sup> , 48 h	0,20	(RASPANTI et al., 2009)
<i>Fusarium sp.</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 45 min.	22,98	(PAN; CAO; ZHANG, 2009)
<i>Fusarium sp.</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 45 min.	166,11	(PAN; CAO; ZHANG, 2009)
<i>Gliocladium roseum</i>	Cd, 10 mg L <sup>-1</sup> , 13 d	185,0	(MASSACCESI et al., 2002)
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Cd, 0,1 mM, 120 h	46	(DENG et al., 2014)
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Pb, 4 mM, 120 h	560	Deng et al. (DENG et al., 2014)
<i>Lentinus sajor-caju</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 30 min.	104,8	(BAYRAMOĞLU; ARICA, 2008)
<i>Mucoromycote sp.</i>	Cd, 500 mg L <sup>-1</sup> , 4 h	79,65	(ZHU et al., 2016)

Tabela 3.5 - Bioissorção de Cd e Pb por células viáveis de diversas espécies fúngicas (conclusão)

Espécie fúngica	Metal e detalhes do experimento	Bioacumulação (mg g <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 24 h	36,46	(ZENG et al., 2013)
<i>Paecilomyces marquandii</i>	Cd, 10 mM, 48 h	8,50	(PARASZKIEWICZ et al., 2007)
<i>Paecilomyces marquandii</i>	Pb, 10 mM, 48 h	65,14	(PARASZKIEWICZ et al., 2007)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cd, 5 mM, 120 h	54,33	(XU et al., 2015)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Pb, 250 mg L <sup>-1</sup> , 178 h	38,98	Iskandar, Zainudin e Tan (2011)
<i>Penicillium sp.</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 45 min.	372,54	(PAN; CAO; ZHANG, 2009)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pb, 50 mg L <sup>-1</sup> , 3 h	80,0	(YETIS et al., 2000)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cd, 6 mg L <sup>-1</sup> , 6 d	1,33	(DEY et al., 1995)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Cd, 50 mg L <sup>-1</sup> , 5 d	29,56	(CIHANGIR; SAGLAM, 1999)
<i>Talaromyces helicus</i>	Cd, 10 mg L <sup>-1</sup> , 13 d	155,0	(MASSACCESI et al., 2002)
<i>Trametes versicolor</i>	Cd, 600 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	102,3	(ARICA; KAÇAR; GENÇ, 2001)
<i>Trametes versicolor</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 1 h	124	(YALÇINKAYA et al., 2002)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Pb, 250 mg L <sup>-1</sup> , 178 h	17,62	Iskandar, Zainudin e Tan (2011)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 60 d	10,75	(MOHSENZADEH; SHAHROKHI, 2014)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Cd, 10 mg L <sup>-1</sup> , 48 h	1,32	(RASPANTI et al., 2009)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Pb, 10 mg L <sup>-1</sup> , 48 h	2,20	(RASPANTI et al., 2009)

Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.2.3.2 Biorremediação de Cádmio e Chumbo por Fungos Inativos

Além dos trabalhos que relatam os resultados da avaliação do crescimento micelial na presença de cádmio e chumbo, há vários estudos em que os pesquisadores utilizaram também, ou, em alguns casos, exclusivamente a biomassa do fungo inativo como adsorvente (IRAM et al., 2015c; ISKANDAR; ZAINUDIN; TAN, 2011; MATHEICKAL; YU, 1997; MOHSENZADEH; SHAHROKHI, 2014; ZHU et al.,

2016). Nestes trabalhos, é frequente o uso da metodologia geral de cultivo do fungo em meio livre de íons metálicos e, após desenvolvimento do micélio, procede-se à inativação celular e obtenção da biomassa seca por meio de calor ou liofilização para, então, realizar os testes de adsorção e obtenção das isotermas de equilíbrio em função da variação da concentração inicial dos íons metálicos, do pH e da temperatura.

Alguns resultados merecem destaque entre as pesquisas que usaram biomassa de fungo inativo como adsorvente, como é o caso do trabalho de Mahmoud e colaboradores (MAHMOUD et al., 2017), no qual isolaram o fungo *Aspergillus flavus* do ambiente marinho e identificaram sua alta capacidade de bioadsorção de cádmio e chumbo. A partir de 5,0 mg de biomassa do fungo, em pH 7,0 e 6,0 e tempo de 40 minutos, foi possível identificar uma capacidade de remoção de 174,2 mg de Cd/g de biomassa fúngica e 207,2 mg de Pb/g de biomassa fúngica. Neste caso, o modelo matemático de Langmuir explicou satisfatoriamente os equilíbrios de adsorção observados.

Akinkunmi e colaboradores (AKINKUNMI et al., 2015) realizaram o isolamento de fungos do solo tolerantes a chumbo e identificaram o isolado mais resistente como a espécie *Fusarium equiseti*, o qual foi utilizado em investigação de bioadsorção do metal em que a eficiência da remoção foi monitorada a partir do controle de pH, temperatura, concentração do metal, agitação, tempo de contato e de crescimento da biomassa. A partir de uma concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> de Pb, em pH 4,0 e temperatura de 30 °C, 97,9% do metal foram adsorvidos pelo fungo *Fusarium equiseti*, utilizando-se 0,04 g de biomassa do fungo, com cinco dias de crescimento, sob agitação de 150 rpm por 60 minutos.

O fungo *Aspergillus niger* demonstrou grande habilidade de bioadsorção de Pb na investigação realizada por Iram e colaboradores (2015a), cujo objetivo era o de descrever habilidades de fungos para remediação de solos contaminados por metais tóxicos. *A. niger* foi capaz de adsorver 172,0 mg de Pb/g de biomassa fúngica com pH ótimo em 5,0 e temperatura de 37°C, dados ajustados ao modelo de Langmuir.

O fungo *Trametes versicolor* apresentou capacidade máxima adsorvente, por bioadsorção, de 120,0 mg de Cd/g de biomassa na temperatura de 25°C e pH 6,0. O equilíbrio de bioadsorção foi adequadamente tratado pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich (ARICA; KAÇAR; GENÇ, 2001).

A Tabela 3.6 apresenta um resumo dos resultados experimentais de publicações que objetivaram a investigação de espécies fúngicas com capacidade de bioabsorção de metais tóxicos, dentre os quais, cádmio e chumbo. Aqui, observa-se uma grande diversidade de espécies fúngicas, realçando, dessa forma, o potencial associado ao uso de fungos inativos para propostas de biorremediação.

Tabela 3. 6 - Bioissorção de cádmio e chumbo por células inativas de diversas espécies fúngicas (continua)

Espécie fúngica	Metal e detalhes do experimento	Bioissorção (mg g <sup>-1</sup> )	Isoterma aplicada	Referência
<i>Absidia orchidis</i>	Pb, 200 mg L <sup>-1</sup> , 3 min	351,0	Langmuir	(HOLAN; VOLESKY, 1995)
<i>Agaricus bisporus</i>	Pb, 200 mg L <sup>-1</sup> , 150 min.	28,8	Langmuir	(VIMALA; DAS, 2008)
<i>Agaricus macrosporus</i>	Cd, 1000 mg L <sup>-1</sup> , 1 h	47,31	-	(MELGAR; ALONSO; GARCÍA, 2007)
<i>Agaricus macrosporus</i>	Pb, 2000 mg L <sup>-1</sup> , 1 h	66,34	-	(MELGAR; ALONSO; GARCÍA, 2007)
<i>Aspergillus flavus</i>	Pb, 1400 mg L <sup>-1</sup> , 50 h	93,65	Langmuir	Iram et al. (2015a)
<i>Aspergillus flavus</i>	Cd, 1000 mg L <sup>-1</sup> , 40 min.	174,22	Freundlich Langmuir	Mahmoud et al. (2017)
<i>Aspergillus flavus</i>	Pb, 2000 mg L <sup>-1</sup> , 40 min.	207,2	Freundlich Langmuir	Mahmoud et al. (2017)
<i>Aspergillus foetidus</i>	Cd, 10 mM, 96 h	73,46	-	(CHAKRABORTY et al., 2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Pb, 1400 mg L <sup>-1</sup> , 50 h	172,25	Langmuir	Iram et al. (2015a)
<i>Beauveria bassiana</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 120 h	13,54	-	(GOLA et al., 2016b)
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Cd, 10 mM, 2 h	130,2	-	(GABRIEL; VOSÁHLO; BALDRIAN, 1996)
<i>Fusarium equiseti</i>	Pb, 300 mg L <sup>-1</sup> , 60 min.	24,5	-	Akinkunmi et al. (2015)
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Cd, 10 mg L <sup>-1</sup> , 4 h	30	Freundlich	(DENG et al., 2014)
<i>Lasiodiplodia sp.</i>	Pb 10 mg L <sup>-1</sup> , 3 h	110	Langmuir	(DENG et al., 2014)
<i>Lentinus sajor-caju</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 30 min.	123,5	Freundlich Langmuir	(BAYRAMOĞLU; ARICA, 2008)
<i>Mucoromycote sp.</i>	Cd, 500 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	79,67	Langmuir	(XIA et al., 2015)
<i>Mucoromycote sp.</i>	Cd, 500 mg L <sup>-1</sup> , 4 h	56,51	Langmuir	(ZHU et al., 2016)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Cd, 500 mg L <sup>-1</sup> , 1 h	77,61	Langmuir	(XIA et al., 2015)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 24 h	24,23	-	(ZENG et al., 2010)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 24 h	41,99	-	(ZENG et al., 2013)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pb, 1223 µmol L <sup>-1</sup> , 24 h	116	-	(NIU et al., 1993)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 3 min	56,0	Langmuir	(HOLAN; VOLESKY, 1995)
<i>Penicillium sp.</i>	Pb, 150 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	72,5	Langmuir	(VELMURUGAN et al., 2010)
<i>Penicillium sp.</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 7 d	11,14	-	(DENG et al., 2017)

Tabela 3. 6 - Bioissorção de cádmio e chumbo por células inativas de diversas espécies fúngicas (continua)

Espécie fúngica	Metal e detalhes do experimento	Bioissorção (mg g <sup>-1</sup> )	Isotherma aplicada	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 20 min.	23,04	Langmuir	Say, Denizli e Arica (2001)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 20 min.	69,77	Langmuir	Say, Denizli e Arica (2001)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 6 h	12	-	Yetis et al. (1998)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 6 h	57,5	-	Yetis et al. (1998)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pb, 50 mg L <sup>-1</sup> , 30 min.	53,6	-	Çeribasi e Yetis (2004)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pb, 200 mg L <sup>-1</sup> , 150 min.	108,0	Langmuir	(WU; LI, 2002)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cd, 300 mg L <sup>-1</sup> , 6 h	27,79	Langmuir	(SAY; DENIZLI; ARICA, 2001)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pb, 300 mg L <sup>-1</sup> , 6 h	86,86	Langmuir	(SAY; DENIZLI; ARICA, 2001)
<i>Phellinus badius</i>	Pb, 200 mg L <sup>-1</sup> , 24 h	170,0	Langmuir	(MATHEICKAL; YU, 1997)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Cd, 50 mg L <sup>-1</sup> , 120 h	33,50	-	(CIHANGIR; SAGLAM, 1999)
<i>Polyporus versicolor</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 6 h	25	-	Yetis et al. (1998)
<i>Polyporus versicolor</i>	Pb, 100 mg L <sup>-1</sup> , 6 h	110	-	Yetis et al. (1998)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Cd, 1 g L <sup>-1</sup> , 2 h	13	-	(MASHITAH; ZULFADHLY; BHATIA, 1999)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Pb, 1 g L <sup>-1</sup> , 2 h	28	-	(MASHITAH; ZULFADHLY; BHATIA, 1999)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	13,0	-	(MASHITAH; ZULFADHLY; BHATIA, 1999)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Pb, 200 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	29,0	-	(MASHITAH; ZULFADHLY; BHATIA, 1999)
<i>Rhizopus cohnii</i>	Cd, 100 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	40,5	Langmuir	(LUO; XIAO; LUO, 2010)
<i>Trametes versicolor</i>	Cd, 600 mg L <sup>-1</sup> , 2 h	120,6	Langmuir	(ARICA; KAÇAR; GENÇ, 2001)
<i>Trametes versicolor</i>	Cd, 10 mM, 2 h	109,5	-	(GABRIEL; VOSÁHLO; BALDRIAN, 1996)
<i>Trametes versicolor</i>	Cd, 200 mg L <sup>-1</sup> , 1 h	153	Langmuir	(YALÇINKAYA et al., 2002)
<i>Trichoderma atroviride</i>	Cd, 1,25 mg L <sup>-1</sup> , 96 h	4,5	-	(LÓPEZ ERRASQUÍN; VÁZQUEZ, 2003)

Fonte: elaborada pelo autor, 2017

### 3.3 MATERIAL E MÉTODO

Todos os equipamentos e reagentes utilizados nesse trabalho estão descritos na tabela 3.7.

Tabela 3. 7 - Descrição dos equipamentos e reagentes utilizados

EQUIPAMENTO/REAGENTES	MARCA/MODELO
Ágar	Mimedia
Agitador mecânico	Quimis
Autoclave vertical	Phoenix
Balança analítica	Shimadzu (AY220)
Batata inglesa	
BDA	MERCK
Capela de fluxo laminar	LABCONCO - 36210
Espectrômetro de absorção atômica com chama	GBC Scientific (SensAA Dual)
Estufa	FABBE (119)
Estufa Incubadora BOD	Nova Ética BOD 411D
Forno de microondas doméstico	BRASTEMP (maxi)
Glicose Anidra (Dextrose)	Synth
Incubadora refrigerada com agitação	Tecnal (TE-424)
Nitrato de cádmio	Dinâmica
Padrão (Cd <sup>2+</sup> )	SCP Science
pHmetro	MS Tecnopon Instrumentalização
Ultrapurificador de água	ELGA (Purelab Classic)

#### 3.3.1 Fungos filamentosos tolerantes à cádmio

Os 52 fungos filamentosos isolados do solo (ver descrição no Capítulo 1) foram submetidos à ensaio para seleção das espécies tolerantes a cádmio, em meio de BDA (Batata, Dextrose, Ágar) suplementado com cátions de cádmio (Cd(II) obtidos de solução de nitrato de cádmio tetra hidratado - Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ) na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>.

Foram utilizadas culturas de até sete dias de crescimento, das quais, fragmentos de aproximadamente 1,0 cm foram transferidos para placas de Petri, contendo o meio BDA suplementado com cádmio. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas à 28 °C pelo período de 10 dias.

Todo meio de cultivo, bem como os materiais utilizados nos procedimentos de inoculação dos fungos neste trabalho, foi esterilizado em autoclave a 121 °C pelo período de 20 minutos.

### **3.3.2 Fungos filamentosos resistentes a cádmio**

Após avaliação da tolerância a cádmio, os fungos capazes de desenvolver algum crescimento micelial, foram submetidos ao mesmo experimento descrito no item 3.3.1, porém utilizando o meio BDA com a concentração de cádmio elevada para 500 mg L<sup>-1</sup> (em triplicata).

Esse potencial foi investigado, ainda, através da determinação da concentração mínima de Cd(II) capaz de inibir o crescimento fúngico. Assim, as espécies, que desenvolveram micélio no meio contendo a concentração de Cd(II) em 500 mg L<sup>-1</sup>, foram submetidas a progressivas concentrações do metal.

A concentração mínima de Cd(II) capaz de impedir o desenvolvimento micelial visível dos fungos em meio líquido foi determinada a partir da inoculação dos fungos em meio BD suplementado por diferentes concentrações de Cd(II), variando de 1.000 até 10.000 mg L<sup>-1</sup>.

Frascos Erlenmeyer, contendo o meio, foram inoculados com fragmentos dos fungos obtidos de placas com cerca de sete dias de crescimento. Os frascos foram incubados ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por dez dias. Após o período de incubação, a menor concentração em que não foi observado o crescimento fúngico foi considerada a inibitória.

Esses mesmos fungos, os considerados resistentes, foram submetidos a ensaios que simularam a micorremediação de cádmio, a saber: bioacumulação por fungo ativo e bioabsorção a partir de biomassa morta.

### **3.3.3 Avaliação da capacidade bioacumulativa de cádmio por fungos filamentosos em meio líquido**

Para avaliar a capacidade de bioacumulação dos fungos, um fragmento de aproximadamente 0,5 cm da cultura, com sete dias de crescimento, foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (Batata, Dextrose)

suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de Cd(II), em triplicata, para cada amostra (ZAPOTOCZNY, 2007). Um frasco contendo apenas o meio BD, sem adição de íons Cd(II), e sem inóculo, foi utilizado como branco. Adicionalmente, um frasco contendo meio BD suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de Cd(II), também sem inóculo, foi utilizado como controle da influência da redução da espécie metálica por fatores abióticos.

A concentração inicial dos íons Cd(II), em cada frasco, foi verificada por espectrometria de absorção atômica com chama (EAAC) antes da inoculação.

O cultivo foi realizado ao abrigo da luz em incubadora rotatória a 28° C e 120 rpm pelo período de 10 dias. Após o período de crescimento, o meio foi filtrado em sistema de filtração a vácuo. O meio filtrado foi utilizado para determinação da concentração final dos íons Cd(II) no sobrenadante por EAAC. A biomassa fúngica foi lavada três vezes com água destilada e seca em estufa à temperatura de 80 °C até se obter uma massa constante (aprox. 24h). Após a secagem, a massa da biomassa fúngica foi medida e definida como “biomassa seca” (g).

A porcentagem de Cd(II) sequestrada  $q$  (mg g<sup>-1</sup>) foi calculada pela Equação 6.

$$q = [(C_i - C_f)/m].V \quad \text{Equação 6}$$

Na Equação 6,  $q$  (mg g<sup>-1</sup>) é a absorção de íons metálicos (mg) por grama de biomassa;  $C_i$  (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração inicial de metal na fase líquida;  $C_f$  (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração final de metal na fase líquida;  $m$  (g) é a massa da biomassa seca; e  $V$  (L) é o volume do meio.

### 3.3.4 Adsorção de cádmio por biomassa fúngica

#### 3.3.4.1 Obtenção da biomassa fúngica

O experimento de bioadsorção de Cd(II) por biomassa de fungo inativo foi realizado a partir dos procedimentos e parâmetros estabelecidos no trabalho de Brito (2017).

Foram realizadas inoculações de fragmentos de aproximadamente 1,0 cm das colônias fúngicas com até sete dias de crescimento, em frascos Erlenmeyer de 1 L,

contendo 200 mL de meio BD. Os frascos foram reservados ao abrigo da luz, e o crescimento das colônias no meio líquido se deu em um período de 10 dias.

Após o crescimento, os frascos contendo os micélios foram autoclavados por 40 minutos a 121 °C. Após esse processo de inativação dos fungos, a biomassa foi filtrada, lavada com água destilada e, em seguida, levada à estufa para secagem com aquecimento em torno de 70 °C, até massa constante.

#### 3.3.4.2 Construção das isotermas de adsorção

As isotermas foram construídas para avaliação dos parâmetros termodinâmicos de capacidades máximas de adsorção, fator de separação e energia de adsorção. Para isso, cinquenta miligramas de cada uma das espécies de fungo foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foram adicionados 25,00 mL de solução contendo  $\text{Cd}^{2+}$  nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\text{mg L}^{-1}$  em pH 6. Em seguida, prosseguiu-se com agitação mecânica (200 rpm) durante 1 h. Os dados foram tratados matematicamente pelos modelos matemáticos de Freundlich e Langmuir.

## 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4.1 Fungos filamentosos tolerantes a cádmio

Como mostrado na Tabela 3.8 todas as 52 espécies fúngicas testadas foram capazes de se desenvolver, em diferentes graus, no meio BDA suplementado com cátions de Cd(II). A não letalidade do meio estressado com uma concentração já elevada de cádmio ratifica a grande capacidade adaptativa comumente relacionada a esses microrganismos, uma vez que foram isolados de ambiente não contaminado pelo metal.

Tabela 3. 8 - Influência do Cd (II) nas características macromorfológicas de fungos filamentosos. (continua)

<b>Código</b>	<b>Cepa</b>	<b>Observações macroscópicas</b>
M01	<i>Penicillium</i> sp.	O micélio apresentou um desenvolvimento mais lento e uma leve despigmentação e diminuição na produção de esporos, porém, a espécie continuou produzindo pigmento amarelo difuso no meio.
M02	<i>Penicillium</i> sp.	Houve uma discreta mudança na coloração e alteração na velocidade do crescimento da colônia. O isolado demonstra considerável tolerância ao cádmio.
M03	<i>Penicillium</i> sp.	Mantiveram-se preservadas a textura de camurça e a superfície lisa do micélio, mas, ocorreu modificação radical na coloração de lilás para branco.
M04	<i>Penicillium</i> sp.	Não ocorreram alterações morfológicas expressivas, foram preservadas a textura de camurça e a superfície lisa, mas o tom da coloração do micélio foi levemente modificado.
M05	Não identificado	O aspecto da colônia foi completamente modificado. Sua coloração originalmente branca passou a ser verde e a textura superficial lisa. Além disso, houve a produção de pigmento verde amarelado difuso no meio.
M06	<i>Fusarium</i> sp.	O aspecto da colônia não foi alterado, porém, a velocidade de crescimento da colônia foi muito afetada.
M09	Não identificado	Afetou, principalmente, a velocidade de crescimento da colônia.
M012	<i>Aspergillus</i> sp.	Causou pequena variação na coloração da colônia e na velocidade de crescimento do fungo.
M013	<i>Fusarium</i> sp.	A coloração e textura da colônia foram altamente modificadas, a espécie passou a produzir um pigmento de coloração amarelada difuso no meio.
M015	<i>Fusarium</i> sp.	O aspecto do micélio foi quase inalterado, mas a velocidade do crescimento foi significativamente diminuída.
M016	<i>Aspergillus</i> sp.	Houve uma total supressão na produção de esporos aéreos pretos, o micélio rasteiro passou a apresentar uma coloração esverdeada com lentidão de crescimento.
M017	<i>Aspergillus</i> sp.	Houve uma total supressão na produção de esporos aéreos pretos, o micélio rasteiro passou a apresentar uma coloração esverdeada com lentidão de crescimento.
M020	Não identificado	Causou completa modificação na textura, na coloração e na velocidade de crescimento do micélio.
M021	<i>Penicillium</i> sp.	Foram modificadas completamente a textura, a coloração e a velocidade de crescimento do micélio. Ocorreu, ainda, a supressão da produção e difusão de pigmento amarelo no meio.
M022	<i>Penicillium</i> sp.	Ocorreu um aumento significativo na produção de esporos aéreos, haja vista a produção de um grande número de colônias.

Tabela 3. 8 - Influência do Cd(II) nas características macromorfológicas de fungos filamentosos. (conclusão)

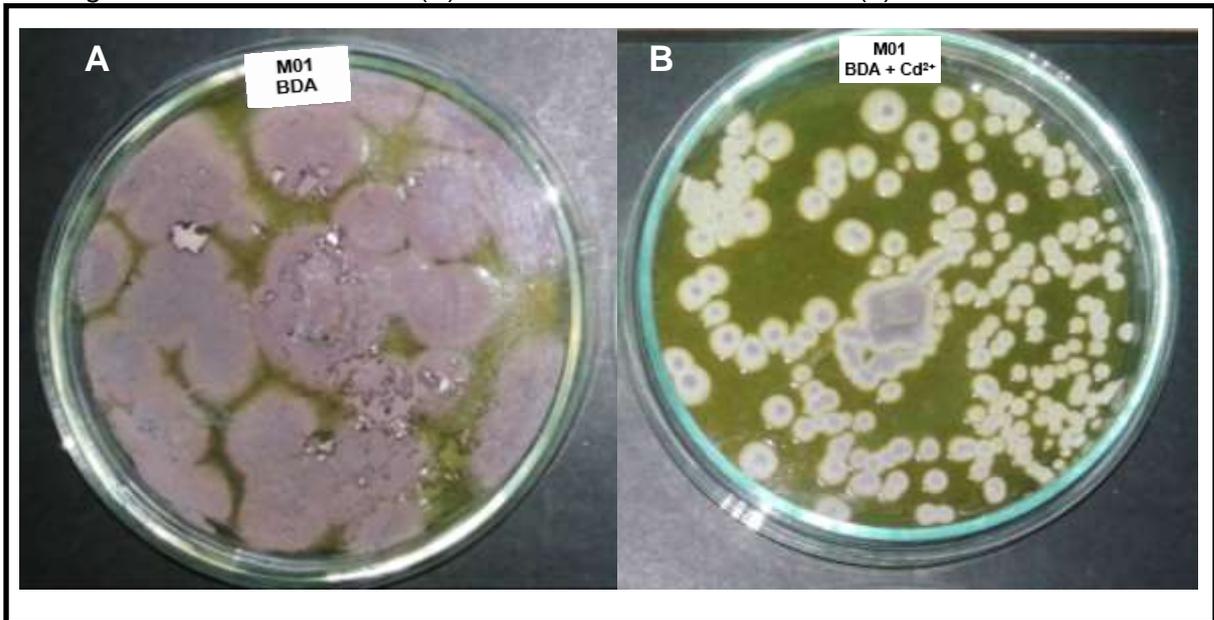
Código	Cepa	Observações macroscópicas
M023	<i>Penicillium</i> sp.	Houve completa modificação na textura, na coloração e na velocidade de crescimento do micélio.
M025	<i>Fusarium</i> sp.	Levou à grande diminuição na velocidade do crescimento e significativa mudança na coloração e textura da colônia. Houve a indução da produção e difusão de pigmento avermelhado para o meio.
M026	<i>Fusarium</i> sp.	Houve completa modificação na textura, na coloração e na velocidade de crescimento do micélio.
M028	<i>Aspergillus</i> sp.	Ocorreu a redução da esporulação e uma grande diminuição na velocidade do crescimento.
M029	<i>Aspergillus</i> sp.	
M030	<i>Aspergillus</i> sp.	
M031	<i>Aspergillus</i> sp.	
M032	<i>Aspergillus</i> sp.	
M033	<i>Aspergillus</i> sp.	
M034	<i>Aspergillus</i> sp.	
M035	<i>Aspergillus</i> sp.	
M036	<i>Aspergillus</i> sp.	
M037	<i>Aspergillus</i> sp.	
M038	<i>Aspergillus</i> sp.	
M039	<i>Aspergillus</i> sp.	
M040	<i>Aspergillus</i> sp.	
M041	<i>Aspergillus</i> sp.	
M042	<i>Aspergillus</i> sp.	Houve uma total supressão na produção de esporos aéreos pretos, o micélio rasteiro passou a apresentar uma coloração amarelada com leve diminuição na velocidade do crescimento.
M043	<i>Aspergillus</i> sp.	
M044	<i>Aspergillus</i> sp.	
M045	<i>Aspergillus</i> sp.	
M046	<i>Aspergillus</i> sp.	
M047	<i>Aspergillus</i> sp.	
M048	<i>Aspergillus</i> sp.	
M050	<i>Aspergillus</i> sp.	
M051	<i>Aspergillus</i> sp.	

Fonte: dados da pesquisa (2019).

Essas observações estão condizentes, também, com resultados observados em trabalhos semelhantes, como o relato da influência do cádmio no atraso das fases de desenvolvimento do fungo *Cunninghamella elegans* (DE LIMA et al., 2013).

A Figura 3.3 apresenta o efeito da presença do metal no meio de crescimento para a morfologia do fungo M01 (*Penicillium* sp.), através da comparação com a espécie desenvolvida em meio livre do estresse metálico. O Apêndice C (p. 244) apresenta esta comparação para todos os isolados testados.

Figura 3. 3 - Comparação entre os aspectos macroscópicos do desenvolvimento da colônia do fungo M01 no meio controle (A) e no meio estressado com Cd(II).



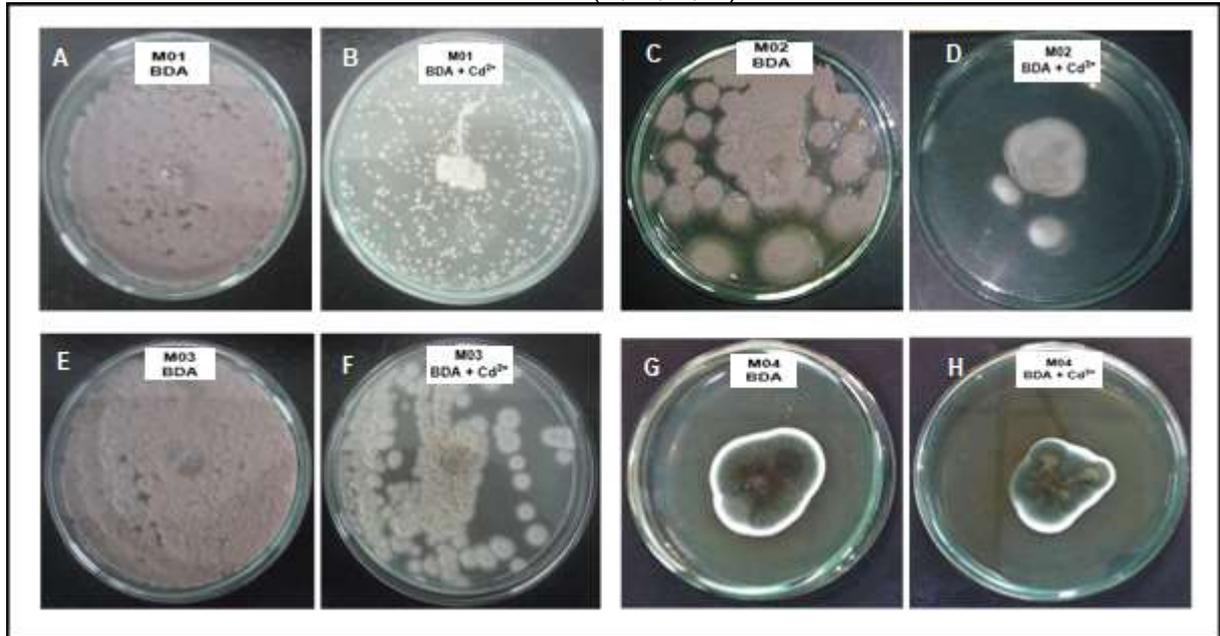
Fonte: imagem do próprio autor (2019).

### 3.4.2 Fungos filamentosos resistentes a cádmio

Com os resultados do teste de tolerância, as 18 espécies descritas isoladamente na Tabela 3.8, além de um representante de cada agrupamento, também descritos na tabela (as espécies de *Aspergillus* M28 do grupo dos *flavus* e M42 do grupo dos *niger*), perfazendo, assim, o total de 20 isolados, foram submetidas ao teste de resistência. O teste consistiu no cultivo dos fungos selecionados em meio estressado com Cd(II) na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>.

Após dez dias de incubação, quatro espécies entre as vinte testadas, foram capazes de desenvolver colônias no meio estressado por cádmio. A Figura 3.4 apresenta uma comparação entre os fungos cultivados em meio BDA controle com aqueles expostos ao meio BDA estressado com cádmio. Observa-se que apenas os isolados, M01, M02, M04 e M04, quatro espécies pertencentes ao gênero *Penicillium*, mostraram-se resistentes à concentração elevada de Cd(II) no meio. É possível inferir que os quatros isolados apresentam grande potencial de resistência ao cádmio.

Figura 3. 4 - Imagens dos fungos resistentes a Cd(II). Colônias em meio controle (A; C; E; G) e colônias em meio estressado com o metal (B; D; F; H).



Fonte: imagem do próprio autor (2019).

Essas quatro espécies foram, em seguida, submetidas a teste para determinação da concentração de Cd(II), que não permitisse o desenvolvimento de suas colônias. Na Tabela 3.9, estão descritos os resultados para o referido teste. Nota-se que, com exceção do fungo M04, todas as espécies cresceram em concentrações de Cd(II) iguais ou superiores a 4.000 mg L<sup>-1</sup>.

Tabela 3. 9 - Concentração Inibitória Mínima de Cd<sup>2+</sup> às espécies de fungos resistentes.

Código	Espécie	CIM (mg L <sup>-1</sup> )
M01	<i>Penicillium</i> sp.	4.000
M02	<i>Penicillium</i> sp.	9.000
M03	<i>Penicillium</i> sp.	6.000
M04	<i>Penicillium</i> sp.	500

Fonte: dados da pesquisa (2019).

A habilidade de resistência a concentrações extremamente altas de Cd(II), exibida por essas espécies de *Penicillium*, sobretudo o M02 (CIM 9000 mg L<sup>-1</sup>), pode indicar que possuem um mecanismo especializado de defesa contra a acumulação de metais tóxicos e de sobrevivência em ambientes estressados por estes materiais. Portanto, fez-se necessários os ensaios de verificação da capacidade de acumulação

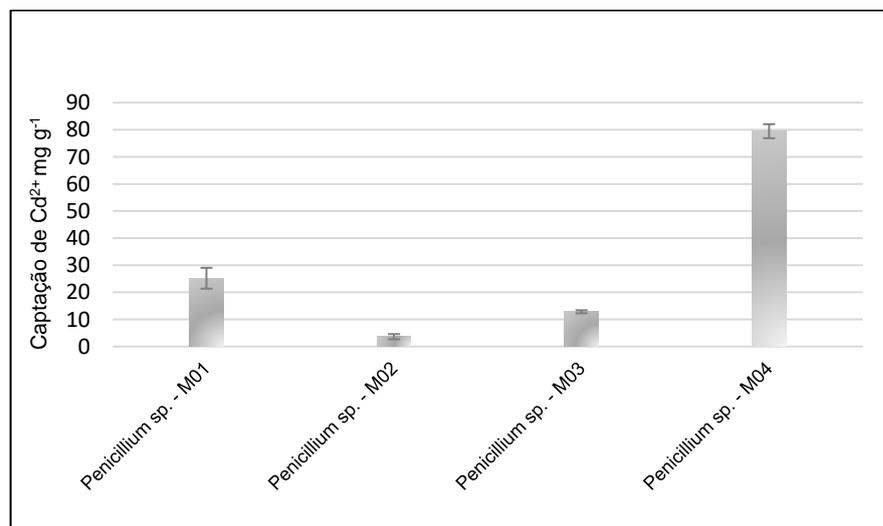
dos íons metálicos por células viáveis, bem como da capacidade de sorção destes íons pela biomassa.

### 3.4.3 Bioacumulação de cádmio por fungos ativos em meio líquido

A concentração final de cádmio do experimento controle foi igual à medida inicialmente, o branco também permaneceu inalterado sem desenvolvimento de microrganismos, garantido que os resultados observados, quanto à redução da concentração de cádmio, estão ligados à ação dos fungos estudados e não sofreram influência de fatores diversos, como a presença de outros microrganismos.

Com relação às quatro espécies, que tiveram seu potencial de bioacumulação avaliado, foram observadas diferenças significativas quanto a essa habilidade, sendo que a espécie *Penicillium* sp. M04 (79,48 mg g<sup>-1</sup>) apresentou o potencial mais elevado, seguido das espécies *Penicillium* sp. M01 (25,19 mg g<sup>-1</sup>), *Penicillium* sp. M03 (12,82 mg g<sup>-1</sup>) e *Penicillium* sp. M02 (3,63 mg g<sup>-1</sup>). Esses resultados estão plotados no gráfico da Figura 3.5.

Figura 3. 5 - Bioacumulação de Cd(II) por diferentes espécies de *Penicillium*.



Fonte: dados da pesquisa, 2019

Considerando que, na bioacumulação, as espécies, neste caso específico, os cátions Cd(II), alcançam a região intracelular por meio de processos de transporte de metais que são essenciais ao metabolismo, sobretudo em substituição ao Mg(II), por conta de propriedades químicas próximas, e considerando ainda que o cádmio

apresenta tempo de meia vida longa, sendo altamente cumulativo e, conseqüentemente tóxico, é possível inferir que a espécie com maior habilidade de bioacumulação também tem o metabolismo mais afetado na presença do metal.

De fato, ao compararmos os resultados obtidos neste ensaio de potencial bioacumulativo, com os testes de resistência apresentados no tópico anterior (3.5.2 – Fungos filamentosos resistentes a cádmio), experimento em que as espécies também foram submetidas ao desenvolvimento em meio líquido suplementado com Cd (II), constata-se que os dados estão totalmente consistentes com esta afirmação.

A espécie *Penicillium* sp. M04 apresentou menor potencial de resistência, desenvolvendo micélio em meio contendo Cd(II) até 500 mg L<sup>-1</sup>. Inversamente, esta espécie apresentou o maior potencial de bioacumulação (74,48 mg g<sup>-1</sup>), superior ao resultado de 63,02 mg g<sup>-1</sup> apresentado pelo *Penicillium chrysogenum* em estudo realizado por Xu e colaboradores (2015). Contudo, a maior absorção/internalização de Cd(II) por esta espécie traduz-se, portanto, em um efeito mais nocivo/tóxico, interferindo expressivamente no seu desenvolvimento.

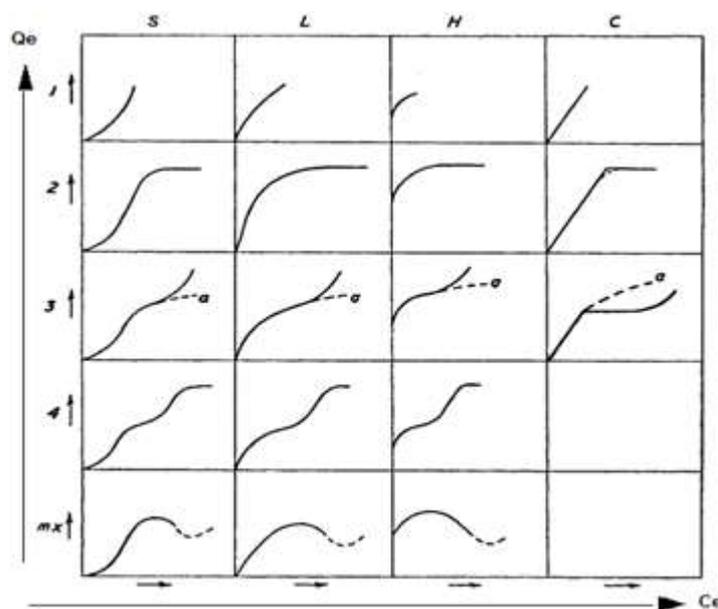
Por outro lado, os resultados observados para a espécie *Penicillium* sp. M02 nos dois experimentos também corroboram com a constatação do efeito nocivo do Cd(II) às células fúngicas. O fato de demonstrar uma baixíssima capacidade de acumulação de Cd(II) indica que a espécie possui um sistema de defesa hábil contra esse cátion, e isso explica a mais alta capacidade de resistência, conseguindo desenvolver micélio em meio suplementado com cádmio em concentração de até 9.000 mg L<sup>-1</sup>.

Para além desta comparação, é preciso adicionar ponderações quanto à eficiência das espécies em processos de biorremediação e isso pode ser traduzido pela relação entre as habilidades de resistência e bioacumulação e a matriz a ser remediada. Neste sentido, uma espécie com baixa resistência e alta habilidade de bioacumulação, como é o caso do isolado M04, é desejável em situações de baixa concentração de contaminante e em pequenas áreas. Em matrizes de grande extensão e com concentração de contaminantes mais altas, espécies como o isolado M01 podem ser mais eficientes, uma vez que este apresentou grande resistência e uma apreciável habilidade de acumulação de íons metálicos.

### 3.4.4 Adsorção de cádmio por biomassa fúngica

Transcorrido o período de incubação/desenvolvimento das colônias, as biomassas das quatro espécies foram obtidas e empregadas no ensaio de construção das isotermas de adsorção e analisadas de acordo com os parâmetros apresentados na Figura 3.6.

Figura 3. 6 - Classificação das isotermas de adsorção segundo Giles e colaboradores (1960).



Fonte: Giles e colaboradores (1960)

De acordo com essa divisão (GILES et al., 1960), os padrões dos grupos e respectivos subgrupos das isotermas relaciona-se com a natureza da inclinação no início da curva. As classes apresentadas S, L, H e C correspondem, respectivamente, a: indicação de orientação vertical das moléculas adsorvidas; indicação de moléculas adsorvidas planas ou verticalmente por atração intermolecular forte; indicação de solutos adsorvidos com micelas iônicas e troca de íons de alta afinidade por íons de baixa afinidade; indicação de solutos com maior poder de penetração em relação ao solvente.

Neste trabalho, as isotermas construídas a partir dos processos adsortivos de Cd(II) pela biomassa de cada um dos quatro isolados apresentaram a tendência de classificação do tipo H, variando entre os subgrupos H2 (*Penicillium* sp. M01), Hmx

(*Penicillium* sp. M02) e H4 (*Penicillium* sp. M03 e *Penicillium* sp. M04). A curva H é definida por Giles e colaboradores (1960) como um caso especial de curva L e, neste caso, a afinidade do soluto é muito alta de modo que, em soluções diluídas, é totalmente adsorvido.

As isotermas foram obtidas separadamente para cada espécie fúngica. Os valores de  $C_e$  (Concentração de Cd(II) no equilíbrio) e  $Q_e$  (massa retida de cádmio em uma massa fixa de adsorvente), obtidos neste trabalho, estão apresentados na Tabela 3.10.

Tabela 3. 10 - Valores de  $C_e$  (mg L<sup>-1</sup>) e  $Q_e$  (mg g<sup>-1</sup>) para construção das isotermas de adsorção de Cd(II) pela biomassa das espécies de *Penicillium*, isolados M01, M02, M03 e M04, n=3.

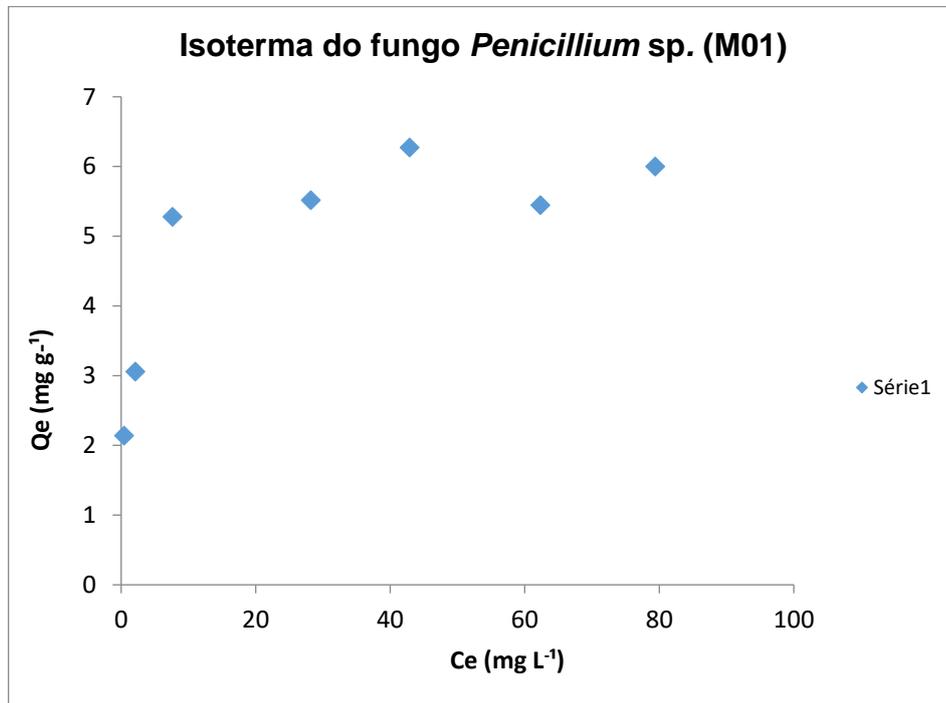
Conc. inicial (mg L <sup>-1</sup> )	<i>Penicillium</i> sp. M01		<i>Penicillium</i> sp. M02		<i>Penicillium</i> sp. M03		<i>Penicillium</i> sp. M04	
	Q <sub>e</sub>	C <sub>e</sub>						
5	2,14	0,45	1,55	1,63	1,84	0,38	1,88	0,31
10	3,06	2,13	1,90	4,44	3,37	2,47	3,82	1,58
20	5,28	7,63	3,71	10,76	3,97	10,89	5,92	6,98
40	5,51	28,21	5,41	28,42	5,70	24,55	6,20	23,55
60	6,27	42,89	3,83	47,77	7,92	40,67	9,19	37,31
80	5,44	62,33	3,17	66,89	11,42	50,37	12,26	48,70
100	5,99	79,41	2,60	86,21	6,77	82,80	7,74	80,86

Fonte: dados da pesquisa, 2018

Os Desvios-padrão Relativos (DPR) formam todos menor ou igual a 36,42

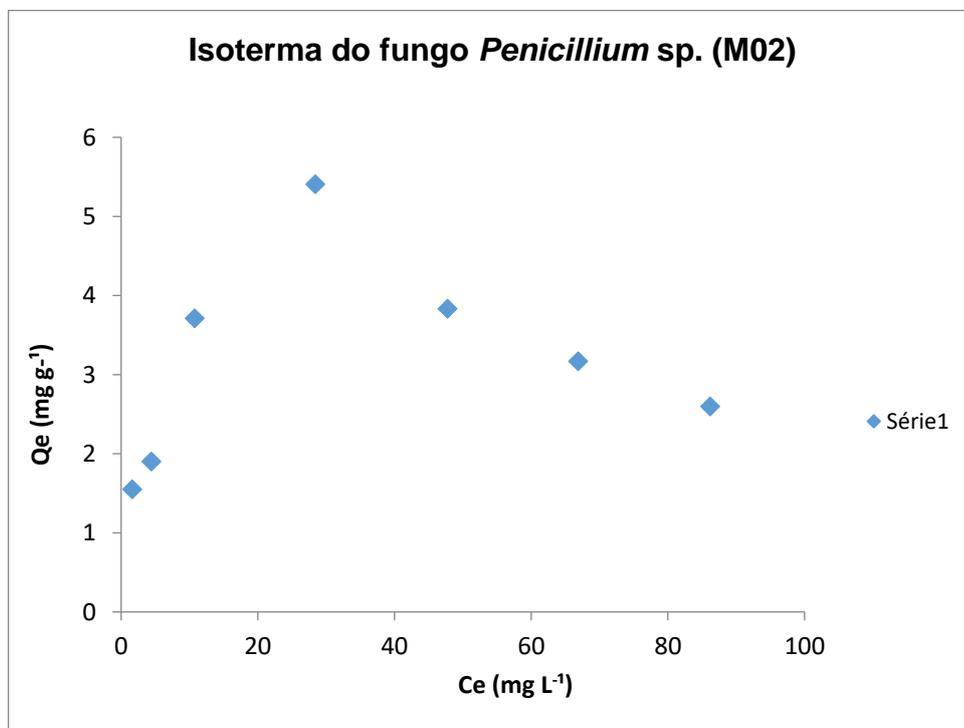
O resultado da construção das isotermas de adsorção de cádmio estão representados nos gráficos da Figura 3.7 (para o fungo *Penicillium* sp. M01), Figura 3.8 (para o fungo *Penicillium* sp. M02), Figura 3.9 (para o fungo *Penicillium* sp. M03) e Figura 3.10 (para o fungo *Penicillium* sp. M04).

Figura 3. 7 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre *Penicillium* sp. M01.



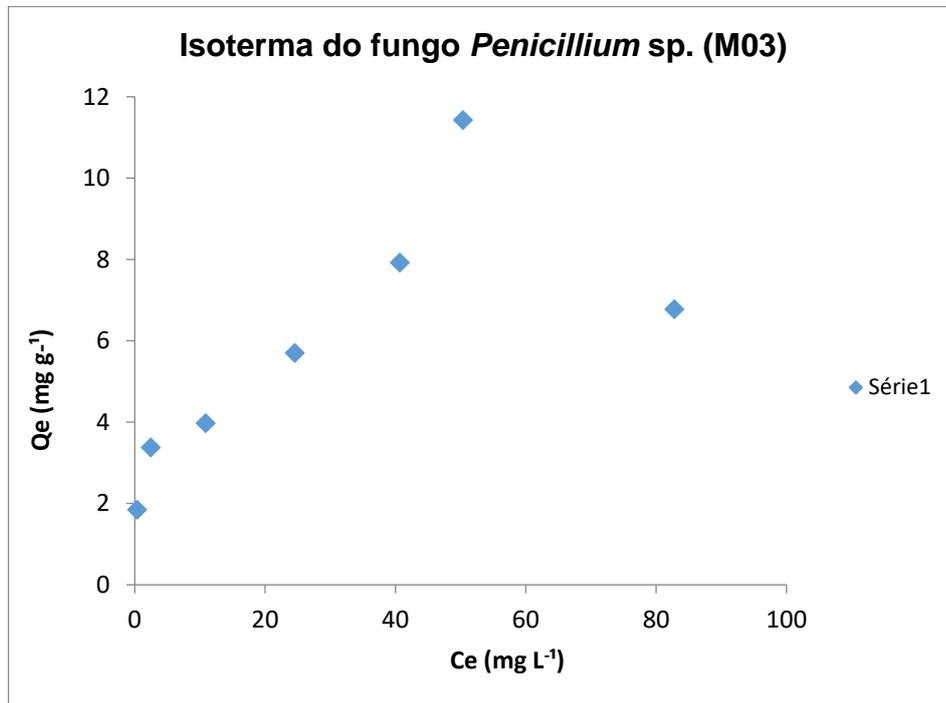
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 3. 8 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre *Penicillium* sp. M02.



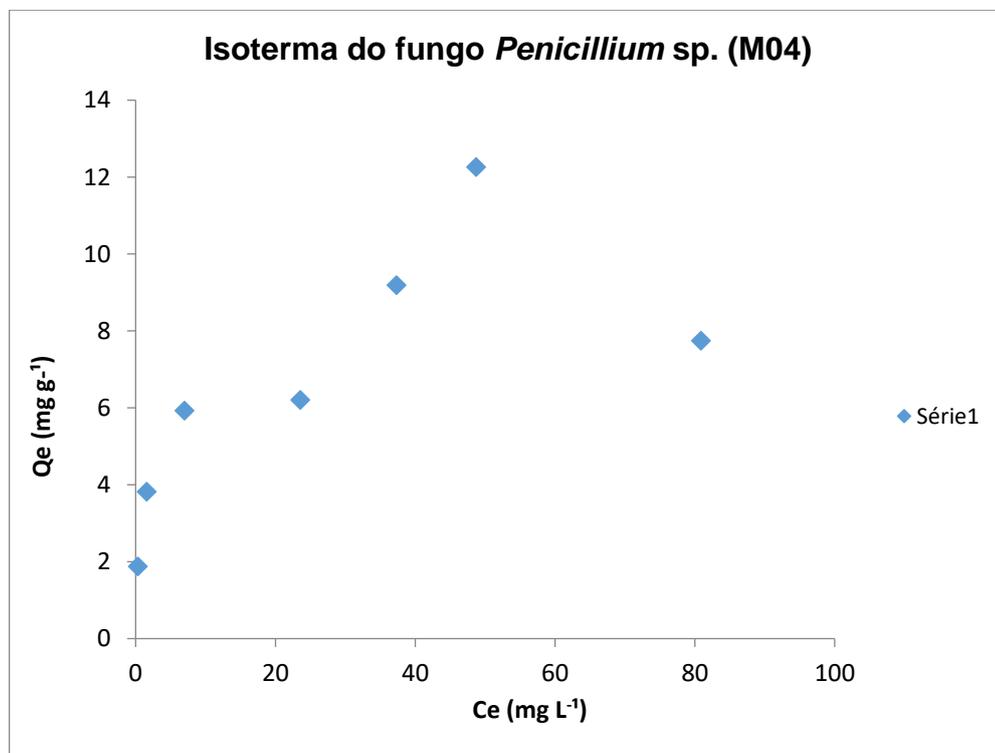
Fonte: dados da pesquisa, 2018.

Figura 3. 9 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre *Penicillium* sp. M03.



Fonte: dados da pesquisa (2018).

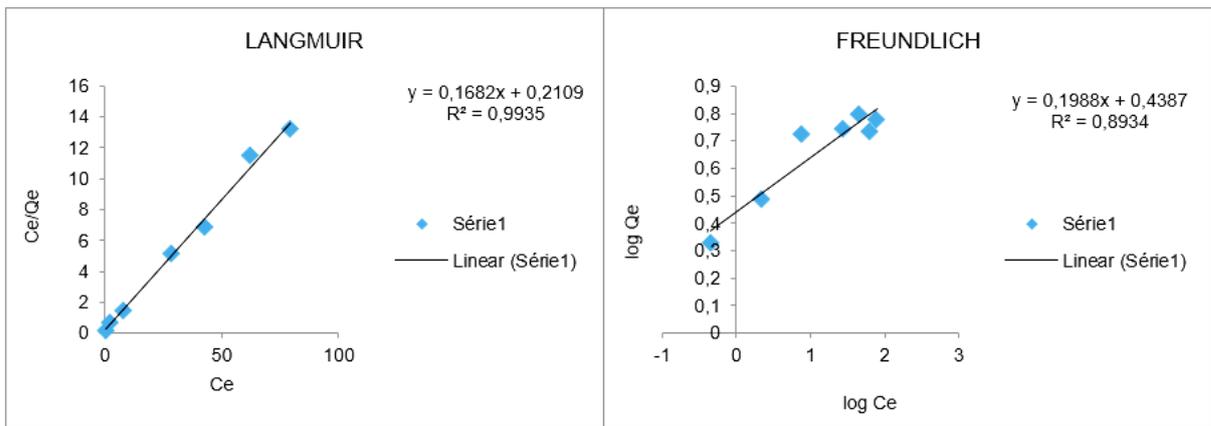
Figura 3. 10 - Isoterma de adsorção de cádmio sobre *Penicillium* sp. M04.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

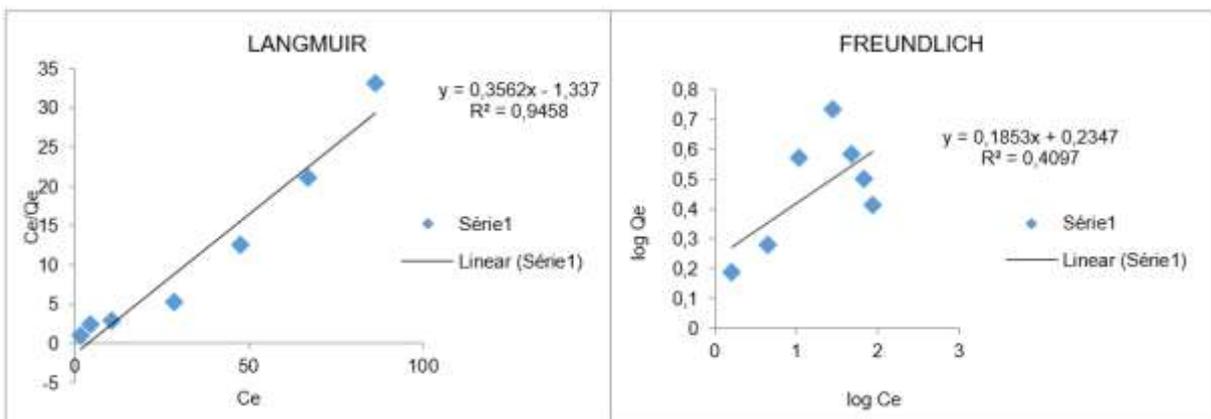
As representações gráficas das linearizações das isotermas de adsorção de cádmio são mostradas nas Figuras 3.11, para o fungo *Penicillium* sp. M01, 3.12, para o fungo *Penicillium* sp. M02, 3.13, para o fungo *Penicillium* sp. M03, e 3.14, para o fungo *Penicillium* sp. M04.

Figura 3. 11 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para *Penicillium* sp. M01 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.



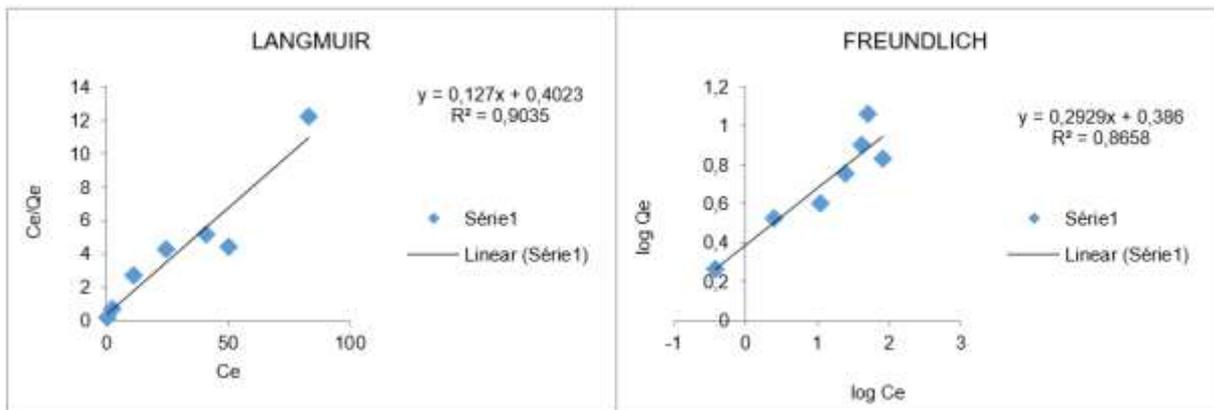
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 3. 12 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para *Penicillium* sp. M02 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.



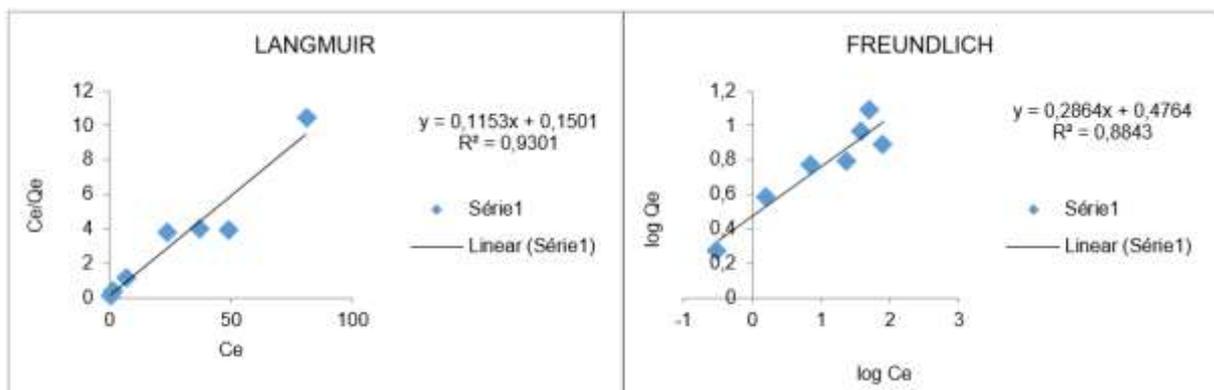
Fonte: dados da pesquisa, 2018.

Figura 3. 13 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para *Penicillium* sp. M03 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.



Fonte: dados da pesquisa, 2018.

Figura 3. 14 - Linearização da isoterma da adsorção de cádmio para *Penicillium* sp. M04 pelos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich.



Fonte: dados da pesquisa (2018).

O ajustamento de um modelo estatístico é dado pelo coeficiente de determinação,  $R^2$ , que varia de 0 a 1, sendo que valores mais próximos de 1 para um determinado modelo, indicam, em porcentual, o melhor ajuste do modelo matemático empregado aos dados adsorptivos experimentais.

Nos gráficos da linearização das isotermas de adsorção de cádmio frente a biomassa dos fungos estudados (Figuras 2.12 a 2.14), também são apresentados os valores de  $R^2$  para os dois modelos analisados (Langmuir e Freundlich). Nota-se, contudo, a partir desse parâmetro ( $R^2$ ), que o modelo de Langmuir consegue explicar melhor a linearização das isotermas das quatro espécies (YE et al., 2015b).

A partir dos valores obtidos da equação da reta apresentada nos respectivos gráficos de linearização das isotermas, pelo modelo de Langmuir, foi possível calcular o valor de  $R_L$  (Tabela 2.11), utilizando a Equação 3, onde  $C_0$  corresponde ao valor de maior concentração inicial da isoterma e  $b$  a constante de Langmuir relacionada à energia de adsorção. O valor de  $R_L$  indica a natureza da isoterma como mostra a Tabela 3.4 (FOO; HAMEED, 2010). Neste estudo, o ponto de maior concentração inicial da solução preparada foi  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo os valores médios das replicatas descritos na Tabela 3.11.

Tabela 3. 11 - Valores estimados dos parâmetros obtidos da isoterma de Langmuir.

Espécie fúngica	$C_0$ (mg L <sup>-1</sup> )	B	$R_L$
<i>Penicillium</i> sp. (M01)	91,40	0,21	0,05
<i>Penicillium</i> sp. (M02)	91,40	1,34	0,008
<i>Penicillium</i> sp. (M03)	96,40	0,40	0,03
<i>Penicillium</i> sp. (M04)	96,40	0,15	0,06

Fonte: dados da pesquisa, 2018

Com base na descrição apresentada na Tabela 3.4, da classificação das isotermas com relação ao valor de  $R_L$ , todos os sistemas estudados podem ser classificados como processos adsorptivos favoráveis, uma vez que os valores calculados estão compreendidos entre 0 e 1.

Como descrito anteriormente, os valores de  $R^2$  demonstraram que o modelo de Langmuir consegue explicar melhor os processos adsorptivos de cádmio sobre as biomassas das quatro espécies fúngicas estudadas. Contudo, com exceção da espécie *Penicillium* sp. (M02), que apresentou uma grande diferença entre os dois modelos, podemos afirmar que o modelo de Freundlich também consegue explicar os processos, isso é corroborado pelos valores estimados de  $n$  (Tabela 3.12).

Tabela 3. 12 - Valores estimados dos parâmetros obtidos da isoterma de Freundlich

Espécie fúngica	$K_f$ (mg g <sup>-1</sup> ) (L mg <sup>-1</sup> ) <sup>1/n</sup>	$n$
<i>Penicillium</i> sp. (M01)	0,4	5,0
<i>Penicillium</i> sp. (M02)	-----	-----
<i>Penicillium</i> sp. (M03)	0,4	3,4
<i>Penicillium</i> sp. (M04)	0,3	3,7

Fonte: dados da pesquisa, 2018

Pelos valores de  $n$ , descritos da Tabela 3.12, os quais se encontram compreendidos entre 1 e 10, evidencia-se que, também, de acordo com o modelo de Freundlich, os processos adsorptivos aqui estudados, são favoráveis.

### 3.5 CONCLUSÃO

A realidade da contaminação ambiental por metais tóxicos exige cada vez o empenho de energia e inovações através de pesquisas com objetivo de eliminar ou mesmo minimizar seus efeitos. Com isso, observa-se, de forma crescente, o surgimento de alternativas de remediação fundamentadas no uso de organismos diversos. Assim, a fitorremediação e a biorremediação têm sido largamente estudadas, sobretudo, por se mostrarem mais eficientes e economicamente viáveis em comparação com os métodos tradicionais.

Este trabalho apresentou um levantamento dos efeitos tóxicos dos metais cádmio e chumbo ao ambiente, bem como um resumo das publicações que empregaram estratégias de bio sorção e bioacumulação desses metais por diferentes fungos. Esses trabalhos demonstram a excelente capacidade que as mais diversas espécies fúngicas possuem de promover a biotransformação e remoção de metais tóxicos em solos e ambientes aquáticos.

O estudo de fungos isolados de solo não contaminado em processos de resistência e bioacumulação de cádmio levou ao conhecimento de espécies de *Penicillium* com alta habilidade de resistência ao metal. Além disso, suas biomassas mostraram-se eficientes para o emprego em sistemas adsorptivos.

Estes resultados são extremamente significativos e inspiram novas investigações neste sentido. O isolamento de novas espécies fúngicas, bem como o estudo do potencial das conhecidas, permitirá a ampliação de possibilidades de uso de materiais biológicos em processos de remediação de metais tóxicos e de outros poluentes ambientais.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIN, H.; LLADOS, F. **TOXICOLOGICAL PROFILE FOR LEAD**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.

ABBAS, S. H. et al. Biosorption of Heavy Metals: Review. **Journal of Chemical Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 74–102, 2014.

ACAR, Y. B.; ALSHAWABKEH, A. N. Recently Made Sigmficmt. **Society**, v. 27, n. 13, p. 2638, 1993.

ADERHOLD, D.; WILLIAMS, C. J.; EDYVEAN, R. G. J. The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 1–6, 1996.

AHTIAINEN, J. et al. Microbial Toxicity Tests and Chemical Analysis as Monitoring Parameters at Composting of Creosote-Contaminated Soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 2, p. 323–329, 2002.

AKCIL, A. et al. A review of approaches and techniques used in aquatic contaminated sediments: Metal removal and stabilization by chemical and biotechnological processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 86, p. 24–26, 2015.

AKINKUNMI, W. et al. Factors affecting toxic lead(II) ion bioremediation by *Fusarium equiseti* isolated from the mangrove soil environment of southeast Borneo. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 11, p. 215–222, 2015.

ALENCAR, F. L. S. DE; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S. DO. The use of bacterial bioremediation of metals in aquatic environments in the twenty-first century: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 20, p. 16545–16559, 2017.

ALI, A. et al. Mycoremediation of Potentially Toxic Trace Elements—a Biological Tool for Soil Cleanup: A Review. **Pedosphere**, v. 27, n. 2, p. 205–222, 2017.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.

ÁLVAREZ, F. F. et al. Physical speciation of arsenic , mercury , lead , cadmium and nickel in inhalable atmospheric particles. v. 524, p. 33–40, 2004.

AMMARI, T. G. et al. Accepted Manuscript. p. 1–44, 2016.

ARICA, M. Y.; KAÇAR, Y.; GENÇ, Ö. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: Preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 2, p. 121–129, 2001.

AWASTHI, A. K.; PANDEY, A. K.; KHAN, J. Biosorption an innovative tool for bioremediation of metal-contaminated municipal solid waste leachate: optimization

and mechanisms exploration. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 4, p. 729–742, 2017.

AYRES, R. U. Toxic heavy metals: materials cycle optimization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 3, p. 815–820, 1992.

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, n. 11, p. 1–18, 2016.

BAES, C. F.; MESMER, R. E. **The Hydrolysis of Cations**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1976.

BAKER, W. R. **Membrane Technology and Applications**. 3<sup>o</sup> ed. Newark: Wiley, 2012.

BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y. Removal of heavy mercury(II), cadmium(II) and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets. **Chemical Engineering Journal**, v. 143, n. 1–3, p. 133–140, 2008.

BERMEJO, P.; JUAN, J. A. C. DE. Analytical procedures for the lead determination in biological and environmental samples. In: CASAS, J. S.; SORDO, J. (Eds.). **Lead: Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects**. Oxford: Elsevier, 2006. p. 229–338.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Effects of Cadmium Exposure in Humans. In: FOULKES, E. C. (Ed.). **Cadmium**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 135–178.

BISHNOI, N. R.; GARIMA, A. Fungus - An alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 2, p. 93–100, 2005.

BOOPATHY. Factors limiting bioremediation technology. **Bioresour Technol**, v. 74, p. 63–67, 2000.

BRASIL. Resolução CONAMA n 316 de 29 de outubro de 2002. Dispõe sobre procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos. . 2002, p. 92–95.

BRASIL. Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 357 de 17 de março de 2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. DOU 18 de março,. . 2005, p. 58–63.

BRASIL. Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 386 de 27 de dezembro de 2006. Altera o art. 18 da Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 316, de 29 de outubro de 2002. . 2006, p. 665.

BRASIL. Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 401 Estabelece os limites máximos de chumbo, cádmio e mercúrio para pilhas e baterias comercializadas no território nacional e os

critérios e padrões para o seu gerenciamento ambientalmente adequado. . 2008 a, p. 108–109.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 396 de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas. . 2008 b, p. 64–68.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 410 de 04 de maio de 2009, Estabelece os limites máximos de chumbo, cádmio e mercúrio para pilhas e baterias comercializadas no território nacional e os critérios e padrões para o seu gerenciamento ambientalmente adequados. . 2009 a, p. 106.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias. 2009 b, p. 81–84.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 424 de abril de 2010. Revoga o parágrafo único do art. 16 da Resolução CONAMA nº 401/2008. 2010, p. 113.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. 2011, p. 89.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 460. Altera a Resolução CONAMA n. 420, de 28 de dezembro de 2009, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e dá outras providências. 2013, p. 153.

BRITO, G. F. M. **Biorremediação de meios aquosos contendo metais tóxicos por bioissorção utilizando fungos**. 97 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada. Universidade do Estado da Bahia, Salvador, 2017.

CARLOS, F. S. et al. A Comparison of Microbial Bioaugmentation and Biostimulation for Hexavalent Chromium Removal from Wastewater. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 6, 2016.

CASAS, J. S.; SORDO, J. An overview of the historical importance, occurrences isolation, properties and applications of lead. In: CASAS, J. S.; SORDO, J. (Eds.). **Lead: Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects**. 1. ed. Oxford: ELSEVIER, 2006. p. 1–40.

ÇERIBASI, I. H.; YETIS, U. Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by Phanerochaete chrysosporium from a binary metal system–kinetics. **Water SA**, v. 27, n. 1, p. 15–20, 2004.

CHAKRABORTY, S. et al. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: Its possible role in cadmium bioremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 106, p. 46–53, 2014.

CHAKRABORTY, S.; MUKHERJEE, A.; DAS, T. K. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: Animplication of bioremediation of lead from liquid media. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 84, p. 134–142, 2013a.

CHAKRABORTY, S.; MUKHERJEE, A.; DAS, T. K. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: Animplication of bioremediation of lead from liquid media. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 84, p. 134–142, 2013b.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. **Environment International**, v. 36, n. 3, p. 299–307, 2010.

CIHANGIR, N.; SAGLAM, N. Short Communication Removal of Cadmium by. **Analysis**, v. 19, p. 171–177, 1999.

CREA, F. et al. Speciation of Cadmium in the Environment. In: ASTRID, S.; HELMUT, S.; ROLAND, S. (Eds.). . **Cadmium: From Toxicity to Essentiality**. 11. ed. [s.l: s.n.]. p. 66–84.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 30, n. 1, p. 38–70, 2005.

CUNNINGHAM, S. D.; BERTI, W. R. Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. n. October, p. 207–212, 1993.

DAVIDSON, A. J.; BINKS, S. P.; GEDIGA, J. Lead industry life cycle studies: environmental impact and life cycle assessment of lead battery and architectural sheet production. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 21, n. 11, p. 1624–1636, 2016.

DE LIMA, M. et al. Cadmium Tolerance and Removal from *Cunninghamella elegans* Related to the Polyphosphate Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7180–7192, 28 mar. 2013.

DENG, Y. et al. Screening and Identifying a Cadmium-resistant Fungus and Characterizing its Cadmium Adsorption. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 3, p. 1011–1021, 2017.

DENG, Z. et al. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 2346–2357, 2014.

DEY, P. et al. Comparative performance evaluation of multi-metal resistant fungal strains for simultaneous removal of multiple hazardous metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 679–685, 2016.

DEY, S. et al. Sorption of heavy metals by four basidiomycetous fungi. **Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 5, p. 273–277, 1995.

- DHANKHAR, R.; HOODA, A. Fungal biosorption-an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. **Environmental Technology**, v. 32, n. 5, p. 467–491, 2011.
- DING, Z. et al. Isolation of heavy metal-resistant fungi from contaminated soil and co-culturing with rice seedlings. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 28, p. 1080–1085, 2016.
- DUCKART, E. C.; WALDRON, L. J.; DONNER, H. E. Selenium uptake and volatilization from plants growing in soil. **Soil Science**, v. 53, n. 2, p. 94–99, 1992.
- DUFFUS, J. H. “HEAVY METALS”—A MEANINGLESS TERM? ( IUPAC Technical Report ) ( IUPAC Technical Report ). **Pure Appl. Chem**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.
- DURSUN, A. Y. et al. Bioaccumulation of copper ( II ), lead ( II ) and chromium ( VI ) by growing *Aspergillus niger*. v. 38, p. 1647–1651, 2003.
- DUSHENKOV, V. et al. Rhiofiltration : The Use of Plants To Remove Heavy Metals from Aqueous Streams. **Environment Science and Technology**, v. 29, n. 5, p. 1239–1245, 1995.
- DYATLOV, V. A.; LAWRENCE, D. A. Neonatal Lead Exposure Potentiates Sickness Behavior Induced by *Listeria monocytogenes* Infection of Mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, p. 477–492, 2002.
- ECCLES, H. Removal of heavy metals from effluent streams - Why select a biological process? **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 35, n. 1–3, p. 5–16, 1995.
- FAZLI, M. M. et al. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p. 19, 2015.
- FLORA, S. J. S.; FLORA, G.; SAXENA, G. Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. In: CASAS, J. S.; SORDO, J. (Eds.). . **Lead: Chemistry, Analytical Aspects, Environmental Impact and Health Effects**. 1. ed. Oxford: ELSEVIER, 2006. p. 158–228.
- GABRIEL, J.; VOSÁHLO, J.; BALDRIAN, P. Biosorption of cadmium to mycelial pellets of wood-rotting fungi. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 5, p. 345–348, 1996.
- GADD, G. M. Metals and microorganisms: A problem of definition - Gadd - 2006 - FEMS Microbiology Letters - Wiley Online Library. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, n. 1–3, p. 197–203, 1992.
- GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytol.**, v. 124, n. 47, p. 25–60, 1993.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, p. 109–119, 2004.

GADD, G. M. et al. Oxalate production by fungi: Significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. **Fungal Biology Reviews**, v. 28, n. 2–3, p. 36–55, 2014.

GARZA, A.; VEGA, R.; SOTO, E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. **Med Sci Monit**, v. 12, n. 3, p. 57–66, 2006.

GILES, C. H. et al. Studies in Adsorption. Part XI. A System of Classification of Solution Adsorption Isotherms, and its Use in Diagnosis of adsorption Mechanisms and in Measurement of Specific Surface Areas of Solids. **J. SOC. Dyers Colourists**, v. 846, p. 3973–3993, 1960.

GIOVANELLA, P. et al. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, n. February, p. 162–169, 2017.

GOLA, D. et al. Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 388–396, 2016a.

GOLA, D. et al. Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 388–396, 2016b.

GOYER, R. A. Lead Toxicity : Current Concerns. v. 100, p. 177–187, 1993.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of the elements**. 2<sup>o</sup> ed. New York: Butterworth Heinemann, 1997. v. 1

GROUP, I. L. & Z. S. **Lead and Zinc Statistics**. Disponível em: <<http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=2>>. Acesso em: 30 set. 2017.

GUARACHO, V. V. **Remediação Eletrocinética De Chumbo E Níquel**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2005.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived Species : Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. **Environ Health Perspect**, v. 102, n. 10, p. 5–12, 1994.

HANIF, M. A.; BHATTI, H. N. Remediation of heavy metals using easily cultivable, fast growing, and highly accumulating white rot fungi from hazardous aqueous streams. **Desalination and Water Treatment**, n. April, p. 1–11, 2013.

HANSDA, A.; KUMAR, V.; ANSHUMALI. A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 170–184, 2016.

HASSLER, C. S.; SLAVEYKOVA, V. I.; WILKINSON, K. J. Discrimination between intra- and extracellular metals using chemical extractions. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 2, p. 237–247, 2004.

HLAVAY, J. et al. Monitoring of the natural environment by chemical speciation of elements in aerosol and sediment samples { . 2001.

HOLAN, Z. R.; VOLESKY, B. Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 133–146, 1995.

HUANG, C. et al. Effect of *Phanerochaete chrysosporium* inoculation on bacterial community and metal stabilization in lead-contaminated agricultural waste composting. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 294–303, 2017.

HUANG, J. et al. Isolation and engineering of plant growth promoting rhizobacteria &i>Pseudomonas aeruginosa&i> for enhanced cadmium bioremediation. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 258–265, 2016.

IRAM, S. et al. Biosorption and Bioaccumulation of Copper and Lead by Heavy Metal-Resistant Fungal Isolates. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1867–1873, 2015a.

IRAM, S. et al. Biosorption and Bioaccumulation of Copper and Lead by Heavy Metal-Resistant Fungal Isolates. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1867–1873, 2015b.

IRAM, S. et al. Biosorption and Bioaccumulation of Copper and Lead by Heavy Metal-Resistant Fungal Isolates. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 40, n. 7, p. 1867–1873, 2015c.

ISKANDAR, N. L.; ZAINUDIN, N. A. I. M.; TAN, S. G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 5, p. 824–830, 2011.

JÄRUP, L. et al. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. v. 24, n. 1, p. 1–51, 2001.

JAYARAMAN, M.; ARUMUGAM, R. Metal tolerance analysis of microfungi isolated from metal contaminated soil and waste water. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 1, p. 63–66, 2014.

KAEWDOUNG, B. et al. Heavy metal tolerance and biotransformation of toxic metal compounds by new isolates of wood-rotting fungi from thailand. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 3–4, p. 283–288, 2016.

KAPOOR, A; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. **Bioresource Technol.**, v. 53, n. 95, p. 185–206, 1995.

KARPOUZAS, D. G.; SINGH, B. K. Application of Fingerprinting Molecular Methods in Bioremediation Studies. In: CUMMINGS, S. (Ed.). . **Bioremediation: Methods and Protocols**. [s.l.] Humana Press, 2010. p. 290.

KHAN, S. et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 3, p. 686–692, 2008.

KONGSRICHAROERN, N.; POLPRASERT, C. Chromium removal by a bipolar electro-chemical precipitation process. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 9 pt 5, p. 109–116, 1996.

KOSNETT, M. J. et al. Factors Influencing Bone Lead Concentration in a Suburban Community Assessed by Noninvasive K X-ray Fluorescence. **JAMA**, v. 271, n. 3, p. 197–203, 1994.

KULSHRESHTHA, A. et al. A Review on Bioremediation of Heavy Metals in Contaminated Water. v. 8, n. 7, p. 44–50, 2014.

KUMAR, B.; SMITA, K.; CUMBAL FLORES, L. Plant mediated detoxification of mercury and lead. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 2335–2342, 2013.

KUPPUSAMY, S. et al. In-Situ Remediation Approaches for the Management of Contaminated Sites: A Comprehensive Overview. In: VOOT, P. DE (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer ed. Londres: [s.n.]. p. 1–116.

LAKHERWAL, D. Adsorption of Heavy Metals: A Review. **International Journal of Environmental Research and Development**, v. 4, n. 1, p. 2249–3131, 2014.

LEITÃO, A. L. Potential of penicillium species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 4, p. 1393–1417, 2009.

LI, J.; ZHANG, G. N.; LI, Y. Review on the remediation technologies of POPs. **Hebei Environmental Science**, p. 65- 68., 2010.

LI, X. et al. Mechanisms of Cd and Cr removal and tolerance by macrofungus *Pleurotus ostreatus* HAU-2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 330, p. 1–8, 2017a.

LI, Y. et al. Cd immobilization and reduced tissue Cd accumulation of rice (*Oryza sativa* wuyun-23) in the presence of heavy metal-resistant bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, n. August 2016, p. 56–63, 2017b.

LIANG, L. et al. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Saline Soils Using Halophytes: Current Progress and Future Perspectives. **Environmental Reviews**, n. 38, p. er-2016-0063, 2016.

LIDSKY, T. I.; SCHNEIDER, J. S. Lead neurotoxicity in children : basic mechanisms and clinical correlates. **Gauarantors of Brain**, v. 126, p. 5–9, 2003.

LIU, Y. et al. Removal of cadmium and zinc ions fi-om aqueous solution by living. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 16, p. 681–686, 2006.

LOPES, A. C. B. DE A. et al. Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A : Current Issues Risk Factors for Lead Exposure in Adult Population in Southern Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 78, p. 78–92, 2015.

LÓPEZ ERRASQUÍN, E.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere**, v. 50, n. 1, p. 137–143, 2003.

LUO, J.; XIAO, X.; LUO, S. Biosorption of cadmium (  $Cd^{2+}$  ) from aqueous solutions by industrial fungus *Rhizopus cohnii*. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 20, n. 6, p. 1104–1111, 2010.

MAHMOUD, M. E. et al. Assessment of heat-inactivated marine *Aspergillus flavus* as a novel biosorbent for removal of  $Cd(II)$ ,  $Hg(II)$ , and  $Pb(II)$  from water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18218–18228, 2017.

MANASI et al. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent. **Chemical Engineering Journal**, v. 235, p. 176–185, 2014.

MARET, W.; MOULIS, J.-M. The Bioinorganic Chemistry of Cadmium in the Context of Its Toxicity. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Eds.). . **Cadmium: From Toxicity to Essentiality**. [s.l.] Springer, 2013. p. 1–30.

MASHITAH; ZULFADHLY, Z.; BHATIA, S. Binding mechanism of heavy metals biosorption by *Pycnoporus sanguineus*. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, v. 27, n. 5–6, p. 441–445, 1999.

MASSACCESI, G. et al. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 817–820, 2002.

MATHEICKAL, J.; YU, Q. Biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Phellinus badius*. **Minerals Engineering**, v. 10, n. 9, 1997.

MATSUMOTO, K.; FUWA, K. The Estimation of Cadmium in Biological Samples. In: FOULKES, E. C. (Ed.). . **Handbook of Experimental Pharmacology: Cadmium**. [s.l: s.n.]. p. 1–32.

MELGAR, M. J.; ALONSO, J.; GARCÍA, M. A. Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Agaricus macrosporus*. **Science of the Total Environment**, v. 385, n. 1–3, p. 12–19, 2007.

MELO, D. DE Q. et al. Equilíbrio de Adsorção. In: NASCIMENTO, R. F. DO et al. (Eds.). . **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. [s.l: s.n.]. p. 23–50.

MIYASAKA, T.; ASAMI, H.; WATANABE, K. Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. **Biodegradation**, v. 17, n. 3, p. 227–235, 2006.

MOHAMED, R. M.; ABO-AMER, A. E. Isolation and characterization of heavy-metal resistant microbes from roadside soil and phylloplane. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 53–65, 2012.

MOHAMMADIAN, E. et al. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. **Chemosphere**, v. 185, p. 290–296, 2017.

MOHSENZADEH, F.; SHAHROKHI, F. Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 1, p. 102, 2014.

MULLIGAN, C.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation Technologies for Metal-Contaminated Soils and Groundwater : An Evaluation. **Engineering Geology**, v. 60, p. 193–207, 2001.

NAWROT, T. S. et al. Cadmium exposure in the population : from health risks to strategies of prevention. **Biometals**, v. 23, p. 769–782, 2010.

NIU, H. et al. Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 785–787, 1993.

NORDBERG, M.; NORDBERG, G. F. Cadmium. In: SARKAR, B. (Ed.). . **Heavy Metals in the Environment**. New York: MARCEL DEKKER, 2002. p. 231–270.

NRIAGU, J. O. Clair Patterson and Robert Kehoe ' s Paradigm of “ Show Me the Data ” on Environmental Lead Poisoning. v. 78, n. 78, p. 71–78, 1998.

O'CONNELL, D. W.; BIRKINSHAW, C.; O'DWYER, T. F. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6709–6724, 2008.

PAGE, A. L.; EL-AMAMY, M. M.; CHANG, A. C. Cadmium in the Environment and its Entry into Terrestrial Food Chain Crops. In: FOULKES, E. C. (Ed.). . **Cadmium**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 33–74.

PAN, R.; CAO, L.; ZHANG, R. Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1–3, p. 761–766, 2009.

PARASZKIEWICZ, K. et al. Enhancement of emulsifier production by *Curvularia lunata* in cadmium, zinc and lead presence. **BioMetals**, v. 20, n. 5, p. 797–805, 2007.

PEDROSO, M. F. M. Gerenciamento dos resíduos. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Eds.). . **Metals – Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 493–511.

QURESHI, A. S. et al. Evaluating heavy metal accumulation and potential health risks in vegetables irrigated with treated wastewater. **Chemosphere**, v. 163, p. 54–61, 2016.

RAMASAMY, K.; KAMALUDEEN; BANU, S. P. Bioremediation of metals: Microbial processes and techniques. **Environmental Bioremediation Technologies**, p. 173–187, 2007.

RASPANTI, E. et al. Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. **Chemosphere**, v. 76, n. 1, p. 48–54, 2009.

RHEE, Y. J.; HILLIER, S.; GADD, G. M. A new lead hydroxycarbonate produced during transformation of lead metal by the soil fungus *paecilomyces javanicus*. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 3–4, p. 250–260, 2016.

RIZZI, L. et al. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. **Chemosphere**, v. 57, n. 9, p. 1039–1046, 2004.

RONIS, M. J. J. et al. Endocrine mechanisms underlying the growth effects of developmental lead exposure in the rat. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 54, p. 101–120, 1998.

ROY, N. M. et al. Neural alterations from lead exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 46, p. 40–48, 2014.

SAY, R.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Biosorption of cadmium ( II ), lead ( II ) and copper ( II ) with the filamentous lumentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource technology**, v. 76, p. 67–70, 2001.

SEKHAR, K. C. et al. Removal of heavy metals using a plant biomass with reference to environmental control. **International Journal of Mineral Processing**, v. 68, n. 1–4, p. 37–45, 1 jan. 2003.

SHINDE, V. et al. Bioremediation Technique for Polluted Soil of Sugar Industry. n. 6, p. 1436–1438, 2016.

SIDHU, G. P. S. Heavy Metal Toxicity in Soils : Sources , Remediation Technologies and Challenges. **Advances in Plants and Agricultural Research**, v. 5, n. 1, p. 4–6, 2016.

SILVA, W. R. DA et al. Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. July, p. 522–530, 2017.

SIOKWU, S.; ANYANWU, C. U. Tolerance for heavy metals by filamentous fungi isolated from a sewage oxidation pond. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p. 2038–2043, 2012.

SOARES, A. R. **Desenvolvimento de Métodos para Determinação de Chumbo e Níquel em Produtos Cosméticos e Cabelo por GF AAS.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

SYUKOR, A. R. A. et al. Integration of phyto-green for heavy metal removal from wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 3124–3131, 2016.

TAMPOURIS, S.; PAPASSIOPI, N.; PASPALIARIS, I. Removal of contaminant metals from fine grained soils, using agglomeration, chloride solutions and pile leaching techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, n. 2–3, p. 297–319, 2001.

TANGAHU, B. V. et al. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, p. 1–32, 2011.

THÉVENOD, F.; LEE, W.-K. Toxicology of Cadmium and Its Damage to Mammalian Organs. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. (Eds.). . **Cadmium: From Toxicity to Essentiality.** New York: Springer, 2013. p. 415–490.

THORNTON, I. Geochemistry of cadmium. In: MISLIN, H.; RAVERA, O. (Eds.). . **Cadmium in the Environment.** [s.l: s.n.]. p. 7–12.

TODOROVA, D. et al. Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger* B 77. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 178–184, 2008.

TRAINA, S. J. The Environmental Chemistry of Cadmium: An Overview. In: MCLAUGHLIN, M. J.; SINGH, B. R. (Eds.). . **Cadmium in Soils and Plants.** [s.l.] Springer Science, 1999. p. 11–37.

TURKDOGAN, M. K. et al. Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 175–179, 2002.

TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231–241, 2011.

VASHEGYI, Á. et al. Phytoremediation of heavy metal pollution : A case study. v. 49, n. Table 1, p. 77–79, 2005.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, v. 44, n. 3, p. 301–316, 1997.

VELMURUGAN, N. et al. Isolation, identification, Pb(II) biosorption isotherms and kinetics of a lead adsorbing *Penicillium* sp. MRF-1 from South Korean mine soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 7, p. 1049–1056, 2010.

VIMALA, R.; DAS, N. Biosorption of Lead ( II ) from Aquatic Environment by a Macrofungus ( *Agaricus bisporus* ). v. 7, 2008.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2–3, p. 203–216, 2001.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.

WANG, L. et al. A review on in situ phytoremediation of mine tailings. **Chemosphere**, v. 184, p. 594–600, 2017.

WANG, T. et al. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-mutant bacillus subtilis 38 assisted by novoGro biostimulation and changes of soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 483–490, 2014.

WILD, J. R.; VARFOLOMEYEV, S. D.; SCOZZAFAVA, A. **Perspectives in Bioremediation**. [s.l.: s.n.].

WU, J.; LI, Q. Biosorption of lead by Phanerochaete chrysosporium in the form of pellets. **Journal of Environmental Sciences**, v. 14, n. 1, p. 108–114, 2002.

WU, Y. et al. In situ bioremediation of surface waters by periphytons. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 367–372, 2014.

XIA, L. et al. A comparative study on the biosorption of Cd<sup>2+</sup> onto Paecilomyces lilacinus XLA and Mucoromycete sp. XLC. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15670–15687, 2015.

XIE, C. et al. Accumulation and tolerance to cadmium heavy metal ions and induction of 14-3-3 gene expression in response to cadmium exposure in Coprinus atramentarius. **Microbiological Research**, v. 196, p. 1–6, 2017.

XU, X. et al. Role of Penicillium chrysogenum XJ-1 in the detoxification and bioremediation of cadmium. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–10, 2015.

YALÇINKAYA, Y. et al. Biosorption of cadmium from aquatic systems by CMC and immobilized Trametes versicolor.pdf. v. 63, p. 31–40, 2002.

YAO, Z. et al. Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 722–729, 2012.

YE, J. et al. Bioremediation of heavy metal contaminated aqueous solution by using red algae Porphyra leucosticta. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p. 1662–1666, 2015a.

YE, J. et al. Bioremediation of heavy metal contaminated aqueous solution by using red algae Porphyra leucosticta. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 9, p. 1662–1666, 2015b.

YETIS, U. et al. THE REMOVAL OF Pb ( II ) BY PHANEROCHAETE CHYSOSPORIUM. **Water research**, v. 34, n. 16, p. 4090–4100, 2000.

YETIS, Ü. et al. Heavy metal biosorption by white-rot fungi. **Water Science and Technology**, v. 38, n. 4-5-5 pt 4, p. 323–330, 1998.

YI, Y. J. et al. Potential use of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* as a probiotic for the removal of Pb(II) toxicity. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 296–303, 2017.

YILMAZER, P.; SARACOGLU, N. Bioaccumulation and biosorption of copper(II) and chromium (III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 4, p. 604–610, 2009.

ZAIER, H. et al. Effects of EDTA on phytoextraction of heavy metals (Zn, Mn and Pb) from sludge-amended soil with *Brassica napus*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 3978–3983, 2010.

ZENG, X. et al. Isolation, identification and cadmium adsorption of a high cadmium-resistant *Paecilomyces lilacinus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6525–6533, 2010.

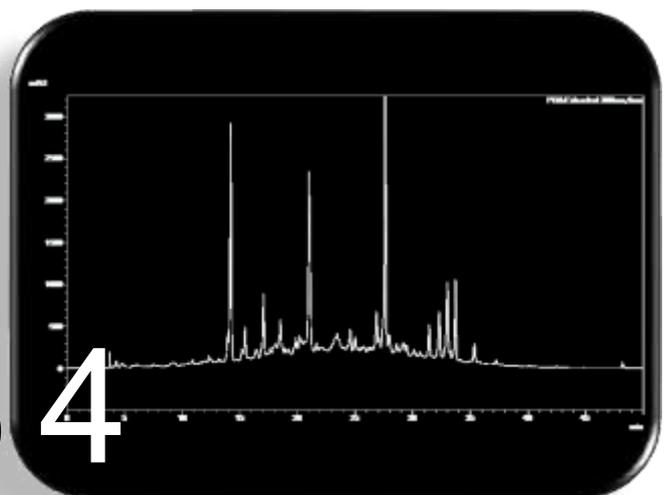
ZENG, X. X. et al. Taxonomy characterization and cadmium biosorption of fungus strain. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)**, v. 23, n. 9, p. 2759–2765, 2013.

ZERAATKAR, A. K. et al. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 817–831, 2016.

ZHOU, D.-M.; HAO, X.-Z.; XUE, Y. Advances in remediation technologies of contaminated soils. **Ecology and Environmental Sciences**, v. 13, n. 2, p. 234–42, 2004.

ZHU, W. et al. Comparative Analysis of Mechanisms of Cd<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> Biosorption by Living and Nonliving *Mucoromycote* sp. XLC. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, n. 3–4, p. 274–282, 2016.

# Capítulo 4



Perfil químico de fungos resistentes à cádmio

## 4 PERFIL QUÍMICO DE FUNGOS RESISTENTES A CÁDMIO

### RESUMO

Cádmio é um metal de transição que é altamente danoso à organismos vivos em qualquer concentração, no entanto há vários dados na literatura relatando a habilidade de fungos, sobretudo os micorrízicos, em se desenvolver e utilizar processos de bioacumulação e detoxificação deste metal. Contudo, os mecanismos e, em maior extensão, os efeitos do metal ao metabolismo secundário ainda não é completamente conhecido e foi muito pouco explorado. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi realizar a investigação do efeito de cádmio (II) no desenvolvimento e no perfil químico do metabolismo secundário de quatro espécies de fungos do gênero *Penicillium* (*Penicillium* sp. M01, *Penicillium* sp. M02, *Penicillium* sp. M03, *Penicillium* sp. M04), que em etapa anterior do trabalho apresentaram alta resistência ao metal. Os fungos foram cultivados no meio líquido de batata-dextrose (BD) e também em BD suplementado com cádmio (II) na concentração de 500 mg/L<sup>-1</sup> e incubados por 21 dias, após este período foram obtidos os extratos do caldo fermentado e do micélio a partir das duas condições de cultivo. Os extratos foram submetidos à análise do perfil químico utilizando CLAE-DAD, CLAE-DAD-IESEM e RMN-<sup>1</sup>H. O fungo *Penicillium* sp. M01 foi cultivado em larga escala e o extrato bruto do caldo fermentado foi selecionado para estudo de fracionamento e isolamento de constituintes do metabolismo secundário. Os dados obtidos demonstraram que apesar da grande capacidade de resistir à cádmio (II), a presença do metal diminuiu significativamente o desenvolvimento dos fungos e causou interferência no metabolismo secundário, pois, observou-se grande diminuição de picos cromatográficos e sinais de deslocamento de hidrogênio. A separação cromatográfica do extrato do caldo fermentado do fungo *Penicillium* sp. M01, levou à identificação do policetídeo derivado sorbicilinoide trichodimerol e a presença de picos em *m/z* [M+H]<sup>+</sup> 249,14; 513,18 e 517,22 no espectro de massas, levaram a inferir que o fungo produziu ainda, as substâncias também derivadas da sorbicilina: sorbicilinol, bisvertinolona e tetrahidrobisvertinolona. O pico atribuído ao trichodimerol também foi identificado no extrato do micélio do fungo. A pesquisa pelos picos de trichodimerol e outros derivados da sorbicilina nos espectros de massas dos extratos obtidos do meio contendo cádmio (II) do *Penicillium* sp. M01, bem como de todos os extratos dos demais fungos, não remeteu resultados. Portanto, as três demais espécies, provavelmente não são produtoras de substâncias sorbicilinoídes. A presença de cádmio (II) causou um bloqueio na produção de metabólitos secundário de *Penicillium* sp. M01, além de promover uma depressão no desenvolvimento e no metabolismo secundário deste e dos demais fungos estudados.

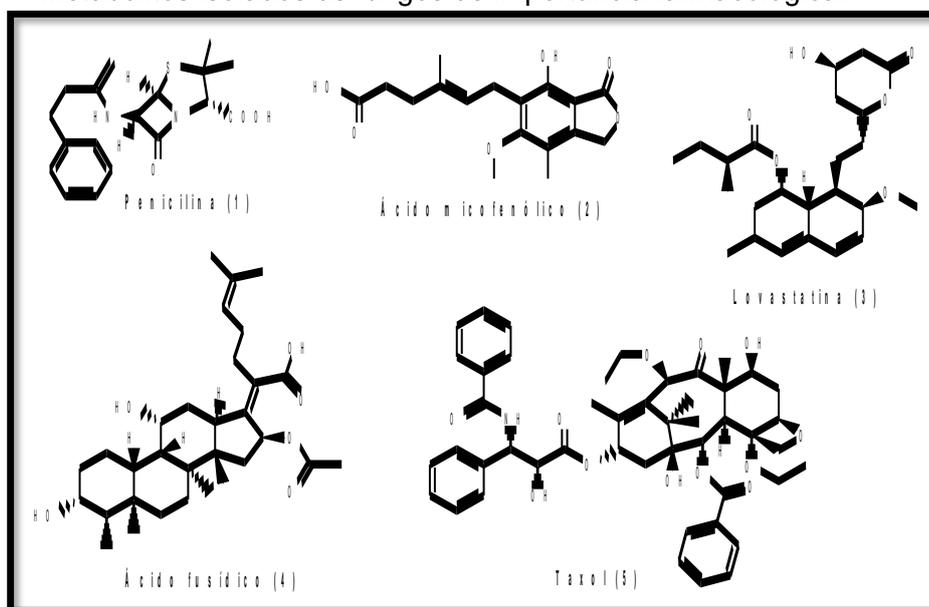
Palavras-chave: sorbisolinóides, trichodimerol, *Penicillium* sp.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos extremamente interessantes para o estudo de substâncias do metabolismo especial visando identificar e aproveitar suas atividades biológicas. Desde o isolamento da penicilina (1) a partir de um fungo do gênero *Penicillium*, que causou uma grande revolução no tratamento de doenças infecciosas, houve um estímulo no interesse em pesquisas com metabólitos de fungos, pois, tem resultado, entre outros benefícios, no conhecimento de substâncias estruturalmente diversas e bioativas, tendo várias destas se tornado um produto fármaco comercializado ou fonte precursora para síntese de medicamentos.

Além da penicilina, outros exemplos de substâncias bioativas (Figura 4.1) como o ácido micofenólico (2) reconhecido por sua ação imunossupressora, mas também apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, o agente hipocolesterolêmico lovastatina (3) empregado no tratamento de doenças cardiovasculares, o Taxol (4) empregado no tratamento de carcinoma e o ácido fusídico (5) utilizado como agente antibiótico, ilustram bem a importância biológica destes microrganismos.

Figura 4. 1 - Metabólitos isolados de fungos de importância farmacológica.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020

Grande parte da produção de metabólitos especiais está ligada à um mecanismo de defesa química dos organismos. Isto, aliado ao fato de que fungos são seres altamente adaptativos, torna estes microrganismos alvos de estudos que visam

estudar o efeito de fatores de estresse no seu desenvolvimento, na busca de um possível incremento na expressão de substâncias de importância medicinal ou de interesse econômico, como o uso de co-culturas e modificação de meio de crescimento. Exemplos disso são encontrados nos trabalhos de Ijoma, Selvarajan e Tekere (2019) que realizaram a dição de resíduos agrícolas no cultivo de várias espécies para investigação do incremento na atividade lignolítica; o uso da co-cultura de fungos dos gêneros *Apergillus* e *Fusarium* que resultou na aceleração e apreciável aumento na produção de novos metabólitos (BERTRAND et al., 2014), bem como a investigação do efeito do emprego de ultrassom na produção de lovastatina por *Aspergillus terreus* (SAINZ HERRÁN et al., 2008).

Um dos estresses no desenvolvimento de fungos que podem ocorrer naturalmente é a contaminação de ambientes com metais tóxicos, como o cádmio, o chumbo e o mercúrio. Muitos estudos (como mostrado na seção 3.3.3) tem avaliado a capacidade destes microrganismos em realizar a bioacumulação de metais para aproveitamento desta habilidade em processo de biorremediação.

Estes processos de bioacumulação, no entanto, em muitos casos estão associados à própria presença do metal e da proteína metalotioneína ou da ausência de íons metálicos essenciais que induzem o fungo à produção ou superprodução de biomoléculas responsáveis pelo seu sequestro do metal tóxico (GADD, 1994) .

Para o cádmio, elemento que apresenta uma das maiores toxicidade aos organismos vivos, há algumas avaliações do seu efeito, sobretudo com relação à expressão gênica e atividade enzimática de fungos (CACCIOLA et al., 2015; GAO et al., 2020; GARG; AGGARWAL, 2011; GUELFY et al., 2003; HEGEDÜS et al., 2007; ILYAS et al., 2016; KHULLAR; SUDHAKARA REDDY, 2019; SHARMA; PARMAR; KUMARI, 2016).

Os efeitos de cádmio no crescimento de *Trichoderma harzianum* foram avaliados por sequenciamento de RNA para identificação de genes e processos regulados nesta condição, dentre outras descobertas, os autores relatam a repressão do metabolismo dos carboidratos (OSHIQUIRI et al., 2020). Em um direcionamento mais específico sobre o metabolismo secundário, há uma relato de estudo em que foi observado o aumento da produção de ácido cítrico por *Aspergillus ninger* na presença de cádmio (ANGUMEENAL et al., 2002)

Tendo em vista o conhecimento de um grande número de espécies fúngicas para as quais já é registrada a habilidade de acumulação de metais tóxicos, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisa sobre os efeitos destes processos no metabolismo secundário do microrganismo.

Deste modo, o objetivo do estudo foi utilizar fungos notadamente resistentes e com potencial para bioacumulação de cádmio (II) para avaliar o efeito do metal no perfil químico do seu metabolismo secundário.

Ressalta-se que este é o primeiro trabalho que investiga a influência de cádmio (II) no perfil do metabolismo secundário de fungos do gênero *Penicillium*, bem como o efeito destes íons na indução ou supressão da produção de policetídeos derivados da sorbicilina.

## 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os equipamentos e reagentes utilizados nesse trabalho estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4. 1 - Descrição dos equipamentos e reagentes utilizados

EQUIPAMENTO/REAGENTES	MARCA/MODELO
Acetato de Etila P.A.	Synth
Acetonitrila grau HPLC	JT. BAKER
Ágar	MERCK
Água ultrapura	Himedia
Agitador mecânico	Quimis
Autoclave vertical	Phoenix
Balança analítica	Shimadzu (AY220)
Batata inglesa	
BDA	MERCK
Capela de fluxo laminar	LABCONCO - 36210
Coluna C <sub>18</sub> (250mm x 10mm, 5µm)	Sigma-Aldrich (Supelco)
Coluna C <sub>18</sub> (250mm x 4,6mm, 5µm)	Sigma-Aldrich (Supelco)
Clorofórmio deuterado 98-99.9%	MERCK
Cromatógrafo – HPLC; bombas; detector; injetor automático	SHIMADZU (LC-20 <sup>a</sup> Prominence); LC-20AR; SPD-M20A; SIL-10AF
Diclorometano P.A.	Hexis
Dimetilsulfóxido deuterado 98-99.9%	MERCK
Espectrômetro de absorção atômica com chama	GBC Scientific (SensAA Dual)
Espectrômetro de RMN	Bruker (AVANCE III HD 400MHz)
Espectrômetro de RMN	Varian (Inova 500MHz)
Espectrômetro de RMN	Agilent0 (DD2 500MHz)
Estufa	FABBE (119)
Estufa Incubadora BOD	Nova Ética BOD 411D
Evaporador rotativo	Fisatom (558)
Forno de microondas doméstico	BRASTEMP (maxi)
Gel de filtração Sephadex-LH20	
Glicose Anidra (Dextrose)	Synth
Hexano P.A.	Synth
Metanol deuterado 98-99.9%	MERCK
Metanol grau HPLC	JT. BAKER
Metanol P.A.	QHEMIS
Nitrato de cádmio	Dinâmica
Sílica gel 230-400 mesh	MERCK
Sílica gel 60 PF254	MERCK
Sílica gel HF254 + 366 suportada em alumínio	MERCK
Sulfato de sódio anidro	Synth
Ultrapurificador de água	ELGA (Purelab Classic)

#### 4.2.1 Cultivo e obtenção dos extratos brutos de fungos resistentes à cádmio

As quatro espécies fúngicas resistentes à cádmio (*Penicillium* sp. M01, *Penicillium* sp. M02, *Penicillium* sp. M03 e *Penicillium* sp. M04) foram cultivadas simultaneamente em dois meios distintos em pequena escala a saber: caldo batata-dextrose (BD) sem suplementação (300 mL x 2 frascos) e caldo BD suplementado por cátions de cádmio (II) na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> (300 mL x 2 frascos), à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante três semanas. Frascos contendo meios BD suplementado e livre de cádmio (II) e sem inócuo, foram utilizados para extração de controles, sendo possibilitando a distinção entre substâncias do meio de cultivo e substâncias produzidas pelos fungos.

Para obtenção dos extratos do caldo fermentado, após separação do micélio por meio de filtração à vácuo, o material foi submetido à processo de partição líquido-líquido (1:1) com mistura diclorometano/acetato de etila (2:3) e adição de 1% ácido fórmico, uma adaptação da metodologia de extração em microescala para triagem de metabólitos de fungos cultivados em placas (SMEDSGAARD, 1997). Após separação, a fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionada sulfato de sódio anidro como agente secante e posteriormente separados por filtração. Por fim, a fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e seco sob vácuo em dessecador de vidro.

O micélio foi macerado e extraído com metanol (3x) em banho de ultrassom por 60 minutos. Em seguida, após separação por filtração, a biomassa foi descartada e o extrato bruto foi obtido após remoção do solvente em rotaevaporador e seco sob vácuo em dessecador de vidro.

#### 4.2.2 Análise do perfil químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e RMN-<sup>1</sup>H

Os perfis cromatográficos dos 16 extratos foram obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiências (CLAE) com equipamento da marca SHIMADZU modelo LC-20A Prominence composto por duas bombas do modelo LC-20AR, detector UV-visível de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A e um injetor automático modelo SIL-10AF, pertencente aos grupos LBQM e GESNAT do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

A separação dos extratos em modo analítico foi realizada em coluna cromatográfica de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C<sub>18</sub> (250mm x 4,6mm, 5µm), em corridas de 50 minutos em modo gradiente utilizando fase móvel composta por água e acetonitrila (proporção inicial 85:15, v/v), atingindo 100% de solvente orgânico em 40 minutos. A vazão foi de 1,0 mL/min.

Foram obtidos os espectros de RMN-<sup>1</sup>H em espectrômetro da marca Bruker AVANCE III HD 400MHz (400 MHz para <sup>1</sup>H e de 100 MHz para <sup>13</sup>C) pertencente ao LMCA-IPeFarM-UFPB.

#### 4.2.3 Extração e isolamento de *trichodimerol*

O *Penicillium* sp. M01 foi cultivado em larga escala seguindo a mesma metodologia descrita na seção 4.2.1 para obtenção dos seus extratos em maior quantidade e fracionamento e purificação de substâncias utilizando técnicas cromatográfica.

Foi selecionado o extrato do caldo fermentado (5,57g), o qual foi submetido à separação cromatográfica em coluna (CC) empacotada com sílica comum (70 – 230 mesh) usando como fase móvel os solventes puros ou em mistura com gradiente crescente em polaridade: hexano (100%), hexano/diclorometano (99:1; 95:5; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90), diclorometano (100%), diclorometano/acetato de etila (80:20; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80;), acetato de etila (100%), acetato de etila/metanol (90:10; 70:30; 60:40; 50:50; 30:70; 10:90) e metanol (100%). As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CDD) comparativa de sílica gel HF254 + 366 suportada em alumínio e foram reunidas de acordo com seus perfis, tendo sido reagrupadas e sete frações.

Após avaliação das amostras por CLAE-DAD analítico, tomou-se 1,0g da fração M01C3 (de 4,6g obtidos) e o submeteu à fracionamento através da separação por exclusão de tamanho utilizando uma coluna de vidro preenchida com Sephadex LH-20, realizando eluição com um gradiente metanol – água iniciando na proporção 50:50, elevando a composição de metanol em 10 unidades até alcançar 100%. Foram obtidas seis frações.

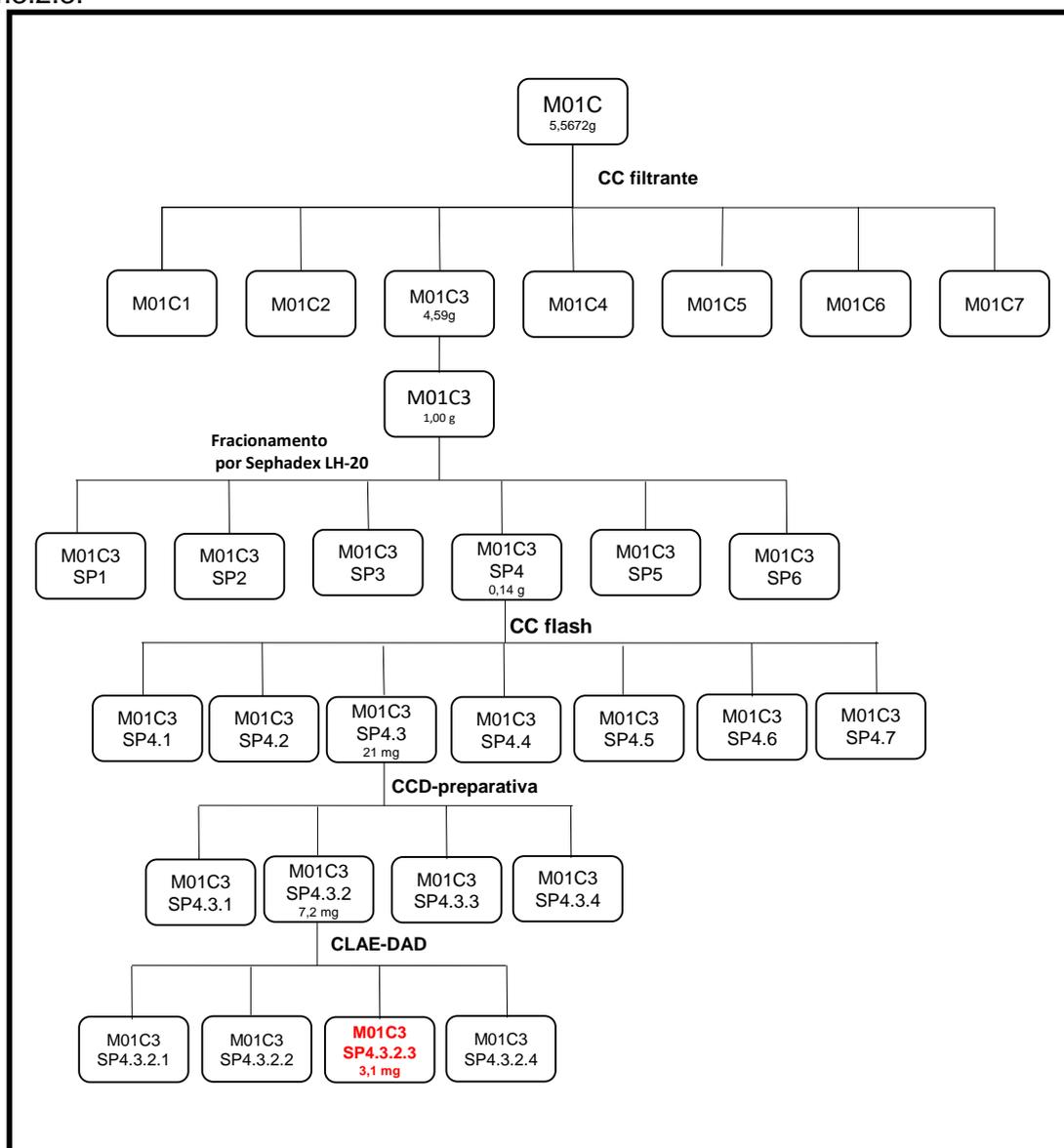
Das seis frações obtidas, a M01C3-SP4 (0,14g) foi submetida à separação por CC de sílica gel flash (230-400 mesh) usando na fase móvel os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros ou em mistura com gradiente

crescente em polaridade. Neste processo foram obtidas sete frações, das quais, a M01C3-SP4.3 (21 mg) apresentou um grau de pureza e foi submetida à purificação por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) com sílica gel 60 PF254 suportada em placas de vidro (20 X 20 cm) tendo como fase móvel diclorometano e acetato de etila 6:4 (v/v).

Da separação por CCDP foram obtidas quatro frações em que M01C3-SP4.3.2 (7,2 mg). A purificação da fração foi realizada em CLAE-DAD com coluna semipreparativa de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C<sub>18</sub> (250mm x 10mm, 5µm), sob fluxo de 2mL/min de fase móvel composta por água e acetonitrila na proporção 9:1 (v/v) modo isocrático. Foram obtidas quatro frações sendo que a M01C3-SP4.3.2.3 (3,1 mg) estava pura.

O fluxograma da Figura 4.2 apresenta um resumo dos procedimentos para obtenção de M01C3-SP4.3.2.3.

Figura 4. 2 - Procedimento de separação da fração M01C3 e obtenção de de M01C3-SP4.3.2.3.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

Para análise das frações e identificação da substância isolada, os espectros de ressonância magnética foram obtidos no equipamento Varian Inova, operando em 500 MHz para hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) e a 125 MHz na frequência do carbono ( $^{13}\text{C}$ ), pertencente ao Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, o espectrômetro Agilent DD2, operando em 500 MHz, pertencente ao Laboratório Nacional de Biociência (LNBio) ligado ao Centro Brasileiro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), bem como o espectrômetro Bruker AVANCE III HD 400MHz (400 MHz para  $^1\text{H}$  e de 100 MHz

para  $^{13}\text{C}$ ) pertencente ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM-UFPB).

As amostras foram preparadas com dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-}d_6$ ) e metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), acrescidos de tetrametilsilano (TMS) utilizado como padrão de referência interna.

#### 4.2.4 Análise do perfil químico por espectrometria de massas

Os extratos obtidos dos fungos foram submetidos à estudo comparativo quanto à presença de *trichodimerol* e outros policetídeos derivados da sorbicilina por espectrometria de massas em equipamento de baixa resolução pertencente ao Laboratório Multiusuários de Caracterização e Análises (LMCA, IPeFarM-UFPB).

Para realização da análise, 1,0 mg de extrato foi dissolvido em 1,0 mL de MeOH com ajuda do banho de ultrassom e filtrado utilizando filtro PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisado por CLAE-IES-EM, utilizando um Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (CLUR) (Shimadzu) contendo duas bombas de solvente LC-20AD, auto amostrador SIL-20AHT, controlador de sistema CBM-20A, acoplado com um espectrômetro de massas ESI-Ion-Trap (AmaZon X). Os experimentos de CLAE foram realizados utilizando uma coluna  $\text{C}_{18}$  (Kromasil - 250 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) no modo gradiente binário de eluição, sendo água com adição de ácido fórmico (0,1% v/v) e metanol, na proporção inicial 1:1 (v/v). As eluições foram através de um gradiente exploratório com 40 minutos de duração, injeção de 20  $\mu\text{L}$  e fluxo de 0,6 mL/min. Os parâmetros de análise do ESI foram: capilar 4,5 kV, ESI no modo positivo, offset da placa final 500 V, nebulizador 40 psi, gás seco ( $\text{N}_2$ ) com fluxo de 8 mL/min e temperatura de 300  $^\circ\text{C}$ . A fragmentação de CID foi realizada no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS. Os espectros ( $m/z$  50-3000) foram registrados a cada 2 s.

Utilizou-se o “software” Bruker Compass DataAnalysis® versão 4.2, para processamento dos espectros, bem como para realização de pesquisa nos cromatogramas de íons extraídos, por picos com  $m/z$  semelhantes aos de alguns derivados da sorbicilina e inferir quanto a possível produção destes pelos fungos resistentes à  $\text{Cd(II)}$ .

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Cultivo e obtenção dos extratos brutos de fungos resistentes à cádmio

Através da metodologia descrita na seção 4.2.1, cada um dos fungos estudados gerou dois extratos, do caldo fermentado e do micélio, para cada uma das condições de cultivo, obtendo-se quatro para cada espécie e um total de 16 extratos, além dos dois extratos apenas dos meios de cultivo que serviram de controles.

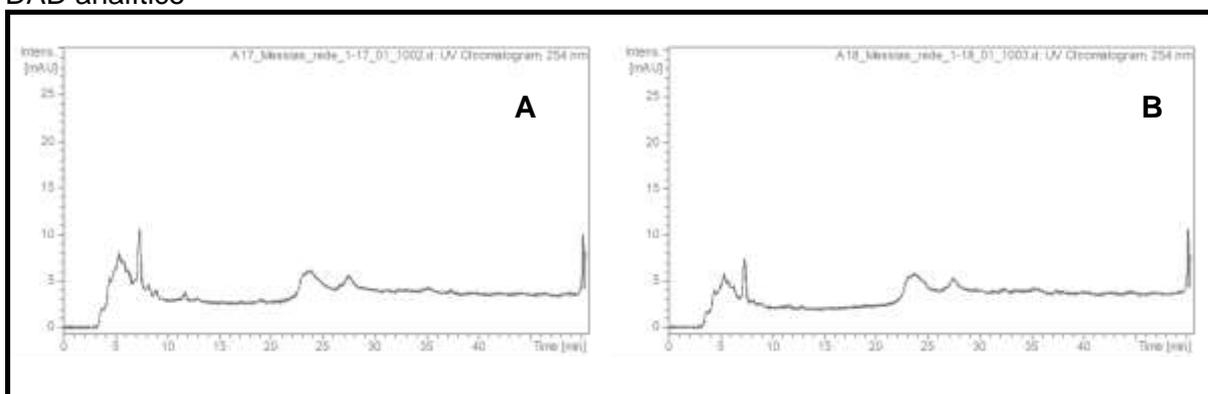
As modificações macromorfológicas como efeito da presença de cátions de cádmio (II) já observadas no desenvolvimento dos isolados fúngicos em meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e descritas no Capítulo 3 (Seção 3.5.1: Tabela 3.7 p. 107 e Apêndice C, p.244) também foram observadas para o cultivo em meio líquido de BD.

#### 4.3.2 Análise do perfil químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e RMN-<sup>1</sup>H

As imagens de cromatogramas apresentados nas Figuras 4.3 a 4.7 evidenciam que a presença de cádmio (II) no meio de crescimento, interfere não apenas no desenvolvimento e morfologia dos fungos (ver descrição na seção 3.5.1, p. 106), mas também em seu padrão de produção de metabólitos secundários.

Parte dos meios de cultivo foi reservada sem inócuo que serviu de controle, tanto para certificação do processo de esterilização quanto para obtenção dos extratos para análise e conhecimento do perfil cromatográfico (Figura 4.3).

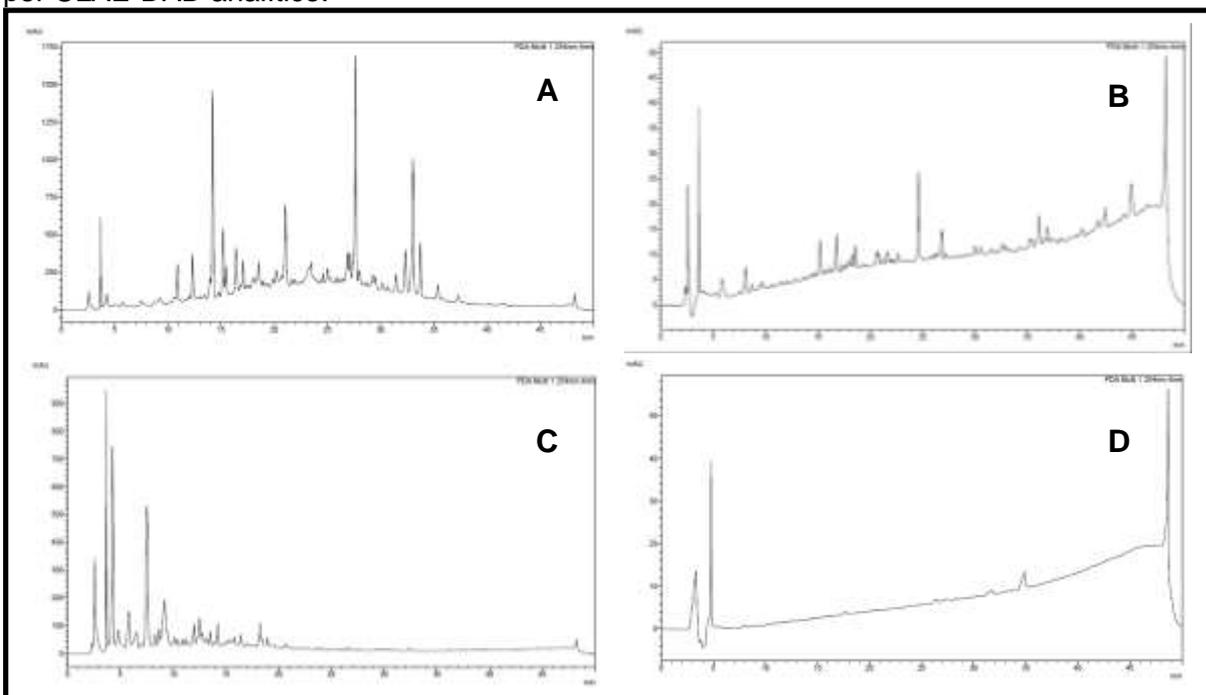
Figura 4. 3 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos dos meios cultura por CLAE-DAD analítico



Fonte: dados da pesquisa, 2018

**A** = Extrato do caldo BD; **B** = Extrato do caldo BD com adição de cádmio (II).

Figura 4. 4 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo *Penicillium* sp. M01, por CLAE-DAD analítico.



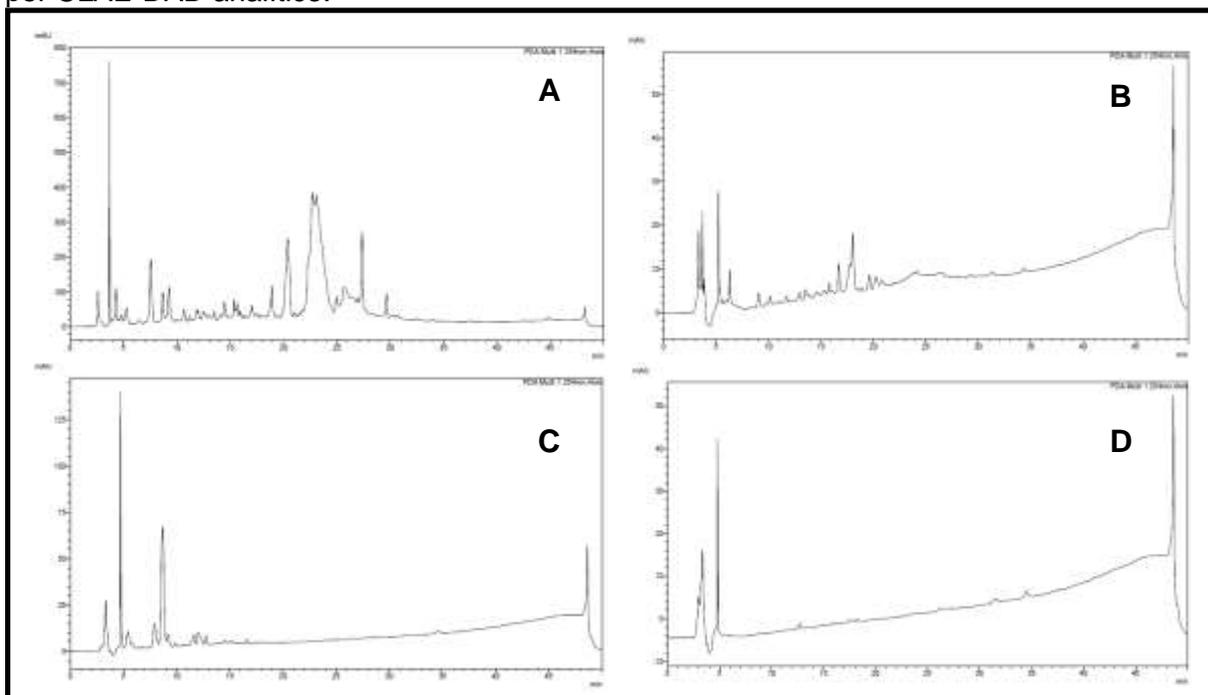
Fonte: dados da pesquisa, 2018

**A** = Extrato do caldo fermentado; **B** = Extrato do micélio **C** = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo cádmio (II); **D** = Extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II).

Essa influência afeta em diferentes graus os fungos estudados. Para os extratos do Fungo *Penicillium* sp. M01 (Figura 4.4), na comparação entre A (extrato do caldo fermentado) e C (extrato do caldo fermentado contendo cádmio (II)), observa-se total supressão das substâncias com tempo de retenção (TR) a partir de 20 minutos e expressiva diminuição na produção das substâncias com TR entre 10 e 20 minutos. Na comparação entre os extratos B (extrato do micélio) e D (extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II)) essa supressão é ainda mais pronunciada.

Essas observações também servem para descrição do ocorrido com o perfil metabólico do Fungo *Penicillium* sp. M02 (Figura 4.5), contudo na comparação entre A e C nota-se que a produção do fungo cultivado em meio contendo cádmio (II), ficou limitada à um conteúdo rico em substâncias mais polares, com total supressão de substâncias de média e baixa polaridade.

Figura 4. 5 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo *Penicillium* sp. M02, por CLAE-DAD analítico.



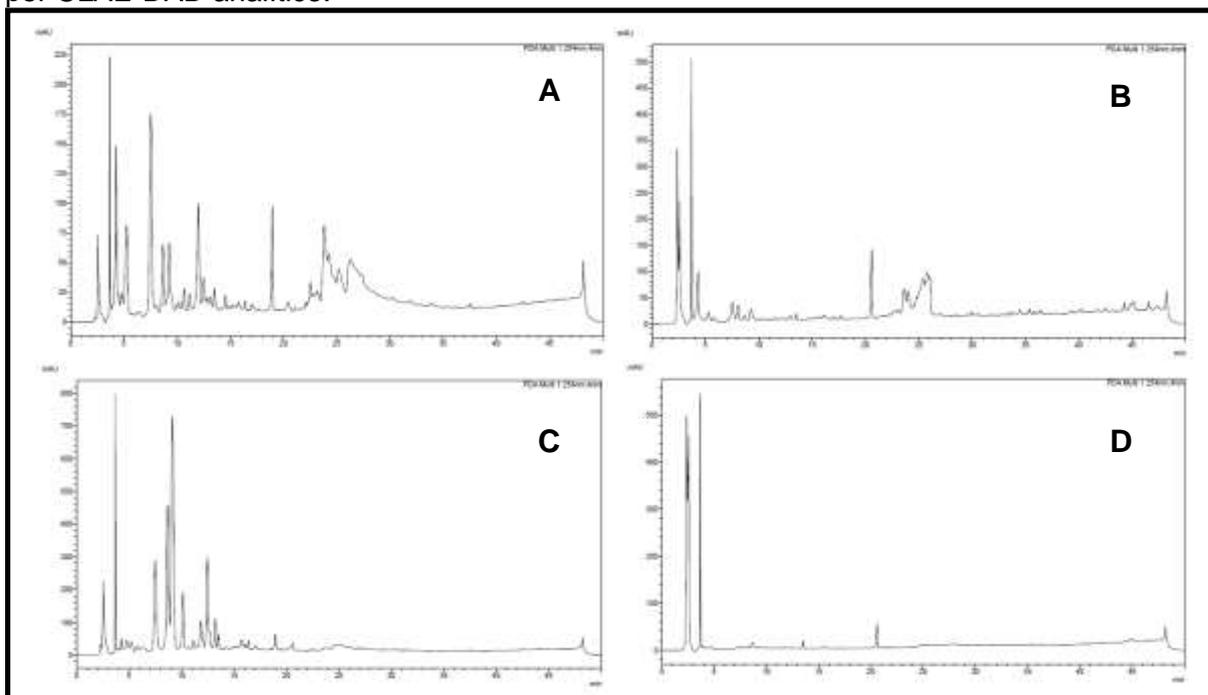
Fonte: dados da pesquisa, 2018

**A** = Extrato do caldo fermentado; **B** = Extrato do micélio **C** = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo cádmio (II); **D** = Extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II).

Também modificado, mas em menor extensão na comparação com os fungos *Penicillium* sp. M01 e *Penicillium* sp. M02, o perfil observado para o fungo *Penicillium* sp. M03 (Figura 4.6), fica mais evidente com o que ocorreu aos extratos do micélio (B e D), em que pode ser observado a supressão dos sinais das substâncias com tempos de retenção entre 20 e 26 minutos.

De modo geral os cromatogramas guardam um grau de semelhança, mas com grande distinção nas intensidades dos picos, o que pode indicar que a presença do metal interferiu fortemente na velocidade de desenvolvimento do metabolismo do fungo.

Figura 4. 6 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo *Penicillium* sp. M03, por CLAE-DAD analítico.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

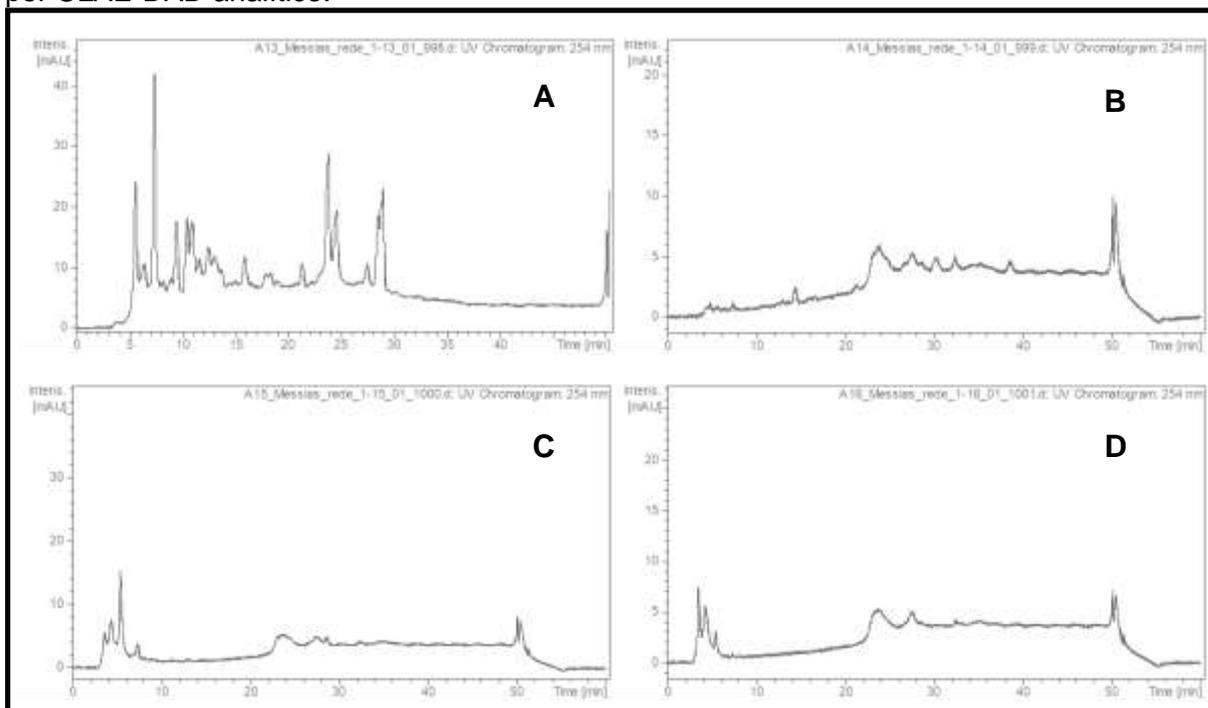
**A** = Extrato do caldo fermentado; **B** = Extrato do micélio **C** = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo cádmio (II); **D** = Extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II).

A observação dos cromatogramas dos extratos do fungo *Penicillium* sp. M04 (Figura 4.7) ressalta-se o efeito da presença de cádmio (II) no meio de crescimento (C), que levou a uma drástica supressão dos picos na comparação com A. O perfil cromatográfico deste extrato está semelhante ao cromatograma do controle (Figura 4.3 B) isso pode significar que o fungo teve seu metabolismo altamente afetado de forma negativa pelo contato com o metal.

O extrato do micélio (B) apresentou uma tímida quantidade de picos e de muito baixa intensidade, já extrato D, de modo análogo a C mostrou mais semelhança com o extrato controle.

Em condições normais de cultivo o fungo *Penicillium* sp. M04 já apresenta baixa velocidade de crescimento, essa característica, portanto, foi acentuada na presença de cádmio (II).

Figura 4. 7 - Cromatogramas da separação dos extratos obtidos do fungo *Penicillium* sp. M04, por CLAE-DAD analítico.

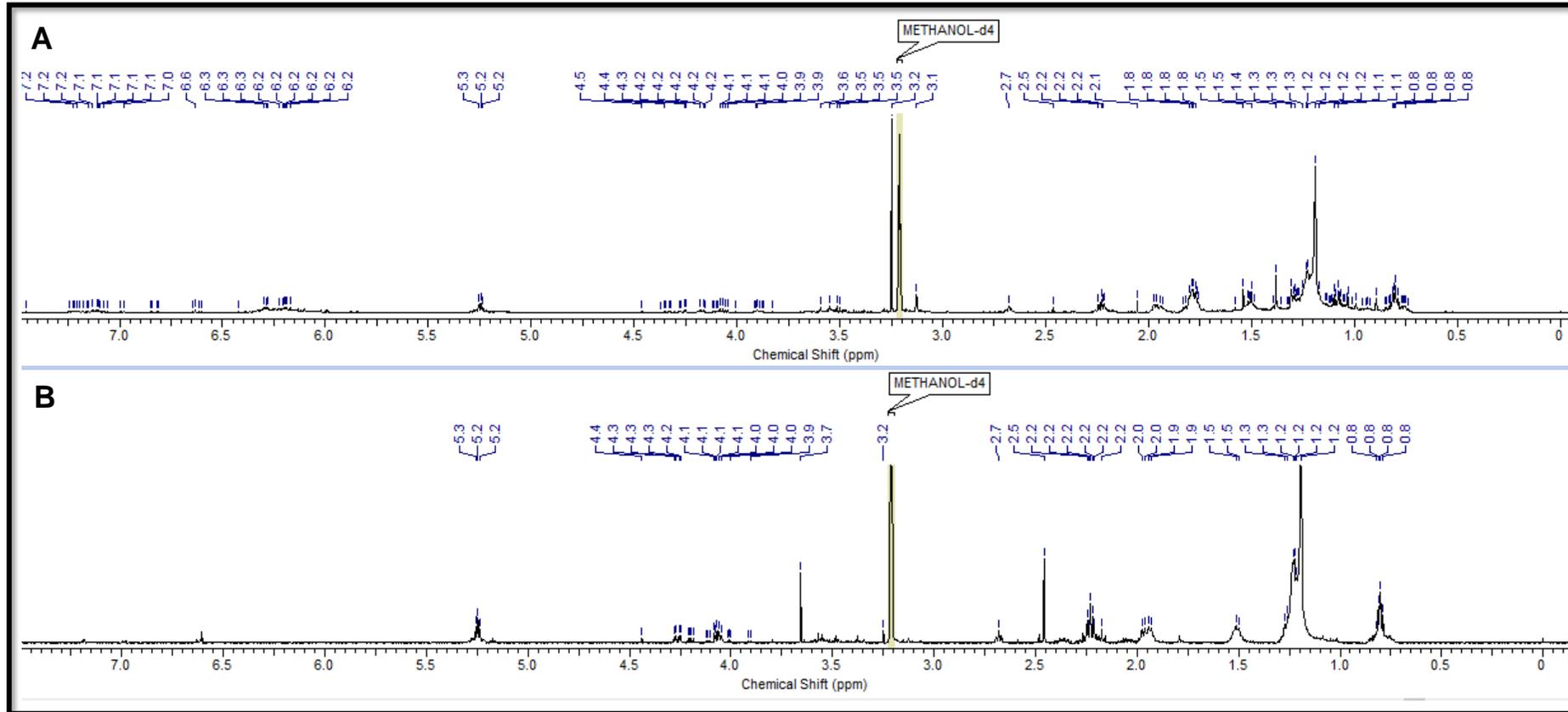


Fonte: dados da pesquisa,2018

**A** = Extrato do caldo fermentado; **B** = Extrato do micélio **C** = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo cádmio (II); **D** = Extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II).

As informações fornecidas pelos espectros de RMN-<sup>1</sup>H obtidos para estes mesmo extratos (Figuras 4.8 a 4.15), reforçam o que foi observado nos cromatogramas de CLAE-DAD. De modo mais pronunciado há a supressão de vários sinais nos espectros correspondentes aos extratos obtidos dos meios contendo cádmio (II) na comparação com os sinais apresentados para os extratos sem a adição do metal.

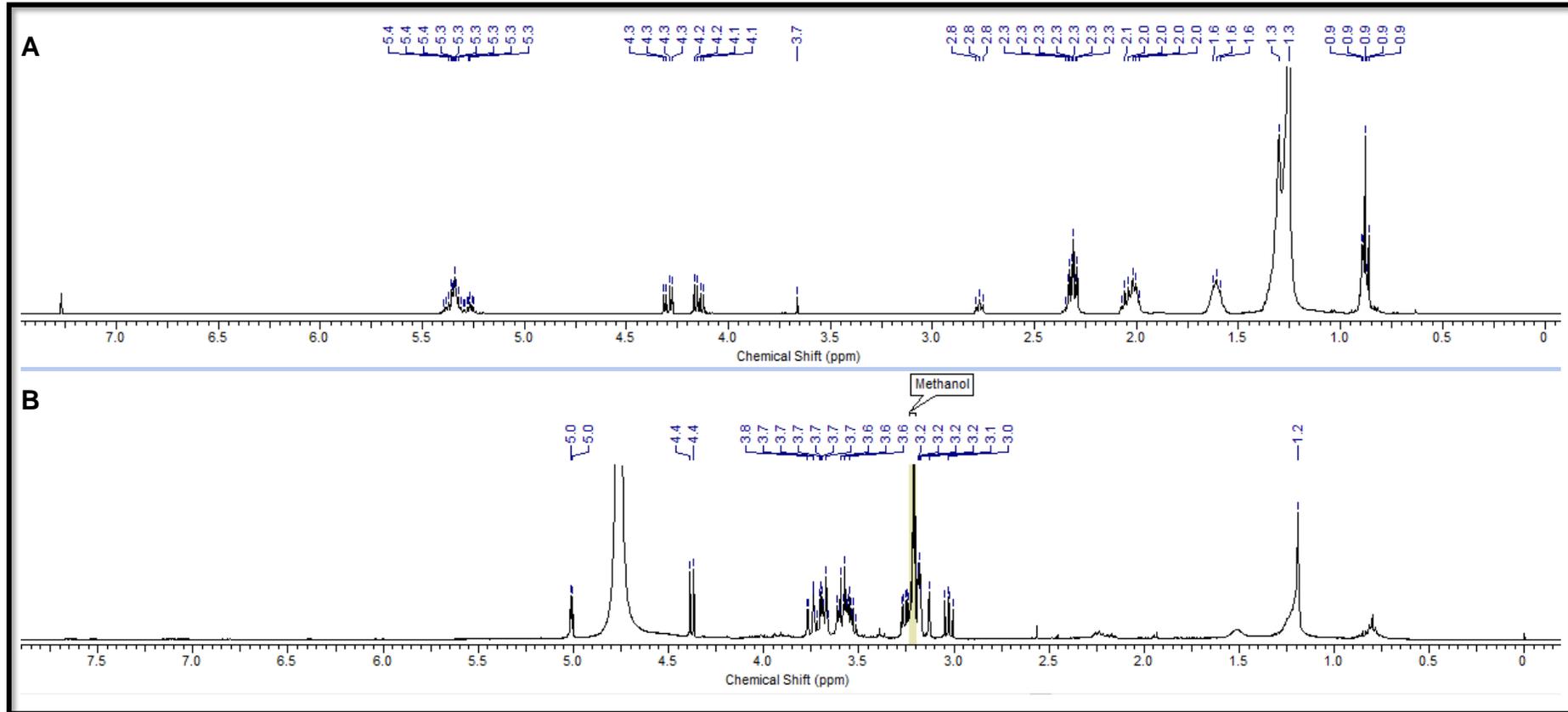
Figura 4. 8 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CD3OD dos extratos dos caldos fermentados do fungo *Penicillium* sp. M01.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

A = Extrato do caldo fermentado; B = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo Cd(II)

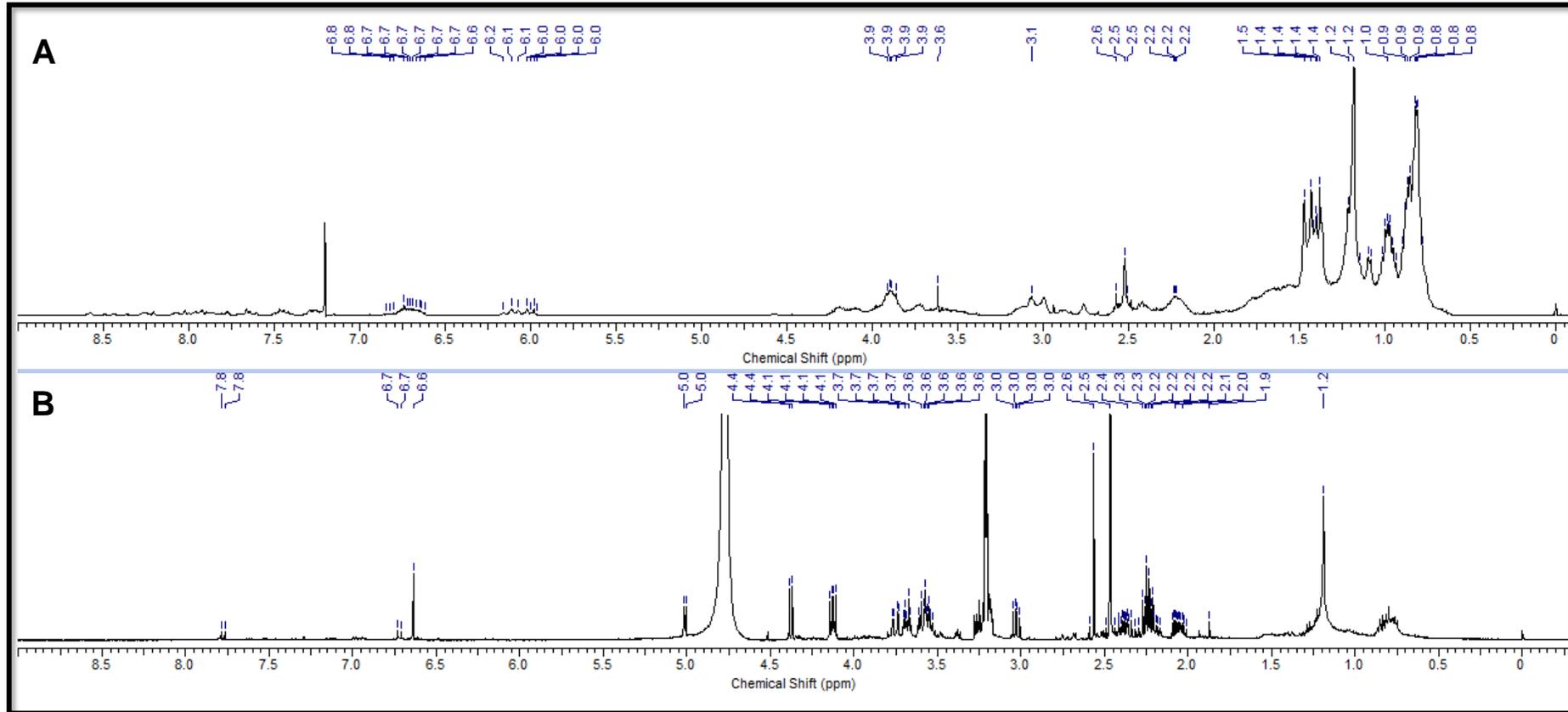
Figura 4. 9 - Figura 4. 9 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CDCl3 e CD3OD dos extratos dos micélios do fungo *Penicillium* sp. M01.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

**A** = Extrato do micélio; **B** = Extrato do micélio obtido do meio contendo Cd(II).

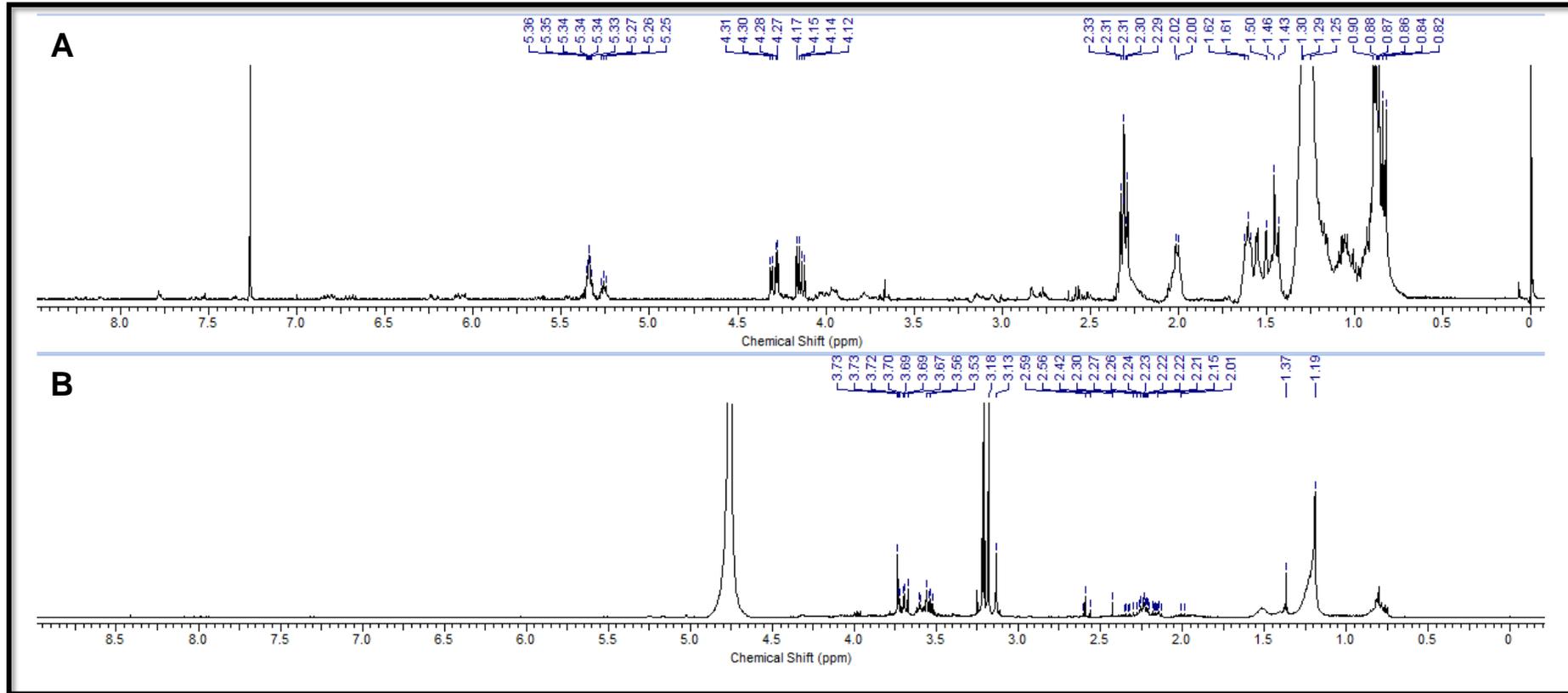
Figura 4. 10 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD dos extratos dos caldos fermentados do fungo *Penicillium* sp. M02.



Fonte: dados da pesquisa,2018

**A** = Extrato do caldo fermentado; **B** = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo Cd(II).

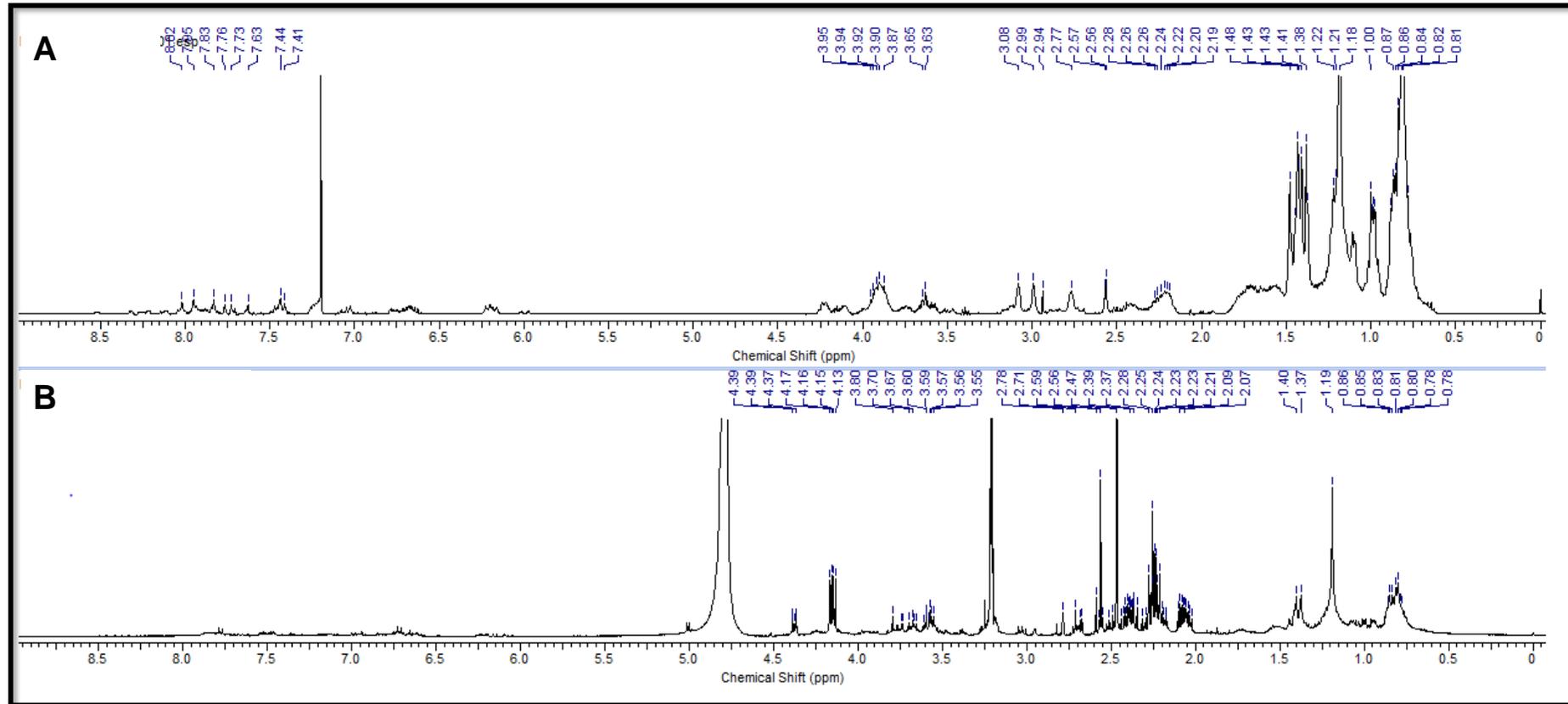
Figura 4. 11- Espectros de RMN-1H (500 MHz) em CDCl3 e CD3OD dos extratos dos micélios do fungo *Penicillium* sp. M02.



Fonte: dados da pesquisa,2018

**A** = Extrato do micélio; **B** = Extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II).

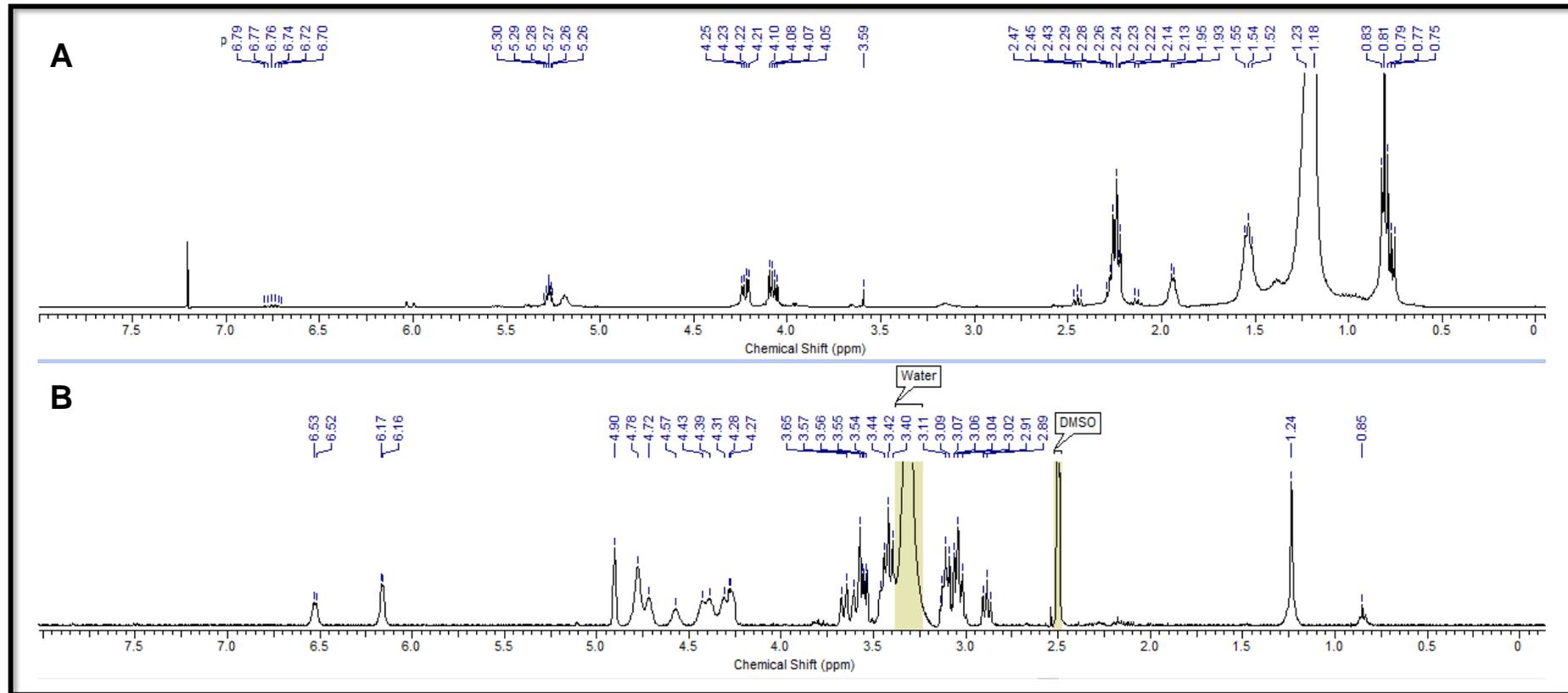
Figura 4. 12 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD dos extratos dos caldos fermentados do fungo *Penicillium* sp. M03.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

**A** = Extrato do caldo fermentado; **B** = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo cádmio (II).

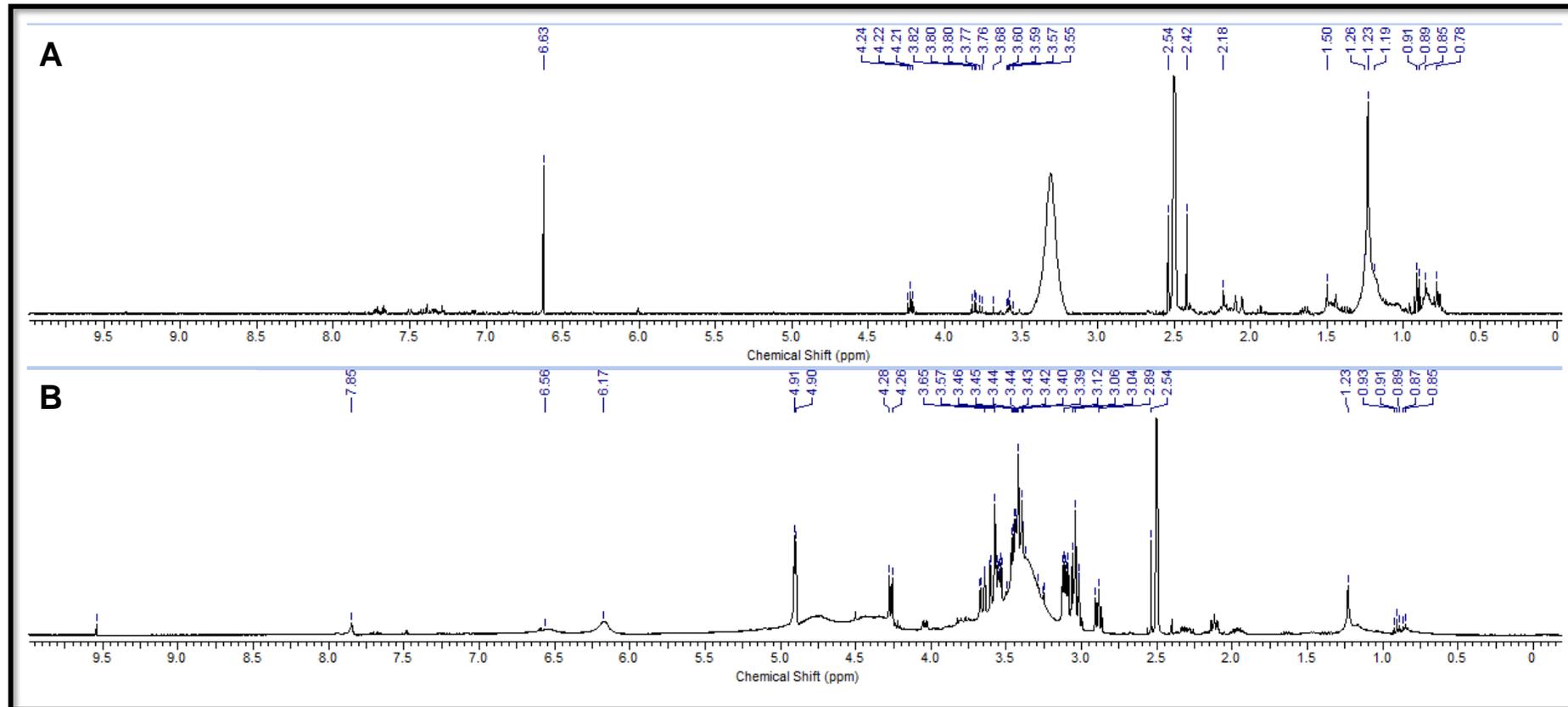
Figura 4. 13 - Espectros de RMN-1H (500 MHz) em CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD dos extratos dos micélios do fungo *Penicillium* sp. M03.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

A = Extrato do micélio; B = Extrato do micélio obtido do meio contendo cádmio (II).

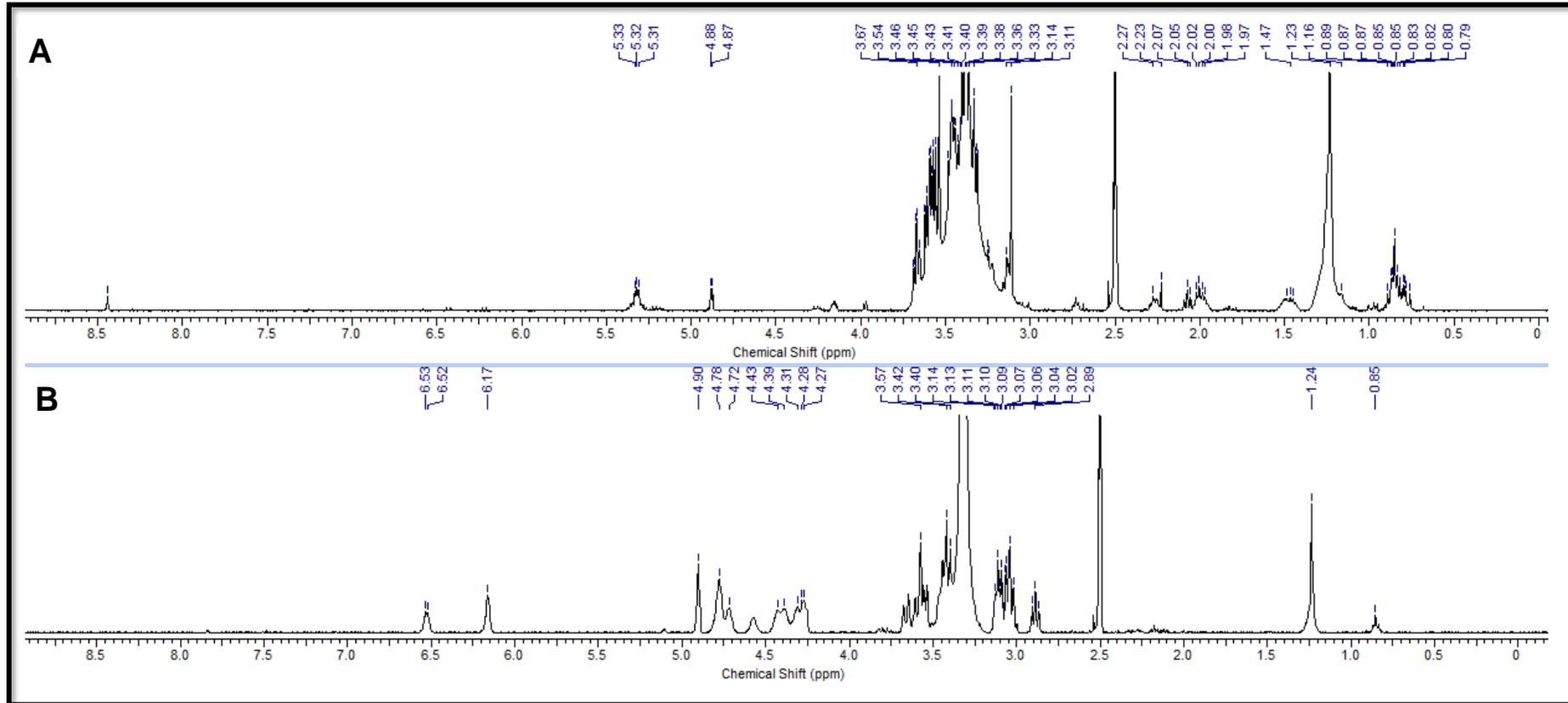
Figura 4. 14 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em DMSO-D6 e dos extratos dos caldos fermentados do fungo *Penicillium* sp. M04.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

A = Extrato do caldo fermentado; B = Extrato do caldo fermentado obtido do meio contendo cádmio (II).

Figura 4. 15 - Espectros de RMN-1H (500 MHz) em DMSO-D6 dos extratos dos micélios do fungo *Penicillium* sp. M03.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

**A** = Extrato do micélio; **B** = Extrato do micélio obtido do meio contendo Cd(II).

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H apresentados foram obtidos dos extratos brutos, assim, podemos inferir que a maioria dos sinais mais intensos são provenientes de açúcares e material graxo. Na análise do espectro da Figura 4.8 (A), obtido do mesmo fungo e nas mesmas condições do extrato de onde foi isolado o trichodimerol o efeito da presença destes constituintes mais abundantes fica evidente, fazendo com que os sinais da substância estejam com baixa intensidade, ainda assim, observa-se sinais na região de hidrogênios aromáticos que se pode atribuir à presença desta substância e possivelmente de outros derivados sorbicilinoídes.

Através destas duas técnicas (CLAE-DAD e RMN-<sup>1</sup>H), verifica-se que as quatro espécies tiveram os seus perfis de metabolismo secundário modificados acentuadamente de modo negativo, haja vista a diminuição de intensidade e/ou supressão de picos cromatográficos e sinais de deslocamentos químicos de hidrogênio ( $\delta_H$ ) dos extratos obtidos do meio contendo cádmio (II) na comparação com os extratos obtidos de meio livre do metal.

Ainda há poucos estudos sobre a influência do cádmio no metabolismo de fungos e, em sua maioria, direcionado ao conhecimento genômico, mas todos descrevem a modificação no desenvolvimento do microrganismo, demonstrando o efeito nocivo do metal aos organismos vivos. Em um destes estudos, Cacciola e colaboradores (2015), visando compreender os mecanismos de tolerância do fungo *Trichoderma harzianum* ao cádmio e relataram a identificação da modificação em 108 genes e inferir que há uma possível ativação de uma proteína transportadora de  $Cd^{2+}/Zn^{2+}$  por transdução de sinal ou uma ATPase de membrana poderia estar envolvidas no processo de compartimentalização do metal na célula.

O efeito de cádmio no desenvolvimento de *T. harzianum* também foi alvo do estudo de Oshiquiri e seus colaboradores (2020) onde foram identificadas modificações genéticas com aumento da regulação de processos de homeostase celular, iniciação da transcrição, biossíntese de compostos de enxofre, processamento de RNA e modificação de proteínas de transporte. Já os processos metabólicos de carboidratos sofreram depleção.

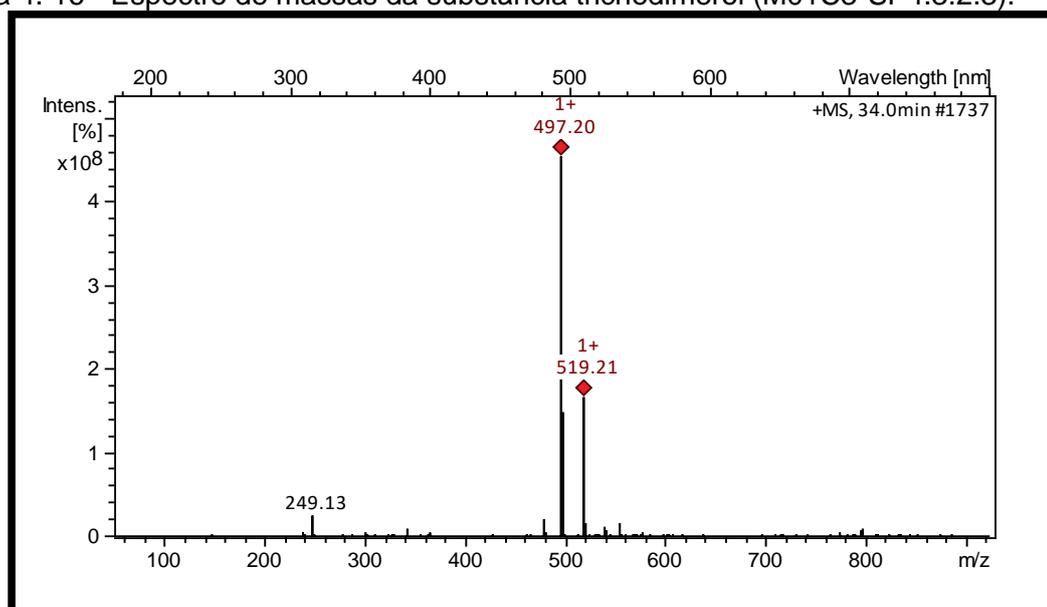
Em uma associação construtiva, do ponto de vista do incremento ao metabolismo secundário, Angumeenal e seus colaboradores (2002) relataram o incremento na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* utilizando cádmio, chumbo e cromo como estimulantes.

### 4.3.3 Identificação de *trichodimerol*

A fração M01C3-SP4.3.2.3 pura se apresentou como um sólido de coloração amarela solúvel em metanol. A determinação da estrutura e identificação como o *trichodimerol*, se deu por meio da análise dos dados de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear uni ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (COSY, HSQC e gHMBC) e a comparação com os dados da literatura. (o conjunto dos espectros está apresentado no Apêndice C).

O espectro de massas (Figura 4.16) obtido em baixa resolução por ESI-MS (+), apresentou um pico em 497,20  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , além de um pico correspondente ao aduto de sódio em 519,21  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_8$  (calculada 496).

Figura 4. 16 - Espectro de massas da substância trichodimerol (M01C3-SP4.3.2.3).

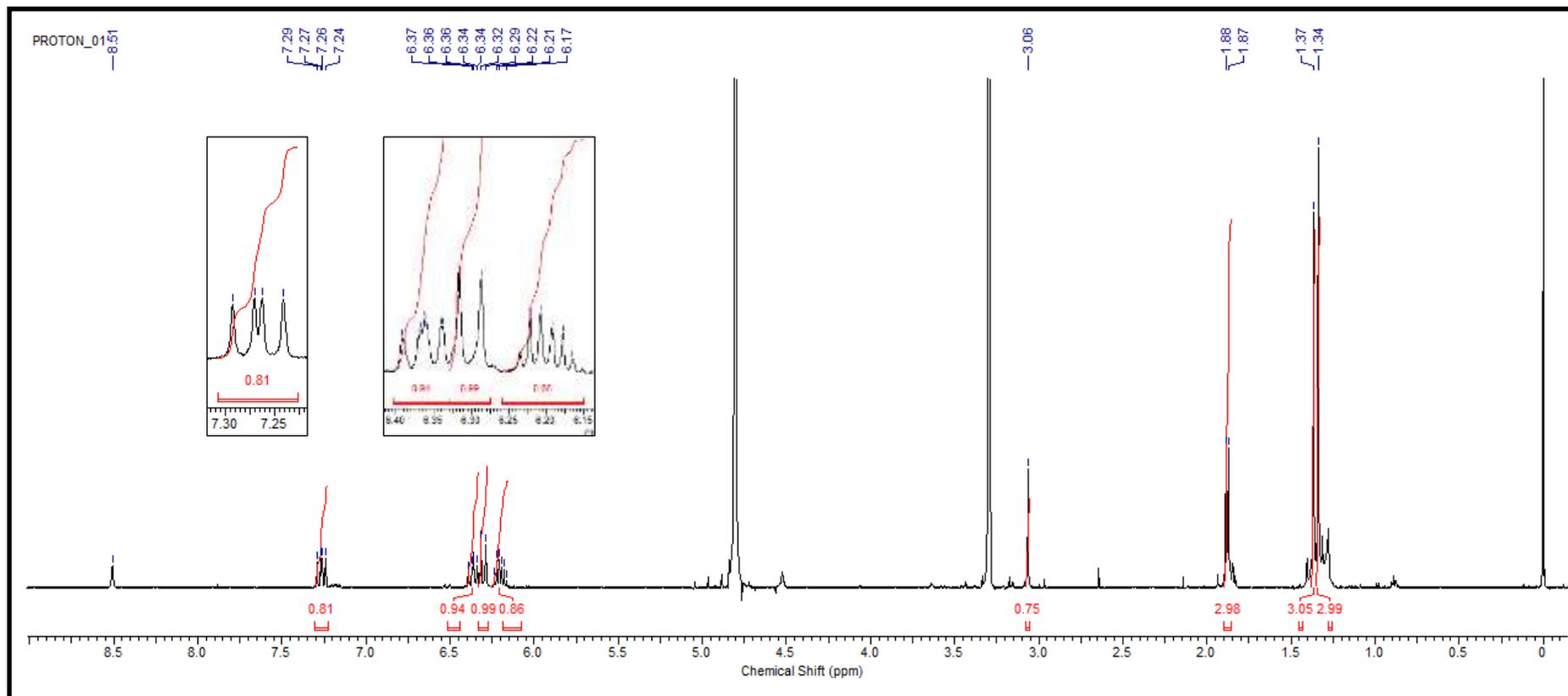


Fonte: dados da pesquisa, 2018

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 4.17) apresentou um sinal de dubleto em  $\delta$  1,88 ppm com integração para três átomos de hidrogênio e acoplamento (J) de 7,0 Hz, dois sinais singletos metílicos em  $\delta$  1,37 ppm e  $\delta$  1,34 ppm, e um sinal singlete de hidrogênio metínico em  $\delta$  3,06 ppm. Além disso, o espectro apresenta um conjunto de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos insaturados, com um dubleto em  $\delta$  6,30 ppm (1H, J 14,7 Hz), duplo-duplo dubleto em

$\delta$  6,36 ppm (1H, J 14,2 Hz; 10,8 Hz; 1,7 Hz), duplo quarteto em  $\delta$  6,21 ppm (1H, J 14,2 Hz; 7,0 Hz) e um duplo dubleto em  $\delta$  7,26 ppm (1H, J 10,8 Hz; 14,7 Hz).

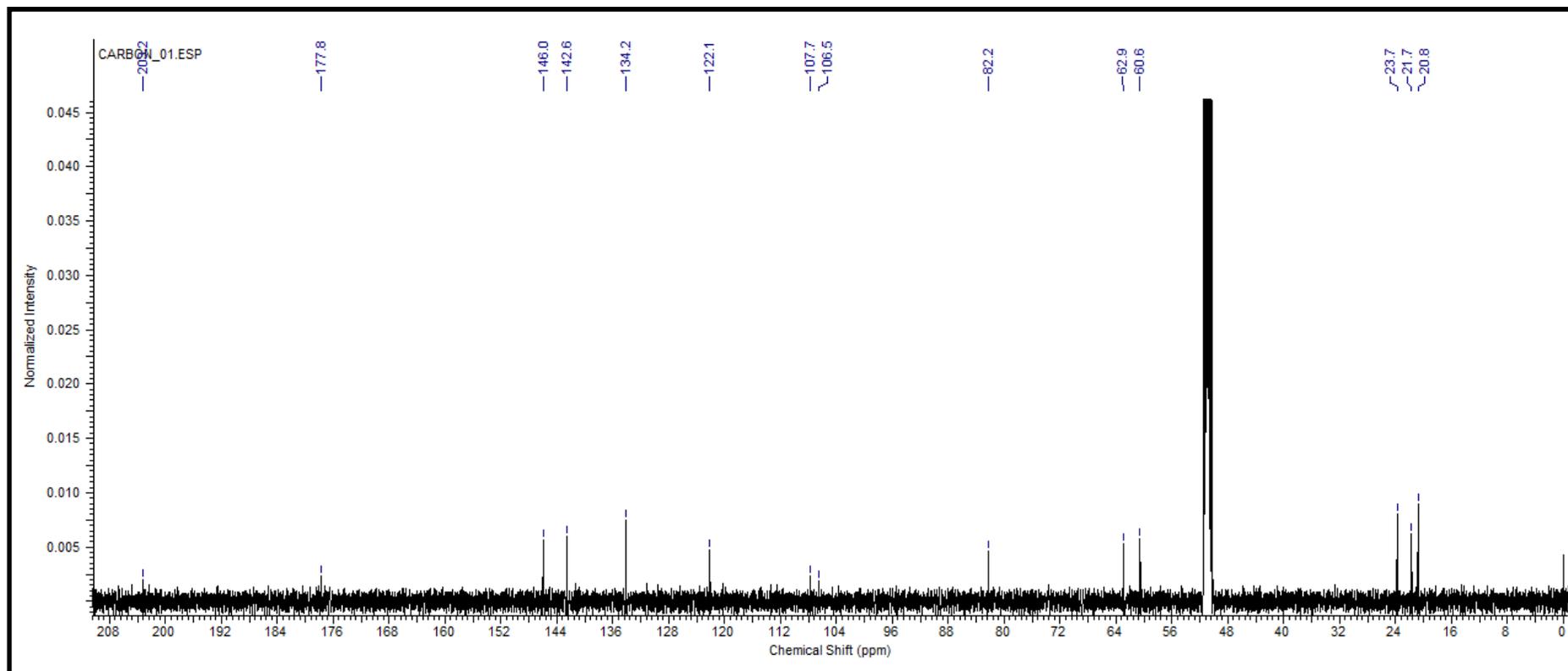
Figura 4. 17 - Espectro de RMN-1H (500 MHz) em CD<sub>3</sub>OD da fração M01C3-SP4.3.2.3.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

No espectro de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) mostrado na Figura 4.18, é possível identificar 14 sinais, sendo seis sinais de carbonos quaternários ( $\delta$  60,6 ppm; 82,2 ppm; 106,5 ppm; 107,7 ppm; 177,8 ppm e 203,2 ppm), cinco carbonos metínicos ( $\delta$  62,9 ppm; 122,1 ppm; 134,2 ppm; 142,6 ppm; 146,0 ppm) e três sinais de carbonos metílicos ( $\delta$  20,8 ppm; 21,7 ppm e 23,7 ppm). A quantidade de sinais visualizados no espectro de  $^{13}\text{C}$ , representa metade dos carbonos presentes na fórmula molecular proposta, logo é possível detectar que a molécula se trata de um dímero.

Figura 4. 18 - Espectro de RMN-13C (500 MHz) em CD3OD da fração M01C3-SP4.3.2.3.

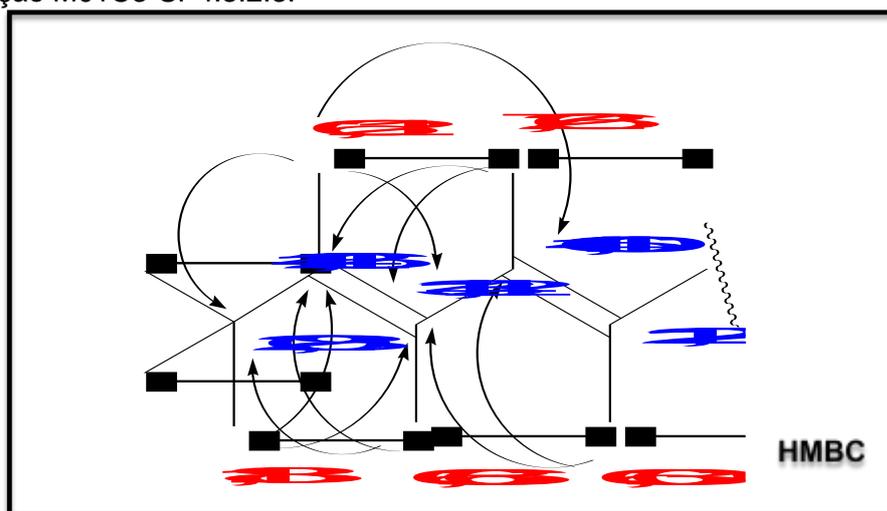


Fonte: dados da pesquisa, 2018

A partir do mapa de contorno *g*HSQC (Figuras 5.7-5.6, p. 277, Apêndice D), foi possível verificar que os carbonos em  $\delta$  20,8; 21,7 e 23,7 estão ligados, respectivamente aos hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,88; 1,37 e 1,34. O carbono em  $\delta$  61,0 apresenta correlação com o hidrogênio metínico em  $\delta$  3,07. O grupo de carbonos insaturados em  $\delta$  122,1; 134,2; 142,6 e 146,0 estão conectados respectivamente aos hidrogênios em  $\delta$  6,30; 6,36; 6,21; 7,26.

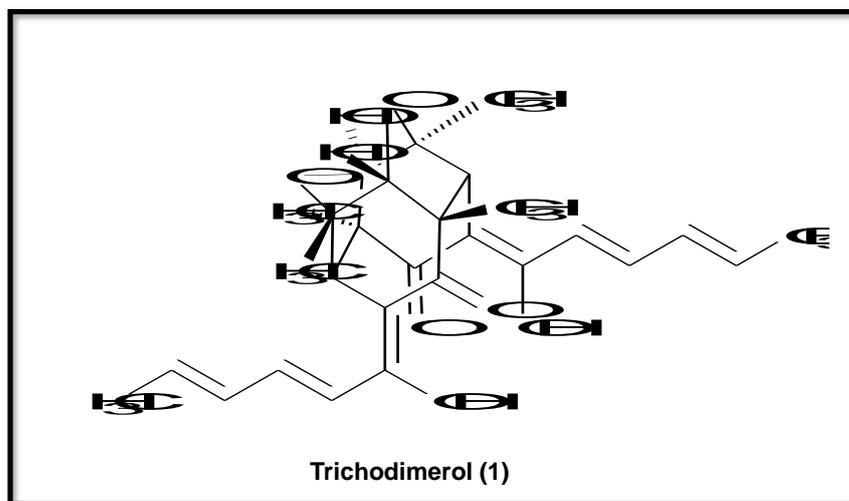
Com base nas correlações apresentadas no mapa de contorno *g*HMBC (Figuras 5.8-5.11, Apêndice D, p. 279 a 282), e dos dados obtidos do *g*COSY (Figuras 5.4 e 5.5, Apêndice D, p. 275) foi possível montar a estrutura parcial mostrada na Figura 4.19.

Figura 4. 19 - Correlações observadas no mapa de contorno *g*HMBC para o composto presente na fração M01C3-SP4.3.2.3.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

A partir das informações do espectro de massas, cuja fórmula molecular obtida ( $C_{28}H_{32}O_8$ ) nos remete à consideração da presença de 13 insaturações (IDH) em união com a análise da semiestrutura da Figura 4.19, com informação de se tratar de um substância dimérica obtida nos espectros de RMN unidimensionais e demais correlações apresentadas pelos experimentos bidimensionais, pode se concluir que se tratava de uma estrutura policíclica o que foi confirmado com os dados da literatura (ANDRADE; AYER; MEBE, 1992). A comparação apresentada na Tabela 4.1, permitiram identificar a substância presente na fração M01C3-SP4.3.2.3 como o *trichodimerol* (Figura 4.20) um policetídeo bisorbicilinoide.

Figura 4. 20 - Trichodimerol - (C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>) (MM = 496)


Fonte: elaborado pelo autor, 2020

 Tabela 4. 2 - Atribuições de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H e comparação com os dados da literatura para a substância trichodimerol.

Posição	Dados da Substância <sup>a</sup>		Dados da Literatura <sup>b</sup>	
	δ de <sup>13</sup> C (ppm) -	δ de <sup>1</sup> H (mult., J Hz, H)	δ de <sup>13</sup> C (ppm)	δ de <sup>1</sup> H (ppm)
1, 1'	60,6	3,07 (s, 1H)	57,6	3,00 (s, 1H)
2, 2'	82,2		78,9	
3, 3'	107,7		104,9	
4, 4'	62,9		58,9	
5, 5'	203,2		197,9	
6, 6'	106,5		102,8	
7, 7'	177,8		176,0	
8, 8'	122,1	6,30 (d, 14,7; 1H)	118,6	6,11 – 6,34 (m)
9, 9'	146,0	7,26 (dd, 14,7; 10,8; 1H)	143,6	7,32 (dd, 14,7; 10,8; 1H)
10, 10'	134,2	6,36 (ddd, 14,2; 10,8; 1,7; 1H)	131,0	6,11 – 6,34 (m)
11, 11'	142,6	6,21 (dq, 14,2; 7,0; 1H)	140,3	6,11 – 6,34 (m)
12, 12'	20,8	1,88 (d, 7,0; 3H)	18,7	1,89 (d, 6,5)
13, 13'	23,7	1,34 (s, 3H)	21,3	1,43 (s)
14, 14'	21,7	1,37 (s, 3H)	18,9	1,46 (s)

Fonte: dados da pesquisa, 2018

<sup>a</sup>Espectrômetro 500 MHz para <sup>1</sup>H e para <sup>13</sup>C 125 MHz, amostra diluída em CD<sub>3</sub>OD, com uso de TMS.

<sup>b</sup>Espectrômetro 360 MHz para <sup>1</sup>H e 75,5 MHz para <sup>13</sup>C, amostra diluída em CDCl<sub>3</sub> (ANDRADE; AYER; MEBE, 1992)

Trichodimerol é uma substância que apresenta uma estrutura contendo um núcleo em forma de gaiola o que lhe garante um aspecto muito especial por ser incomum entre os metabólitos secundários (HARNED; VOLP, 2011). Foi inicialmente isolada do fungo *Trichoderma longibrachiatum* (ANDRADE; AYER; MEBE, 1992). Posteriormente, foram relatados isolamentos a partir de outras espécies do gênero *Trichoderma*, a exemplo de *Trichoderma citrinoviride* (EVIDENTE et al., 2009; MARRA et al., 2019), *Trichoderma reesei* (HINTERDOBLER et al., 2019; MONROY et al.,

2017; REHMAN et al., 2020) *Trichoderma* sp. (ABDEL-LATEFF, 2008; ABDEL-LATEFF; FISCH; WRIGHT, 2009; ABE et al., 2001; ABE; MURATA; HIROTA, 1998; NEUMANN et al., 2007; SHIROTA et al., 1997; ZHAI et al., 2016; ZHAO et al., 2017), bem como a partir dos fungos *Acremonium citrinum* (PENG et al., 2020), *Clonostachys rósea* (ZHAI et al., 2016) e *Phialocephala* sp. (LI et al., 2010).

Além disso, assim como neste trabalho, também há descrição de isolamento da substância a partir de cepas isoladas do solo (LEE et al., 2005; LIU et al., 2005) e de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium*, como é o caso da produção por *Penicillium chrysogenum* (CASTILLO et al., 2016; GAO et al., 1995; MAZZUCCO; WARR, 1996), *Penicillium Terrestre* (LIU et al., 2005) e *Penicillium* sp. (ALY et al., 2011; CHEN et al., 2015).

Estes estudos também denotam uma grande importância biológica para substância, sendo associada, dentre outros, à processos de inibição da produção de fator de necrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) (LEE et al., 2005; WARR et al., 1996), à atividade citotóxica (DU et al., 2009; YAO et al., 2017, 2015), atividade antioxidante (ABDEL-LATEFF; FISCH; WRIGHT, 2009; ABE et al., 2001; ABE; MURATA; HIROTA, 1998); atividade anti-inflamatória (ZHAO et al., 2017) e atividade anti-tripanososoma (ALY et al., 2011).

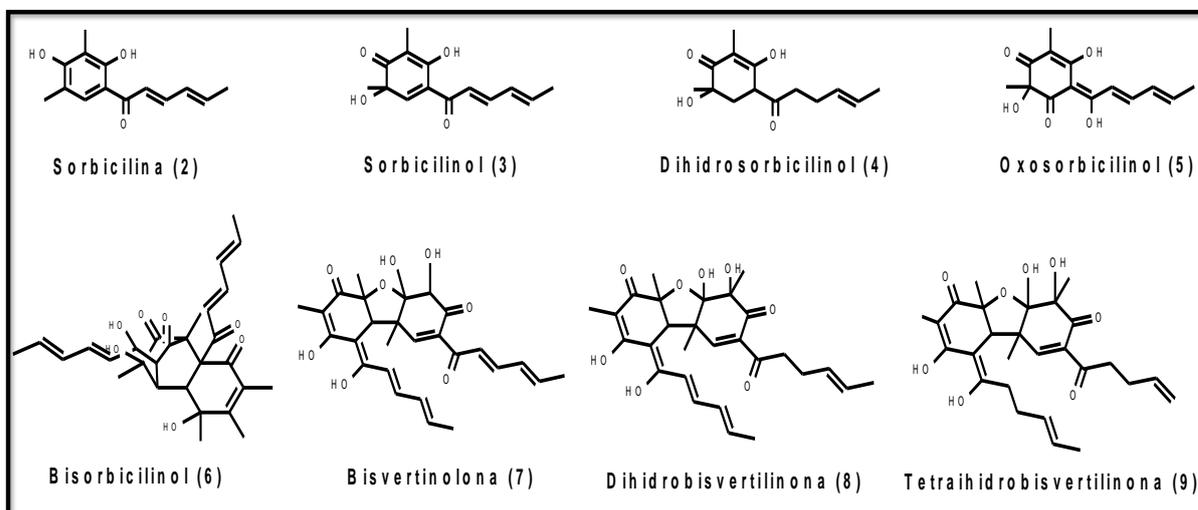
#### 4.3.4 Análise do perfil químico por espectrometria de massas

Como foi possível verificar através das imagens de cromatogramas dos extratos dos fungos (seção 4.3.2), o perfil metabólico na presença de cádmio (II) foi consideravelmente alterado. Assim, tendo em vista o isolamento da substância trichodimerol, e ainda que esta pertença a uma subfamília de ocorrência conhecida no gênero *Penicillium* e em outros gêneros, a interferência de cádmio (II) no desenvolvimento metabólico dos fungos resistente ao metal, foi analisada a partir da busca de metabólitos derivados da sorbicilina, através da metodologia de pesquisa nos cromatogramas de íons extraídos utilizando o “software” processador de espectros Bruker Compass DataAnalysis®.

Na Figura 4.21 apresenta-se as estruturas da sorbicilina e de seus derivados, os quais já possuem relatos de isolamento a partir de fungos do gênero *Penicillium*, a exemplo do trabalho de Salo e seus colaboradores (2016) que relacionam essas substâncias como constituintes do extrato obtida da cultura de uma cepa de

*Penicillium chrysogenum* em estudo com objetivo de identificar as enzimas envolvidas na biossíntese destas substâncias.

Figura 4. 21 - Substâncias relacionados à sorbicilina isoladas de *Penicillium chrysogenum*.



Fonte: Adaptado de Salo e seus colaboradores (2016).

Após obtenção das análises de Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas de baixa resolução (CL/EM) dos extratos, foi realizada uma busca nos cromatogramas de íons extraídos utilizando o processador de espectros Bruker Compass DataAnalysis versão 4.2, pelos picos característicos de oitos substâncias derivadas da sorbicilina mostrados na Figura 4.21, além do trichodimerol.

A tabela 4.2 apresenta o resultado da busca para os extratos do *Penicillium* sp. M01.

Tabela 4. 3 - Atribuições de pico de metabólitos pesquisados no espectro CL/EM dos extratos do fungo *Penicillium* sp. M01

Substâncias	Massa molecular	m/z [M+H] <sup>+</sup>	Extratos			
			M01C	M01C-Cd	M01M	M01M-Cd
Sorbicilina	232	-	-	-	-	-
Sorbicilinol	248	249,14	+	-	-	-
Dihidrosorbicilinol	250	-	-	-	-	-
Oxosorbicilinol	264	-	-	-	-	-
Trichodimerol	496	497,22	+	-	+	-
Bisorbicilinol	496	-	-	-	-	-
Bisvertinolona	512	513,18	+	-	-	-
Dihidrobisvertinolona	514	-	-	-	-	-
Tetraihidrobisvertinolona	516	517,22	+	-	-	-

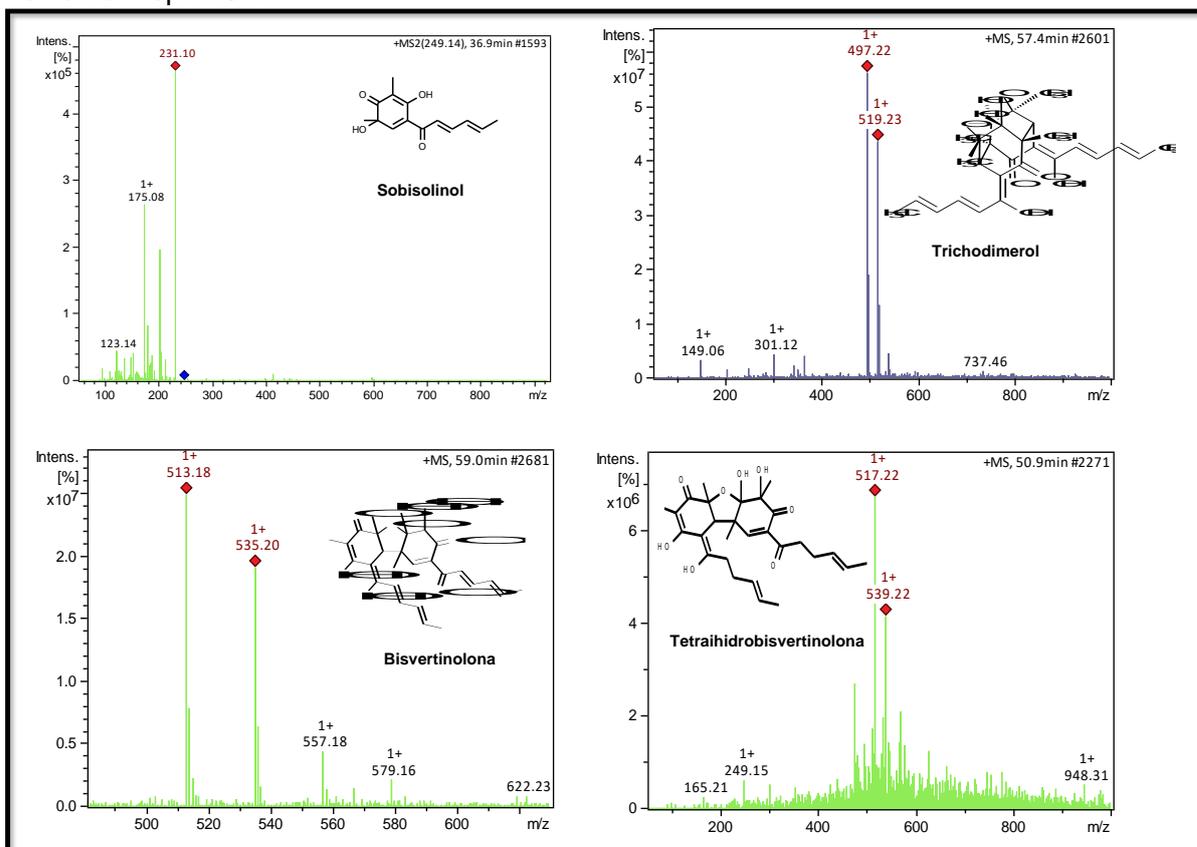
Fonte: dados da pesquisa, 2018

M01C = Extrato do caldo fermentado; M01C-Cd = Extrato do caldo fermentado do meio contendo cádmio (II); M01M = Extrato do micélio; M01M-Cd = Extrato do micélio do meio contendo cádmio (II). (+) representa a presença e (-) a ausência do composto em cada extrato.

Além de trichodimerol, de acordo com os dados apresentados na Tabela 4.2, a presença dos sinais em  $m/z$  249,14; 513,18 e 517,22, permitiu inferir que houve a produção de três derivados da sorbicilina no extrato do caldo fermentado (M01C), quem correspondem, respectivamente ao sorbicilinol (**3**), bisvertinolona (**7**) e o tetraihidrobisvertinolona (**9**), cujos espectros de massas são apresentados na Figura 4.22. Foi possível identificar trichodimerol também no extrato do micélio do meio livre de cádmio (II) (M01M). A ausência do pico referente à sorbicilina pode encontrar apoio em estudos anteriores que relatam sua presença apenas em quantidade traço a partir de extratos de fungos (HARNED; VOLP, 2011; LI et al., 2018)

Na Tabela 4.2 também é apresentada a informações de que o pico correspondente ao trichodimerol, bem como os demais pesquisados, não foram identificados nos extratos obtidos do meio contendo cádmio (II) (M01C-Cd e M01M-Cd). Deste modo, ratifica-se que os íons do metal promoveram uma grande depleção na produção de metabólitos pelo fungo *Penicillium* sp. M01.

Figura 4. 22 - Espectros de massas de derivados da sorbicilina produzidos pelo fungo *Penicillium* sp. M01.



Fonte: dados da pesquisa, 2018

Não foram encontrados nenhum dos picos pesquisados nos extratos (caldo fermentado e micélio nas duas condições) dos fungos *Penicillium* sp. M02, *Penicillium* sp. M03 e *Penicillium* sp. M04.

#### 4.4 CONCLUSÃO

Apresentamos neste trabalho o primeiro relato sobre os efeitos de cádmio no desenvolvimento e perfil químico do metabolismo secundário de quatro espécies de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium*. Embora as quatro espécies tenham demonstrado alta resistência ao cádmio, todos tiveram o desenvolvimento diminuído em cultivo suplementado com o metal. Além disso, a observação da alteração no perfil cromatográfico por CLAE-DAD, espectrometria de massas e espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H, os quais permitem visualizar também, de modo geral, a diminuição da produção e metabólitos secundários associada à presença de Cd(II).

Os resultados experimentais indicam que o estresse provocado pelo metal ao metabolismo dos fungos não resultou em uma interação benéfica para o fornecimento dos metabólitos secundários de importância biológica, trichodimerol e outros derivados da sorbicilina, que foram alvos de busca neste trabalho, uma vez que não foi possível verificar o incremento ou o início da produção pelos organismos estudados.

## 4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATEFF, A. Bioproduction of Sorbicillin Derivatives from Marine *Trichoderma* sp. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 9–10, p. 631–635, 1 out. 2008.

ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K.; WRIGHT, A. D. Trichopyrone and Other Constituents from the Marine Sponge-Derived Fungus *Trichoderma* sp. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 3–4, p. 186–192, 1 abr. 2009.

ABE, N. et al. Sorbicillinol, a Key Intermediate of Bisorbicillinoid Biosynthesis in *Trichoderma* sp. USF-2690. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2271–2279, jan. 2001.

ABE, N.; MURATA, T.; HIROTA, AKIRA. Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 661–666, 1998.

ALY, A. H. et al. NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 414–421, 2011.

ANDRADE, R.; AYER, W. A.; MEBE, P. P. The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. Part 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 2526–2535, 1 out. 1992.

ANGUMEENAL, A. et al. Effect of transition metal cations and anions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 9, p. 508–512, 2002.

BERTRAND, S. et al. Multi-well fungal co-culture for de novo metabolite-induction in time-series studies based on untargeted metabolomics. **Mol. BioSyst.**, v. 10, n. 9, p. 2289–2298, 2014.

CACCIOLA, S. O. et al. Cadmium induces cadmium-tolerant gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 11, p. 1559–1570, nov. 2015.

CASTILLO, N. I. et al. Identification of mycotoxins by UHPLC-QTOF MS in airborne fungi and fungi isolated from industrial paper and antique documents from the Archive of Bogota. **Environmental Research**, v. 144, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 130–138, 2016.

CHEN, H. et al. A new fusarielin analogue from *Penicillium* sp. isolated from the Mediterranean sponge *Ircinia oros*. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 39, p. 5317–5320, set. 2015.

DU, L. et al. Cytotoxic Sorbicillinoids and Bisorbicillinoids from a Marine-Derived Fungus *Trichoderma* sp. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 57, n. 2, p. 220–223, 2009.

EVIDENTE, A. et al. Bisorbicillinoids Produced by the Fungus *Trichoderma citrinoviride* Affect Feeding Preference of the Aphid *Schizaphis graminum*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 5, p. 533–541, maio 2009.

GADD, G. M. Interactions of Fungi with Toxic Metals. In: POWELL, K. A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. F. (Eds.). . **The Genus *Aspergillus***. Boston, MA: Springer US, 1994. p. 361–374.

GAO, Q. et al. Crystal Structure of Trichodimerol. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 12, p. 1817–1821, dez. 1995.

GAO, Y. et al. Melatonin enhances the cadmium tolerance of mushrooms through antioxidant-related metabolites and enzymes. **Food Chemistry**, v. 330, p. 127263, nov. 2020.

GARG, N.; AGGARWAL, N. Effects of Interactions Between Cadmium and Lead on Growth, Nitrogen Fixation, Phytochelatin, and Glutathione Production in Mycorrhizal *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 3, p. 286–300, set. 2011.

GUELF, A. et al. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, n. 49, p. 63–73, 2003.

HARNED, A. M.; VOLP, K. A. The sorbicillinoid family of natural products: Isolation, biosynthesis, and synthetic studies. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 11, p. 1790–1810, 2011.

HEGEDÜS, N. et al. Effect of heavy metals on the glutathione status in different ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p. 1339–1343, 2007.

HINTERDOBLER, W. et al. The role of PKAc1 in gene regulation and trichodimerol production in *Trichoderma reesei*. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 12, dez. 2019.

IJOMA, G. N.; SELVARAJAN, R.; TEKERE, M. The potential of fungal co-cultures as biological inducers for increased ligninolytic enzymes on agricultural residues. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 1, p. 305–324, jan. 2019.

ILYAS, S. et al. Proteomic analysis of an environmental isolate of *Rhodotorula mucilaginosa* after arsenic and cadmium challenge: Identification of a protein expression signature for heavy metal exposure. **Journal of Proteomics**, v. 141, p. 47–56, jun. 2016.

- KHULLAR, S.; SUDHAKARA REDDY, M. Cadmium and arsenic responses in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: glutathione metabolism and its role in metal(loid) homeostasis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 11, n. 2, p. 53–61, abr. 2019.
- LEE, D. et al. Fungal Metabolites, Sorbicillinoid Polyketides and Their Effects on the Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$ . **J. Antibiot.**, v. 58, n. 10, p. 6, 2005.
- LI, C. et al. Constitutive hyperproduction of sorbicillinoids in *Trichoderma reesei* ZC121. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 291, dez. 2018.
- LI, D. et al. Three new sorbicillin trimers, trisorbicillinones B, C, and D, from a deep ocean sediment derived fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. **Tetrahedron**, v. 66, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 5101–5106, 2010.
- LIU, W. et al. Dihydrotrichodimerol and Tetrahydrotrichodimerol, Two New Bisorbicillinoids, from a Marine-derived *Penicillium* terrestre. **J. Antibiot.**, v. 58, n. 10, p. 4, 2005.
- MARRA, R. et al. Inhibitory effect of trichodermanone C, a sorbicillinoid produced by *Trichoderma citrinoviride* associated to the green alga *Cladophora* sp., on nitrite production in LPS-stimulated macrophages. **Natural Product Research**, v. 33, n. 23, p. 3389–3397, 2 dez. 2019.
- MAZZUCCO, C. E.; WARR, G. Trichodimerol (BMS-182123) inhibits lipopolysaccharide-induced eicosanoid secretion in THP-1 human monocytic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, n. 2, p. 271–277, ago. 1996.
- MONROY, A. A. et al. A CRE1- regulated cluster is responsible for light dependent production of dihydrotrichotetronin in *Trichoderma reesei*. **PLoS One**, v. 12, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. e0182530/1-e0182530/20, 2017.
- NEUMANN, K. et al. Novel sorbicillin derivatives with an unprecedented carbon skeleton from the sponge-derived fungus *Trichoderma* species. **European Journal of Organic Chemistry**, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 2268–2275, 2007.
- OSHIQUIRI, L. H. et al. *Trichoderma harzianum* transcriptome in response to cadmium exposure. **Fungal Genetics and Biology**, v. 134, p. 103281, jan. 2020.
- PENG, X.-P. et al. Acrepyrone A, a new  $\gamma$ -pyrone derivative from an endophytic fungus, *Acremonium citrinum* SS-g13. **Natural Product Research**, v. 34, n. 8, p. 1091–1096, 17 abr. 2020.
- REHMAN, S. U. et al. Sorbicillinoid Derivatives From Sponge-Derived Fungus *Trichoderma reesei* (HN-2016-018). **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1334, 23 jun. 2020.

SAINZ HERRÁN, N. et al. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 593–600, maio 2008.

SALO, O. et al. Identification of a Polyketide Synthase Involved in Sorbicillin Biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3971–3978, 1 jul. 2016.

SHARMA, V.; PARMAR, P.; KUMARI, N. Differential cadmium stress tolerance in wheat genotypes under mycorrhizal association. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 14, p. 2025–2036, 5 dez. 2016.

SHIROTA, O. et al. Structural elucidation of trichotetronines: polyketides possessing a bicyclo[2.2.2]octane skeleton with a tetronic acid moiety isolated from *Trichoderma* sp. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 2961–2964, 1997.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, n. 2, p. 264–270, jan. 1997.

WARR, G. A. et al. TNF- $\alpha$  by Macrophages and Monocytes. **THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS**, v. 49, n. 3, p. 7, 1996.

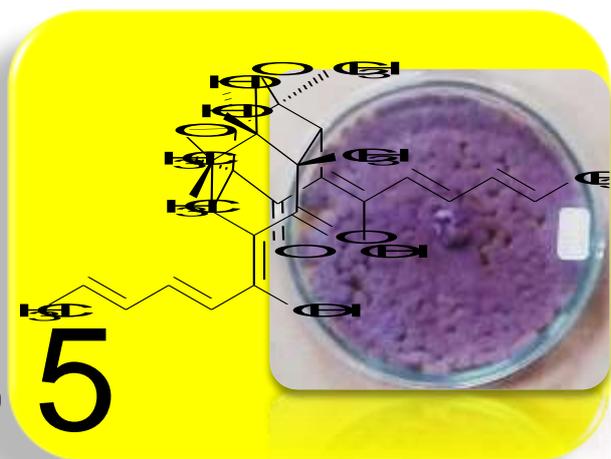
YAO et al. Trichodimerol induces apoptosis in A375-S2 human melanoma cells through modulation of RK and p38 activities mediated by reactive oxygen species. **Abstracts / Biochemical Pharmacology**, v. 139, p. 1, 2017.

YAO, Y. et al. Trichodimerol and sorbicillin induced apoptosis of HL-60 cells is mediated by reactive oxygen species. n. 6, p. 394–398, jun. 2015.

ZHAI, M.-M. et al. Isolation of Secondary Metabolites from the Soil-Derived Fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a Biological Control Agent, and Evaluation of Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 2298–2306, 23 mar. 2016.

ZHAO, J.-L. et al. Bioactive steroids and sorbicillinoids isolated from the endophytic fungus *Trichoderma* sp. Xy24. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. Copyright (C) 2020 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 1028–1035, 2017.

# Capítulo 5



## Considerações Finais

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da metodologia de espalhamento de suspensão de solo em placa levou ao isolamento de uma considerável diversidade de espécies fúngicas, em sua maioria pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, assim identificados utilizando microscopia ótica e comparação com a literatura.

A realização de metodologia de triagem por atividade biológica e enzimática, através de desenvolvimento dos fungos em placas de co-cultura e na presença de meios específicos, mostrou-se muito eficiente por serem técnicas simples, não onerosas e de resultados muito rápidos, com certeza deve servir de modelo para futuros trabalhos do grupo, sobretudo os bioguiados com alvo na obtenção de espécies com capacidades de produção de enzimas de interesse comercial e/ou o isolamento de metabólitos com atividade biológica.

Foi possível identificar a grande habilidade adaptativa dos isolados frente ao estresse por cádmio, um metal altamente tóxico que, somente em altíssimas concentrações promoveu a inativação das quatro espécies resistentes. Testes com matrizes reais, certamente ainda necessitam ser realizados, no entanto, as capacidades de bioacumulação e biossorção demonstradas nos ensaios já são animadoras.

Há vários relatos da avaliação da associação de fungos com outras espécies e/ou com agentes de estresse visando a modificação metabólica para, por exemplo, promover a produção de substâncias de importância médica.

Contudo, este é um dos poucos relatos sobre o estudo da interferência do cádmio no perfil químico de fungos, sendo o primeiro a descrever esse efeito em um grupo de fungo do gênero *Penicillium*, uma vez que a busca em bases de dados não remeteu resultados. Neste estudo, avaliamos que o estresse causado pelo cádmio aos fungos não resultou em uma interação benéfica. Todas as quatro espécies tiveram seu crescimento e o perfil metabólico alterado, por meio da supressão da produção de substâncias.

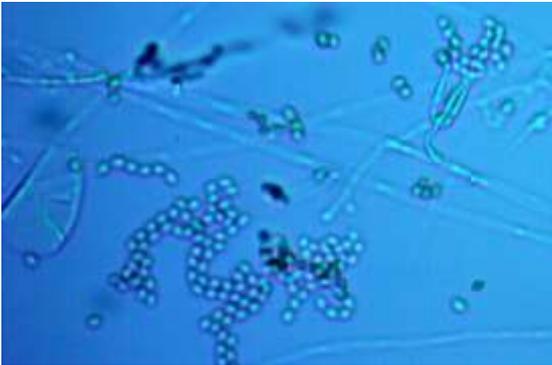
A utilização da espectroscopia de massas incrementou os resultados para o perfil, contudo, o potencial da técnica não pode ser utilizado por completo. Experimentos necessitam ser refeitos, e talvez com a obtenção de novos extratos, para o emprego da metodologia de construção de redes moleculares, com a qual, o nível de confiança quanto a identificação de substância torna-se maior.

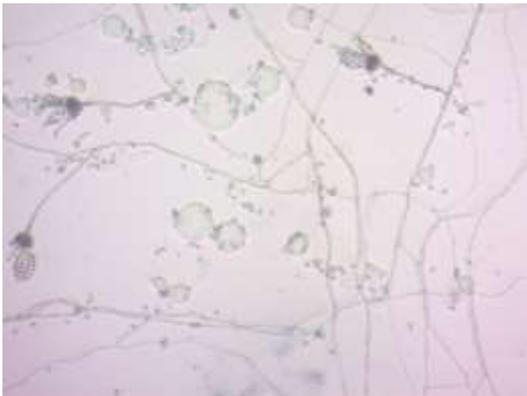
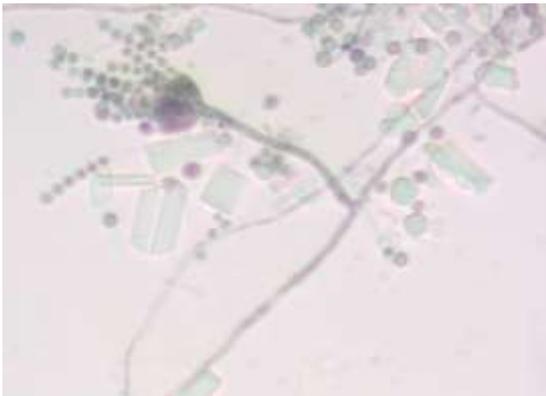
O grupo de fungos isolados, sobretudo os resistentes a cádmio contribuem para confirmar o quanto esses organismos são extraordinários e que guardam grandes e diversos potenciais a serem explorados.

# Apêndices

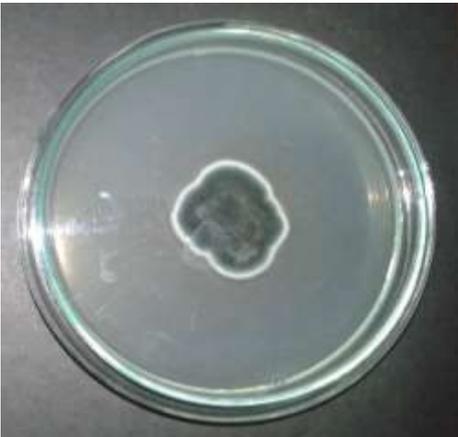
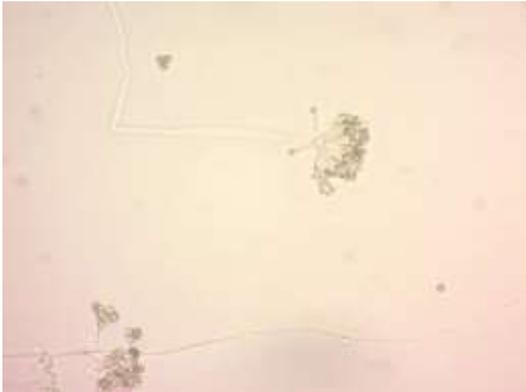
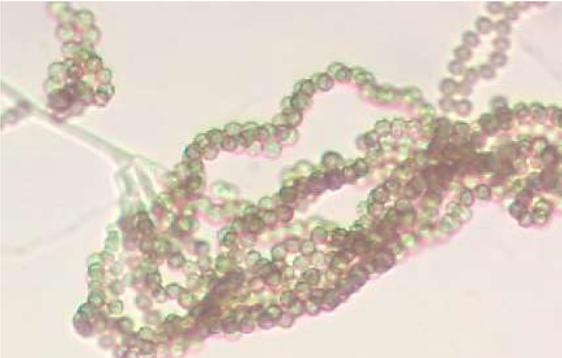


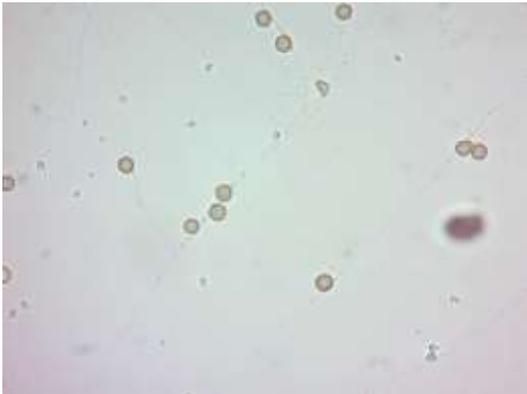
**APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICAS DAS LINHAGENS ISOLADAS DO SOLO PARA DEPÓSITO NA COLEÇÃO DE CULTURAS DE MICRORGANISMOS DO LBQM.**

Número da Cultura:01 <b>LBQM-M01</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<p><b>Características Macromorfológicas</b></p> <p>Meio BDA; 5 dias de incubação; 2,51 cm de diâmetro          Micélio: filamentososo/rasteiro          Coloração da colônia: roxa          Reverso: amarelo          Textura de camurça; superfície rugosa; centro umbilicado; borda franjada          Produção de pigmento: amarelo difuso no ágar</p>	<p>Código da linhagem: A4b Isolado 3          Fonte de Isolamento: solo          Método de preservação: Castellani          Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido</p> <p><b>Características Micromorfológicas:</b></p> <p><b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas  <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa</p>
<b>Fotografias da linhagem</b>	
<p>a) Frente</p> 	<p>b) Reverso da placa</p> 
<p>c) Estruturas de reprodução</p> 	<p>d) Conídios</p> 

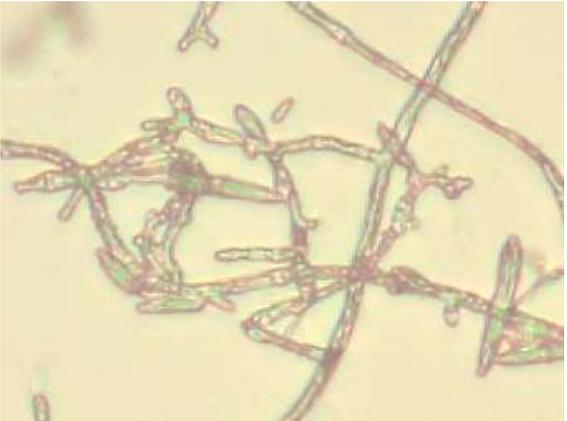
Número da Cultura:02 <b>LBQM-M02</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 3,03 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: lilás Reverso: avermelhado Textura de camurça; superfície rugosa; centro umbilicado; borda arredondada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4a Isolado 4 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente  	b) Reverso da placa  
c) Estruturas de reprodução  	d) Conídios  

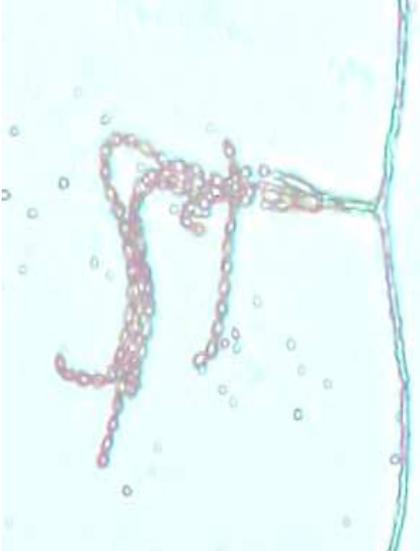
Número da Cultura:03 <b>LBQM-M03</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 3,21 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: lilás Reverso: cinza Textura de camurça; superfície lisa; centro umbilicado; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B5c Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

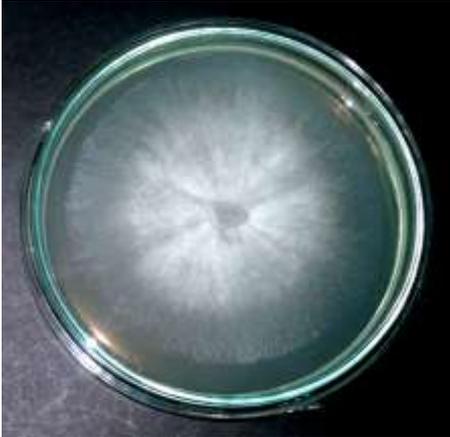
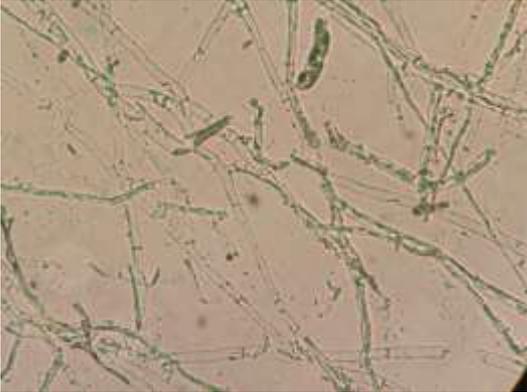
Número da Cultura:04 <b>LBQM-M04</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 1,85 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura de camurça; superfície rugosa; centro umbilicado; borda ondulada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B5b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

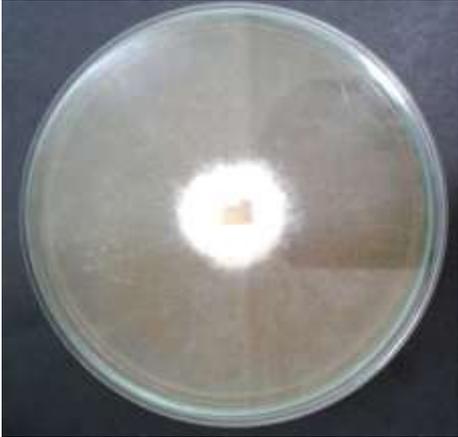
Número da Cultura:05 <b>LBQM-M05</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> Não identificado	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 2,32 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: avermelhada Textura de camurça; superfície cerebriforme; centro crateriforme; borda arredondada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 11 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução	d) Conídios 

Número da Cultura:06 <b>LBQM-M06</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 7,98 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: amarelada Textura cotonosa; superfície rugosa; centro plana; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B5a Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrica
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

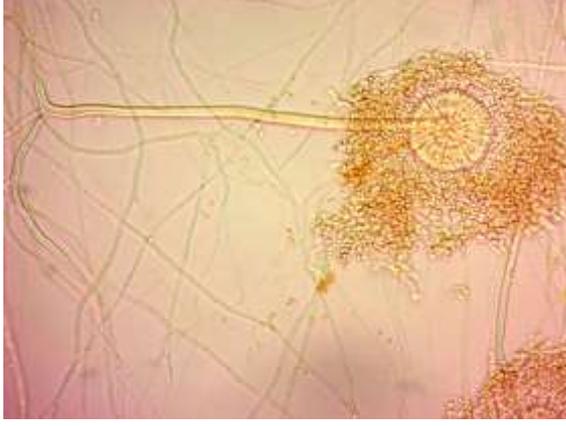
Número da Cultura:07	<b>LBQM-M07</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.		<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 3,60 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: avermelhada Textura cotonosa; superfície algodonosa; centro crateriforme; borda ondulada Produção de pigmento: não		Código da linhagem: A3b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
		<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrica
<b>Fotografias da linhagem</b>		
a) Frente	b) Reverso da placa	
		
c) Estruturas de reprodução	d) Conídios	
		

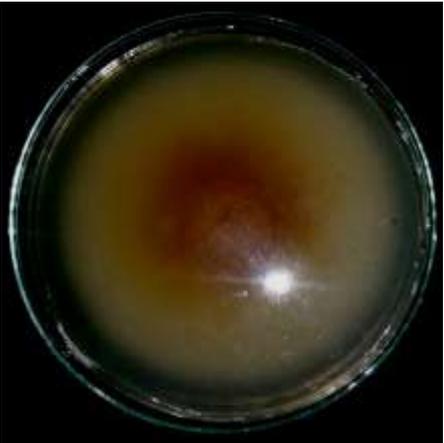
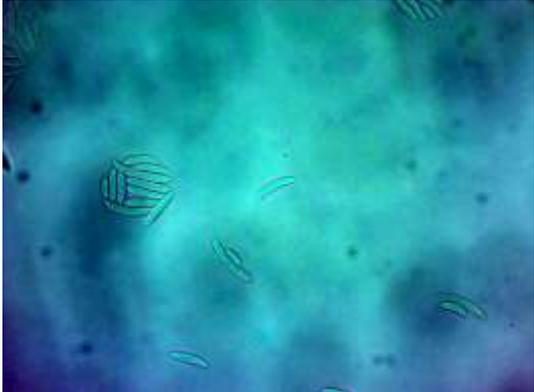
Número da Cultura:08 <b>LBQM-M08</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 3,60 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: amarela Reverso: amarelado Textura de glabra feltrada; superfície algodonosa; centro plana; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4c Isolado 3 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

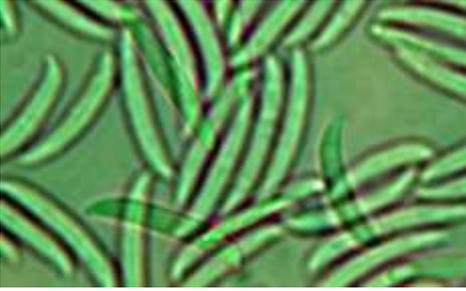
Número da Cultura:09 <b>LBQM-M09</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> Não identificado	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,00 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: amarela Reverso: amarelado Textura cotonosa; superfície algodonosa; centro plana; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B5b Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b>
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios

Número da Cultura:10 <b>LBQM-M10</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> Não identificado	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 5,76 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: branca Textura cottonosa; superfície algodonosa; centro crateriforme; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B6a Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b>
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução	d) Conídios

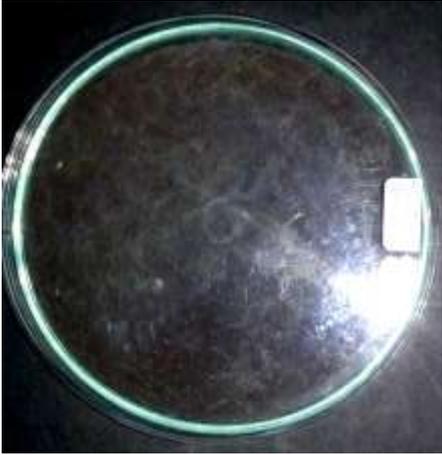
Número da Cultura: 11 <b>LBQM-M11</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 4,64 cm de diâmetro Micélio: filamentosso/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: branca Textura cotonosa; superfície algodonosa; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: A3b Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrica
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente  	b) Reverso da placa  
c) Estruturas de reprodução  	d) Conídios  

Número da Cultura: 12 <b>LBQM-M12</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 4,85 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: amarela Reverso: amarelado Textura de glabra feltrada; superfície elevada; centro crateriforme; borda ondulada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: A4b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

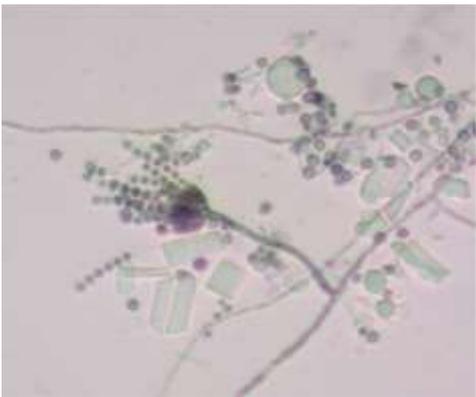
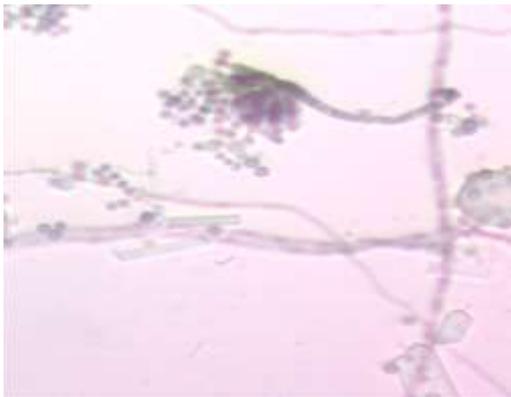
Número da Cultura: 13 <b>LBQM-M13</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
Nome científico e autor(es): <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 6,58 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: amarelado Textura aveludada; superfície plana; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 8 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrica
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

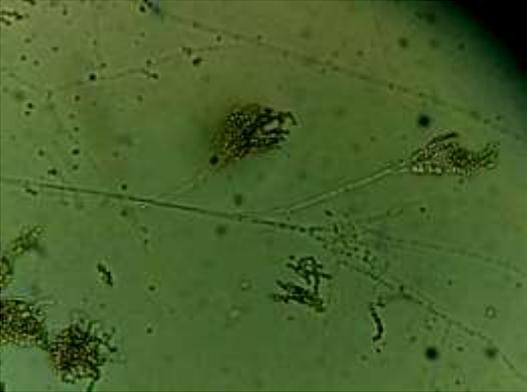
Número da Cultura: 14 <b>LBQM-M14</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 5,79 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: alaranjada Reverso: amarelado Textura aveludada; superfície plana; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrica
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

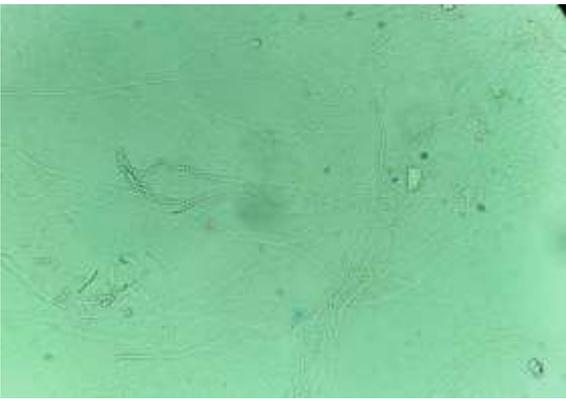
Número da Cultura: 15 <b>LBQM-M15</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 6,05 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: alaranjada Reverso: amarelado Textura aveludada; superfície plana; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 5 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrica
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

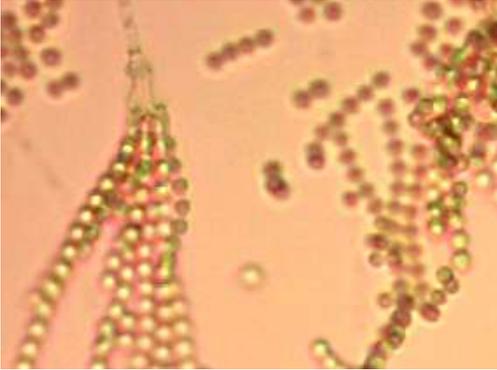
Número da Cultura: 16 <b>LBQM-M16</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 9,00 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preta Reverso: cinza Textura pulverulenta; superfície opaca; centro plana; borda inteira Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

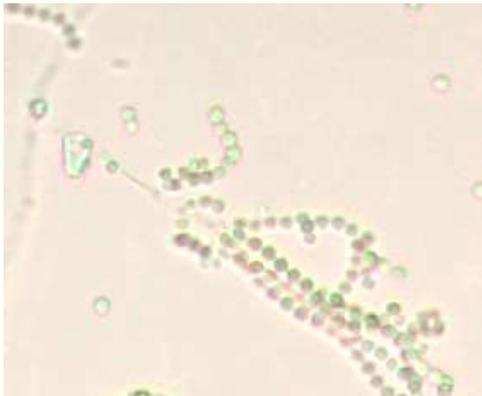
Número da Cultura: 17 <b>LBQM-M17</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 9,00 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preta Reverso: cinza Textura pulverulenta; superfície opaca; centro plana; borda inteira Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

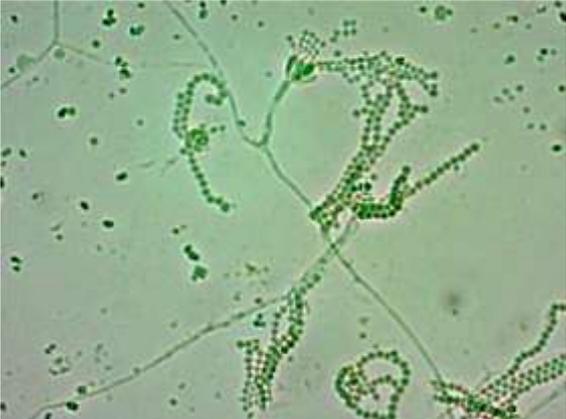
Número da Cultura: 18 <b>LBQM-M18</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 2,26 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: cinza Reverso: amarelo Textura de camurça; superfície verrucosa; centro plana; borda franjada Produção de pigmento: amarelo difuso no ágar	Código da linhagem: B3a Isolado 4 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 19 <b>LBQM-M19</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 9,00 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: cinza Reverso: branco Textura de camurça; superfície opaca; centro plana; borda lisa Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

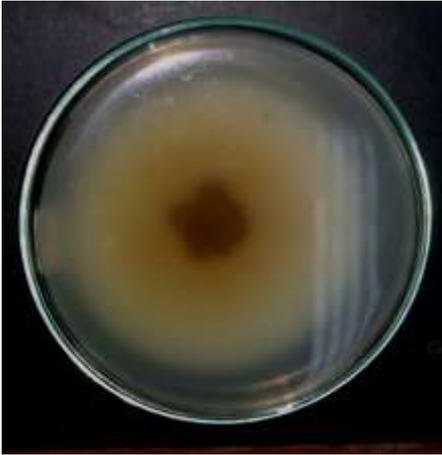
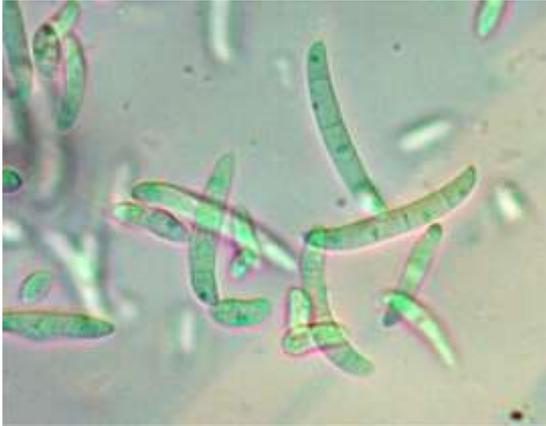
Número da Cultura: 20 <b>LBQM-M20</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 2,58 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: marrom Reverso: vermelho Textura de camurça; superfície coriácea; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 4 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 21 <b>LBQM-M21</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 2 dias de incubação; 2,54 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: cinza Reverso: amarelo Textura pulverulenta; superfície plana; centro plano; borda lisa Produção de pigmento: amarelo difuso no ágar	Código da linhagem: B3c Isolado 6 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

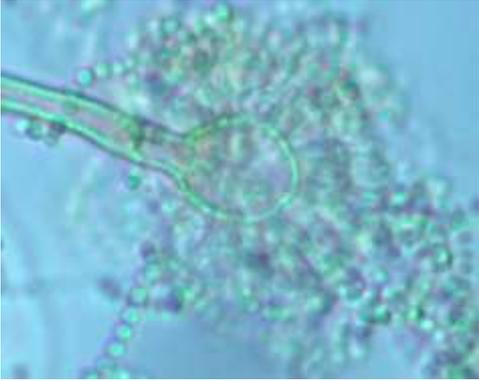
Número da Cultura: 22 <b>LBQM-M22</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 1,18 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: avermelhado Textura camurça; superfície rugosa; centro plano; borda arredondada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4c Isolado 4 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

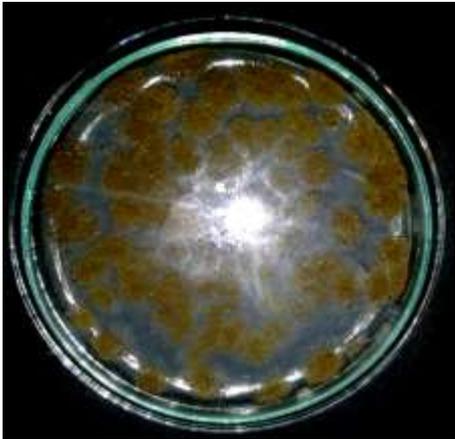
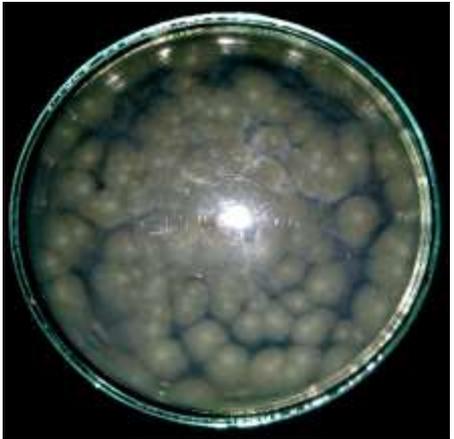
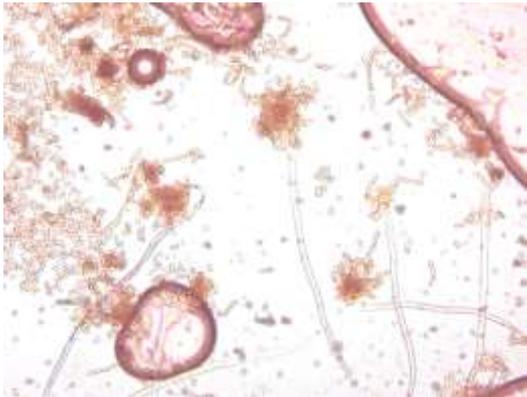
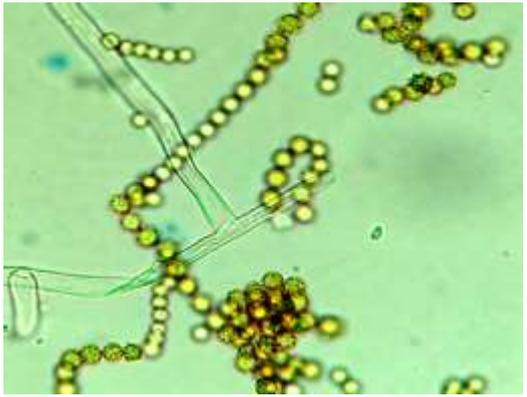
Número da Cultura: 23 <b>LBQM-M23</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Penicillium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 1,08 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: marrom Reverso: branca Textura pulverulenta; superfície camurça; centro cerebriforme; borda ondulada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4c Isolado 5 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

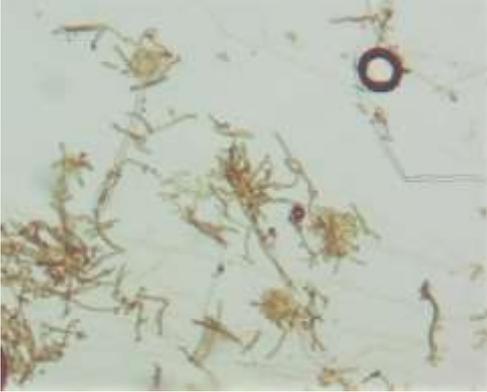
Número da Cultura: 24 <b>LBQM-M24</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> Não identificado	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 6,71 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: marrom Reverso: branca Textura de glabra feltrada; superfície aveludada; centro umbilicado; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B5c Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

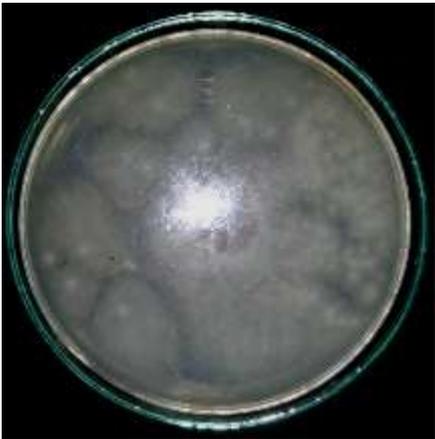
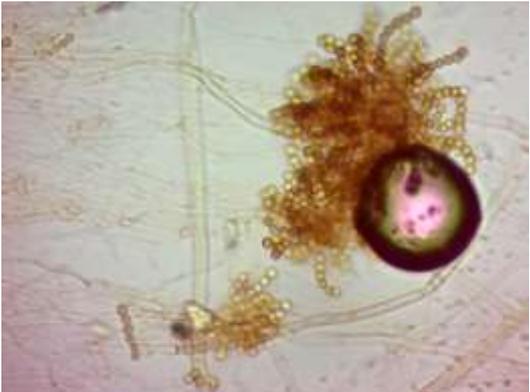
Número da Cultura: 25 <b>LBQM-M25</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: amarelada Textura aveludada; superfície aveludada; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B2b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrico
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 26 <b>LBQM-M26</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Fusarium</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 5 dias de incubação; 3,8 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: branca Reverso: branco Textura aveludada; superfície aveludada; centro plano; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B2b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio fusiforme/ hialino; cabeça conidial cilíndrico
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

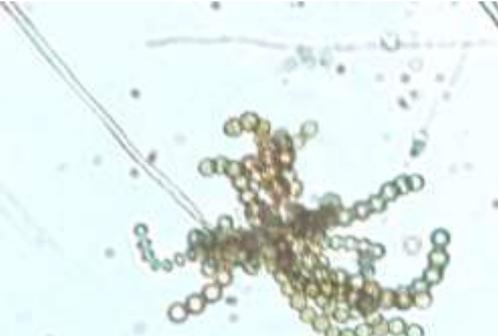
Número da Cultura: 27 <b>LBQM-M27</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 5,8 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: rosa Reverso: vermelha Textura granulosa; superfície brilhante; centro plana; borda franjada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4c Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

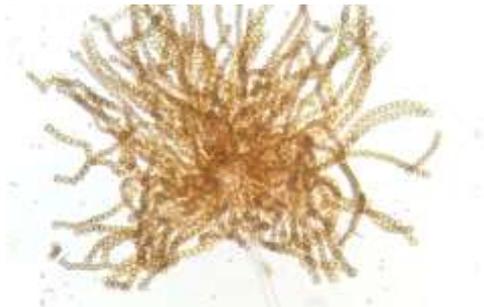
Número da Cultura: 28 <b>LBQM-M28</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B2c Isolado 7 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

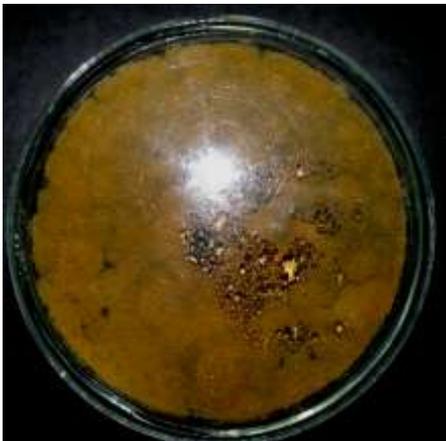
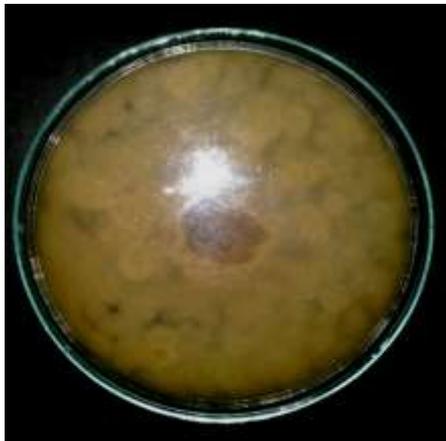
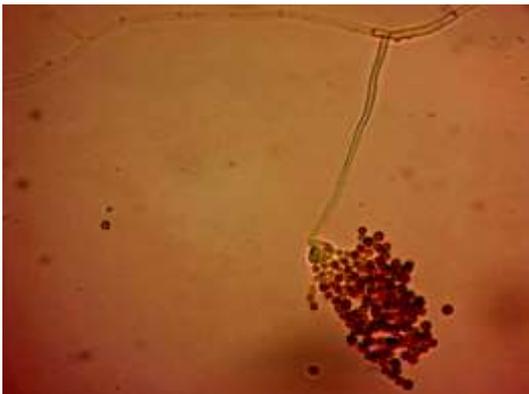
Número da Cultura: 29 <b>LBQM-M29</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 5 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

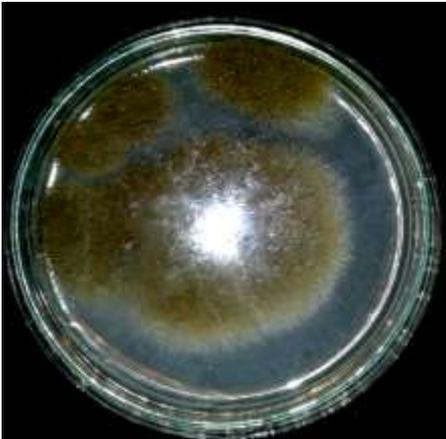
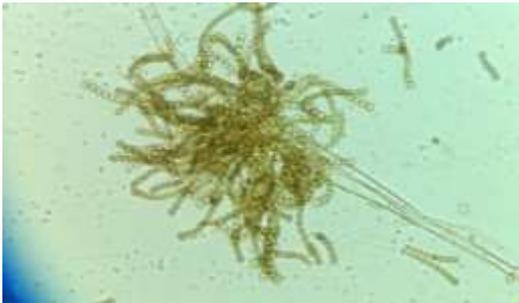
Número da Cultura: 30 <b>LBQM-M30</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 8 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 31 <b>LBQM-M31</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 9 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

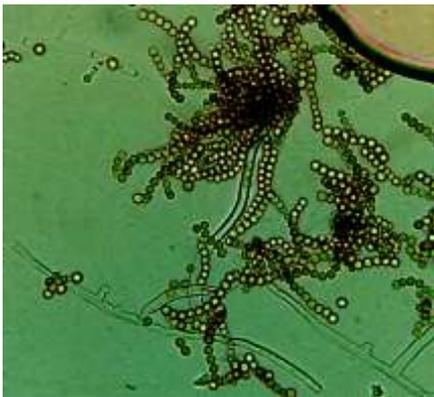
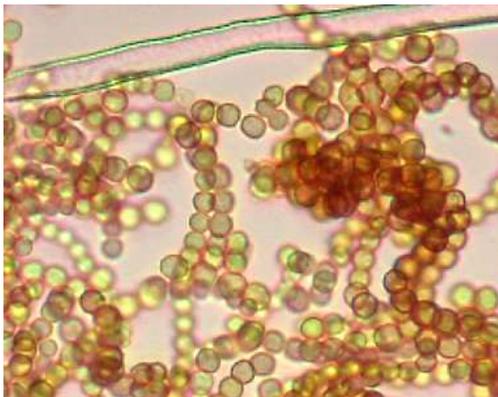
Número da Cultura: 32 <b>LBQM-M32</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 12 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 33 <b>LBQM-M33</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4a Isolado 3 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 34 <b>LBQM-M34</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: amarelada Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4a Isolado 5 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente  	b) Reverso da placa  
c) Estruturas de reprodução  	d) Conídios  

Número da Cultura: 35 <b>LBQM-M35</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4a Isolado 7 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 36 <b>LBQM-M36</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4b Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente  	b) Reverso da placa  
c) Estruturas de reprodução  	d) Conídios  

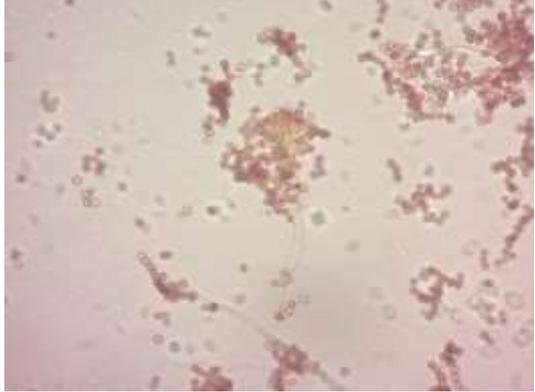
Número da Cultura: 37 <b>LBQM-M37</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B4b Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

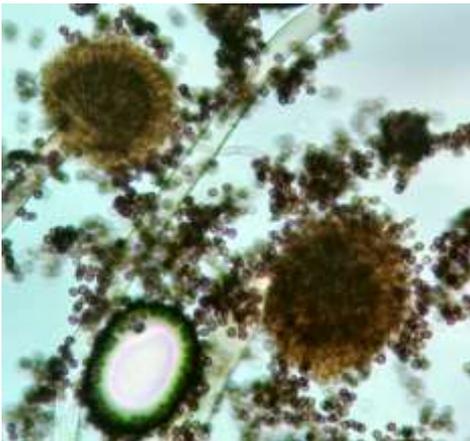
Número da Cultura: 38 <b>LBQM-M38</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 6 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

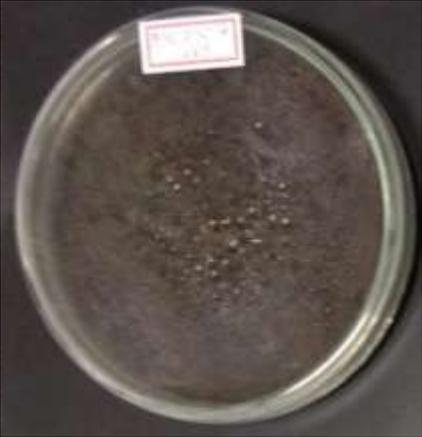
Número da Cultura: 39 <b>LBQM-M39</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3b Isolado 3 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

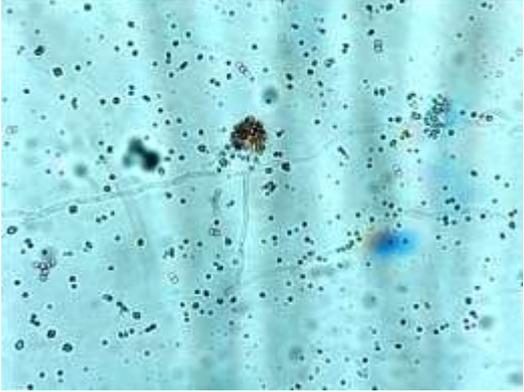
Número da Cultura: 40 <b>LBQM-M40</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3b Isolado 5 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

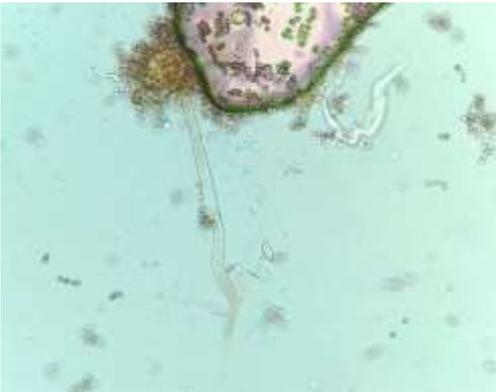
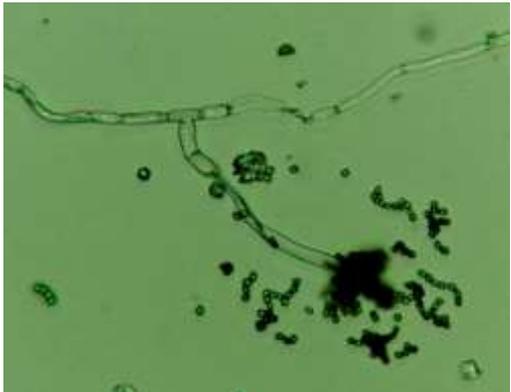
Número da Cultura: 41 <b>LBQM-M41</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: verde Reverso: cinza Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro umbilicado; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3b Isolado 6 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

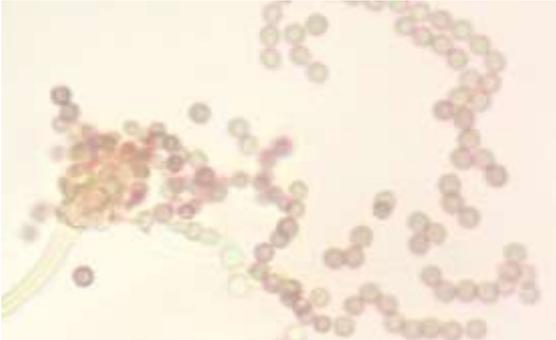
Número da Cultura: 42 <b>LBQM-M42</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: preto Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

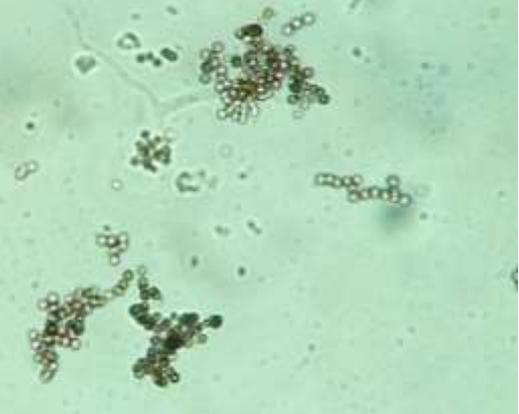
Número da Cultura: 43 <b>LBQM-M43</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: branco Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B2c Isolado 5 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 44 <b>LBQM-M44</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 7 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 45 <b>LBQM-M45</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda enrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 3 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 46 <b>LBQM-M46</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 1 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde e ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b>  <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente  	b) Reverso da placa  
c) Estruturas de reprodução  	d) Conídios  

Número da Cultura: 47 <b>LBQM-M47</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3b Isolado 2 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 48 <b>LBQM-M48</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3c Isolado 10 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

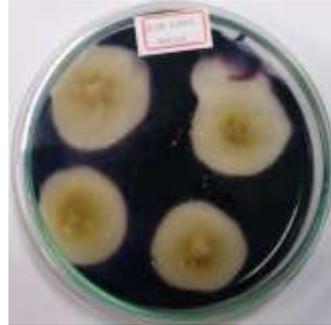
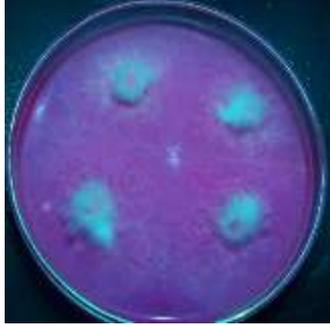
Número da Cultura: 49 <b>LBQM-M49</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B2c Isolado 4 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

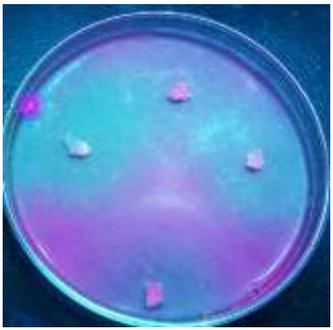
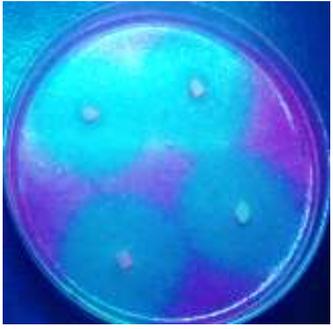
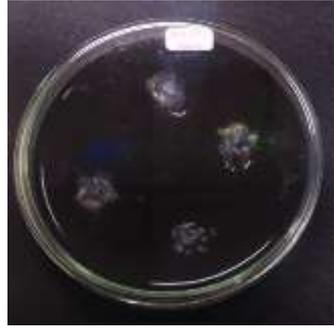
Número da Cultura: 50 <b>LBQM-M50</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentosos/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B2c Isolado 6 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde ao meio ambiente: desconhecido  <b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

Número da Cultura: 51 <b>LBQM-M51</b>	Data de Depósito: 20/ 10/ 2015
<b>Nome científico e autor(es):</b> <i>Aspergillus</i> sp.	<b>Procedência da Linhagem:</b>
<b>Características Macromorfológicas</b> Meio BDA; 7 dias de incubação; 9,0 cm de diâmetro Micélio: filamentososo/rasteiro Coloração da colônia: preto Reverso: amarelado Textura granulosa; superfície pulverulenta; centro plano; borda encrespada Produção de pigmento: não	Código da linhagem: B3a Isolado 7 Fonte de Isolamento: solo Método de preservação: Castellani Perigo à saúde ao meio ambiente: desconhecido
	<b>Características Micromorfológicas:</b> <b>HIFAS:</b> septadas/ hialinas <b>ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO:</b> conidióforo; conídio globoso/ hialino; cabeça conidial globosa
<b>Fotografias da linhagem</b>	
a) Frente 	b) Reverso da placa 
c) Estruturas de reprodução 	d) Conídios 

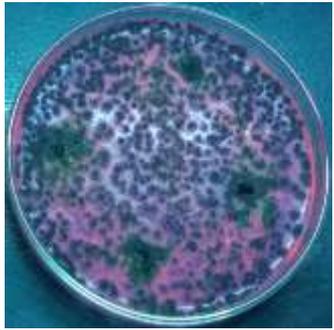
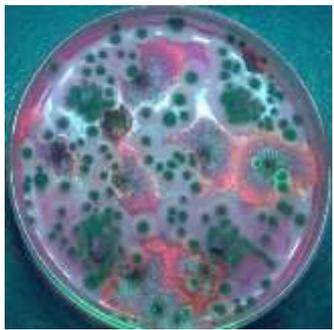
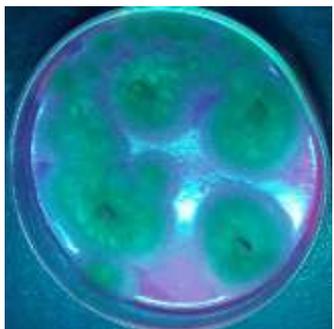
**APÊNDICE B – REGISTRO FOTOGRÁFICO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS ISOLADOS**

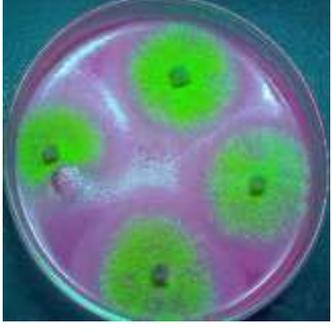
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M01 <i>Aspergillus</i> sp.			
M02 <i>Aspergillus</i> sp.			
M03 <i>Aspergillus</i> sp.			
M04 <i>Aspergillus</i> sp.			

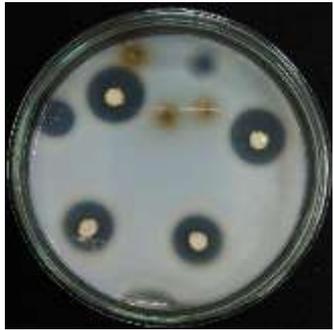
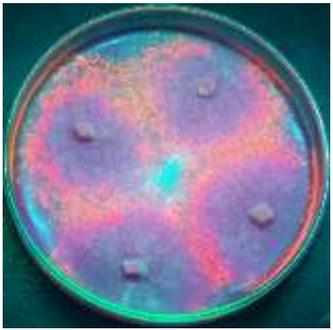
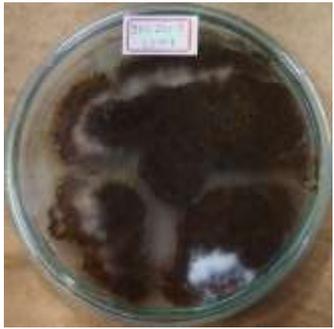
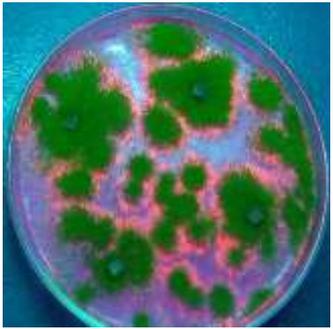
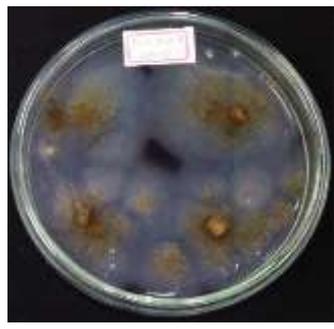
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M05 Não identificado			
M06 <i>Fusarium</i> sp.			
M07 <i>Fusarium</i> sp.			
M08 <i>Penicillium</i> sp.			

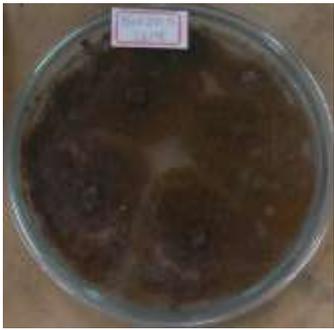
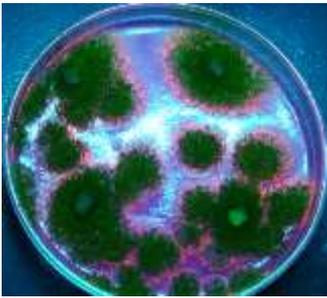
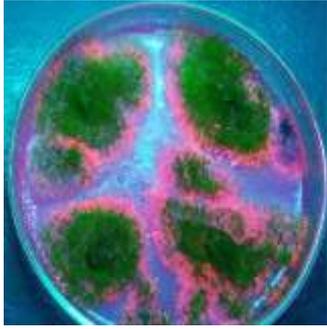
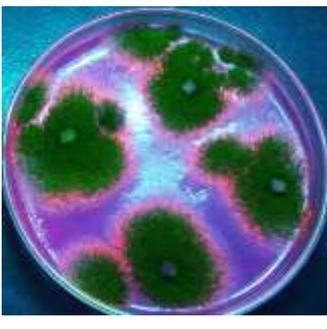
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M09 Não identificado			
M10 Não identificado			
M11 <i>Fusarium</i> sp.			
M12 <i>Aspergillus</i> sp.			

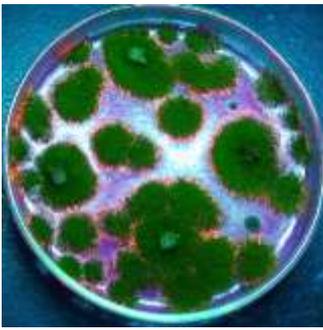
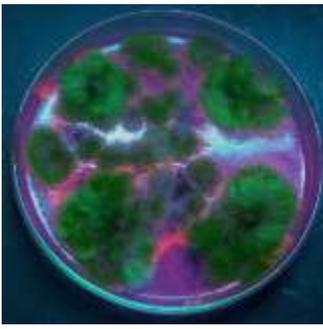
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M13 <i>Fusarium</i> sp.			
M14 <i>Fusarium</i> sp.			
M15 <i>Fusarium</i> sp.			
M16 <i>Aspergillus</i> sp.			

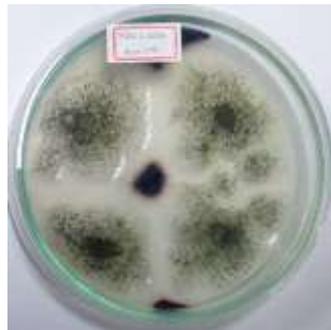
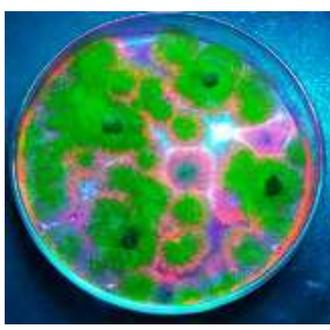
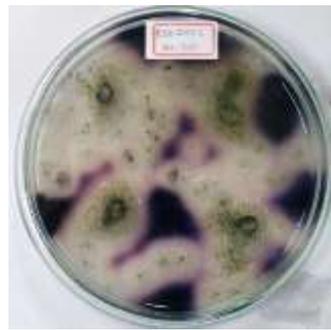
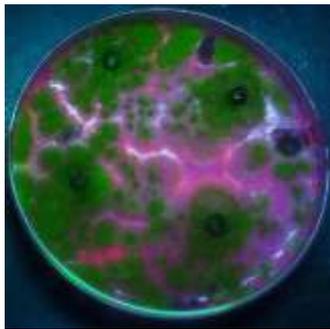
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M17 <i>Aspergillus</i> sp.			
M18 <i>Penicillium</i> sp.			
M19 <i>Penicillium</i> sp.			
M20 Não identificado			

Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M21 <i>Penicillium</i> sp.			
M22 <i>Penicillium</i> sp.			
M23 <i>Penicillium</i> sp.			
M24 Não identificado			

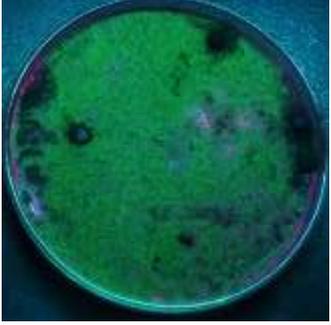
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M25 <i>Fusarium</i> sp.			
M26 <i>Fusarium</i> sp.			
M27 <i>Aspergillus</i> sp.			
M28 <i>Aspergillus</i> sp.			

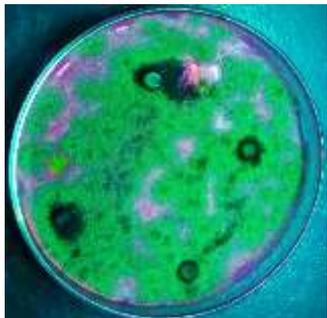
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M29 <i>Aspergillus</i> sp.			
M30 <i>Aspergillus</i> sp.			
M31 <i>Aspergillus</i> sp.			
M32 <i>Aspergillus</i> sp.			

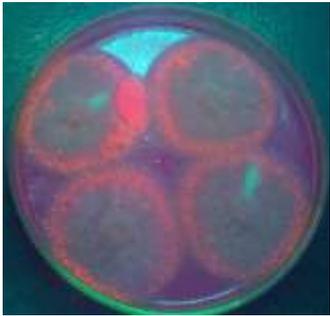
Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M33 <i>Aspergillus</i> sp.			
M34 <i>Aspergillus</i> sp.			
M35 <i>Aspergillus</i> sp.			
M36 <i>Aspergillus</i> sp.			

Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M37 <i>Aspergillus</i> sp.			
M38 <i>Aspergillus</i> sp.			
M39 <i>Aspergillus</i> sp.			
M40 <i>Aspergillus</i> sp.			

Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M41 <i>Aspergillus</i> sp.			
M42 <i>Aspergillus</i> sp.			
M43 <i>Aspergillus</i> sp.			
M44 <i>Aspergillus</i> sp.			

Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M45 <i>Aspergillus</i> sp.			
M46 <i>Aspergillus</i> sp.			
M47 <i>Aspergillus</i> sp.			
M48 <i>Aspergillus</i> sp.			

Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M49 <i>Aspergillus</i> sp.			
M50 <i>Aspergillus</i> sp.			
M51 <i>Aspergillus</i> sp.			
M52 <i>Aspergillus</i> sp.			

Fungos	Meios de crescimento utilizados		
	LEITE	AZEITE	AMIDO
M53 <i>Fusarium sp.</i>			

**APÊNDICE C – REGISTRO FOTOGRÁFICO DO TESTE DE TOLERÂNCIA A CÁDMIO****GRUPO 1****A4b-Isolado 3***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O isolado apresentou tolerância ao íon metálico apesar de notar-se uma clara mudança na morfologia macroscópica da colônia desenvolvida no meio contendo cádmio, esta apresentou um desenvolvimento mais lento e a considerável diminuição na produção de esporos, contudo, é possível perceber que a espécie continuou produzindo pigmento difuso no meio corando-o de amarelo.

**B3c-Isolado 11***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo apresentou tolerância ao metal, porém, o aspecto da colônia foi completamente modificado no cultivo em meio contendo cádmio na comparação com o controle. O isolado que possuía colônia branca avermelhada e textura de camurça, passou a apresentar coloração verde e uma textura superficial lisa. Além disso, passou a produzir pigmento verde amarelado corando o meio.

**B4a-Isolado 4***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

Poucas alterações na morfologia macroscópica foram observadas para a espécie. Além da discreta mudança na coloração, a presença do metal alterou um pouco a velocidade do crescimento da colônia. Assim, o isolado demonstra considerável tolerância ao cádmio.

**B5a-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

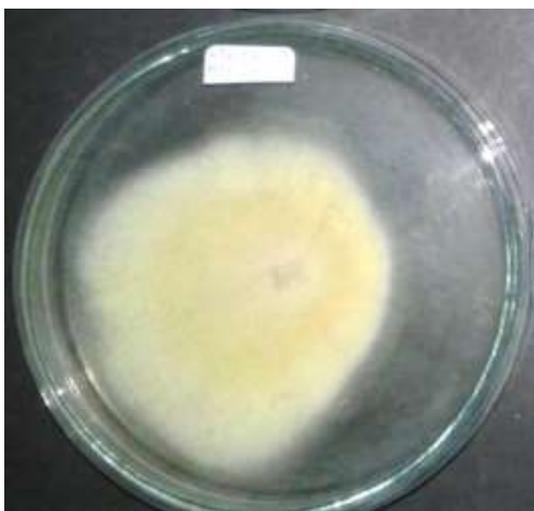
Houve reprodução no aspecto da colônia, porém, a presença do metal no meio de crescimento, afetou a velocidade de crescimento da colônia.

**B5c-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

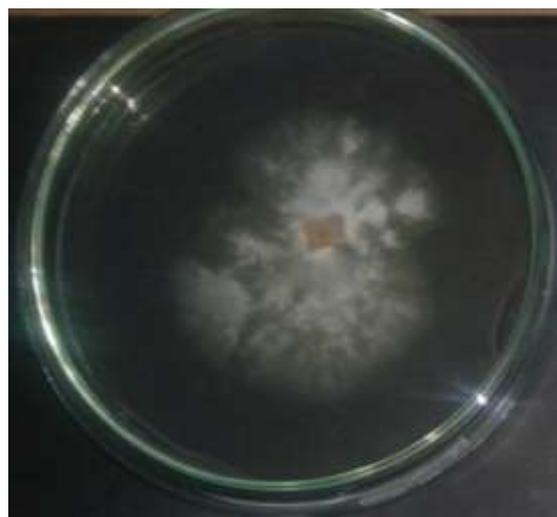
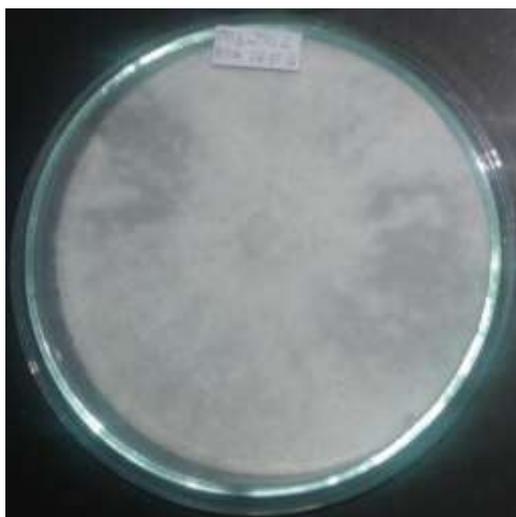
O fungo mostrou boa capacidade de se desenvolver em meio contaminado, uma vez que o seu cultivo na presença de cádmio não alterou de forma expressiva suas características morfológicas, mantendo preservadas a textura de camurça e superfície lisa, mas, modificou principalmente sua coloração.

**GRUPO 2****A3b-solado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Após o período de incubação, não houve desenvolvimento de colônia do fungo inoculado na presença de cádmio mostrando que a espécie não resistente à concentração do metal no meio.

**B4c-Isolado 3***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

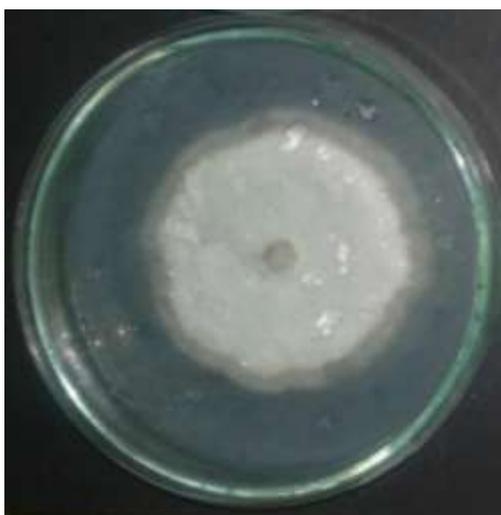
Após dez dias de incubação, não houve desenvolvimento de colônia do fungo inoculado na presença de cádmio mostrando que a espécie não foi resistente à concentração do metal no meio.

**B5b-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

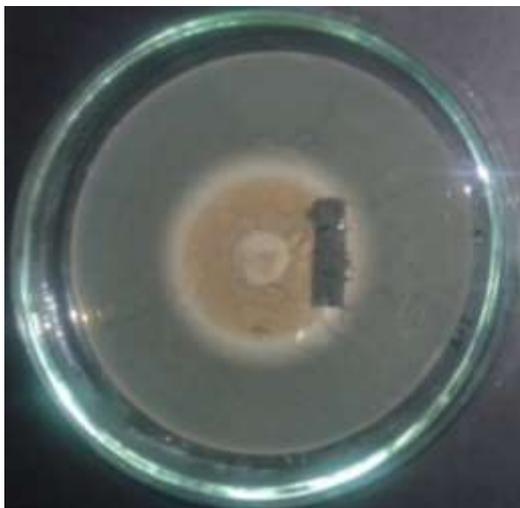
A presença de cádmio no meio de crescimento influencia principalmente na velocidade de crescimento da colônia, apesar disso, o isolado mostrou-se resistente ao metal.

**B6a-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

A presença de cádmio no meio de crescimento impediu o desenvolvimento da colônia, o que demonstra que, à concentração do meio de crescimento, o metal é tóxico para o fungo.

**GRUPO 3****A3b-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

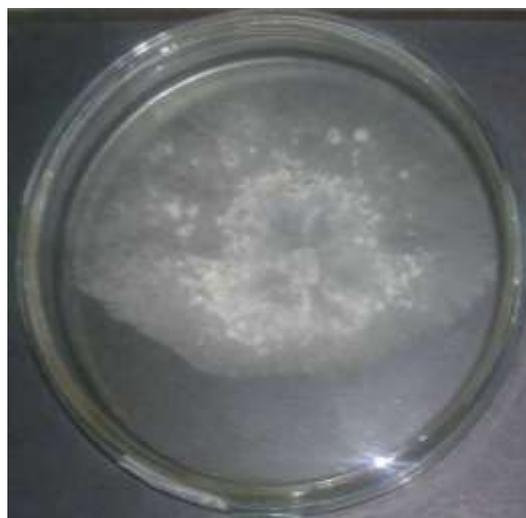
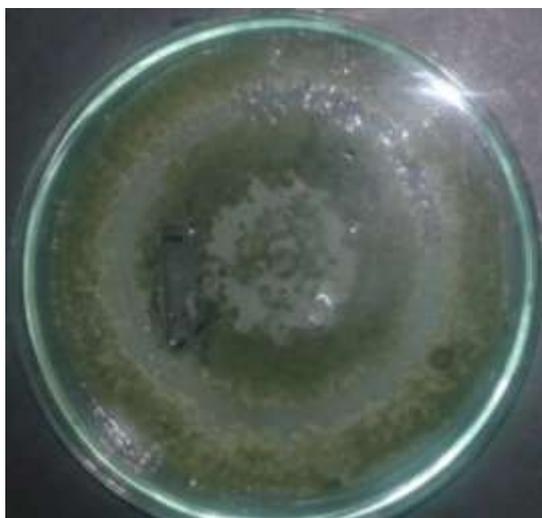
O fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento

**A4b-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

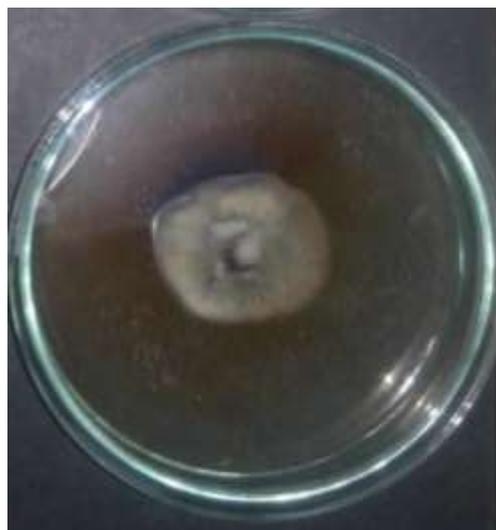
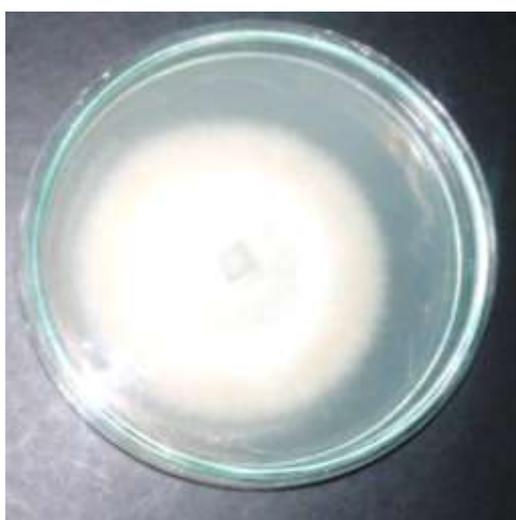
A presença de cádmio no meio de crescimento causou pequena variação na coloração da colônia e na velocidade de crescimento do fungo, no entanto, a espécie foi resistente ao metal.

**B3a-Isolado 8***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

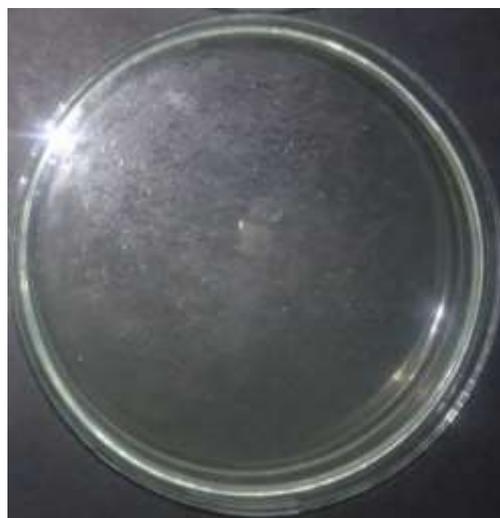
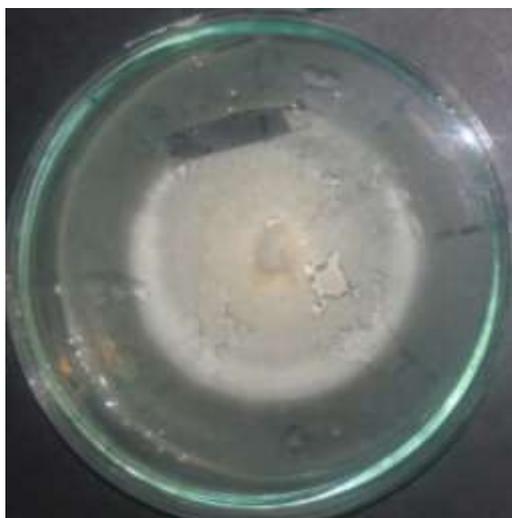
O fungo mostrou boa resistência ao metal, contudo, sua morfologia sofreu grande modificação, sobretudo na coloração. O fungo crescido no meio contendo cádmio passou a produzir também um pigmento de coloração amarelada difuso no meio.

**B4c-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

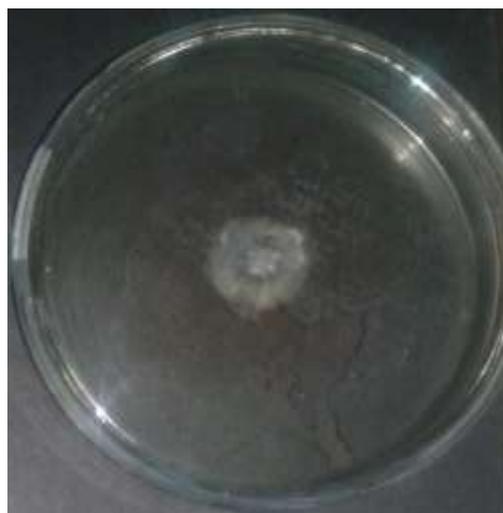
Apesar da grande mudança na coloração, o fungo mostrou boa resistência ao metal, mantendo o mesmo aspecto e velocidade de crescimento da colônia.

**B2c-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

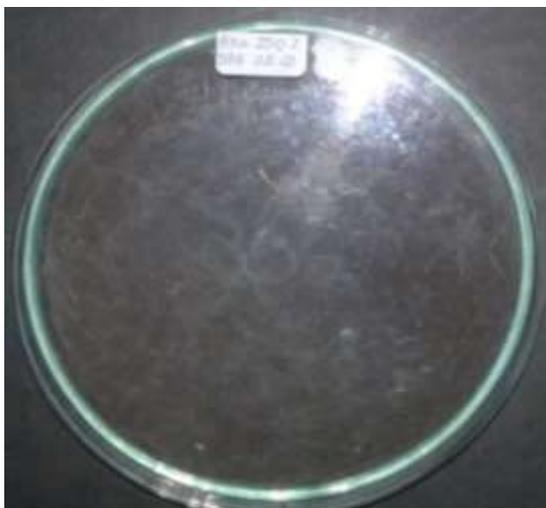
O fungo mostrou boa resistência ao metal, contudo, sua morfologia sofreu grande modificação, sobretudo na coloração. O fungo crescido no meio contendo cádmio passou a produzir também um pigmento de coloração amarelada difuso no meio.

**B3b-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

O fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento, pois não foi possível observar desenvolvimento de colônia.

**B3c-Isolado 5***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

O metal presente no meio de crescimento interferiu, principalmente na velocidade de crescimento da colônia, e na coloração, mantendo as demais características.

**GRUPO 4****B3a-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram os principais fatores afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**B3a-Isolado 9***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram os principais fatores afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

---

**GRUPO 5****B2b-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Não houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento.

**B3a-Isolado 4***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

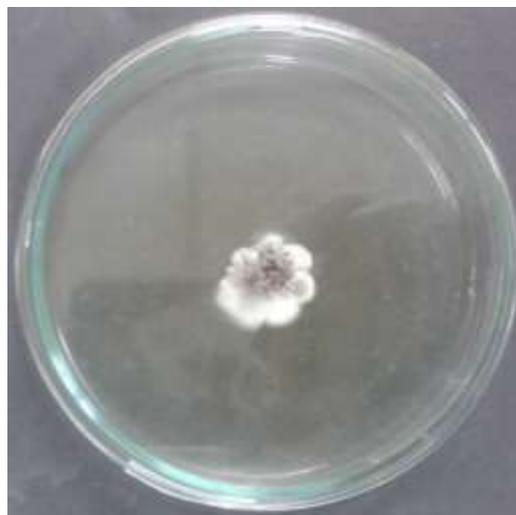
O fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento, pois não foi possível observar desenvolvimento de colônia.

**B3c-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

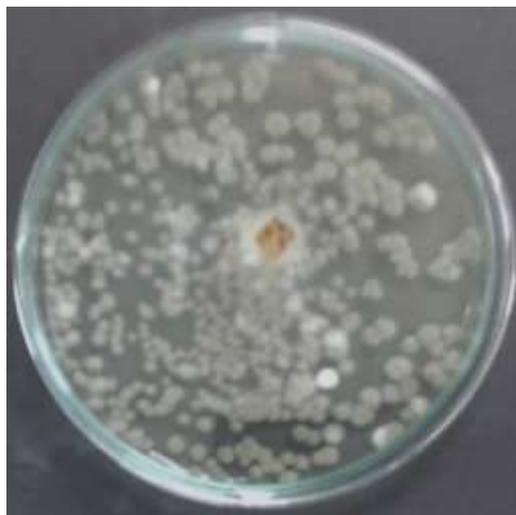
Não houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento.

**B3c-Isolado 4***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

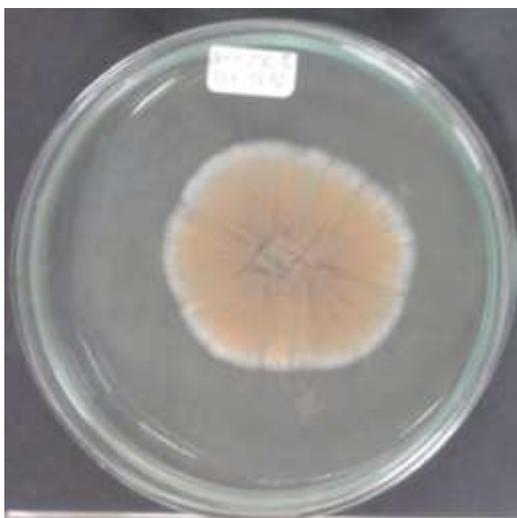
O isolado foi pouco resistente ao cádmio, houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, porém com velocidade de crescimento muito reduzida.

**B3c-Isolado 6***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

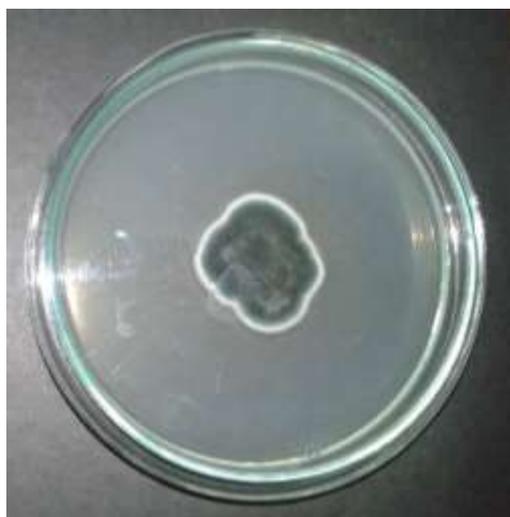
O fungo mostrou pequena resistência ao cádmio, houve desenvolvimento de colônia no meio contendo o metal, porém, suas características foram muito modificadas, principalmente a velocidade de crescimento.

**B4c-Isolado 4***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup> (100 mg/L)*

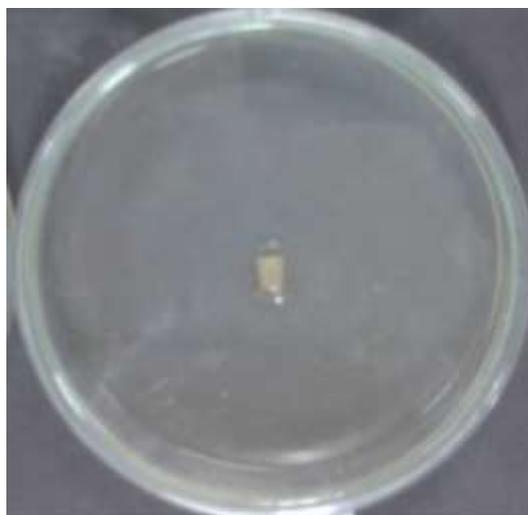
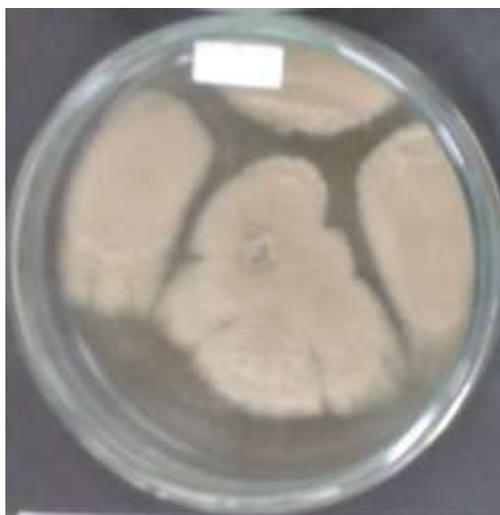
O fungo mostrou boa capacidade de se desenvolver na presença de cádmio, observa-se pequenas alterações na morfologia, manteve preservadas a textura e a coloração.

**B4c-Isolado 5***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

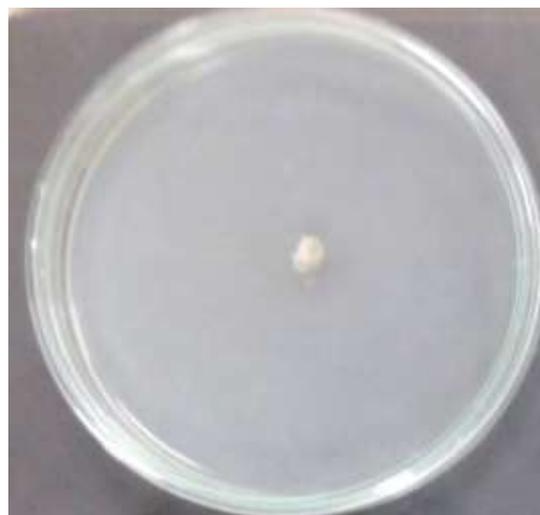
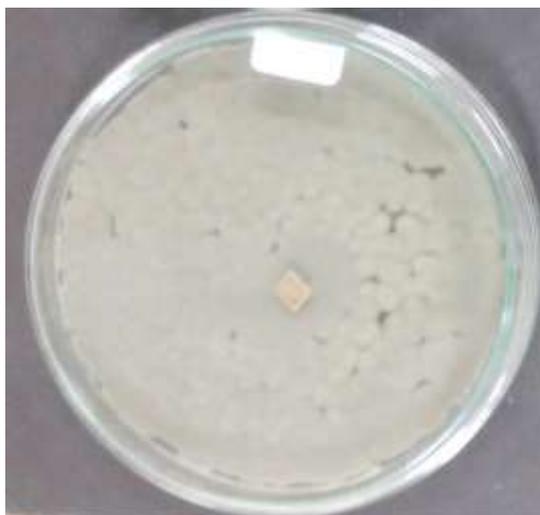
O fungo mostrou pequena resistência ao cádmio, houve desenvolvimento de colônia no meio contendo o metal, porém, suas características foram muito modificadas, principalmente a velocidade de crescimento.

**B5b-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

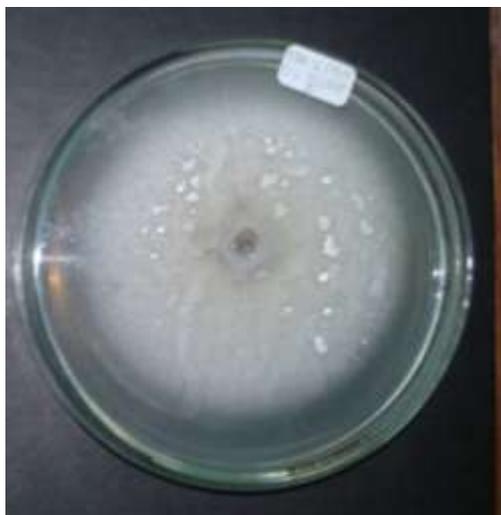
O fungo mostrou boa capacidade de se desenvolver em meio contaminado, uma vez que o seu cultivo na presença de cádmio não alterou de forma expressiva suas características morfológicas, mantendo preservadas a textura de camurça e superfície lisa, mas, modificou levemente sua coloração.

**B5c-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Não houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento.

**B3b-Isolado 4***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Não houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento.

**GRUPO 6****B2b-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo mostrou pequena resistência ao cádmio, houve desenvolvimento de colônia no meio contendo o metal, porém, suas características foram modificadas, sobretudo a velocidade de crescimento.

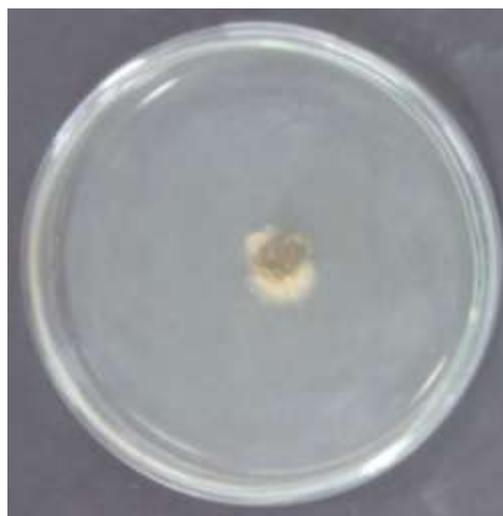
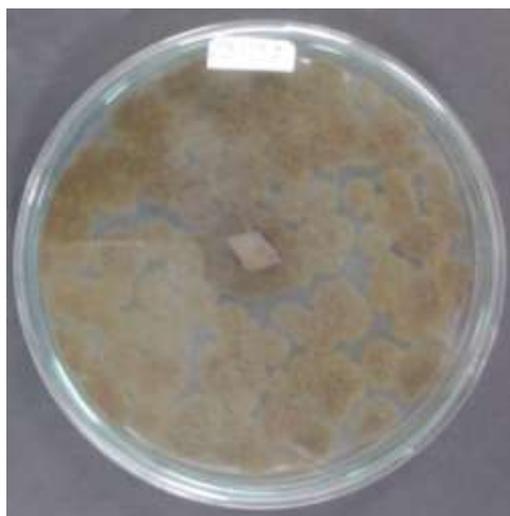
**B4a-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Não houve um bom desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo demonstra baixa resistência ao metal na concentração do meio de crescimento.

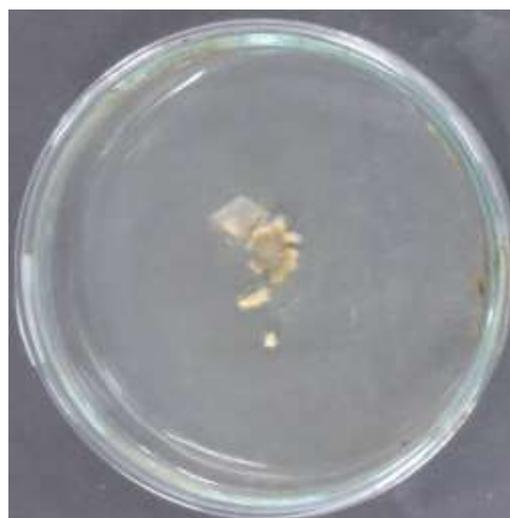
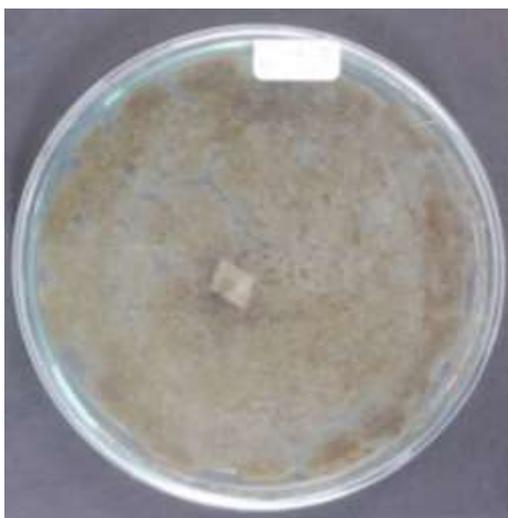
---

**B4c-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

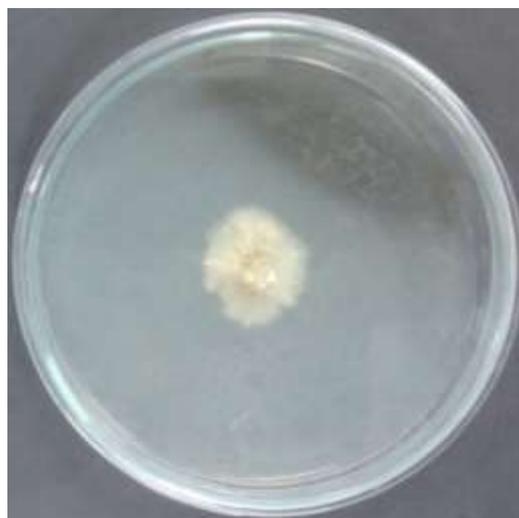
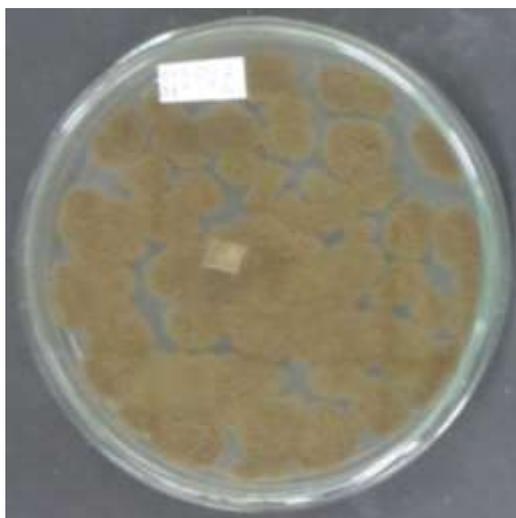
Não houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento.

**GRUPO 7****B4a-Isolado 7***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Após o período de incubação o crescimento da colônia foi muito pequeno, assim, o fungo demonstra baixa resistência ao cádmio na concentração presente no meio de crescimento.

**B3a-Isolado 5***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Não houve um bom desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo demonstra baixa resistência ao metal na concentração do meio de crescimento.

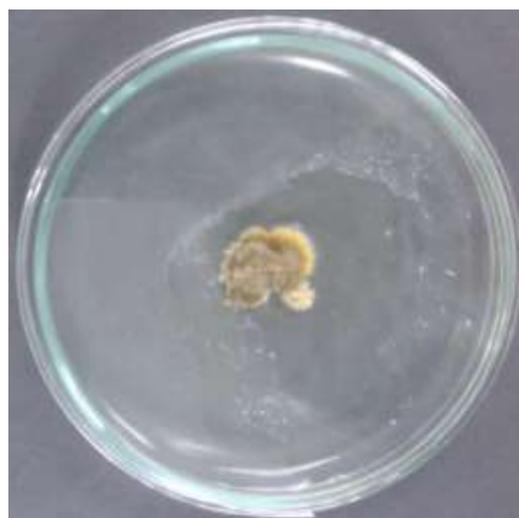
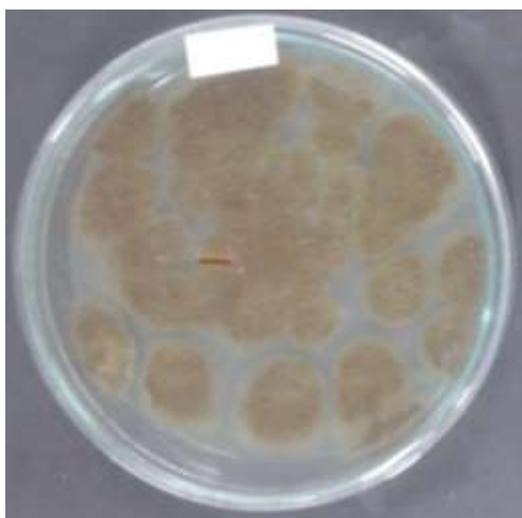
**B4b-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

Não houve um bom desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo demonstra baixa resistência ao metal na concentração do meio de crescimento.

**B3c-Isolado 9**

*Fungo Cultivado em Meio DBA*

*Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de  $Cd^{2+}$  (100 mg/L)*

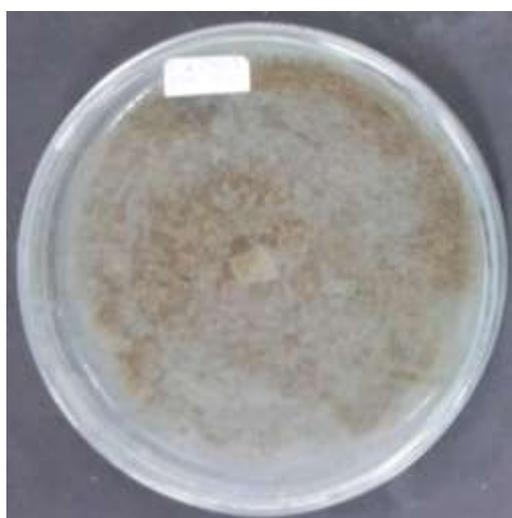


Não houve um bom desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo demonstra baixa resistência ao metal na concentração do meio de crescimento.

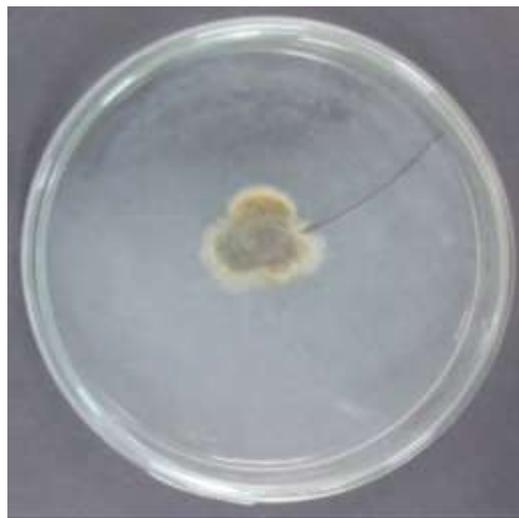
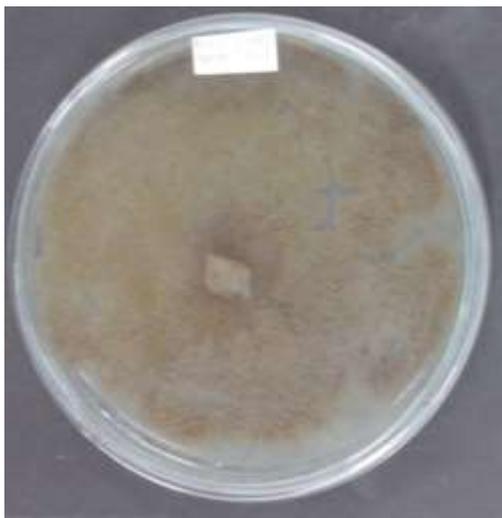
**B4a-Isolado 5**

*Fungo Cultivado em Meio DBA*

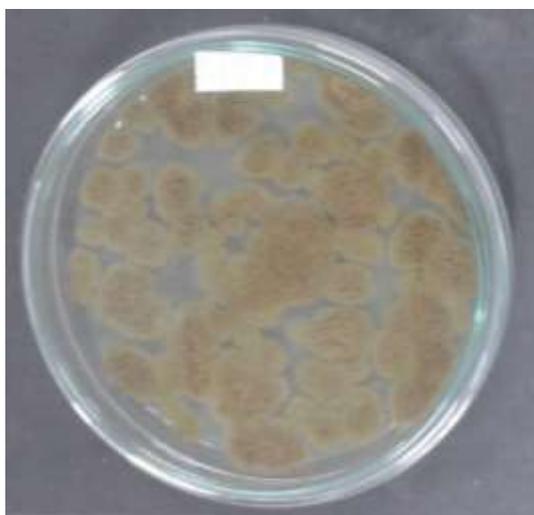
*Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de  $Cd^{2+}$  (100 mg/L)*



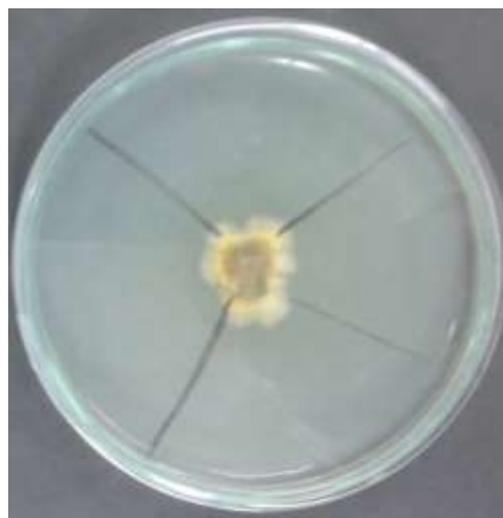
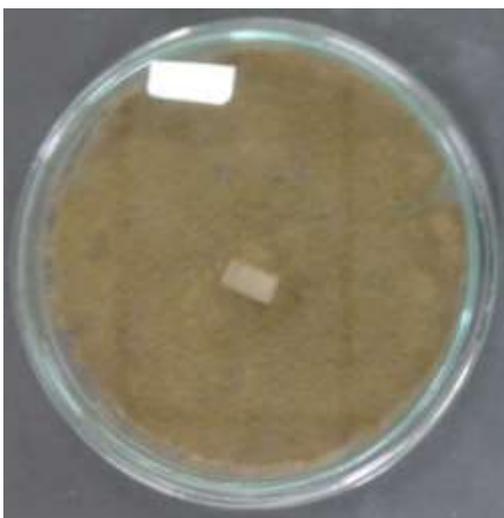
O fungo apresentou resistência ao cádmio, porém a velocidade do crescimento da colônia foi muito reduzida, a produção de esporos aéreos também foi muito afetada.

**B3c-Isolado 12***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de  $Cd^{2+}$  (100 mg/L)*

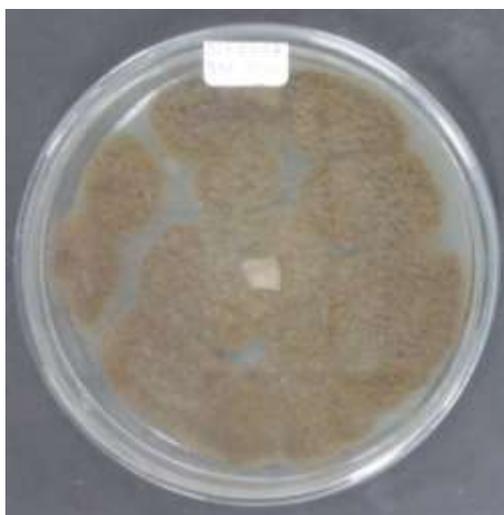
O fungo apresentou resistência ao cádmio, porém a velocidade do crescimento da colônia foi muito reduzida, a produção de esporos aéreos também foi muito afetada.

**B4a-Isolado 3***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de  $Cd^{2+}$  (100 mg/L)*

Não houve um bom desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo demonstra baixa resistência ao metal na concentração do meio de crescimento.

**B3c-Isolado 8***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo apresentou resistência ao cádmio, porém a velocidade do crescimento da colônia foi muito reduzida, a produção de esporos aéreos também foi muito afetada.

**B2c-Isolado 7***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo apresentou resistência ao cádmio, porém a velocidade do crescimento da colônia foi muito reduzida.

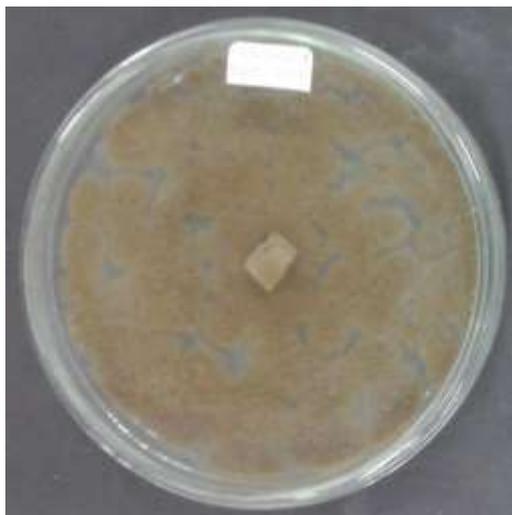
---

**B4b-Isolado 1**

*Fungo Cultivado em Meio DBA*

*Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de  $\text{Cd}^{2+}$  (100 mg/L)*

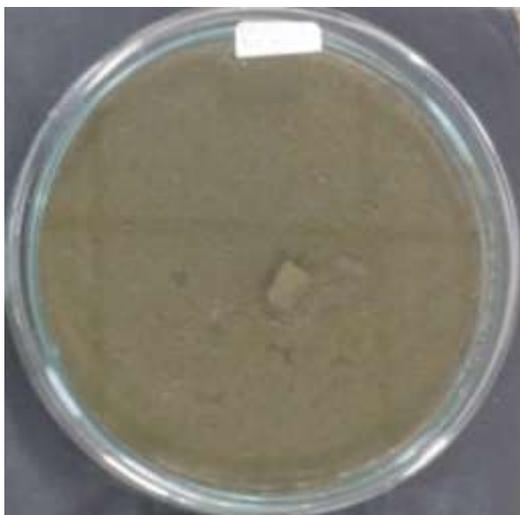
---



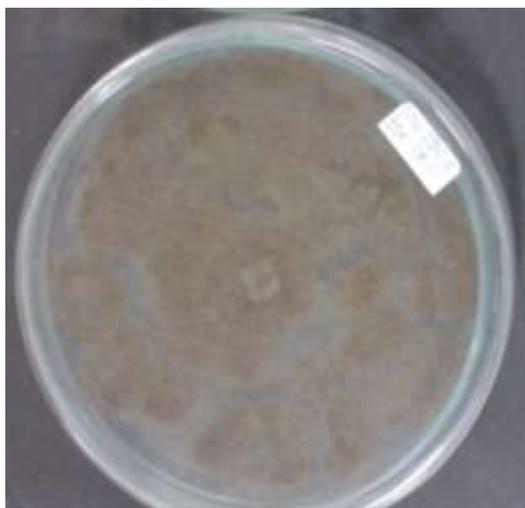
---

O fungo apresentou resistência ao cádmio, porém a velocidade do crescimento da colônia foi muito reduzida.

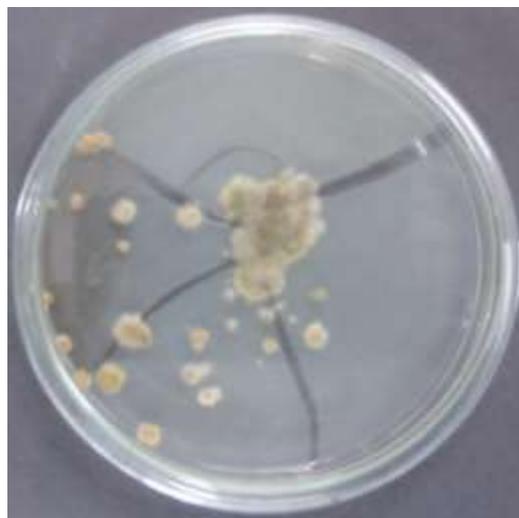
---

**GRUPO 8****B3b-Isolado 3***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

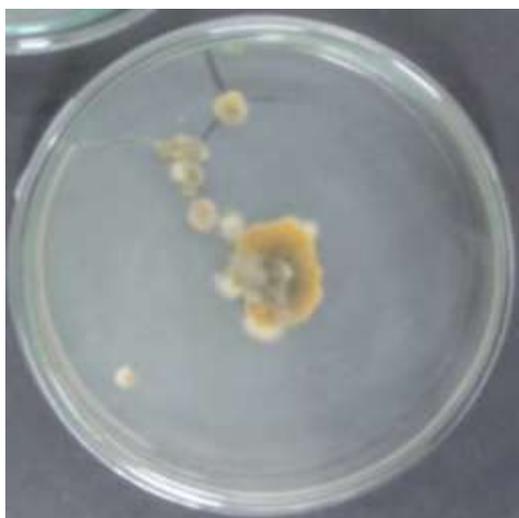
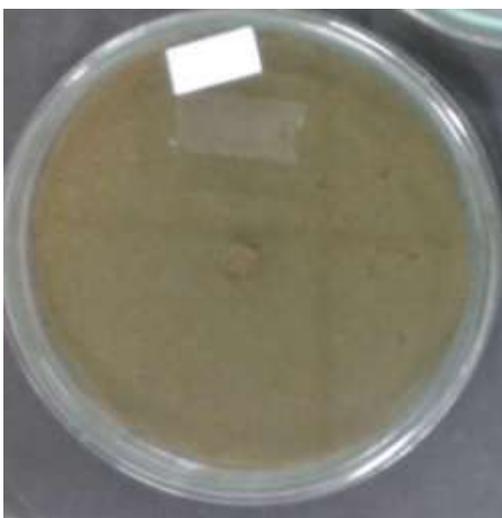
O fungo cultivado no meio contendo cádmio apresentou modificações na coloração e na velocidade de crescimento, mas, mostrou-se tolerante.

**B3a-Isolado 6***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

O fungo cultivado no meio contendo cádmio apresentou modificações na coloração e na velocidade de crescimento, mas, mostrou-se tolerante.

**B3b-Isolado 5***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

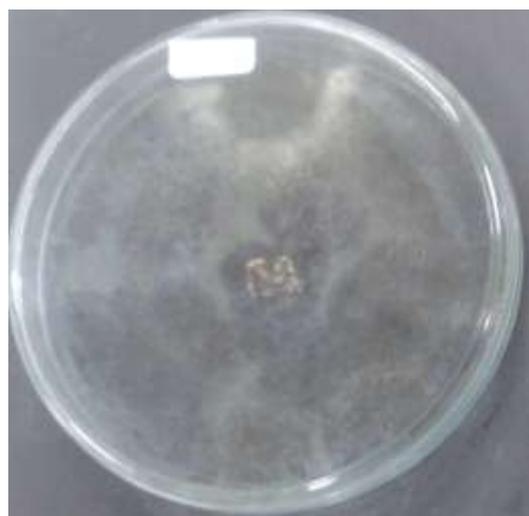
A presença de cádmio no meio de crescimento fez com que a colônia se desenvolvesse mais lentamente.

**B3b-Isolado 6***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

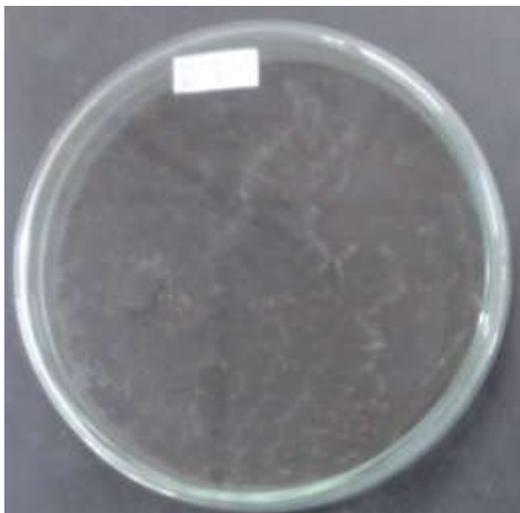
A mudança na coloração da colônia e na velocidade do crescimento foram os principais fatores afetados pela presença do cádmio.

**GRUPO 9****B3a-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

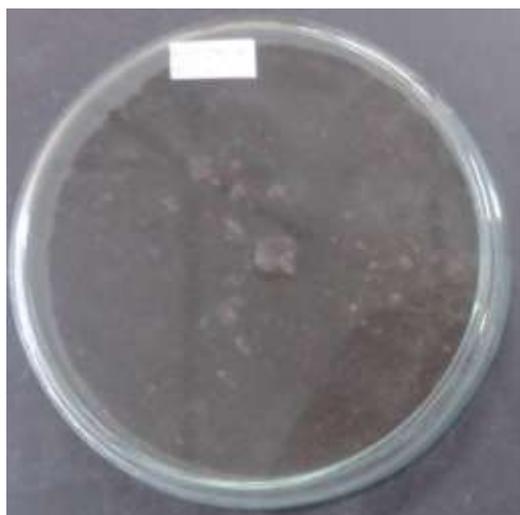
O fungo mostrou boa resistência ao metal, porém houve grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia não sofreu muita influência, mas a produção de esporos aéreos foi muito afetada pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**B3c-Isolado 10***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

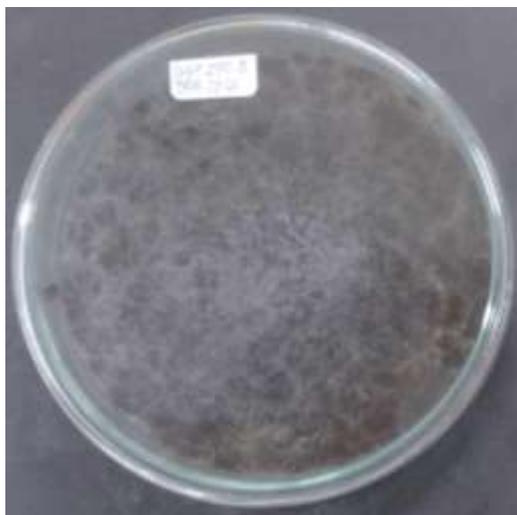
O aspecto da colônia foi alterado principalmente pela ausência de esporos aéreos pretos, a velocidade do crescimento também foi afetada pela presença do cádmio no meio

**B3b-Isolado 2***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

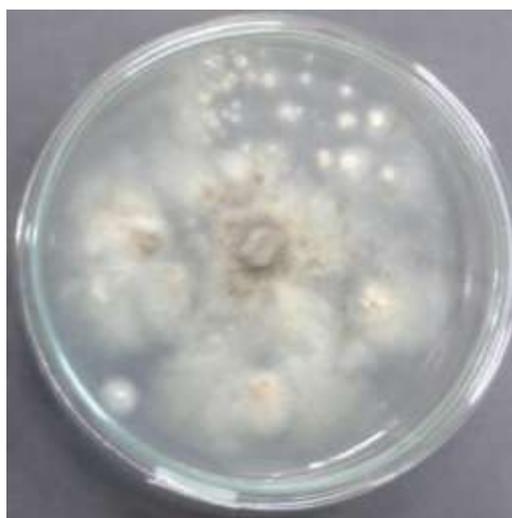
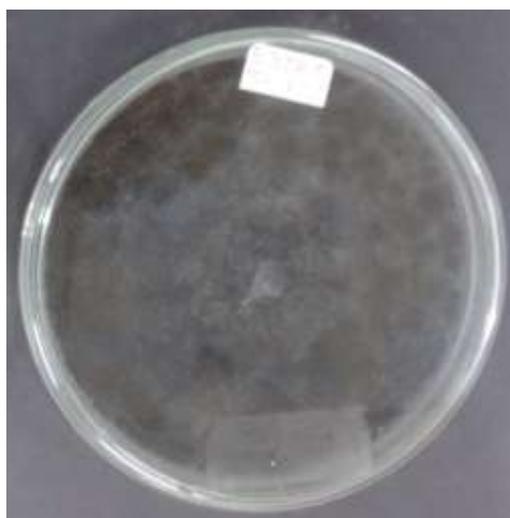
O fungo mostrou boa resistência ao metal, porém, a velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**B3c-Isolado 7***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

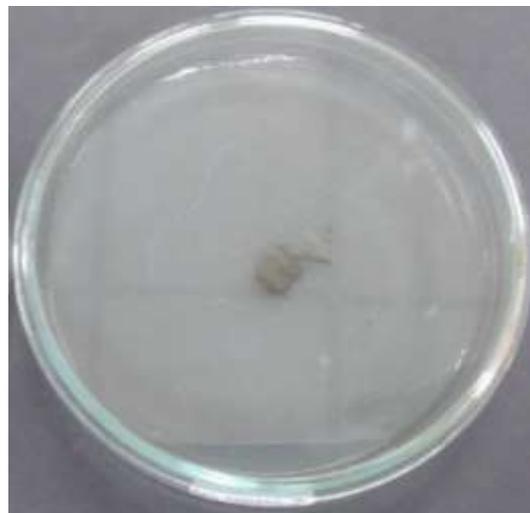
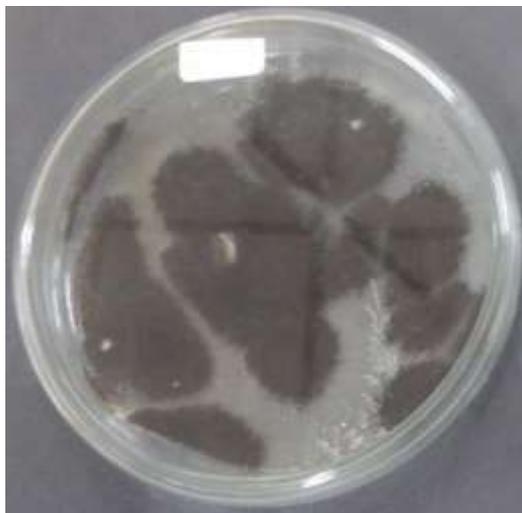
O aspecto da colônia foi alterado principalmente pela ausência de esporos aéreos pretos, a velocidade do crescimento também foi afetada pela presença do cádmio no meio

**B3c-Isolado 3***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

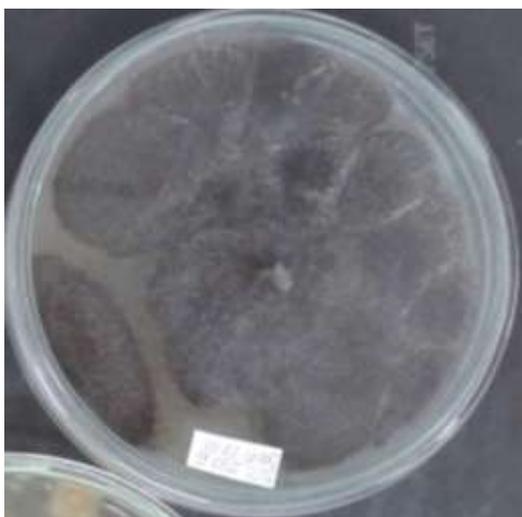
O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram os principais fatores afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**B2c-Isolado 5***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

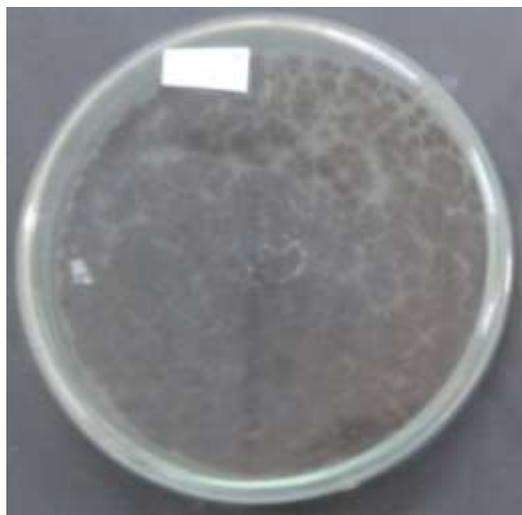
O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram os principais fatores afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**GRUPO 10****B2c-Isolado 4***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

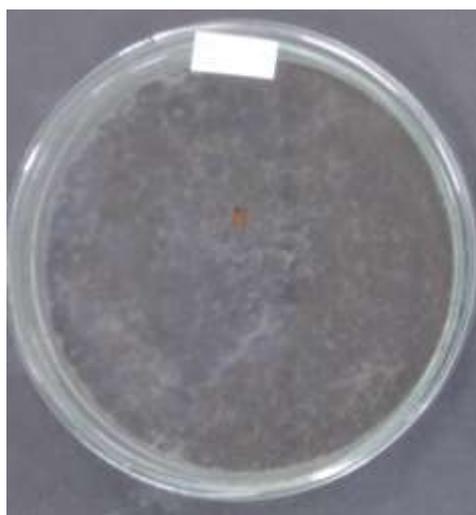
Não houve desenvolvimento de colônia no meio contendo cádmio, assim, o fungo não foi resistente ao metal na concentração do meio de crescimento.

**B2c-Isolado 6***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

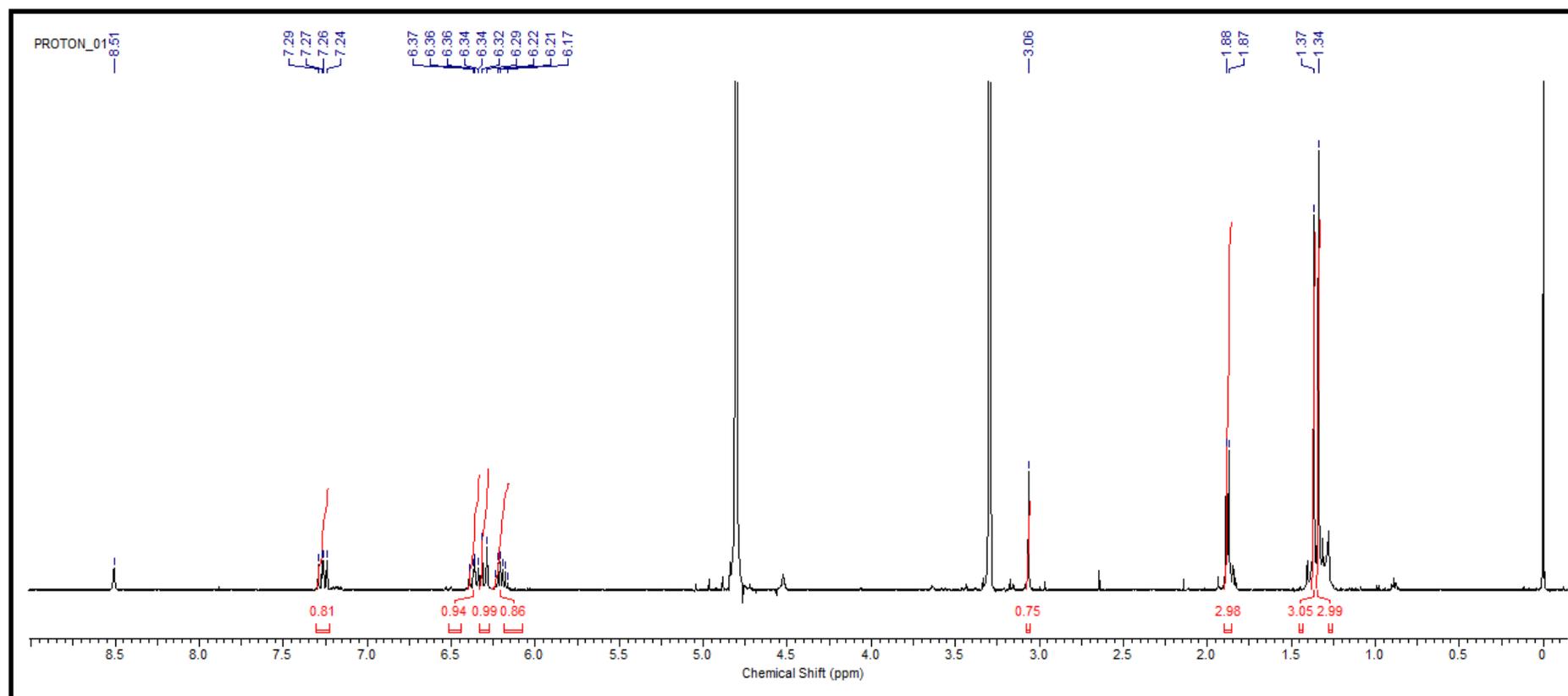
O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram os principais fatores afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**B3a-Isolado 7***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

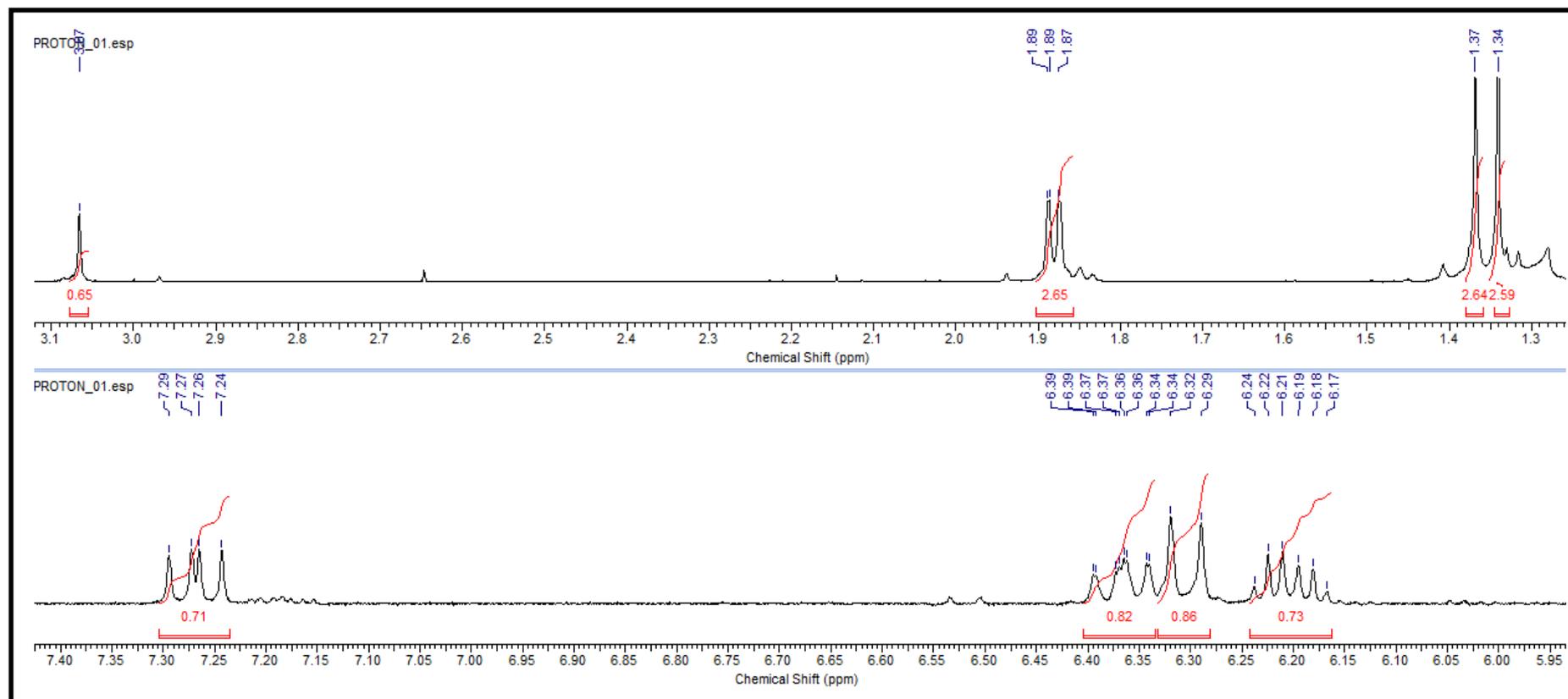
O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A produção de esporos aéreos foi o principal fator afetado pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**B3c-Isolado 1***Fungo Cultivado em Meio DBA**Fungo Cultivado em Meio DBA com adição de Cd<sup>2+</sup>(100 mg/L)*

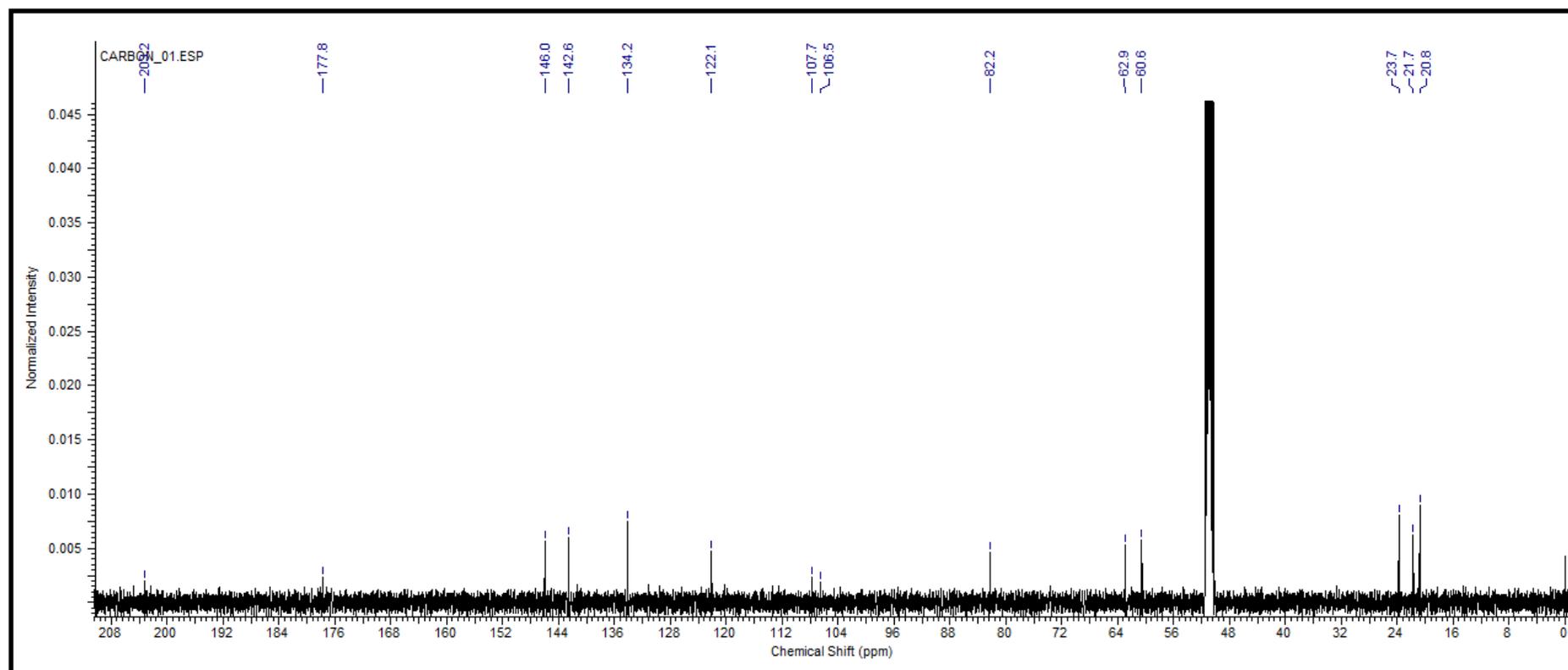
O fungo mostrou boa resistência ao metal, apesar da grande modificação em sua morfologia. A velocidade do crescimento da colônia e a produção de esporos aéreos foram os principais fatores afetados pela presença de cádmio no meio de cultivo.

**APÊNDICE D: DADOS ESPECTROSCÓPICOS DA FRAÇÃO M01C3-SP4.3.2.3**Figura 5. 1 - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração M01C3-SP4.3.2.3.

Fonte: dados da pesquisa, 2018

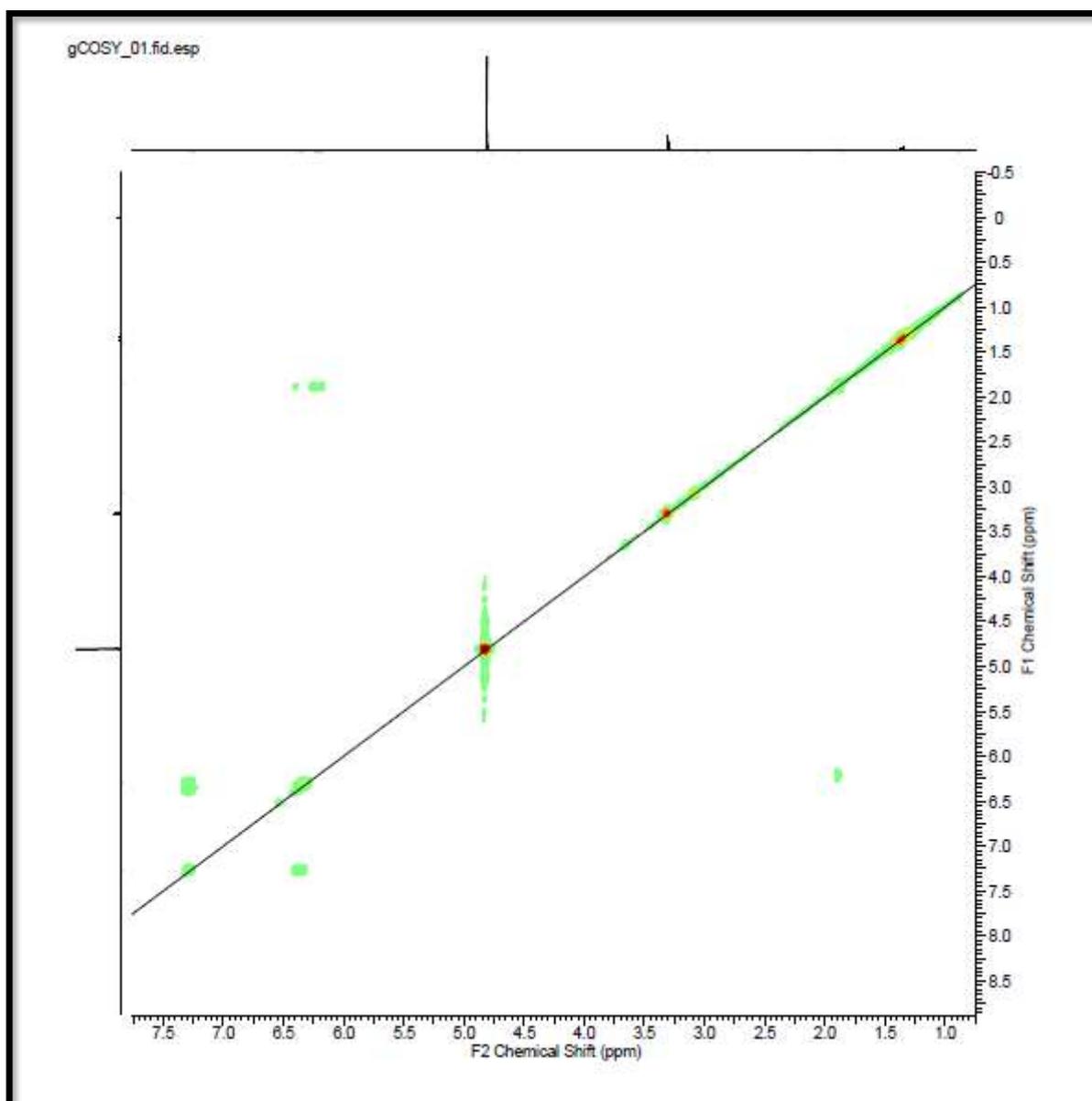
Figura 5. 2 - Ampliações do Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração M01C3-SP4.3.2.3.

Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 3 - Figura 5. 3 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração M01C3-SP4.3.2.3

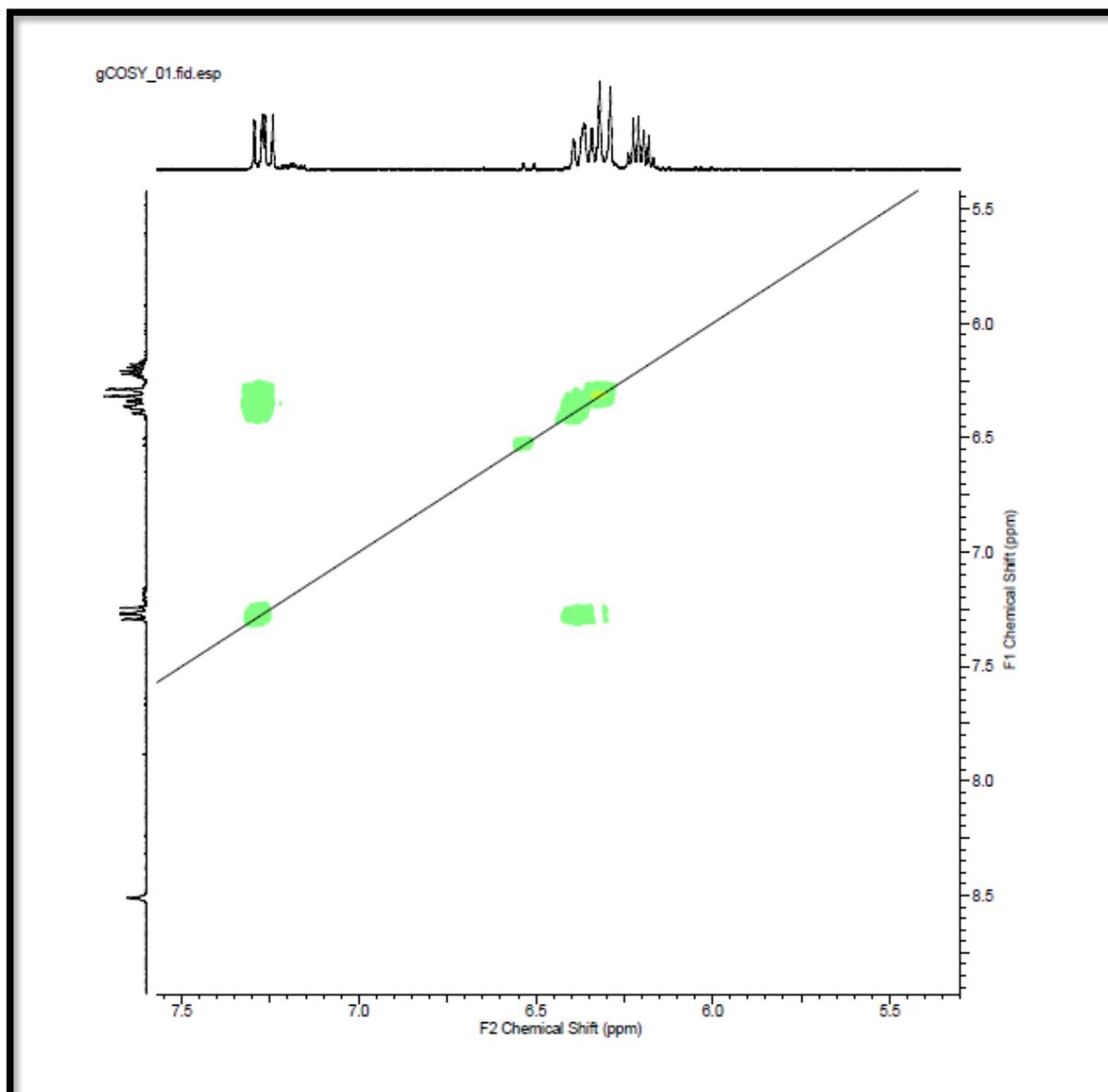
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 4 - Mapa de contorno gCOSY da fração M01C3-SP4.3.2.3



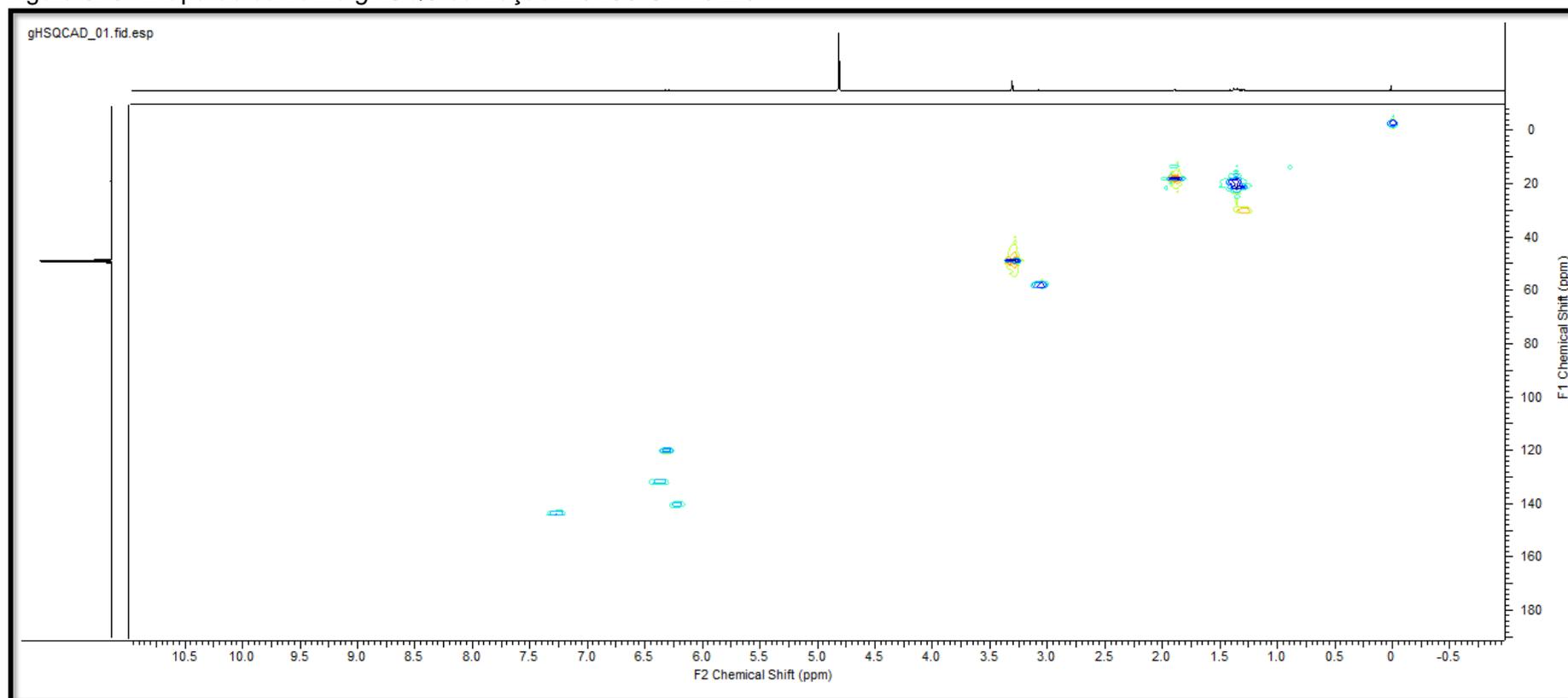
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 5 - Ampliação do mapa de contorno gCOSY da fração M01C3-SP4.3.2.3



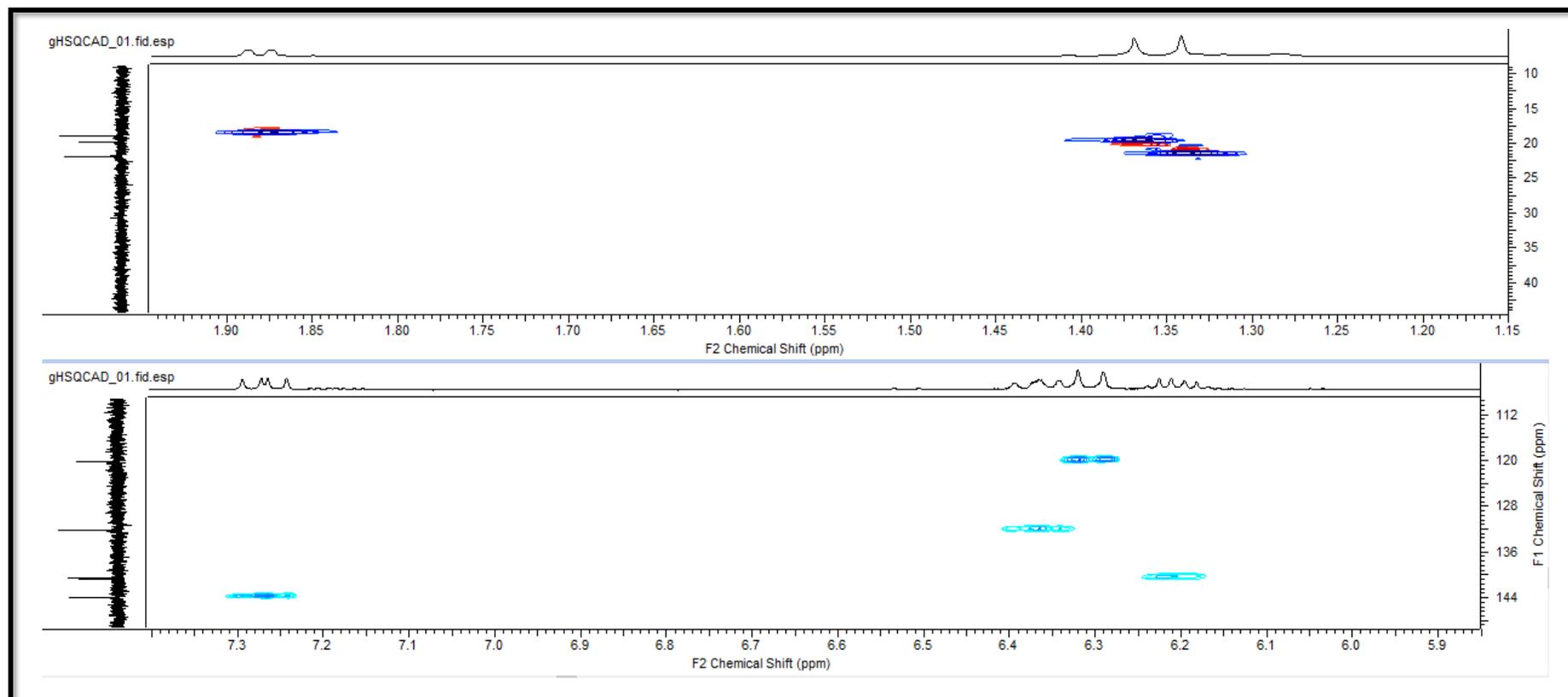
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 6 - Mapa de contorno gHSQC da fração M01C3-SP4.3.2.3



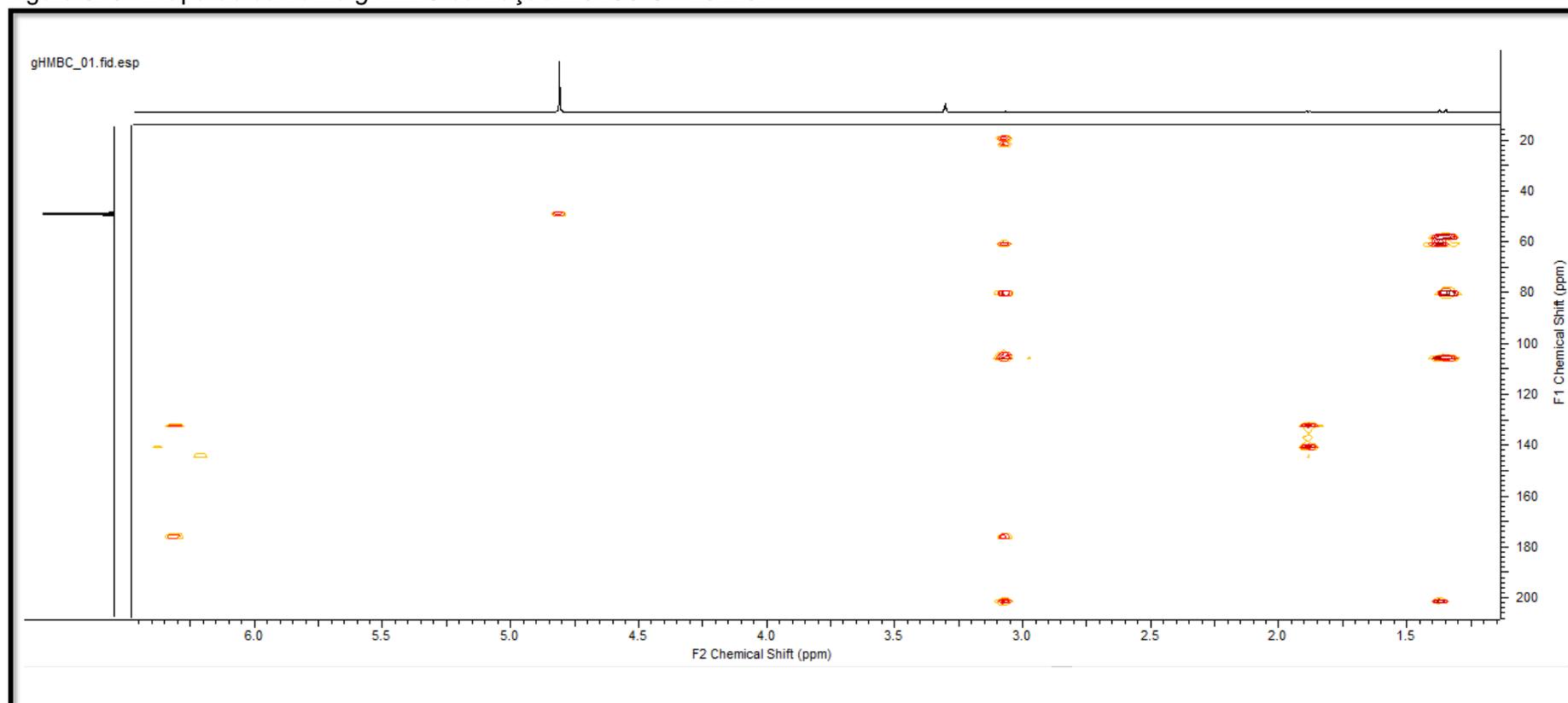
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 7 – Ampliações do mapa de contorno gHSQC da fração M01C3-SP4.3.2.3.



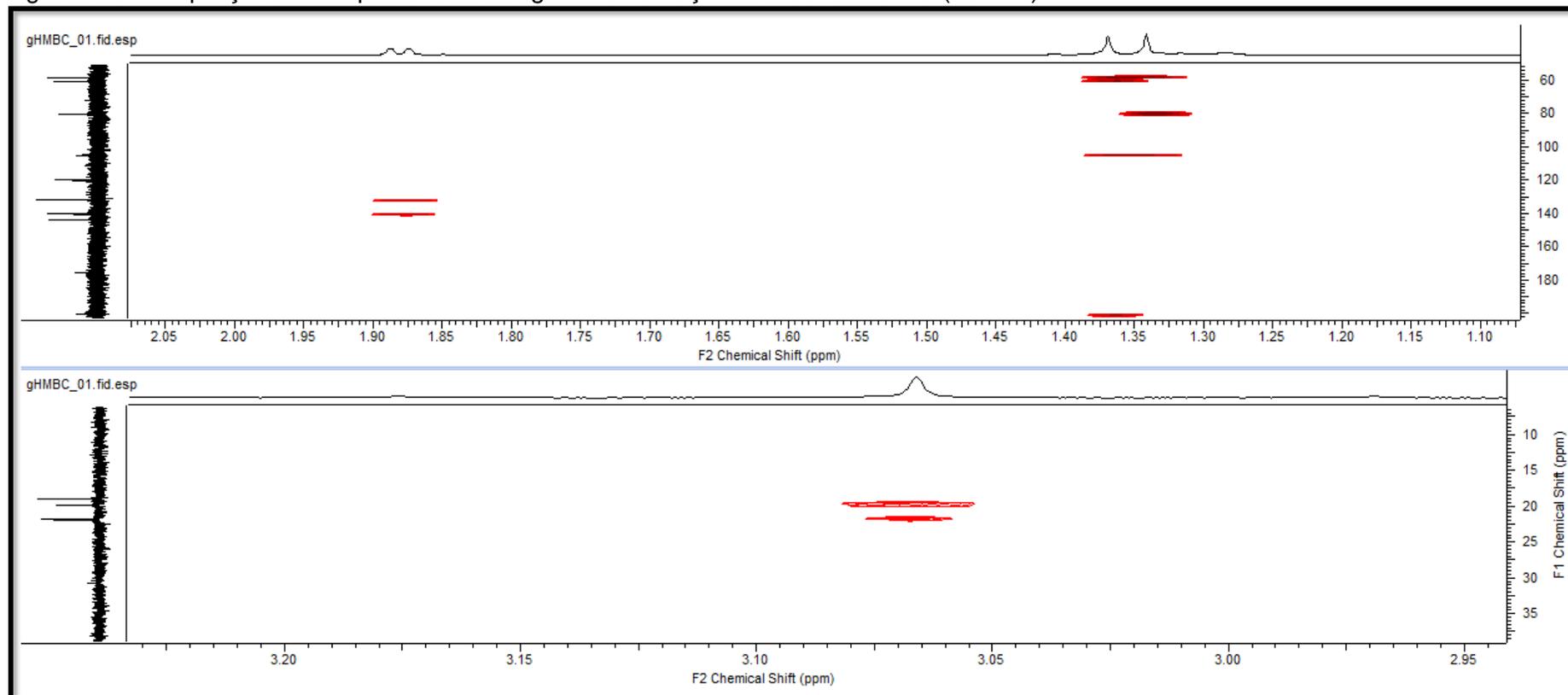
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 8 - Mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3.



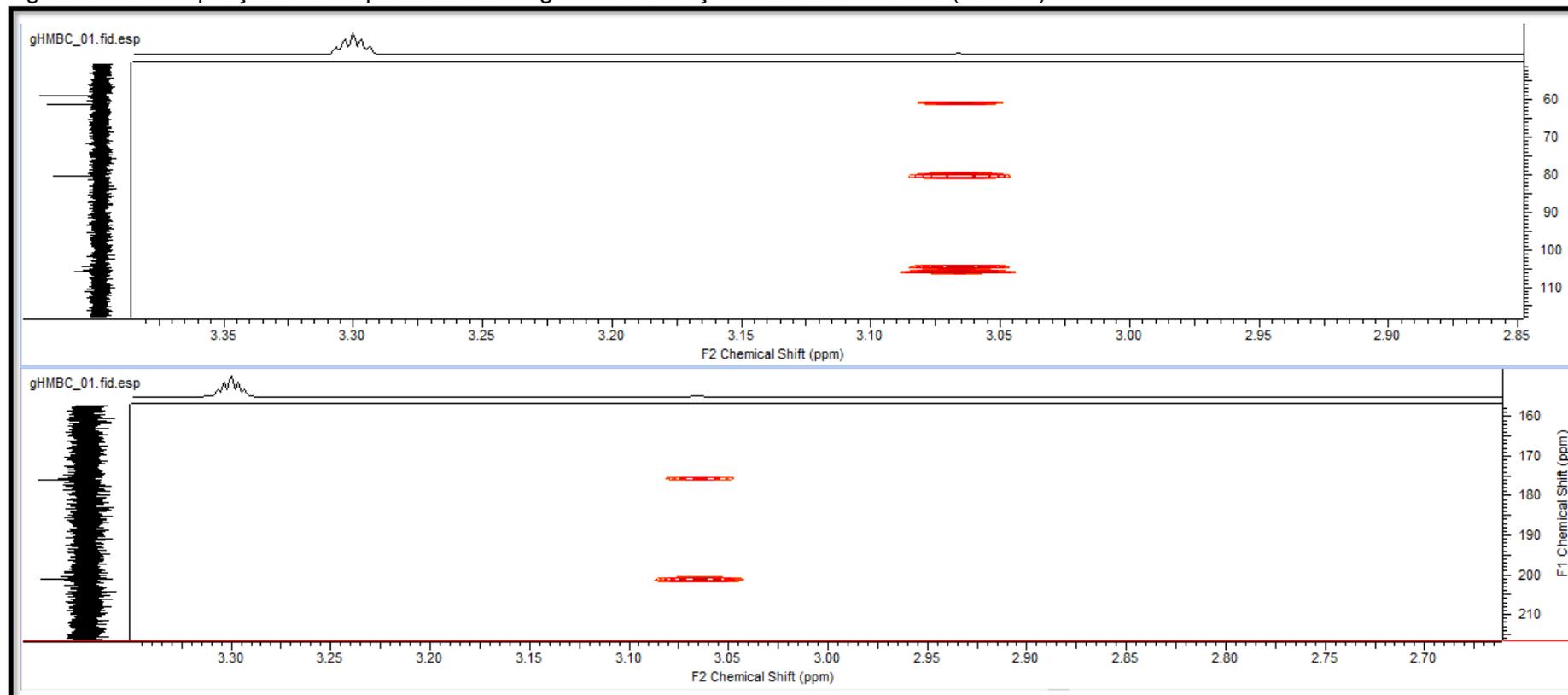
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 9 – Ampliações do mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3 (Parte 1).



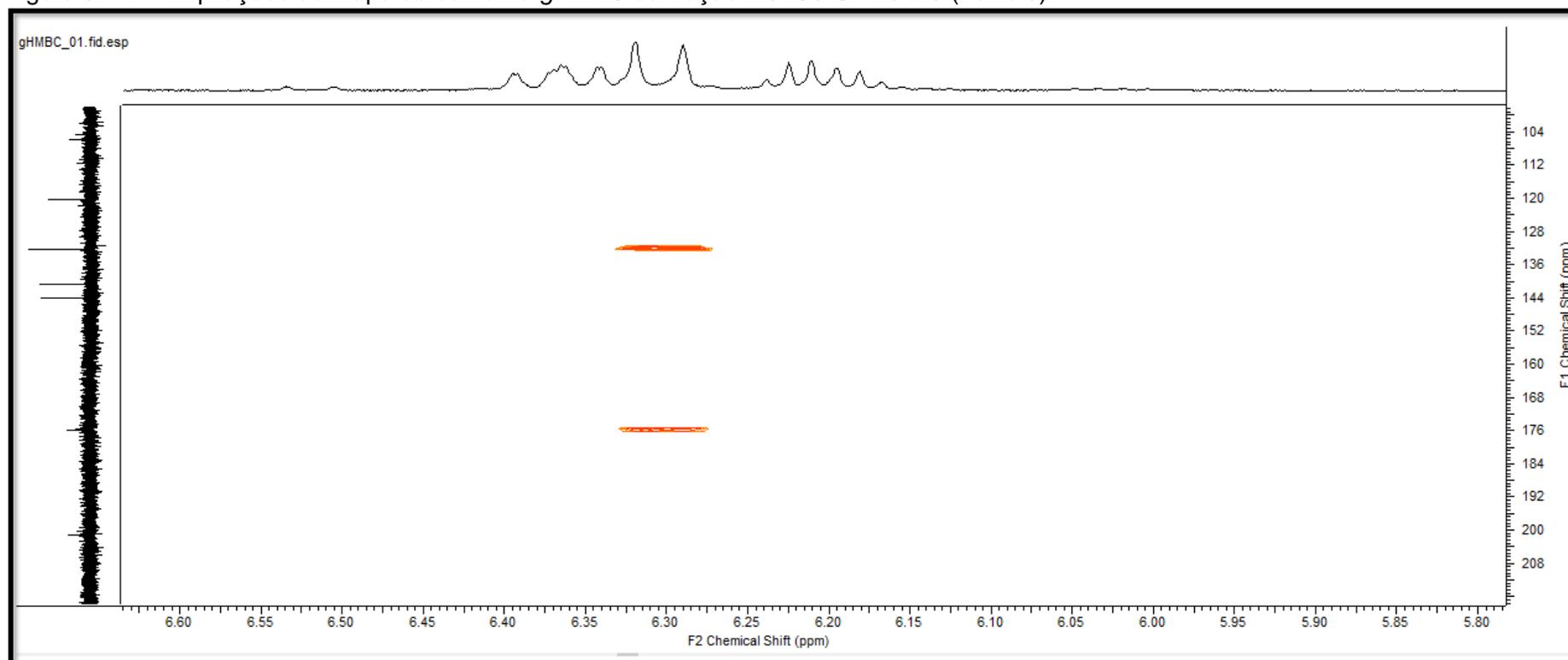
Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 10 - Ampliações do mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3 (Parte 2).



Fonte: dados da pesquisa, 2018

Figura 5. 11 - Ampliações do mapa de contorno gHMBC da fração M01C3-SP4.3.2.3 (Parte 3).



Fonte: dados da pesquisa, 2018