UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

FERNANDA DE FREITAS VENTURA

Efeitos das condições de cultivo e desenvolvimento de um bioensaio de toxicidade com o fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri*

Versão original da dissertação

São Paulo
Data do depósito na CPG:
05/05/2015

FERNANDA DE FREITAS VENTURA

Efeitos das condições de cultivo e desenvolvimento de um bioensaio de toxicidade com o fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Cassius Vinicius Stevani

São Paulo

2015

Dedicatória

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO), por viabilizar o prosseguimento e a conclusão deste trabalho.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Usina São Jose da Estiva (Novo Horizonte, SP), pelo fornecimento de melaço de cana-de-açúcar para o preparo de meios de cultura e à Daniela Silva pela atenção e disponibilização de informações sobre o produto doado.

À equipe administrativa, de motoristas, manutenção e limpeza do IQ-USP, pelo auxílio em serviços necessários.

Ao Prof. Dr. Josef Wilhelm Baader, por permitir o uso do luminômetro de tubo e pelo empréstimo de reagentes.

Ao Prof. Dr. Leandro Helgueira Andrade pela disponibilização de uma câmara climática para condução de parte dos experimentos.

À Profa. Dra. Iolanda Midea Cuccovia, pelo empréstimo de materiais e à Márcia Aparecida da Silva, pela gentileza na disponibilização dos mesmos.

Aos Profs. Drs. Reinaldo Camino Bazito, Guilherme Andrade Marson e Renato Sanches Freire, pela sugestão de ideias diversas ao longo do projeto.

Aos Profs. Drs. Pedro Vitoriano de Oliveira e Ernani Pinto Junior, por terem contribuído fazendo parte da minha banca de qualificação.

À todos os professores que passaram pela minha vida, desde o colégio até a faculdade e pós-graduação, pelos ensinamentos.

À Beatriz e à Geórgia, pelo auxílio sempre eficiente e paciente no laboratório.

Aos meus colegas do LBF, pela colaboração, amizade, troca de conhecimentos e conversas.

Aos meus colegas do GPQVA, pela gentileza e simpatia.

Aos meus colegas da Oswaldo Cruz, por terem me acompanhado em um período singular de nossas vidas.

À Paula, à Marcela, ao Walter e à Patrícia, pelos conselhos, desabafos, conversas, incentivo, compreensão, tolerância e trabalho em conjunto.

À Sandra, à Larissa, à Daiane, à Sarah, à Fernanda, ao Júlio, ao Carlos e ao Daniel, pelas conversas malucas, pela companhia, pela ajuda de uma forma ou de outra e por todo o resto que naturalmente acompanha tantos anos de amizade.

Ao Will, que sempre deixou faltar o ódio, pelos diversos serviços prestados gentilmente ao longo dos anos (de configuração da rede sem fio à troca de fechaduras), pela paciência ao escutar minhas lamúrias e pelo apoio incondicional, apesar das minhas paranoias.

Ao Evandro, por ter me ensinado a respirar com o umbigo.

Ao Filipe, por ser a criatura divertida, rabugenta e carinhosa que trouxe consigo um amor tranquilo e me ensinou o verdadeiro significado do queijo minas.

Ao Prof. Dr. Cassius V. Stevani, pela excelente orientação, compreensão e motivação nos momentos mais difíceis (obrigada por ter sempre mantido a calma e o ânimo em meio ao meu desespero!). Agradeço por ter me dado a oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa e, assim, por ter me ensinado tanto nestes últimos anos. Obrigada também pela dedicação imensa como orientador e pela capacidade incrível de despertar o melhor dos seus orientandos.

Aos meus pais, pelo amor e carinho que sempre me deram, mesmo nos momentos de rebeldia, e por terem feito de tudo para que eu pudesse continuar os meus estudos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com o projeto e não foram devidamente citados devido à minha falha memória.

Epígrafe

"Eu posso não ter ido para onde eu pretendia ir, mas eu acho que acabei terminando onde eu pretendia estar".

Douglas Adams

RESUMO

Ventura, F.F. **Efeitos das condições de cultivo e desenvolvimento de um bioensaio de toxicidade com o fungo bioluminescente *Neonothopanus gardneri*.** 2015. 146 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os fungos são decompositores primários e, portanto, ocupam uma posição estratégica na base da cadeia alimentar em diversos ecossistemas, incluindo os terrestres. Por tais características, estes organismos são de especial interesse na aplicação em bioensaios de toxicidade. As metodologias com espécies bioluminescentes são geralmente práticas, economicamente viáveis e de fácil aplicação. Ainda assim, os fungos naturalmente bioluminescentes são ainda pouco estudados para este propósito, em comparação com os organismos aquáticos, como as bactérias. Neste cenário, o presente trabalho apresenta os efeitos de diferentes condições de cultivo sobre o perfil de bioluminescência do fungo *Neonothopanus gardneri*, buscando o desenvolvimento de um bioensaio de toxicidade utilizando esta espécie.

Estudos preliminares foram destinados à redução da variação experimental, à identificação de algumas das características intrínsecas do organismo em cultura e, ainda, à definição de procedimentos de análise e de inoculação do micélio. Em seguida, a emissão de luz foi monitorada variando as temperaturas de incubação, o pH dos meios de cultura e as concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio, adotadas como nutrientes. Identificou-se que a incubação a 30ºC em meios com 2% de ágar, 1% de melaço de cana de açúcar, 0,02% de extrato de levedura e pH 6 resultou em um perfil de bioluminescência mais adequado ao propósito de interesse, apesar de não ter resultado na maior emissão de luz possível.

Nestas condições de cultivo, foi possível desenvolver um bioensaio de toxicidade. Para

isso, foi necessário avaliar o comportamento da luz emitida pelo micélio em contato tanto com ar atmosférico quanto com alguns potenciais diluentes, estabelecendo-se também o tempo de exposição necessário para uma resposta máxima do fungo *N. gardneri* em contato com soluções de Cu^{+2} (50 mM) e fenol (10 mM). Neste caso, uma solução aquosa de Triton X-100 na concentração de 0,01% (m:v) tamponada com ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico (MES, 50 mM, pH 5,7) foi adotada para diluir os agentes tóxicos, aos quais o micélio foi exposto durante 24 horas.

Posteriormente, a metodologia foi aplicada para testar a toxicidade de dois metais e dois fenóis (Cu^{+2}, Cd^{+2}, fenol e 4-nitrofenol), obtendo-se respectivos valores de EC_{50} (concentração mediana efetiva) iguais a (0,53 ± 0,09) mM; (8,0 ± 0,5).10^{-3} mM; (1,7 ± 0,3) mM e (0,34 ± 0,04) mM. Entretanto, em experimentos paralelos, a quantificação espectrofotométrica de fenóis nos meios de cultura indicou que os mesmos são difundidos homogeneamente pelo ágar. Neste caso, os valores de EC_{50} seriam divididos por 6, para considerar a diluição dos compostos pelos meios.

O bioensaio com a espécie *N. gardneri* possui vantagens, principalmente em relação ao comportamento reprodutível da emissão de luz, à alta intensidade da bioluminescência, ao crescimento rápido do micélio e à sensibilidade aos agentes tóxicos testados. Considerando tais características, a metodologia desenvolvida representa um procedimento viável em bioensaios de toxicidade. Assim, a mesma pode ser aperfeiçoada em trabalhos futuros e aplicada em complemento com outros métodos já desenvolvidos para outros organismos terrestres ou aquáticos.

Palavras-chave: ecotoxicologia tropical, basidiomiceto, toxicidade de solo, fungicida, fenol, metal.

ABSTRACT

Ventura, F.F. **Effects of culture conditions and development of a toxicity bioassay with the bioluminescent fungi *Neonothopanus gardneri*. 2015.** 146 p. Masters thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fungi are primary decomposers, thus occupying a strategic position at the base of the food chain in many ecosystems, including terrestrial ones. Due to such characteristics, these organisms are of special interest to toxicity bioassays. Bioluminescent-based methods are usually practical, economically viable and easy to perform. Nevertheless, naturally bioluminscent fungi are still poorly studied in this respect, compared to aquatic organisms like bacteria. In the above mentioned scenario, this work presents the effects of different culture conditions on the bioluminescence profile of the fungus *Neonothopanus gardneri*, aiming at the development of a toxicity bioassay using this species.

Preliminary studies were intended to reduce experimental variation, identify some of the intrinsic characteristics of the organism in culture, and also to define the procedures for analysis and mycelium inoculation. Following this, light emission was monitored varying the incubation temperatures; the culture media pH and the concentrations of carbon and nitrogen nutrient sources. It was identified that the incubation at 30ºC in culture media containing 2% agar, 1% sugar cane molasses, 0.02% yeast extract and pH 6 resulted in the most appropriate bioluminescence profile for the purpose of interest, although it has not resulted in the higher light emission.

Under these culturing conditions, it was possible to develop a toxicity bioassay. To this end, it was necessary to assess the behavior of light emission from the mycelium in contact with both atmospheric air and some potential diluents, also establishing the exposure time required for a maximum response of *N. gardneri* in contact with Cu^{+2} (50 mM) and phenol

(10 mM) solutions. In this case, an aqueous solution of Triton X-100 in the concentration of 0.01% (w:v) buffered with 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES, 50 mM) was chosen to dilute the toxic agents, to which the mycelium was exposed for 24 hours.

Thereafter, the methodology was applied to test the toxicity of two metals and two phenols (Cu^{+2}, Cd^{+2}, phenol and 4-nitrophenol), obtaining respective EC_{50} values (median effective concentration) equal to (0,53 ± 0,09) mM; (8,0 ± 0,5).10^{-3} mM; (1,7 ± 0,3) mM e (0,34 ± 0,04) mM. Meanwhile, in parallel experiments, the spectrophotometric quantification of phenols in culture media indicated that they are evenly diffused through agar. In this case, the EC_{50} values would be divided by 6, in order to consider the dilution of compounds by the media.

The toxicity bioassay with *N. gardneri* species has advantages, manly in relation to the reproducible behavior of light emission, high intensity of bioluminescence, rapid growth of mycelium and sensitivity to the tested toxic agents. Considering these characteristics, the developed methodology represents a viable procedure for a toxicological bioassay. Accordingly, it can be improved in future work and performed in addition to other methods already developed for other terrestrial or aquatic organisms.

Keywords: tropical ecotoxicology, basidiomycete, soil toxicity, fungicide, phenol, metal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 Fungos: aspectos gerais e importância 13

1.2 Bioluminescência em fungos 20

1.2.1 Histórico 20

1.2.2 Distribuição de espécies 21

1.2.3 Mecanismo de bioluminescência 23

1.2.4 Possíveis funções da bioluminescência para os fungos 26

1.3 Fatores que afetam o crescimento e a emissão de luz 30

1.3.1 Nutrientes básicos 30

1.3.2 Condições ambientais: temperatura, pH e umidade 32

1.3.3 Curvas de crescimento em meios de cultura 34

1.4 Agentes químicos e suas interações com os fungos: metais e fenóis 36

1.4.1 Fatores que afetam a biodisponibilidade de compostos orgânicos e metais 38

1.4.2 Mecanismos de toxicidade de metais e fenóis para fungos 41

1.5 Bioensaios de toxicidade 44

2 OBJETIVOS 53

3 MATERIAIS E MÉTODOS 55

3.1 Reagentes 55

3.2 Materiais e aparelhagem 55

3.3 Preparo de soluções e meios de cultura 56

3.3.1 Tampão ácido cítrico/fosfato 56

3.3.2 Meios de cultura 57

3.3.3 Diluentes para os agentes tóxicos 58

3.3.4 Soluções de fenóis e cátions metálicos 58

3.3.5 Soluções para o método de quantificação dos fenóis em meios de cultura 59

3.4 Procedimentos de inoculação 60

3.5 Estudos preliminares sobre a BL 61

3.6 Efeito das condições de cultura sobre a BL 62

3.7 Desenvolvimento do bioensaio 64

3.8 Quantificação de fenol e fenóis substituídos em meios de cultura 65

3.9 Tratamento dos dados 66

3.10Resíduos 68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 68
4.1 Estudos preliminares 69
4.1.1 Alteração do equipamento de quantificação 70
4.1.2 Adaptação do suporte de placas do luminômetro 71
4.1.3 Alteração no tamanho e material das placas 73
4.1.4 Alteração no melaço 75
4.1.5 Diminuição do teor de água sobre os meios 78
4.2 Efeitos das condições de cultura sobre a BL 81
4.3 Desenvolvimento do bioensaio de toxicidade 91
4.3.1 Seleção de solventes 91
4.3.2 Determinação do tempo de exposição 98
4.3.3 Realização do bioensaio de toxicidade 101
4.4 Absorção de fenol e fenóis substituídos em meios de cultura 111
5 CONCLUSÃO 117
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 119
APÊNDICE A – Valores de BL medidos nos luminômetros de tubo e de microplacas. 130
APÊNDICE B – Perfis de BL construídos com os valores do apêndice A. 132
APÊNDICE C – Valores de BL medidos no luminômetro de microplacas utilizando um suporte individual de placas de 35 mm. 133
APÊNDICE D – Perfis de BL construídos com os valores do apêndice C. 134
APÊNDICE E – Valores de BL medidos no luminômetro de microplacas utilizando um suporte individual de placas de 60 mm. 135
APÊNDICE F – Perfis de BL construídos com os valores do apêndice E. 136
APÊNDICE G – Valores de BL do fungo *N. gardneri* cultivado em placas de petri de 35mm, variando as condições de temperatura e pH. 137
APÊNDICE H – Valores de BL do fungo *N. gardneri* cultivado em placas de petri de 35 mm, variando as concentrações de extrato de levedura e melaço. 139
APÊNDICE I – Valores de BL do fungo *N. gardneri* em placas fechadas e após exposição ao ar e aos diluentes testados no desenvolvimento do bioensaio. 141
APÊNDICE J – Valores de BL do fungo *N. gardneri* após exposição a uma solução de cobre 50mmol.L^{-1} e de fenol 10mmol.L^{-1}. 142
APÊNDICE K - Valores de BL e de $BL_{inibida}$ do fungo *N. gardneri* após exposição de 24 h aos agentes tóxicos na aplicação bioensaio. 143
SÚMULA CURRICULAR 145

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos: aspectos gerais e importância

Os fungos constituem um grupo amplo e diversificado de organismos eucariontes, aclorofilados e pluricelulares - com algumas exceções de espécies unicelulares, como é o caso das leveduras. Uma vez que não são capazes de produzir o próprio alimento, os nutrientes necessários para seu crescimento e sobrevivência são tipicamente obtidos por meio da decomposição de matéria orgânica morta (espécies saprotróficas), pela ação parasitária (espécies patógenas ou parasitas) ou como decorrência de relações simbióticas com plantas e animais. A absorção desses nutrientes ocorre através das membranas e paredes celulares dos fungos, sendo estas formadas principalmente por quitina (e/ou, mais raramente, celulose) em combinação com uma grande diversidade de compostos orgânicos complexos – entre eles, outros polissacarídeos, lipídios e proteínas (Sharma 2006, Gupta 2004, Carris et al. 2012).

O habitat destes organismos é amplamente diversificado e varia de acordo com a especificidade das espécies, que em alguns casos podem se desenvolver até em ambientes aparentemente desfavoráveis para a sua sobrevivência, como rochas (Gadd 2007, Gupta 2004). Ainda assim, os fungos crescem preferencialmente em solos, onde há, naturalmente, maior quantidade de matéria orgânica, em ambientes escuros e úmidos, sob temperaturas ótimas variando de 22ºC a 27ºC e meios com pH entre 5 e 6,5 (Sharma 2006).

Excetuando-se algumas espécies mais primitivas e outras unicelulares, a maior parte dos fungos - incluindo a espécie de interesse neste trabalho - possui morfologia filamentosa, desenvolvendo-se a partir das hifas: filamentos longos e ramificados, de estrutura tubular (cilíndrica). O conjunto de hifas forma o micélio, que além de ser o responsável pela fixação em substratos e auxiliar na alimentação, contém esporos para reprodução (Walker & White 2005).

Sob as condições ambientais adequadas, tendo em vista a disponibilidade de nutrientes e

de acordo com as características da espécie, os corpos de frutificação (cogumelos) originam-se da reprodução sexuada, que envolve, de forma geral, a fusão de células haplóides sexualmente compatíveis e posterior meiose (Griffin 1994, Ferreira 2005). No caso mais específico dos fungos basidiomicetos, grupo no qual estão inseridos todos os fungos bioluminescentes, há a formação de basidiósporos (esporos sexuados) no interior das estruturas reprodutivas dos cogumelos (basídios). Ao germinarem, os basiósporos resultam em novas hifas haplóides que, ciclicamente, podem reproduzir-se assexuadamente para formação de mais hifas – principalmente por fragmentação e esporulação - ou sexuadamente, originando novos corpos de frutificação (Griffin 1994, Ferreira 2005). Estes, por sua vez, têm como principais estruturas o píleo, a estipe e as lamelas, onde ficam localizados os basídios (Figura 1).

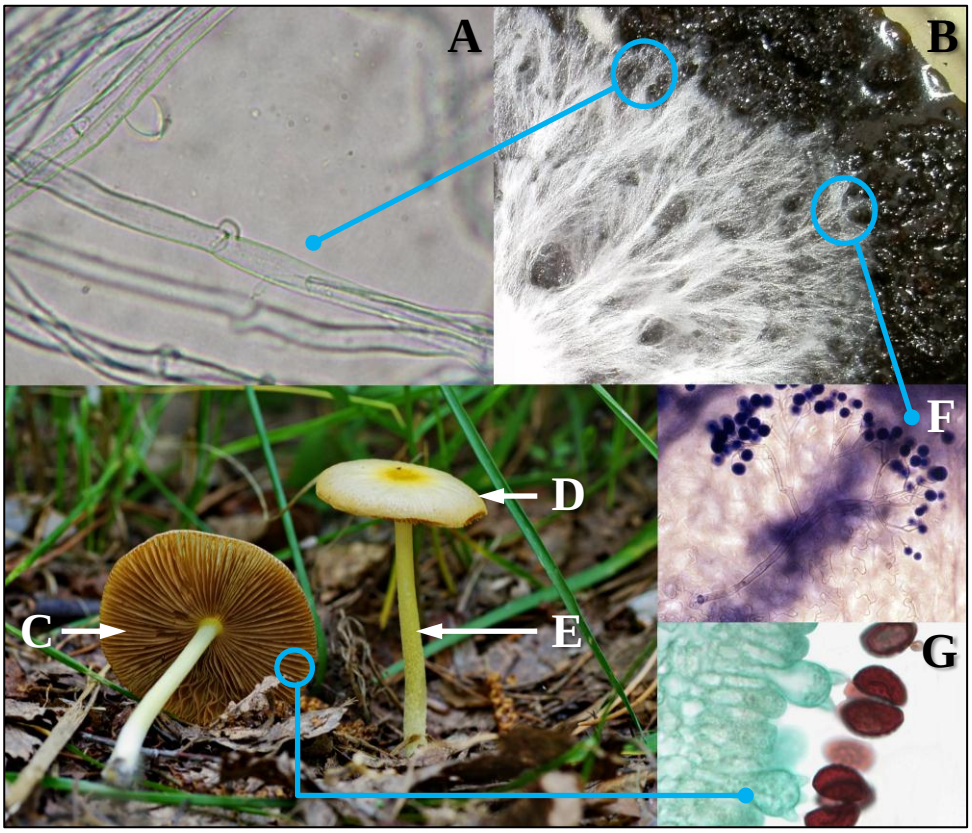


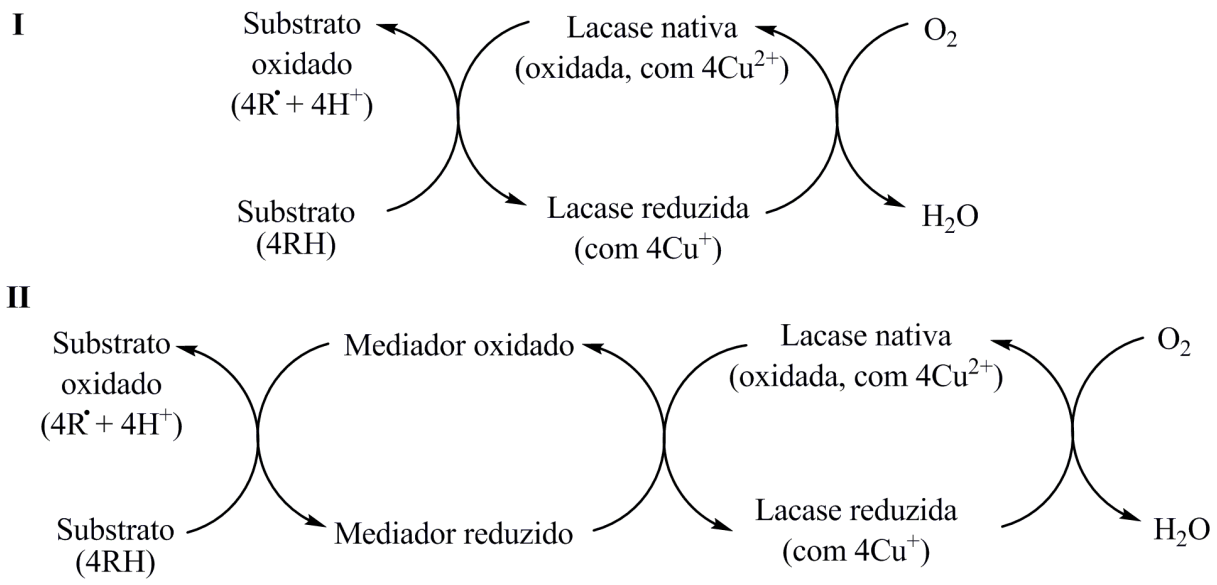
Figura 1: Principais estruturas que constituem os fungos. A: hifa, B: micélio, C: lamelas, D: píleo, E: estipe, F: esporos assexuais (no exemplo, conídios), G: basídios (estruturas azul-esverdeadas) produzindo basidiósporos (representados na cor vinho). Fontes: Keisotyo (2008, Fig. A), Kellner (2012, Fig. B), Bulynkova (2010, Fig C-E), Boutet (2002, Fig. F), Houseman & Ford (2014, Fig G).

Apesar dos prejuízos causados pelas espécies parasitas e pela decomposição de alimentos e outros materiais de valor econômico ou histórico, os fungos são essenciais no ecossistema em que estão inseridos e nas atividades humanas, sendo largamente utilizados na fabricação de diversos produtos de uso comum – entre eles, bebidas alcoólicas, medicamentos, vitaminas e alimentos (Gadd 1993, Stevani et al. 2013). A capacidade de degradar matéria orgânica morta e promover a reciclagem de resíduos lignocelulósicos faz com que esses organismos sejam uns dos principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes, disponibilizando-os em formas que podem ser absorvidas novamente por níveis tróficos superiores e auxiliando, desta forma, na manutenção da cadeia alimentar (Gadd 1993).

Em algumas espécies de fungos, enzimas extracelulares são produzidas para promover a degradação de lignina – composto polimérico que confere maior rigidez às paredes celulares em plantas, sendo formado por unidades monoméricas dos álcoois cumarílico; coniferílico e sinapílico (Evans & Hedger 2001). A lignina está associada à celulose e à hemicelulose, formando a lignocelulose, que constitui um material estrutural nas plantas. No entanto, diferentemente destes últimos dois compostos, que podem ser degradados por ação enzimática sobre ligações químicas específicas, a lignina requer enzimas com atuação mais promíscua, sobre vários tipos de ligação química. Neste caso, as enzimas necessárias para viabilizar tais processos são produzidas pelos fungos de podridão branca, compreendendo os basidiomicetos lignolíticos, que são de maior interesse no presente trabalho, uma vez que, como já mencionado anteriormente, todas as espécies bioluminescentes de fungos pertencem a esse grupo (Hatakka 2005, Desjardin et al. 2008, Stevani et al. 2013).

As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina e produzidas pelos basidiomicetos são as lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase. As primeiras são cobre-dependentes, e têm como função catalisar a oxidação de compostos fenólicos da lignina, gerando radicais fenoxila que, ao passarem por posteriores transformações químicas,

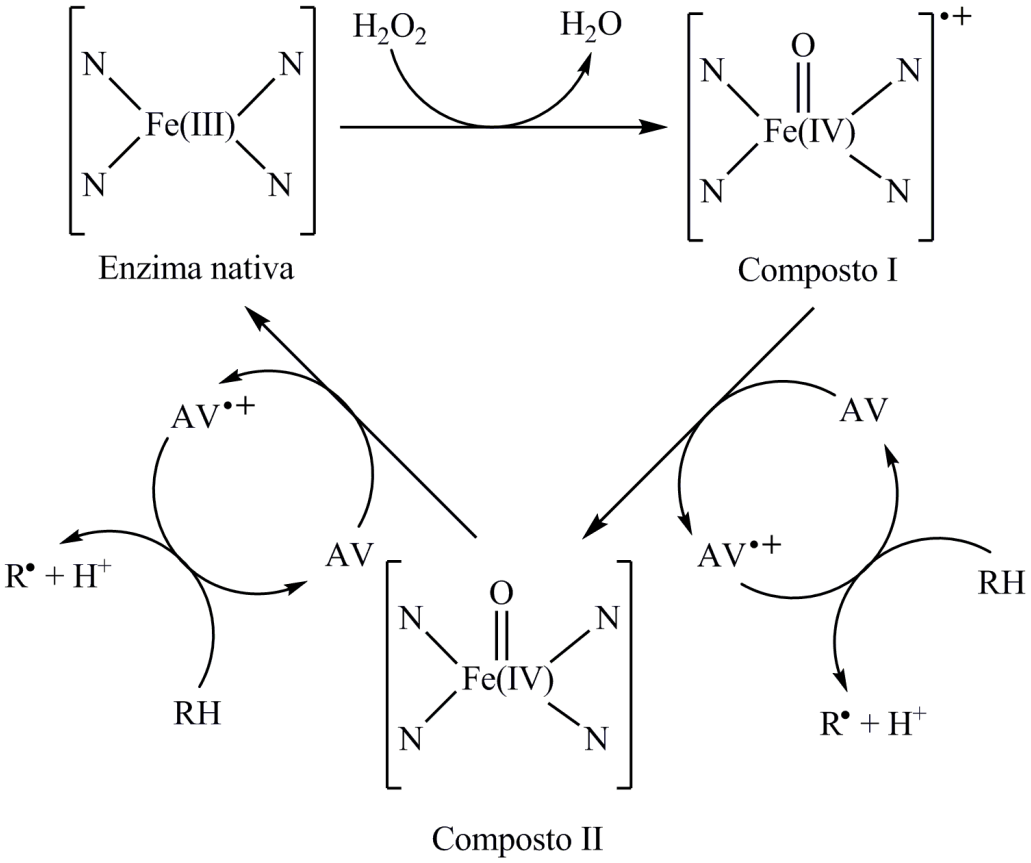
resultam na decomposição do material. Quando na presença de mediadores, estas enzimas são capazes de promover também a degradação de compostos não fenólicos (Esquema 1). Em ambos os casos, a enzima retorna à sua forma nativa utilizando o oxigênio molecular como agente oxidante, sendo este transformado em água após redução (Bugg et al. 2011, Hatakka 2005, Dashtban et al. 2010).



Esquema 1. Atividade da enzima lacase na decomposição de substratos fenólicos (I) e não fenólicos (II). Fontes: Wong (2009) e Correia et al. (2011).

A lignina peroxidase e a manganês peroxidase, por outro lado, são glicoproteínas que contém em sua estrutura grupos heme e utilizam peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Assim, o grupo heme da enzima lignina peroxidase reage com H_2O_2, produzindo um composto I intermediário com deficiência de dois elétrons. Para voltar à sua estrutura inicial, a enzima promove a oxidação de compostos fenólicos ou não fenólicos da lignina, além de reagir também com outros substratos mediadores, como o álcool veratrílico (AV) produzido pelos próprios fungos como metabólito secundário (Esquema 2). Os cátion-radicais $AV^{\bullet+}$ formados neste processo auxiliam na decomposição da lignina, reagindo com substratos não oxidados diretamente pela enzima. Adicionalmente, tal metabólito pode atuar também na

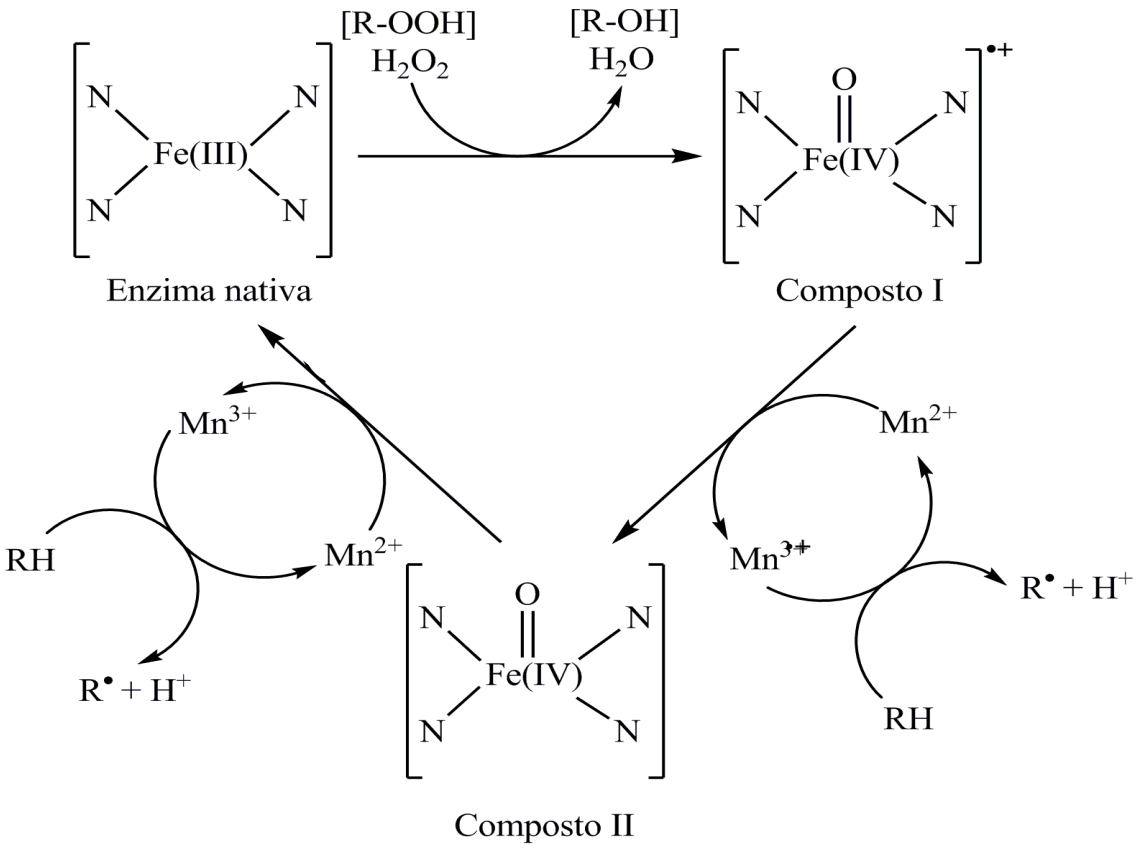
proteção da lignina peroxidase, impedindo que a mesma se mantenha inativa devido à oxidação do composto intermediário II em excesso de H_2O_2. Deste modo, o AV seria o responsável por retornar a enzima à forma nativa (Bugg et al. 2011, Hatakka 2005, Dashtban et al. 2010, Wong 2009, Correia et al. 2011).



Esquema 2. Atividade da enzima lignina peroxidase. Fonte: adaptado de Cameron (2000).

O grupo heme da enzima manganês peroxidase também é oxidado na presença de H_2O_2, formando um composto I intermediário que é posteriormente reduzido em duas etapas pelo Mn^{+2}, até que a enzima retorne à sua forma nativa. Os cátions Mn^{+3} resultantes deste processo, por sua vez, são responsáveis por promover a oxidação de substratos fenólicos na lignina, gerando radicais fenoxila (Esquema 3). Quando na presença de mediadores que reagem alternativamente com o Mn^{+3} para originar outros radicais, pode ocorrer também a degradação de compostos não fenólicos. Já nos casos em que a enzima é inativada devido ao

excesso de H_2O_2, o cátion Mn^{+3} novamente apresenta uma função importante, sendo o principal responsável por proteger e reestabelecer a forma nativa da enzima (Bugg et al. 2011, Hatakka 2005, Dashtban et al. 2010, Wong 2009, Correia et al. 2011).



Esquema 3. Atividade da enzima manganês peroxidase. Fonte: adaptado de Cameron (2000).

Além da degradação de lignina e demais materiais orgânicos para ciclagem de nutrientes, outro fator de relevância ecológica é a simbiose, onde a associação dos fungos com organismos vivos permite tanto a obtenção de nutrientes quanto a disponibilização de substâncias indispensáveis ao crescimento e sobrevivência entre as espécies que participam dessa relação mutualística. As micorrizas são exemplos bem conhecidos de associações simbiontes entre raízes de plantas e fungos, incluindo diversos basidiomicetos. Estima-se que cerca de 80% das espécies de plantas possuam algum tipo de relação simbionte com fungos (Gadd 2007), sendo as endomicorrizas e as ectomicorrizas duas das categorias mais comuns.

A primeira refere-se aos casos em que há desenvolvimento do micélio no interior das raízes, de modo que as hifas ficam não apenas ao redor, mas também no interior das células de estruturas primárias – mais especificamente, córtex e epitélio. As ectomicorrizas, por outro lado, correspondem à colonização apenas ao redor das raízes e entre as células corticais, formando o que é chamado de rede de Hartig para auxiliar na transferência de nutrientes e água (Gadd et al. 2007, Gadd 2007). A relevância ecológica das micorrizas é atribuída principalmente ao fornecimento de fontes de carbono aos fungos - em geral, açúcares na forma de hexoxes e vitaminas. Estes, por sua vez, favorecem a manutenção de umidade para absorção de água pela raiz e disponibilizam ou translocam elementos essenciais como enxofre, nitrogênio e fósforo, desempenhando um papel fundamental, em especial, quando há falta de nutrientes no solo; quando estes predominam em formas insolúveis e também quando possuem baixa mobilidade (Carlile et al. 2001).

Dada a sua capacidade de desenvolver mecanismos de defesa e/ou adaptação a poluentes tóxicos, os fungos têm sido estudados também quanto à viabilidade de promoverem a recuperação de ambientes contaminados, retirando do solo alguns agentes tóxicos para plantas e animais ou transformando-os em compostos menos nocivos (Meharg 2003, Bishnoi & Garima 2005, Bending et al. 2002, Gaur & Adholeya 2004). Os basidiomicetos, neste caso, são comumente adotados em estudos nessa área, uma vez que a ação enzimática que promove a degradação da lignina é inespecífica, atuando também sobre alguns poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; compostos orgânicos clorados, pesticidas, aromáticos nitrogenados e bifenilas policloradas (Gadd 2007, Harvey & Thurston 2001).

Os basidiomicetos têm, ainda, mecanismos para transformar metais em formas mais inertes com menor toxicidade, por exemplo, por biossorção; bioacumulação intracelular e produção de compostos extracelulares para complexar ou precipitar os metais ou de enzimas para alterar a especiação dos mesmos (Gadd 2007, Meharg 2003). De forma complementar,

com esses mecanismos de degradação e transformação de poluentes, alguns fungos micorrízeos podem proteger e auxiliar na sobrevivência das plantas às quais estão associados em alguns ambientes contaminados (Meharg 2003, Gadd 2007, Leyval et al. 1997). Portanto, as relações simbiontes poderiam também favorecer direta ou indiretamente processos de fitoremediação, devido à contribuição para o desenvolvimento de plantas capazes de imobilizar ou retirar os contaminantes tóxicos do solo (Gadd 2007).

1.2 Bioluminescência em fungos

1.2.1 Histórico

A bioluminescência (BL) é um fenômeno observado desde os tempos mais antigos por filósofos e cientistas. Os primeiros relatos científicos envolvendo a BL em microrganismos foram documentados por Aristóteles (384-322 a.C.) e Plínio, o Velho (23-79). Ambos, já nesta época, associavam a luz ao possível desenvolvimento de bactérias e fungos bioluminescentes sobre a matéria orgânica vegetal ou animal em decomposição. Entretanto, a teoria mais difundida nesta época ainda era centrada na emissão da luz como consequência do processo de decomposição em si, ignorando os microrganismos decompositores como fonte causadora do fenômeno observado.

Somente no século XIX, por meio de observações publicadas por Derschau (um diretor de minas em Bochum, na Alemanha), foi retomada a associação da BL, até então atribuída à matéria morta, aos microrganismos (neste caso, fungos). Evidências científicas mais concretas acerca dessa associação foram publicadas 30 anos depois, em 1853, pelo então professor da Universidade de Viena, J. F. Heller (1813-1871), que provou por técnicas de microscopia que a luz observada era, de fato, resultante do desenvolvimento do micélio dos fungos sobre a matéria em putrefação.

Apesar de algumas descrições sobre corpos de frutificação bioluminescentes terem sido

feitas por Aristóteles; Plínio, o Velho e alguns botânicos, a atenção científica estava inicialmente voltada para a emissão de luz na matéria orgânica. Nesse sentido, um dos primeiros registros sobre a observação de cogumelos bioluminescentes foi feito apenas no século XVIII pelo médico; mercante e cônsul holandês na Indonésia, G. E. Rumph (1637 – 1706). De acordo com as suas descrições, os cogumelos emitiam uma luz azulada (similar à de centopeias bioluminescentes), sendo utilizados por nativos para iluminar seus caminhos em trilhas noturnas (Harvey 1957, Desjardin et al. 2008, Shimomura 2012).

Mais recentemente, grande parte dos estudos envolvendo os fungos bioluminescentes envolve as áreas de taxonomia, ecologia, bioquímica e ecotoxicologia. Estes são coincidentes com os objetivos do nosso grupo, que estão voltados principalmente à: (i) identificação de novas espécies ainda não catalogadas, (ii) determinação das funções ecológicas da BL fúngica, (iii) elucidação das estruturas químicas das moléculas envolvidas na reação bioluminescente e do seu mecanismo detalhado, (iv) avaliação dos efeitos de condições de cultura sobre a intensidade e perfil de emissão de luz, e (v) determinação da fungitoxicidade de alguns compostos químicos (Desjardin et al. 2005, Desjardin et al. 2007, Mendes et al. 2008, Desjardin et al. 2008, Oliveira & Stevani 2009, Mendes et al. 2010, Desjardin et al. 2010, Mendes & Stevani 2010, Capelari et al. 2011, Oliveira et al. 2012, Stevani et al. 2013, Oliveira et al. 2013, Ventura et al. 2015).

1.2.2 Distribuição de espécies

Estima-se que existam, no mínimo, 1,5 milhões de espécies de fungos no mundo, dentre as quais apenas cerca de 100 mil foram identificadas e descritas até o momento. De um total aproximado de 32 mil espécies catalogadas de basidiomicetos, apenas 77 foram reconhecidas como bioluminescentes, sendo distribuídas em quatro linhagens evolutivas distintas, porém com possível origem em comum, dentro da ordem Agaricales (ordem de fungos formadores

de cogumelos): 58 micenóides; 5 Armillaria, 12 Omphalotus e 2 Lucentipes (Oliveira et al. 2012, Hawksworth 2012, Kirk et al. 2008, Stevani et al. 2013, Chew et al. 2014).

Os fungos bioluminescentes são encontrados preferencialmente em habitats de clima tropical ou temperado ao redor do mundo (Figura 2). Nestes ambientes, as condições de temperatura amenas, entre 20ºC e 30ºC, e a umidade elevada favorecem o crescimento e o desenvolvimento desses organismos. Considerando que as espécies são basidiomicetos de podridão branca, outro fator fundamental para a sua manutenção no ambiente é a disponibilidade de materiais lignocelulósicos no solo, que serão decompostos e utilizados como fonte de alimento (Oliveira et al. 2013).

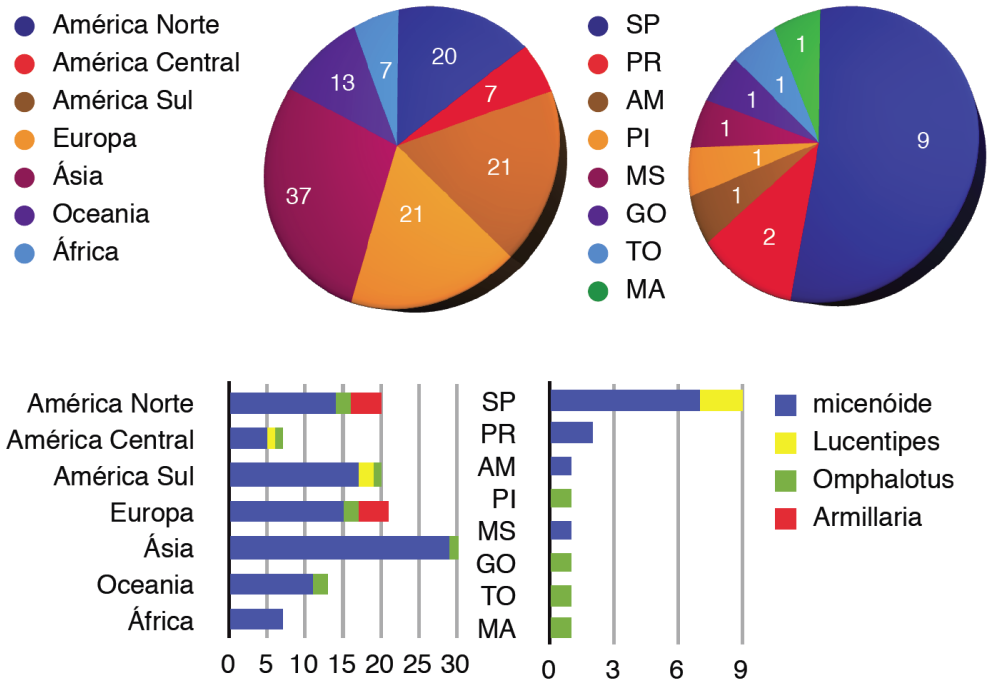


Figura 2. Distribuição das espécies de fungos bioluminescentes encontrados no Brasil e ao redor do mundo. Fonte: Oliveira et al. 2013.

No Brasil foram encontradas 12 espécies de fungos bioluminescentes, identificadas entre 2002 e 2010 com participação direta ou indireta do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Cassius V. Stevani. Grande parte dessas espécies (Figura 3) foram localizadas no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR, no município de Iporanga – SP), mas tais organismos

estão também distribuídos ao longo de diversos estados brasileiros (Figura 2).

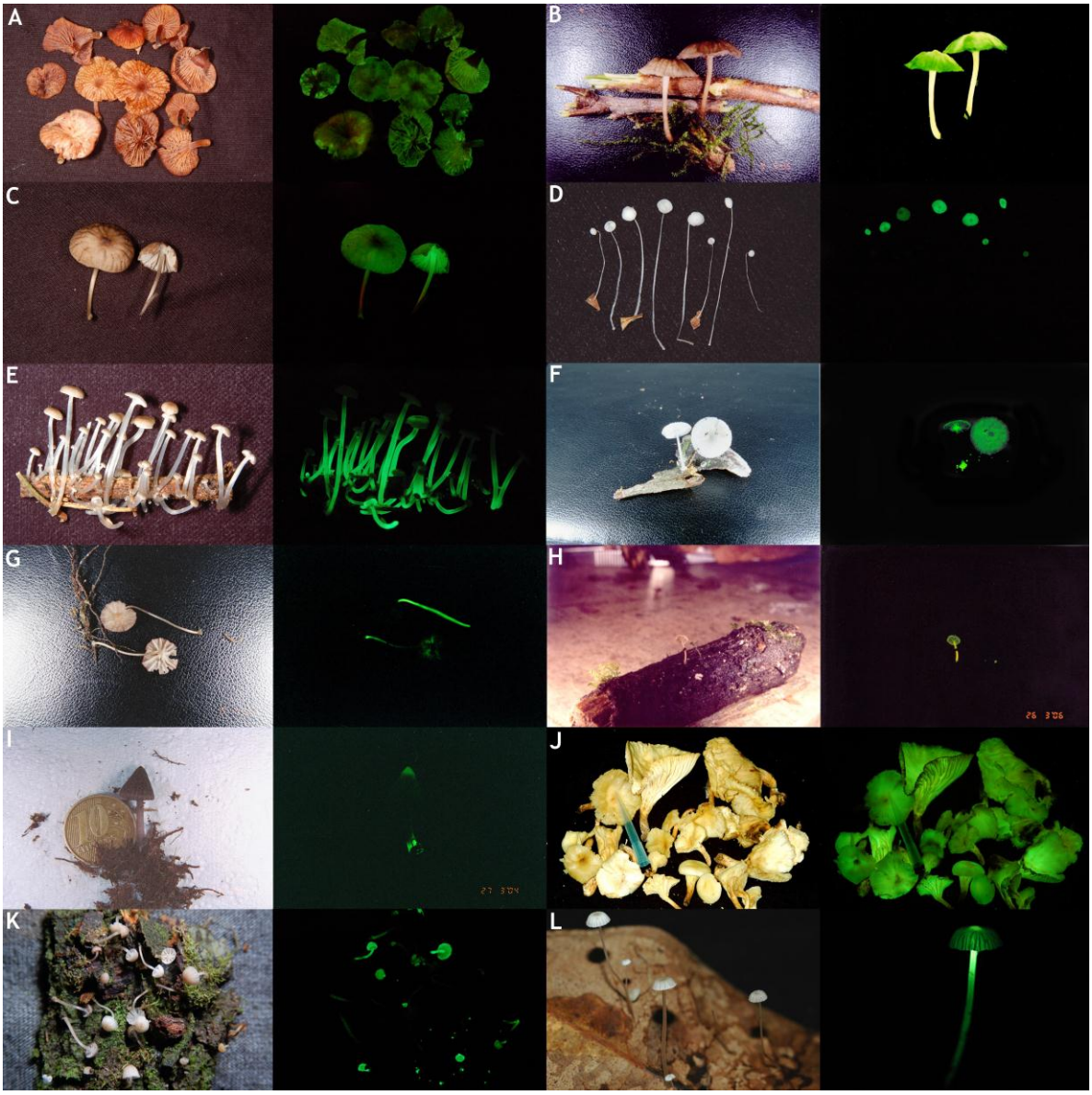


Figura 3. As doze espécies de fungos bioluminescentes encontradas no Brasil (A-L), durante os treze anos (2002-2015) de trabalho do grupo. A: *Gerronema viridilucens*, B: *Mycena lucentipes*, C: *Mycena fera*, D: *Mycena asterina*, E: *Mycena luxaeterna*, F: *Mycena discobasis*, G: *Mycena singeri*, H: *Mycena abieticola*, I: *Mycena globulispora*, J: *Neonothopanus gardneri*, K: *Mycena luxarboricola* e L: *Mycena lacrimans*. Fonte: Oliveira et al. (2013).

1.2.3 Mecanismo de bioluminescência

A BL é caracterizada pela emissão natural de luz visível e fria produzida por organismos vivos, tendo sido observada ao redor do mundo em uma ampla variedade de espécies, tanto

terrestres quanto aquáticas, mas principalmente marinhas. Em fungos, a luz é emitida de forma ininterrupta tanto no micélio quanto no cogumelo, com máximo de emissão entre 520 e 530 nm - região verde do espectro eletromagnético (Oliveira et al. 2013, Desjardin et al. 2008). De forma similar ao que ocorre com outros organismos, a BL ocorre em decorrência de uma reação bioquímica catalisada por enzimas, onde o oxigênio molecular reage com o substrato. Como resultado final, há a formação de um composto emissor no estado excitado que, ao retornar ao estado fundamental, emite luz. A estrutura molecular do substrato varia entre os organismos bioluminescentes, mas recebe o nome genérico de luciferina. O mesmo ocorre em relação à enzima, que é comumente denominada luciferase (Wilson & Hastings 1998).

Em fungos, tanto a estrutura molecular das enzimas e do substrato quanto o mecanismo detalhado envolvido na reação de BL ainda são objeto de estudo e não estão totalmente elucidados. Uma das primeiras propostas para desvendar o mecanismo de reação envolvido na BL fúngica foi feita na década de 60 por Airth e Foerster, que conduziram experimentos utilizando extratos quentes e frios dos micélios de duas espécies de fungos bioluminescentes. Ao misturar o extrato frio de uma espécie com os componentes do extrato quente da outra espécie na presença de NADH ou NADPH, foi observada a emissão de luz. Os resultados sugeriram que no extrato quente havia luciferina, enquanto que o extrato frio continha duas enzimas: luciferase, contida no precipitado separado por centrifugação, e uma redutase, solúvel no sobrenadante. Os autores propuseram, então, que a reação de bioluminescência seria enzimática, ocorrendo em duas etapas distintas (Figura 4), e que tanto o substrato quanto as enzimas eram similares em ambas as espécies (Airth & Foerster 1962).

Alguns autores não conseguiram reproduzir os resultados de Airth e Foerster, possivelmente devido à alta instabilidade da luciferina nos extratos, degradação das enzimas nos processos de purificação e identificação da sua estrutura molecular, baixa concentração de

enzimas e/ou substrato e, devido à possível emissão fraca de luz, necessidade de equipamentos mais sensíveis - indisponíveis na época em os experimentos foram conduzidos (Nakamura et al. 1988, Shimomura et al. 1993). Nesse contexto, foram sugeridos mecanismos não enzimáticos para explicar a BL em fungos, mantendo a incerteza sobre o envolvimento ou não de enzimas na emissão de luz até 2009, quando a natureza enzimática da BL fúngica foi confirmada por Oliveira e Stevani, que conseguiram reproduzir os experimentos de Airth e Foerster, observando a emissão de luz com o mesmo perfil e características encontradas naturalmente nos fungos bioluminescentes (Oliveira & Stevani 2009).

$$L + NAD(P)H + H^+ \xrightarrow[(redutase)]{\text{enzima solúvel}} LH_2 + NAD(P)^+$$

$$LH_2 + O_2 \xrightarrow[(luciferase)]{\text{enzima insolúvel}} LO + H_2O + h\nu$$

Figura 4. Proposta de Airth e Foerster para o mecanismo de bioluminescência em fungos. L: luciferina, LH_2: luciferina reduzida, LO: oxiluciferina. Fonte: Oliveira et al. 2013.

Adotando o mecanismo enzimático, portanto, a BL ocorre em decorrência da redução de uma luciferina na presença de NADH ou NADPH em uma reação catalisada por uma enzima solúvel (redutase). A luciferina reduzida reage, então, com oxigênio molecular em um processo catalisado pela luciferase, provavelmente uma enzima associada à membrana, uma vez que a mesma é insolúvel (Figura 4). Este processo resulta, por fim, na produção de oxiluciferina e na emissão de luz (Airth & Foerster 1962, Oliveira & Stevani 2009).

Posteriormente, Oliveira et al. (2012) evidenciaram que há emissão de luz quando os extratos frios e quentes de fungos pertencentes a cada uma das quatro linhagens evolutivas são combinados de todas as formas possíveis, sugerindo que todas as linhagens compartilham os mesmos substratos; enzimas e mecanismos na reação de BL. Os resultados indicaram, com isso, que a bioluminescência teve possivelmente uma única origem entre os fungos

pertencentes à ordem Agaricales, e que esta provavelmente foi perdida; inativa ou não reconhecida ao longo da evolução fúngica.

1.2.4 Possíveis funções da bioluminescência para os fungos

Os organismos bioluminescentes utilizam a emissão de luz para diferentes propósitos, de acordo com as suas características específicas e habitats. Funções usuais incluem mecanismos de defesa, comunicação, propagação e predação. Quando relacionada à defesa, a emissão de luz é utilizada para assustar ou confundir os predadores, emitir sinais aposemáticos (indicando perigo, a fim de que o predador evite a presa) ou como forma de camuflagem. Na comunicação, a BL é destinada à reprodução e ao reconhecimento entre espécies. Para a propagação, a luz é utilizada na atração de predadores nos quais as espécies bioluminescentes se desenvolvem - essa função é desempenhada em organismos como as bactérias, que crescem dentro de peixes e são eliminadas nas fezes dos mesmos, sendo propagadas novamente em outros peixes, de forma cíclica. Por sua vez, a BL associada à ação predatória, visando à obtenção de alimentos, é empregada tanto para o aumento da visibilidade em habitats escuros quanto para atrair as presas ou assustar predadores (Wilson & Hastings 2013).

Embora o papel da BL seja amplamente estudado e conhecido em algumas espécies, as funções associadas à emissão de luz por fungos ainda não foram totalmente elucidadas. Algumas das principais hipóteses para explicar o papel da BL nesses organismos foram apresentadas e discutidas por Sivinski (1981), ao investigar a atração de insetos pelos fungos bioluminescentes. Para tal propósito, o autor utilizou armadilhas construídas a partir de frascos fechados e cobertos por um material pegajoso, que continham em seu interior micélio e corpos de frutificação tanto bioluminescentes (frascos de teste) quanto não-bioluminescentes (controle). As armadilhas foram deixadas, durante a noite, em locais onde já

havia o crescimento natural dos fungos. Os resultados indicaram que mais artrópodes foram encontrados nos frascos de teste do que nos controles, levando às seguintes possibilidades de explicação para as funções da BL fúngica:

a. Dispersão de esporos: insetos dispersores de esporos seriam atraídos pela luz emitida, de modo semelhante ao que ocorre na atração de algumas espécies por odores e cores. Essa possibilidade, no entanto, não explicaria satisfatoriamente a emissão de luz pelo micélio, a não ser que este se mantenha inalterado após o seu consumo e excreção, ou que seja carregado para novos locais pelo contato externo com o exoesqueleto dos insetos. Além disso, conforme argumentado por Desjardin et al. (2008), a dispersão natural pelo vento dos milhões de esporos produzidos por espécies bioluminescentes e não-bioluminescentes mantém desconhecida a real vantagem evolutiva da BL neste quesito, exceto em regiões com pouca circulação de ar.

b. Predação de fungívoros - os fungos poderiam ser favorecidos caso os predadores dos fungívoros fossem atraídos pela luz em maiores proporções. Entretanto, existe a possibilidade dos fungos serem confundidos com as presas e consumidos no lugar destas.

c. Atração de fungívoros – no caso dos fungos serem impalatáveis ou difíceis de digerir, os fungívoros poderiam consumir, alternativamente, competidores adjacentes. Entretanto, a hipótese não se refere às espécies bioluminescentes mais facilmente digeridas pelos insetos.

d. Atração de fertilizadores - a atração de alguns insetos pela luz poderia fazer com que estes liberassem substâncias benéficas, que ajudariam no crescimento fúngico. No entanto, a BL também poderia atrair predadores.

e. Repulsão de fungívoros fotofóbicos - embora essa função possa explicar a BL em micélios crescendo em locais com pouca luminosidade (por exemplo, dentro de troncos podres e sob camadas de folhas mortas), não há evidências de que existam artrópodes fotofóbicos não subterrâneos - complementarmente, a ideia de repulsão é menos provável do

que a de atração nos casos onde a luz é emitida ininterruptamente (Herring 1994). Esses dois últimos fatores seriam desvantajosos também quando fosse considerada a função da BL como sinal de advertência para fungívoros de hábitos noturnos. Ainda assim, ambas as possibilidades não poderiam ser excluídas totalmente, uma vez que: (i) não foram estudadas as atrações ou repulsões de outros organismos que não fossem insetos; (ii) as armadilhas podem ser ineficientes para prender animais maiores, caso estes influenciem no resultado; e (iii) as mesmas não foram instaladas em locais mais escuros, onde tanto o micélio quanto seus fungívoros poderiam ser encontrados (Sivinski 1981).

Um trabalho publicado mais recentemente evidencia a existência de um ritmo circadiano na BL fúngica, associado a uma atração significativa de insetos. Neste caso, culturas do fungo *N. gardneri* foram submetidas durante 48 horas a um ciclo escuro/claro de 12h/12h, sendo mantidas no escuro ao longo do restante do período de incubação. Como resultado, foi identificada uma emissão crescente de luz na fase correspondente ao escuro e um decrescimento durante a fase sob iluminação, confirmando um ritmo circadiano que se manteve mesmo em diferentes temperaturas de incubação. Da mesma forma, as atividades das enzimas luciferase e redutase, assim como a concentração de luciferina, oscilaram de modo compatível com o ciclo circadiano observado na emissão de luz (Oliveira et al. 2015).

Paralelamente neste mesmo estudo, foram preparadas armadilhas para insetos, que consistiram em cogumelos de resina acrílica cobertos por cola inodora e iluminados com luzes LED verdes, a fim de simular a BL fúngica. Como controles, foram utilizadas as mesmas armadilhas, mas com as luzes LED apagadas. De modo similar ao encontrado por Sivinski (1981), em comparação com os controles, foi identificada uma atração maior de insetos nas armadilhas com as luzes ligadas. Todos os organismos atraídos, por sua vez, pertenciam a ordens taxonômicas capazes de enxergar a luz verde, no comprimento de onda da BL (Oliveira et al. 2015).

Com isso, os autores consideram que a luz emitida pelos fungos possuiria uma função de auxiliar na dispersão de esporos pela atração de insetos. Conforme já mencionado anteriormente, estes seriam capazes de propagar os esporos pela aderência externa ao exoesqueleto ou pela excreção dos mesmos, inalterados, após o consumo dos fungos como alimento. Neste caso, a luz menos intensa da espécie *N. gardneri* durante o ciclo diurno foi apontada como um mecanismo do fungo para que haja menor gasto energético durante o dia, quando a BL não é notavelmente percebida pelos insetos. De noite, entretanto, a luz se torna mais intensa para favorecer uma maior atração de organismos dispersores dos esporos. A hipótese levantada pelos autores foi reforçada levando em consideração que o vento pode apresentar um fluxo mais restrito nos habitats de florestas estratificadas e fechadas onde os fungos são encontrados, permanecendo mais próximo do solo e dificultando a dispersão dos esporos. Com isso, a propagação adicional pelos insetos representaria uma vantagem biológica para a colonização dos fungos em novos substratos. Além disso, outro fator que corrobora com a hipótese levantada pelos autores é que a dispersão de esporos nos habitats supracitados é mais intensa durante a noite ou primeiras horas da manhã, quando tanto a umidade do ambiente quanto a germinação de esporos é maior (Oliveira et al. 2015).

Além das hipóteses relacionadas à interação com outros organismos, que são atraídos ou repelidos pela luz, outras possibilidades incluem a BL como um processo bioquímico para auxiliar na defesa contra agentes nocivos. Uma dessas hipóteses indica que a BL estaria relacionada à decomposição da lignina, levando em consideração que todas as espécies bioluminescentes são basidiomicetos. A emissão de luz, neste caso, teria a função de auxiliar no controle de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o processo de degradação extracelular (Bermudes et al. 1992, Lingle 1989, Desjardin et al. 2008). Outra possibilidade viável indica que a BL tenha surgido como um mecanismo de proteção contra EROs produzidas principalmente em decorrência da respiração nas mitocôndrias – nesse

sentido, a BL poderia ter surgido a partir de um mecanismo ancestral de desintoxicação, voltado especificamente ao consumo de oxigênio (Oliveira et al. 2013, Desjardin et al. 2008).

Uma última hipótese afirma que a BL não teria função para os fungos, sendo meramente o resultado da formação incidental de um subproduto de uma reação enzimática de oxidação, na qual a energia seria liberada na forma de luz visível ao invés de calor. No entanto, a observação de luz em intensidade maior nas lamelas e esporos em algumas espécies; a constatação de que a BL é emitida mais ou menos intensamente de acordo com o período do dia (em ciclos) e as hipóteses relacionadas aos mecanismos de defesa contra espécies reativas e nocivas indicam o contrário. Assim, a hipótese que exclui uma função ecológica ou biológica para o fenômeno de emissão de luz é considerada como a menos provável no estudo com fungos (Sivinski 1998, Herring 1994, Weitz 2004, Oliveira et al. 2015).

1.3 Fatores que afetam o crescimento e a emissão de luz

1.3.1 Nutrientes básicos

Os fungos necessitam de uma série de condições para sobreviver e crescer em determinados ambientes ou meios de cultura. Os requisitos mínimos para manter o seu sustento incluem o fornecimento de nutrientes orgânicos e minerais, que consistem em fontes carbono (utilizadas na síntese celular e obtenção de energia) e elementos essenciais como nitrogênio; fósforo e ferro, entre outros (Tabela 1), com funções diversas na manutenção da homeostase (Deacon 2006).

Os nutrientes são absorvidos do ambiente pelas paredes celulares e membranas plasmáticas dos fungos, por meio de mecanismos de transporte variados – entre eles, difusão simples e facilitada e transporte ativo. Como as estruturas celulares não permitem a passagem de moléculas mais complexas (polímeros, por exemplo), diferentes enzimas extracelulares são produzidas e secretadas para promover a transformação desses compostos em formas mais

simples, que poderão ser mais facilmente absorvidas e utilizadas como fonte de alimento - este é o caso da degradação da lignina, já abordado anteriormente. Assim, as principais fontes de carbono são constituídas por monossacarídeos (em especial, glicose) e dissacarídeos (Deacon 2006, Walker & White, 2005). De forma compatível, Bermudes et al. (1990) identificaram alguns desses açúcares como principais fontes de carbono para o crescimento e BL do fungo *Panellus stipticus* em meios de cultura, associando os nutrientes considerados como ótimos com a sua presença natural no habitat da espécie, em ambientes onde há decomposição de madeira.

Tabela 1. Nutrientes e suas principais funções para os fungos.

Elemento	**Funções**
Hidrogênio	Promove o gradiente eletroquímico de prótons, utilizado na conversão de ADP em ATP para fornecimento de energia por vias metabólicas. Ajuda a manter a acidez intracelular (pH cerca de 5-6), necessária para o metabolismo fúngico.
Oxigênio	Substrato para enzimas oxidativas e/ou envolvidas na respiração celular. Essencial para a síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol, que compõe as membranas celulares.
Fósforo	Participação na transdução energética. É também um elemento presente na estrutura das membranas e em ácidos nucleicos.
Potássio	Atua como cofator enzimático e contribui para balanço iônico (osmoregulação).
Magnésio	Atua como cofator enzimático. Estrutura de células e organelas.
Enxofre	Composição de vitaminas e aminoácidos sulfurados.
Cálcio	Mensageiro secundário em processos de transdução de sinal.
Cobre	Atua como cofator enzimático.
Ferro	Composição de proteínas contendo grupo heme e citocromos.
Manganês	Atua como cofator enzimático.
Zinco	Atua como cofator enzimático.
Níquel	Atua como cofator da enzima uréase.
Molibdênio	Composição da vitamina B12 e contribuição como cofator da enzima nitrato redutase no metabolismo do nitrato.

Fonte: Traduzido e adaptado de Walker & White (2005).

Entre os nutrientes minerais, o nitrogênio é um dos principais elementos para os fungos,

desempenhando um papel limitante no seu crescimento e síntese de enzimas e componentes estruturais celulares (tal como proteínas e ácidos nucléicos). Os fungos não são organismos diazotróficos - ou seja, não promovem a fixação de nitrogênio - e, portanto, obtêm esse nutriente de compostos inorgânicos (como nitratos e sais de amônio) ou orgânicos - por exemplo, aminoácidos, proteínas nitrogenadas e moléculas contendo aminas e amidas (Deacon 2006, Walker & White 2005, Carlile et al. 2001).

Um dos processos mais usuais para a assimilação do nitrogênio pelos fungos ocorre a partir de íons amônio, utilizados na síntese do aminoácido glutamato por via enzimática. Este, por sua vez, é transformado em outro aminoácido (glutamina) em uma reação também mediada por enzimas. A partir daí, vários outros aminoácidos podem ser produzidos por reações de transaminação. Os nitratos são utilizados alternativamente por alguns fungos como fonte de nitrogênio, sendo reduzidos enzimaticamente a amônio (Deacon 2006, Walker & White 2005, Carlile et al. 2001).

1.3.2 Condições ambientais: temperatura, pH e umidade

Assim como devem ser fornecidos alguns nutrientes fundamentais para o desenvolvimento dos fungos, certas condições ambientais são necessárias para favorecer o crescimento e a sobrevivência destes organismos. Alguns dos principais fatores neste quesito são temperatura, pH (do solo ou meios de cultura) e umidade.

As temperaturas nas quais os fungos se desenvolvem são muito variadas, de acordo com as características de cada espécie e das demais condições do meio. Entretanto, a maioria das espécies é classificada como mesofílica devido ao seu desenvolvimento em temperaturas mais moderadas, geralmente de 10-35ºC, com uma faixa ótima em torno de 15-30ºC. Ainda assim, alguns fungos podem também apresentar termo ou psicrotolerância - ou seja, o crescimento ocorre tanto em temperatura ambiente quanto em temperaturas mais extremas,

respectivamente maiores e menores (Smith 1988, Walker & White, 2005).

A predominância dos fungos mesofílicos deve-se a dois principais fatores: (i) em temperaturas muito baixas, o metabolismo torna-se mais lento, desfavorecendo as reações bioquímicas que promovem o desenvolvimento fúngico – adicionalmente, a membrana citoplasmática se torna rígida a ponto de não permitir mais a absorção de nutrientes, e os seus processos de transporte tornam-se lentos; e (ii) temperaturas muito altas usualmente se distanciam da condição ótima de ação das enzimas, que podem sofrer desnaturação – consequentemente, as reações bioquímicas envolvidas na sobrevivência e crescimento dos fungos também são negativamente afetadas. Além disso, as altas temperaturas podem causar danos às membranas das células, entre outras estruturas celulares (Smith 1988, Walker & White 2005, Madan & Thind 1998).

Embora existam espécies capazes de sobreviver em uma faixa ampla de pH e, em alguns casos, em ambientes com maior acidez ou alcalinidade, os fungos crescem preferencialmente em meios neutros ou ligeiramente ácidos (pH 4-6). Alterações mais bruscas no potencial hidrogeniônico do meio podem exercer uma grande influência principalmente sobre: (i) o transporte de nutrientes pelas membranas celulares dos fungos, devido à alteração na permeabilidade das mesmas; (ii) a especiação de nutrientes; e (iii) o funcionamento de enzimas, que possuem valores ótimos de pH para catalisar reações (Madan & Thind 1998). Com isso, a alteração desses fatores em decorrência do pH afetaria tanto as reações bioquímicas promovidas pelos fungos para crescimento e sobrevivência quanto a disponibilidade dos nutrientes essenciais.

A umidade no ambiente normalmente favorece o crescimento fúngico, além de influenciar outros fatores como a formação e germinação de esporos e morfologia. Assim, no cultivo em laboratório, a umidade é controlada em câmaras climáticas e adicionalmente fornecida pela água na composição dos meios de cultura, que evapora progressivamente ao longo do tempo

de incubação dos fungos cultivados (Carlile et al. 2001, Madan & Thind 1998).

Níveis adequados de umidade no ambiente são essenciais à sobrevivência destes organismos, uma vez que as células possuem água em seu citoplasma e demais estruturas internas. Esta atua como solvente de solutos diversos e participa da troca de nutrientes com o ambiente externo. Em ambientes com baixa umidade relativa; substratos muito secos e/ou com concentrações muito elevadas de solutos, a água tende a sair das células para compensar o desiquilíbrio com o ambiente externo, até que fiquem desidratadas e morram. Na situação oposta, em situações onde há excesso de água para determinada espécie e/ou menor concentração de solutos no ambiente externo, as paredes e membranas celulares podem sofrer rupturas devido ao aumento do volume de água absorvida por osmose. Para compensar as variações naturais de umidade no seu habitat, os fungos desenvolveram alguns mecanismos a fim de evitar a perda ou ganho excessivo de água na troca com o ambiente - um exemplo é a liberação de solutos intra ou extracelulares, dependendo da necessidade. Desta forma, embora não seja possível compensar totalmente situações mais extremas ou prolongadas de excesso ou falta de umidade, as variações de umidade naturalmente esperadas no ambiente não impediriam a sobrevivência dos organismos (Carlile et al. 2001, Madan & Thind 1998).

1.3.3 Curvas de crescimento em meios de cultura

Uma vez fornecidos os nutrientes e as condições ambientais mínimas para o desenvolvimento fúngico, existem diversos parâmetros para medir a dimensão do seu crescimento em meios de cultura – entre eles, por exemplo, massa; diâmetro do micélio e atividade metabólica. Independentemente do parâmetro adotado, é esperado que os fungos se desenvolvam dentro de um padrão estabelecido em curvas de crescimento, que possuem quatro principais fases: indução (lag), exponencial, estacionária e morte (Figura 5).

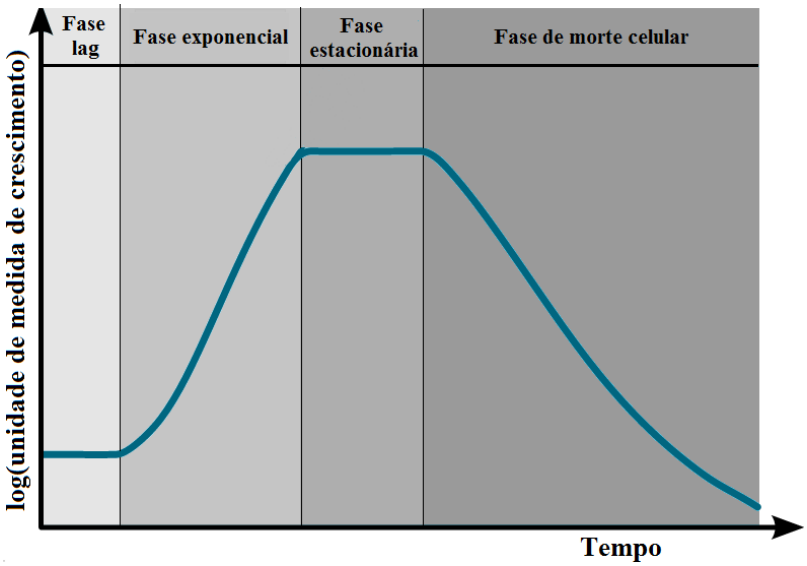


Figura 5. Curva de crescimento para microorganismos, como fungos.

A fase de indução corresponde à etapa inicial da curva, sendo caracterizada pelo período de tempo em que o fungo se adapta ao ambiente e sintetiza novos compostos para promover seu desenvolvimento (e.g., enzimas e ribossomos), sem que haja crescimento populacional. A fase exponencial, por sua vez, é o período em que ocorre o metabolismo primário, relacionado ao fornecimento de energia e biossíntese de precursores químicos indispensáveis ao crescimento e reprodução (e.g., aminoácidos, vitaminas e ácidos orgânicos). Consequentemente, a taxa de crescimento nesta fase é máxima e aumenta em escala logarítmica (Walker & White 2005).

À medida que ocorre o envelhecimento e os nutrientes no meio se tornam mais escassos ou, alternativamente, quando o organismo está exposto a condições menos favoráveis ao seu crescimento (por exemplo, alterações na temperatura ou contato com metabólicos tóxicos e/ou produtos de excreção, que podem também alterar o pH do meio), o fungo entra na fase estacionária e o seu crescimento exponencial é interrompido. Nesta etapa, a taxa de crescimento é nula, devido ao equilíbrio entre as células que morrem e as que são formadas por divisão celular. A fase estacionária corresponde ao processo de sobrevivência do organismo por períodos prolongados e à manutenção de sua atividade celular, sem interrupção

de seu metabolismo energético e da biossíntese de moléculas. Nesta etapa de restrição de crescimento, os fungos podem sintetizar, a partir dos metabólitos primários, diversos compostos que não contribuem para o crescimento, mas que podem auxiliar na manutenção do estado estacionário – e.g., pigmentos como a melanina, que protegem os fungos em situações de estresse ambiental (Walker & White 2005, Madigan et al. 2010, Kulkarni 2002). Por fim, a fase de morte celular ocorre quando os nutrientes se esgotam e/ou metabólitos tóxicos excretados pelo próprio fungo tornam-se mais concentrados no meio de cultura, a ponto de não favorecer a sua sobrevivência ou o crescimento de novas células em quantidades superiores ou iguais às das células morrendo (Walker & White 2005).

Uma relação entre crescimento e emissão de luz foi encontrada em alguns estudos com fungos bioluminescentes, que mostraram um aumento significativo da BL durante a fase exponencial de crescimento e um decréscimo da mesma depois de atingida a fase estacionária. Além disso, valores menores de emissão de luz foram encontrados em associação com menor crescimento das culturas. Deste modo, foi sugerido que a BL em fungos seja constitutiva durante o crescimento, ou seja, é essencial ao desenvolvimento do organismo e pode estar relacionada à sua atividade metabólica, indicando também que, enquanto houver crescimento celular, a emissão de luz poderia ser correlacionada com a curva de crescimento, dada em termos de biomassa (ou diâmetro do micélio) em função do tempo (Weitz et al. 2002, Weitz et al. 2001, Mendes et al. 2008).

1.4 Agentes químicos e suas interações com os fungos: metais e fenóis

Os fungos estão em contato direto com uma grande variedade de agentes químicos no ambiente em que se desenvolvem. Estes compostos são provenientes de fontes naturais, resultantes de processos como intemperismo e lixiviação, ou de fontes antropogênicas - quando emitidos por interferência humana em atividades industriais, agrícolas e urbanas, por

exemplo (Gadd 2007). Com o desenvolvimento tecnológico e o aumento da população e da urbanização, houve uma intensificação na emissão dos poluentes gerados por fontes antropogênicas e, consequentemente, seus impactos ambientais se tornaram mais evidentes. Tal emissão em maiores proporções tem gerado sérias consequências para os organismos nos ambientes contaminados, podendo resultar na diminuição da biodiversidade nestes locais (Fuge 2012, Lovejoy 1997). Dependendo da concentração, até mesmo compostos considerados como nutrientes podem causar danos aos organismos expostos. Além disso, a toxicidade de cada agente químico varia de acordo com as suas propriedades, a sensibilidade específica das espécies expostas e as condições ambientais (Pierzynski et al. 2005).

Os fenóis e os metais constituem dois grupos de compostos caracterizados como poluentes de grande relevância nos diferentes compartimentos ambientais, uma vez que são amplamente utilizados na fabricação de produtos com valor comercial e descartados como resíduos, alguns dos quais persistentes no ambiente (Lee et al. 2006, Hoyos-Hernandez et al. 2014, Gadd 2007). Desta forma, os metais de origem antropogênica estão presentes em uma série de materiais como pigmentos; baterias; aparelhos eletrônicos; fertilizantes; pesticidas e lodo de esgoto contaminado, e são emitidos em decorrência de processos como a queima de combustíveis fósseis e atividades industriais, de metalurgia e de mineração (Leyval et al. 1997, Gadd 2010). Os fenóis, por sua vez, estão presentes em produtos como inseticidas; herbicidas e corantes, e podem ser emitidos em função da fabricação de papel e celulose; refino de petróleo; produção de coque e síntese de resinas e polímeros, entre outras atividades (Santos & Linardi 2001, Lee et al. 2006). Entretanto, uma vez lançados no ambiente, esses compostos precisam estar em uma forma biodisponível para causar, de fato, uma ação tóxica aos organismos expostos.

O termo ‘biodisponibilidade’, neste caso, refere-se não à concentração total de um poluente no ambiente, mas à quantidade deste composto em formas que sejam efetivamente

absorvidas por um organismo vivo (ou seja, têm a capacidade de atravessar as suas paredes e membranas celulares), resultando em uma possível toxicidade em função da interação do organismo com o agente químico assimilado (Naidu et al. 2008). A biodisponibilidade, entretanto, varia de acordo com as propriedades dos compostos químicos, as características do solo ou meios de cultura e as especificidades dos organismos dentro de determinadas condições. Para melhor elucidar essa questão, alguns dos fatores relacionados a essas variações na biodisponibilidade (consequentemente, na toxicidade) serão abordados a seguir.

1.4.1 Fatores que afetam a biodisponibilidade de compostos orgânicos e metais

Para compostos orgânicos, grupo no qual os fenóis estão inseridos, a biodisponibilidade em ambientes terrestres é afetada principalmente pela sua volatilização, lixiviação, degradação, bioacumulação, transformação química ou biológica e sequestro em componentes do meio de crescimento – este inclui o aprisionamento em microporos ou matéria orgânica e a sorção, geralmente por ligações covalentes ou iônicas e interações intermoleculares (Stokes 2006, Reid et al. 2000, Semple et al. 2003, Ruggiero et al. 2002).

A biodisponibilidade dos metais, por sua vez, é influenciada principalmente pela sua especiação e mobilidade. Em geral, os metais não são degradáveis ou voláteis, como alguns dos compostos orgânicos, mas, de forma semelhante a estes, podem ser sequestrados, lixiviados, bioacumulados e transformados. Os metais podem estar presentes na forma de íons livres ou permutáveis (que apresentam maior mobilidade e, portanto, maior toxicidade e biodisponibilidade) e em ligações com outros elementos, sendo aprisionados em, por exemplo, silicatos minerais, complexos solúveis com ligantes orgânicos, compostos organometálicos e compostos insolúveis – entre eles, óxidos, carbonatos e hidróxidos (Leyval et al. 1997).

As propriedades físico-químicas dos poluentes, incluindo estrutura molecular e

especiação, polaridade, solubilidade em água, hidrofobicidade, lipofilicidade (que podem ser correlacionados com os coeficientes de partição carbono orgânico do solo/água e octanol/água), reatividade e volatilidade são determinantes para o comportamento dos agentes químicos no ambiente - desta forma, compostos apolares, menos solúveis, lipofílicos e hidrofóbicos indicam um favorecimento do sequestro e consequente persistência no habitat terrestre (Stokes et al. 2006, Megharaj et al. 2011). Dependendo da reatividade, por outro lado, alguns poluentes podem ser transformados em função de reações como oxidação, redução e fotólise. Em virtude disso, podem formar produtos intermediários e/ou finais com toxicidades maiores ou menores, dependendo da reação (Gadd 1993, Stokes 2006).

Em conjunto com as propriedades dos agentes químicos, as características dos meios onde os fungos se desenvolvem também influenciam na biodisponibilidade, que varia de acordo com alguns fatores como pH; área superficial de contato para a interação entre poluentes e fungos; capacidade de trocas iônicas (principalmente catiônicas) e composição dos meios de crescimento (Stokes et al. 2006, Megharaj et al. 2011, Gadd 1993). O pH do ambiente pode afetar a dissociação e a solubilidade (associada à mobilidade) dos compostos, influenciando também nas trocas iônicas e interações intermoleculares, responsáveis pela adsorção dos poluentes e diminuição da biodisponibilidade no meio de crescimento. Neste caso, a carga e o raio iônico são propriedades importantes: quanto maior a carga e menor o raio, mais intensa será a adsorção no ambiente terrestre, devido à maior força das interações eletrostáticas e trocas iônicas (Rieuwerts 1998).

No mesmo sentido, uma composição mais rica em matéria orgânica, à qual os compostos, especialmente os lipofílicos, interagem e são aprisionados em maior intensidade, também resultaria em uma menor biodisponibilidade (Reid et al. 2000). Para metais, a quantidade de matéria orgânica contribui ainda para a formação de complexos metálicos - este é o caso do cobre, que, além de ser retido no solo por mecanismos de troca iônica e adsorção, possui

afinidade por ligantes orgânicos solúveis e matéria húmica. Já a presença de alguns compostos inorgânicos, como óxidos de ferro ou manganês, e íons inorgânicos também podem potencializar a sorção de metais e a formação de complexos – por exemplo, o cádmio tende a formar complexos com íons cloro quando estes são abundantes em solos, diminuindo sua biodisponibilidade (Gadd 1993, Balasoiu et al. 2001, Gadd 2007).

O potencial redox do ambiente de crescimento, influenciado por sua composição (e.g., teor de oxigênio, água e minerais), é outro fator importante na decomposição e transformação de poluentes orgânicos, exercendo influência também na especiação dos metais, cujos estados de oxidação variam de acordo com reduções ou oxidações promovidas por agentes oxidantes ou redutores no ambiente. Desta forma, um mesmo elemento pode também apresentar toxicidades distintas (Gadd 1993). Já para os fenóis, a presença de agentes oxidantes, como óxidos de ferro e manganês, pode auxiliar na desintoxicação de ambientes contaminados pela sua transformação em compostos menos tóxicos ou menos biodisponíveis - por exemplo, por formação de dímeros e oligômeros (Ruggiero et al. 2002, Ruggiero 1999).

A variabilidade entre as espécies e alguns dos seus mecanismos de defesa são igualmente levados em consideração para a biodisponibilidade. A atividade das enzimas extracelulares fúngicas na transformação, mineralização e biodegradação de poluentes é uma das principais formas de alteração na biodisponibilidade de compostos orgânicos (Gadd 2004, Pointing 2001). Para metais, os mecanismos são geralmente voltados à alteração na especiação e na mobilidade desses elementos. Um exemplo disso é a produção e secreção de metabólitos, como ácidos orgânicos (e.g., ácido oxálico), provocando a lixiviação dos metais, que podem ainda ser quelados, precipitados ou sofrer reações de oxirredução pelos compostos secretados. Outra forma de interferência na biodisponibilidade são os processos de biossorção em polissacarídeos e proteínas de paredes celulares (e.g., quitina, quitosana e melanina), que promovem a imobilização dos metais. (Baldrian 2003, Gadd 2000, Meharg 2003, Hartley et

al. 1997, Gadd 1993).

Os fatores abordados nesta seção, além da disponibilidade de nutrientes para favorecer um melhor desenvolvimento fúngico, ilustram a complexidade de estudar os efeitos tóxicos de um composto a um organismo vivo. As interações entre compostos, ambiente e organismos determinarão as formas em que um agente químico estará ou não disponível para possível absorção e efeito tóxico. Desde que estejam na forma biodisponível, no entanto, os diferentes compostos em contato com os fungos podem causar danos segundo mecanismos específicos de toxicidade, conforme será abordado a seguir.

1.4.2 Mecanismos de toxicidade de metais e fenóis para fungos

Considerando a variedade das possíveis interações entre fungos e poluentes, tais compostos, quando biodisponíveis, afetam grande parte de aspectos ligados ao metabolismo, crescimento, reprodução, atividade enzimática, morfologia e diferenciação dos organismos, entre outros fatores. Desta forma, os metais podem bloquear grupos funcionais de moléculas biológicas (por exemplo, enzimas e sistemas de transporte para nutrientes e íons), deslocar e/ou substituir metais essenciais de biomoléculas e unidades celulares, comprometer a integridade das membranas de células e organelas e interagir com enzimas para provocar a sua modificação; desnaturação e inativação (Gadd 1993, Baldrian et al. 2003).

Devido à baixa especificidade de sistemas de transporte para viabilizar a absorção de metais essenciais, alguns metais não essenciais potencialmente tóxicos com características semelhantes (e.g., tamanho e carga) podem ser alternativamente transportados para o interior dos organismos. Uma vez absorvidos, tais elementos podem afetar tanto reações específicas quanto processos metabólicos como um todo, além de influenciar a produção das enzimas extracelulares, sem as quais a obtenção de nutrientes para sobrevivência se torna dificultada. Esse mecanismo pode ocorrer com o Cd^{+2}, por exemplo, que se associa rapidamente à parede

celular do basidiomiceto *Paxillus involutus* e, dependendo do potencial da membrana deste fungo, é absorvido em um processo mais lento associado ao transporte de Ca^{+2} para o interior das células (Baldrian et al. 2003, Blaudez et al. 2000).

Mecanismos indiretos de toxicidade dos metais envolvem a formação de radicais livres por meio de reações de oxirredução. Uma vez produzidos, esses radicais podem participar de reações em cadeia envolvendo a degradação de moléculas biológicas, tal como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Um dos maiores alvos, neste caso, são as membranas celulares, que sofrem danos por peroxidação lipídica. Neste processo, as cadeias alquílicas dos lipídeos são transformadas em radicais peroxialquila e hidroperóxidos de ácidos graxos pela reação com outros radicais livres presentes no meio (Gadd 1993).

Adicionalmente, alguns complexos lipossolúveis de metais de transição (ou, alternativamente, complexos e íons livres em solução aquosa), como o Fe^{+2} e o Cu^{+}, podem promover, por meio da reação de Fenton com os hidroperóxidos, a formação de radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$), acelerando o processo de peroxidação lipídica e potencializando um estresse oxidativo, que ocorre quando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) excede a capacidade de defesa antioxidante de um organismo. Reações envolvendo a redução de Cu^{+2} por EROs (e.g., radicais ânion-superóxido) também ocorrem, resultando em O_2 e Cu^{+}, utilizado novamente na reação de Fenton (Gadd 1993, Bai et al. 2003).

É conhecido que os fenóis, entre outros compostos orgânicos, podem ser degradados em decorrência da atividade fúngica, devido à produção de enzimas originalmente destinadas à decomposição de matéria orgânica no ambiente, como é o caso da lignina, que possui grupos fenólicos em sua macromolécula. Tal característica é, inclusive, amplamente empregada em processos de bioremediação, na descontaminação de ambientes poluídos. No entanto, o acúmulo de compostos fenólicos no ambiente pode interferir na atividade de enzimas e afetar a função dos fungos no solo. Exemplos disso são a inibição de hidrolases e enzimas com

grupos –SH em sua composição, ambas essenciais na decomposição da matéria orgânica e obtenção de nutrientes essenciais. O acúmulo dos fenóis, neste caso, pode ser causado pela diminuição da capacidade de degradação do fungo, que é afetada por outras enzimas, como as fenoloxidases, cujas atividades são reduzidas à medida que a temperatura; o pH e a concentração de O_2 diminuem. Alternativamente, os fenóis podem ser também acumulados quando as emissões antropogênicas excedem a capacidade de decomposição ou transformação dos poluentes em compostos menos tóxicos (Laiho 2006, Voda et al. 2003).

A capacidade de causar efeitos tóxicos na interação direta entre poluentes e organismos aumenta, em geral, com a lipofilicidade das moléculas que não foram imobilizadas no ambiente (Michalowicz & Duda 2007). Assim, os compostos lipofílicos tendem a ser absorvidos pelos fungos em maior proporção, por afinidade com as suas paredes e membranas celulares (Dambolena et al. 2012, Voda et al. 2004).

O modo de ação dos fenóis depende das formas nas quais estes se encontram no ambiente: protonada, ionizada ou oxidada. Se houver predominância de fenóis protonados, há uma maior tendência para as ligações de hidrogênio e outras interações reversíveis com grupos hidrofóbicos em biomoléculas - por exemplo, grupos químicos de proteínas, cadeias alifáticas ou aromáticas em aminoácidos e cadeias alquílicas em ácidos graxos. Já na forma ionizada, ligações iônicas reversíveis são geralmente formadas devido à atração eletrostática por regiões com cargas positivas em outras moléculas. Ainda na forma ionizada, a oxidação dos fenóis pode ser favorecida pela alta reatividade dos íons fenolato (Appel 1993).

A oxidação fenólica constitui um dos principais mecanismos pelos quais os poluentes fenólicos são transformados no ambiente e interagem com as biomoléculas para causar danos aos organismos (Appel 1993). Assim, este processo pode ocorrer por via química (e.g., em reações com peróxido de hidrogênio ou ferro) ou enzimática - neste caso, por exemplo, com a participação de fenoloxidases e peroxidases produzidas pelos fungos. O resultado da

oxidação, no entanto, pode levar à origem de radicais fenoxila e metabólitos intermediários (e.g., semiquinonas) que, nesta forma, interagem com as biomoléculas nas células. Nestas reações, há uma consequente produção de peróxido de hidrogênio ou radical-ânion superóxido e radical hidroxila, contribuindo para a peroxidação lipídica, danos às estruturas celulares e inativação de enzimas (Michalowicz & Duda 2007, Appel 1993, Xu 1996). Na forma oxidada ou protonada, podem ainda ocorrer ligações covalentes irreversíveis com biomoléculas, originadas a partir de processos enzimáticos e não enzimáticos (Appel 1993).

Portanto, a reatividade dos fenóis com biomoléculas é também um fator determinante para os efeitos tóxicos causados aos fungos, e está relacionada com as propriedades do ambiente de crescimento - pH, potencial de redução, teor de enzimas extracelulares e presença de agentes redutantes ou oxidantes não enzimáticos - e a facilidade de doação de elétrons pelos fenóis que, por sua vez, é influenciada pela estrutura da molécula (Michalowicz & Duda 2007, Appel 1993).

As principais consequências dos danos às membranas celulares, tanto por metais quanto por compostos orgânicos, são a sua despolarização e o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial. A primeira afeta o potencial eletroquímico das células e, portanto, interfere na absorção de nutrientes essenciais, na obtenção de energia a partir dos mesmos, e na troca iônica com o ambiente externo. A segunda ocorre em consequência da despolarização das membranas mitocondriais, já que a fosforilação oxidativa é desacoplada quando não há uma diferença de potencial eletroquímico nas mitocôndrias, prejudicando a síntese de ATP pelo organismo afetado (Gadd 1993, Belgers et al. 2009, Stevani et al. 2013).

1.5 Bioensaios de toxicidade

Compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais podem ser quimicamente identificados e quantificados por meio de técnicas analíticas tradicionais (e.g.,

espectrofotometria de absorção atômica e cromatografia). Entretanto, ensaios com organismos vivos, apesar de não estabelecerem por si só a concentração ou identificação dos agentes químicos, permitem um conhecimento mais real acerca dos efeitos tóxicos causados às espécies. Isso porque a resposta biológica em decorrência da exposição a um composto tóxico leva em consideração não apenas a concentração dos poluentes, mas também a sua biodisponibilidade, as características dos organismos (e.g., mecanismos de defesa) e a sua interação com os agentes tóxicos em condições específicas de incubação (Steinberg et al. 1995, Weitz et al. 2002). Assim, os métodos analíticos (químicos) e os bioensaios apresentam diferentes enfoques, podendo ser utilizados um em complemento ao outro, ou preferencialmente adotados de acordo com os objetivos de interesse no estudo.

Conforme exposto acima, os bioensaios de toxicidade baseiam-se na resposta biológica de um organismo vivo quando exposto por determinado tempo (suficiente para que os efeitos tóxicos ocorram) a uma faixa de concentrações de um agente químico de interesse, com o qual a espécie utilizada interage por diferentes mecanismos, levando-se em conta as especificidades da mesma e os demais fatores abordados na seção anterior. Uma série de organismos aquáticos e terrestres representativos de diferentes níveis tróficos é utilizada em bioensaios desenvolvidos para avaliar a toxicidade de compostos orgânicos e inorgânicos. As respostas biológicas de inúmeras espécies de animais, algas, plantas e microorganismos são, principalmente, alterações na reprodução, no crescimento, na mobilidade, mortalidade, biomassa, emissão de luz, germinação e produção enzimática (Stephenson et al. 2002).

A toxicidade de cada composto - ou, alternativamente, de uma mistura de compostos - é obtida a partir de um gráfico da concentração do agente químico na escala logarítmica em função do efeito causado ao organismo - e.g., inibição de crescimento e diminuição da luz emitida (Landis & Yu 1995, Weitz et al. 2002). Como resultado, é obtida uma curva, em geral, de forma sigmoidal (Figura 6).

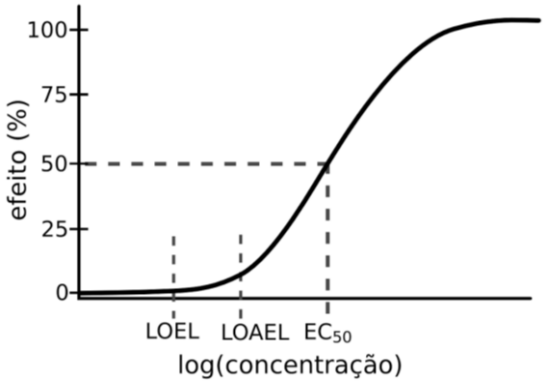


Figura 6. Curva típica de toxicidade. Fonte: Kent (1998).

A curva de toxicidade indica que, a partir de determinada concentração (*LOEL* – do inglês, "*Lowest Observed Effect Level"*), alguns efeitos sobre a espécie utilizada no bioensaio começam a ser observados, mas são ainda discretos e, portanto, não podem ser diretamente correlacionados com a resposta do organismo à toxicidade de um dado composto ou mistura. Entretanto, atingida uma concentração mínima, a resposta do organismo intensifica-se e torna-se mais evidente, podendo ser associada aos mesmos efeitos tóxicos adversos causados pela exposição em concentrações maiores – neste ponto tem-se o *LOAEL* (do inglês, "*Lowest Observed Adverse Effect Level"*). Por fim, os efeitos adversos se tornam altos o suficiente para resultar na morte de 100% dos organismos expostos e/ou na resposta máxima em decorrência da interação com o composto testado (Kent 1998, Landis & Yu 1995).

A toxicidade é usualmente representada pelos valores de concentração que causam 50% do efeito biológico no eixo y. Neste contexto, o valor de EC_{50} (concentração mediana efetiva) é um dos parâmetros utilizados em ensaios de toxicidade, de modo que quanto menor o seu valor, maior será a toxicidade do composto - ou seja, uma menor quantidade de um agente tóxico será necessária para causar 50% do efeito sobre o organismo em estudo. A inclinação das curvas também é importante na avaliação da toxicidade em alguns casos mais específicos - por exemplo, compostos com diferentes valores de EC_{50} em curvas com inclinações semelhantes podem indicar um mecanismo de toxicidade em comum, enquanto que valores de

EC_{50} semelhantes em curvas com inclinações distintas mostram que um composto pode ser mais ou menos tóxico do que outro em pontos específicos, em concentrações maiores ou menores do que a do EC_{50} (Landis & Yu 1995).

Em geral, o compartimento ambiental aquático é considerado o principal receptor de poluentes. Isso se deve à possibilidade de solubilização e migração de agentes químicos tóxicos do solo e/ou do ar para as fontes de água (lagos, rios, oceanos, etc.) em decorrência de, por exemplo, chuvas (CETESB 2014). De forma compatível, existe uma grande quantidade de ensaios de toxicidade voltados aos organismos aquáticos, propostos inclusive por agências governamentais (como a CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo e USEPA – *United States Environmental Protection Agency*) e órgãos voltados à elaboração de normas técnicas - entre eles, ISO - *International Organization for Standardization* e ABNT - *Associação Brasileira de Normas Técnicas* (CETESB 1988, ABNT 2011, ISO 2012, USEPA 1993).

Os bioensaios com microrganismos empregam, em grande parte, espécies de bactérias, tal qual a *Pseudomonas putida*, cujo efeito estudado é a inibição do crescimento. Mais usualmente, são utilizadas as espécies aquáticas bioluminescentes Aliivibrio fischeri (ex *Vibrio fischeri*) e *Photobacterium phosphoreum*, avaliando-se a diminuição da emissão de luz como resposta à exposição aos agentes químicos. O desenvolvimento de bioensaios com tais organismos deve-se ao fato de constituírem métodos práticos, reprodutíveis, diretos, rápidos, sensíveis e economicamente viáveis, podendo ser utilizados para avaliar a toxicidade de uma grande quantidade de compostos e amostras ambientais – características desejáveis para viabilizar qualquer bioensaio de toxicidade (Farré & Barceló 2003).

Por esses mesmos motivos, um dos bioensaios mais utilizados e comercialmente disponíveis é o Microtox®, desenvolvido em 1979. Como procedimento básico, a espécie *A. fischeri* reconstituída é utilizada para testar a toxicidade de amostras principalmente aquosas -

por exemplo, efluentes industriais e municipais, água para consumo ou de chuvas, descartes perigosos e extratos de sedimentos ou solo. A variação da BL é medida em um fotômetro específico, com controle de temperatura, antes e depois de períodos geralmente em torno de 15-30 min ou 22 h, a partir dos quais ocorrem os efeitos tóxicos, respectivamente agudos e crônicos. Tais efeitos são associados aos danos na atividade metabólica da espécie, sendo quantificados pela consequente diminuição da bioluminescência (Brovko 2007, Bulich 1979, Farré & Barceló 2003).

Apesar da ampla utilização de bactérias aquáticas em bioensaios com microrganismos, uma avaliação mais completa acerca da toxicidade de agentes químicos em um ambiente é idealmente realizada a partir da combinação de dados de toxicidade obtidos não apenas para um organismo em um compartimento ambiental, mas para uma junção de organismos que, juntos, representariam com maior exatidão a diversidade da flora e fauna em um ecossistema. Assim, essa "bateria" de testes de toxicidade seria útil para levar em consideração, por exemplo, a variedade de sensibilidades em espécies de diferentes grupos taxonômicos e a diversidade de espécies com relevâncias e funções ecológicas distintas, que entram em contato com poluentes por meio de diferentes compartimentos ambientais, interagindo com os contaminantes por diferentes rotas de exposição (Stephenson et al. 2002).

Embora as bactérias utilizadas em bioensaios e os fungos ocupem posições na base da cadeia alimentar, ambos não são normalmente encontrados no mesmo compartimento ambiental. Portanto, é natural que desenvolvam mecanismos distintos de defesa e de interação com os agentes químicos, podendo apresentar diferentes respostas biológicas em decorrência da exposição a poluentes tóxicos. Considerando a sua função ecológica, os fungos seriam organismos estratégicos para avaliar a toxicidade de compostos no ambiente terrestre, representando com maior exatidão espécies que vivem neste compartimento ambiental. Os testes de toxicidade seriam então destinados, entre outras aplicações, à avaliação de danos

provocados por poluentes em ambientes contaminados, podendo ser utilizados em conjunto com os bioensaios utilizando espécies aquáticas, ou ao teste de novos fungicidas, visando aprimorar a produção agrícola (Weitz et al. 2002, Stevani et al. 2013).

O efeito mais estudado nos bioensaios com fungos é a inibição do crescimento, obtida tipicamente pelas medidas do diâmetro ou biomassa do micélio (Weitz et al. 2002). Neste caso, o procedimento consiste em homogeneizar o agente químico de interesse, cuja toxicidade está sendo testada, em meios de cultura esterilizados e com composição definida. Posteriormente, estes meios são inoculados com a espécie em estudo e o crescimento é medido após um determinado período de incubação, em condições controladas. Os dados de tais medições são comparados com controles, onde não houve a adição de compostos potencialmente tóxicos ao meio, calculando-se a inibição de crescimento em cada concentração testada, o que permite a construção da curva de toxicidade e a obtenção do EC_{50} (Guillén & Machuca 2008, Donlaporn & Suntornsuk 2010, Devappa et al. 2012, Weitz 2002, Dambolena et al. 2012).

Apesar de serem mais tradicionais, os bioensaios de toxicidade com base no crescimento pela medida do diâmetro radial do micélio não consideram a sua densidade (Hartley et al. 1997, Stevani et al. 2013). Assim, um maior diâmetro não necessariamente terá relação com um melhor desenvolvimento da espécie, uma vez que o micélio pode apresentar amplo crescimento horizontal no meio de cultura sem apresentar um crescimento proporcional na biomassa e, consequentemente, haverá uma baixa densidade micelial. Tal resultado foi obtido, por exemplo, por Guillén e Machuca (2008), que mediram o diâmetro e a biomassa do micélio de 10 espécies fúngicas expostas a diferentes concentrações de cobre (II), identificando que as espécies com maior biomassa não correspondiam às espécies com maior diâmetro radial.

Além disso, o crescimento não ocorre somente no plano horizontal, como é considerado quando se obtém apenas o diâmetro do micélio, mas também no plano vertical. A medida da

biomassa, que seria um método para levar em consideração o crescimento tridimensional do micélio, por outro lado, constitui um procedimento pouco prático, consumindo maior quantidade de tempo e trabalho (Weitz et al. 2002, Stevani et al. 2013). Isso porque, neste caso, é necessário separar o fungo por filtração (após fundir os meios de cultura), para posterior secagem do micélio – que pode durar até 48h - e pesagem (Weitz et al. 2002, Guillén & Machuca 2008). Depois deste processo, os micélios são descartados, necessitando uma quantidade maior de culturas no caso de serem necessárias medidas do crescimento ao longo dos dias de incubação – por exemplo, para avaliar o perfil de crescimento do fungo.

Como alternativa às limitações dos bioensaios mais tradicionais, nos quais a inibição de crescimento é avaliada, existem os bioensaios baseados na bioluminescência, que também apresentam baixo custo, facilidade de aplicação e sensibilidade. Os seus procedimentos são mais simples, rápidos e práticos do que a medida de biomassa e a intensidade da emissão de luz se relaciona melhor com a densidade e desenvolvimento do micélio do que o crescimento a partir do diâmetro radial, cujas medições, por serem obtidas manualmente com réguas ou paquímetros, podem ser difíceis de interpretar (Mendes & Stevani 2010, Weitz et al. 2002, Weitz 2007).

Existem dois principais métodos para a realização dos bioensaios com fungos naturalmente bioluminescentes. Um deles foi proposto por Weitz et al (2002), utilizando micélios globulares das espécies *Armillaria mellea* e *Mycena citricolor* cultivadas por, respectivamente, 10 e 7 dias, sob agitação constante em meios de cultura líquidos. Os autores avaliaram a toxicidade de metais e fenóis substituídos após 60 min de exposição com o micélio. Por sua vez, Mendes e Stevani (2010) desenvolveram o primeiro bioensaio utilizando um fungo bioluminescente em meio de cultura sólido, no qual os agentes tóxicos, ao invés de serem incorporados aos meios, são aplicados diretamente sobre o micélio já desenvolvido. Na metodologia proposta pelos autores, a toxicidade de metais foi avaliada para a espécie *G.*

viridilucens após 10 dias de crescimento nos meios de cultura a base de ágar, adotando-se 24 horas como tempo de exposição.

Diferentemente dos bioensaios tradicionais, ambos os métodos bioluminescentes descritos acima não necessitam de controles separados, permitindo que cada uma das culturas utilizadas nos testes de toxicidade seja controle de si mesma. Isso ocorre porque os poluentes a serem testados não necessitam ser diluídos nos meios antes da inoculação, como é feito na metodologia convencional, que utiliza espécies não bioluminescentes. Alternativamente, os compostos químicos são aplicados após o desenvolvimento do micélio, que tem a sua BL medida antes e depois de um determinado tempo de exposição – ou seja, a medida realizada anteriormente à aplicação do agente tóxico é utilizada como controle e comparada com o valor obtido após a exposição. Tal característica do método favorece maior reprodutibilidade e diminui erros experimentais associados a possíveis variabilidades entre os micélios que crescem em placas diferentes. Além disso, é possível identificar quaisquer anomalias no desenvolvimento da espécie, relacionadas a questões não envolvidas com os efeitos tóxicos dos poluentes, evitando erros de interpretação dos resultados (Mendes & Stevani 2010).

O cultivo em meio líquido afeta em menor escala a biodisponibilidade dos compostos testados, quando em comparação com os meios sólidos. Estes, por possuírem ágar e outros componentes em sua composição, podem imobilizar os poluentes no meio, podendo afetar os resultados de EC_{50} pela alteração da biodisponibilidade. Por essa razão, a toxicidade de um mesmo composto obtida por bioensaios em meios líquidos é frequentemente maior do que quando os fungos são inoculados em meios sólidos (Gadd 1983, Hartley et al. 1997, Mendes & Stevani 2010). Um exemplo disso são os resultados obtidos por Jones e Muehlchen (1994) para a espécie *Thelephora terrestris*, que apresentou alta tolerância a concentrações de 100-500 mg/L de cobre em meio sólido, mas teve seu crescimento inibido sob 200-400 mg/L do mesmo elemento em meio líquido.

Por outro lado, o crescimento do micélio em meios líquidos é menos representativo do seu crescimento natural no solo, e, como consequência, os resultados do bioensaio podem refletir de forma menos exata a toxicidade em situações reais de desenvolvimento fúngico, onde a sensibilidade da espécie utilizada pode variar em função do ambiente onde é inoculada e da sua diferenciação no mesmo (Hartley et al. 1997). Consequentemente, o bioensaio proposto por Mendes e Stevani (2010) apresentaria uma maior proximidade com as características dos fungos se desenvolvendo em seu habitat natural, em comparação com o bioensaio desenvolvido por Weitz et al. (2002).

Com as metodologias apresentadas acima, pode-se dizer que os bioensaios com fungos bioluminescentes representam uma opção adicional aos bioensaios já existentes com outras espécies aquáticas e terrestres, além de ser um complemento às análises químicas para quantificação e identificação de compostos. Desta forma, tais bioensaios representam uma metodologia viável que poderia, inclusive, ser utilizada com outras espécies bioluminescentes seguindo a mesma base de procedimentos, desde que se estabeleça previamente as melhores condições para a sua emissão de luz. Assim, podem ser ampliados os testes existentes, voltados à avaliação da toxicidade de substâncias puras ou misturas, de amostras ambientais e de fungicidas de interesse comercial para combater fungos basidiomicetos patógenos (Stevani et al. 2013, Mendes & Stevani 2010, Weitz et al. 2002).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho buscou avaliar os efeitos de algumas condições de cultura sobre o perfil de BL do fungo *Neonothopanus gardneri*, ajustando-as com foco no desenvolvimento de um bioensaio de toxicidade. Para estes propósitos, os objetivos específicos do estudo foram:

1. Conduzir experimentos preliminares para estudar o comportamento da espécie e diminuir a dispersão nos valores de BL.

2. Incubar o fungo em diferentes temperaturas, variando também o pH e as concentrações de nutrientes (fontes de carbono e de nitrogênio), a fim de identificar condições de cultivo em que o perfil de BL é favorável à aplicação do bioensaio.

3. Avaliar a influência do ar atmosférico sobre a BL no procedimento de abertura das placas, necessário para a aplicação de agentes potencialmente tóxicos e diluentes sobre o micélio.

4. Determinar um solvente para os compostos cujas toxicidades serão testadas. Com esta etapa, buscou-se identificar um diluente que não cause efeitos tóxicos associados à inibição de BL, para evitar erros na análise dos resultados.

5. Estabelecer o tempo de exposição ideal para o bioensaio, equivalente ao período mínimo necessário para que a resposta do fungo aos efeitos tóxicos seja máxima, sem que haja influência do ar atmosférico ou dos diluentes sobre a BL.

6. Aplicar o bioensaio de toxicidade para dois metais (Cu^{+2} e Cd^{+2}) e dois fenóis (fenol e 4-nitrofenol), analisando as suas vantagens e desvantagens frente aos demais bioensaios desenvolvidos para espécies de fungos bioluminescentes.

Além das etapas supracitadas, este trabalho também apresenta experimentos para determinar se ocorre absorção de fenol e fenóis substituídos em meios de cultura, de modo a alterar significativamente a concentração de tais agentes tóxicos expostos aos fungos. Os

compostos testados foram escolhidos com base na sua aplicação em um bioensaio desenvolvido anteriormente pelo grupo com outra espécie de fungo bioluminescente, *Gerronema viridilucens*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os meios de cultura foram preparados com água destilada, ágar (AgarGel, grau alimentício), extrato de levedura (Sigma-Aldrich) e melaço de cana de açúcar (Brix 83,4%, Pol 49,2%) doado pela Usina São José da Estiva (Novo Horizonte – SP). Melaços alimentícios da SuperBom® e da Homemade® foram alternativamente utilizados em ensaios preliminares. Ácido cítrico anidro (Casa Americana de Artigos para Laboratório, grau PA) e Na_2HPO_4 anidro (Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99%) foram empregados em tampões. Para ajustes no pH, foram preparadas soluções de NaOH (Synth, grau PA), H_3PO_4 ou H_2SO_4 (Merck, grau PA). Para o bioensaio, foram utilizados $3CdSO_4.8H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, fenol, 4-nitrofenol, Triton X-100, ácido 2-(N-morfolino)etano sulfônico (tampão MES, Merck e Sigma-Aldrich, purezas ≥ 99%) e dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, pureza 99,9%). Para a quantificação de fenóis em meios de cultura, além do fenol e do 4-nitrofenol supracitados, foram utilizados $FeCl_3.6H_2O$ (Sigma-Aldrich, pureza ≥ 98%), HCl (Merck, 37,5%), $K_3[Fe(CN)_6]$ (Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99%), 2,4,6-triclorofenol, 4-cianofenol, 4-metóxifenol e 4-clorofenol (Sigma-Aldrich e ACROS, purezas ≥ 98%). Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (MilliQ).

3.2 Materiais e aparelhagem

Uma balança analítica e outra semi-analítica (Mettler Toledo, modelos AG285 e PB3001-S, respectivamente) foram utilizadas na pesagem dos reagentes e componentes dos meios de cultura, preparados em frascos Schott. A esterilização de materiais e meios de cultura foi realizada durante 30 min. a 121ºC, sob pressão de 1,1kgf.cm^{-2}, em uma autoclave vertical (Phoenix, linha AV). Um bico de bünsen foi adicionalmente utilizado para a esterilização de algumas das aparelhagens. Todos os procedimentos para o preparo das culturas foram

conduzidos em um fluxo laminar (Pachane, modelo PCR T2,5), localizado em uma sala devidamente limpa e submetida à incidência de luz UV para descontaminação do ambiente.

Culturas do fungo *N. gardneri* foram inicialmente isoladas a partir de corpos de frutificação coletados no município de Altos, na Mata dos Cocais (Fazenda Cana Brava, de propriedade do Prof. Dr. Ismael Dantas). Amostras da espécie estão depositadas no herbário do Instituto de Botânica, em São Paulo-SP, sob o número de identificação SP 416342 (Capelari et al. 2011). Os materiais utilizados na inoculação do micélio consistiram em uma pinça metálica, um fura-rolhas de 3,5 mm de diâmetro interno, filme plástico de PVC e placas de Petri descartáveis de plástico (Corning e J. prolab, com 100 mm, 60 mm e 35 mm de diâmetro) ou de vidro (com 60 mm e 35 mm de diâmetro). As culturas preparadas foram mantidas em câmaras climáticas (BINDER, modelos KBF-240 e KB-53, e Tecnal TE-391) com controle de temperatura e umidade. Para a medição da BL fúngica, foram utilizados luminômetros de tubo (Berthold Sirius) e de microplacas (Tecan Infinite® M200).

As soluções foram preparadas utilizando béqueres, balões volumétricos, funis de vidro, pipetas Pasteur e micropipetas (Eppendorf Research). Um ultrapurificador de água (Merck-Millipore, modelo MilliQ Direct 16) forneceu água destilada e ultrapura. Para facilitar a solubilização de sólidos e homogeneização de soluções, foi utilizado um banho ultrassônico (Elma, modelo 420). Ajustes de pH foram feitos em um pHmetro da marca Marconi, modelo PA 200. Para verificar se houve absorção de fenóis em meios de cultura, utilizou-se uma chapa de aquecimento (Thermo Scientific), lâminas de micrótomo, pinças metálicas, tubos de ensaio, cubetas de vidro e um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, modelo U-2010).

3.3 Preparo de soluções e meios de cultura

3.3.1 Tampão ácido cítrico/fosfato

Foram preparados tampões em pH 4, 6 e 8 em água ultrapura, ajustando o pH, quando

necessário, com soluções 0,1M de NaOH ou H_3PO_4 (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações para preparo de tampões citrato/fosfato.

pH	Ácido Cítrico	Na_2HPO_4
4	11,7 gL^{-1} (61 mM)	10,9 gL^{-1} (77 mM)
6	7,1 gL^{-1} (37 mM)	17,9 gL^{-1} (126 mM)
8	0,8 gL^{-1} (4 mM)	27,6 gL^{-1} (194 mM)

3.3.2 Meios de cultura

Nos estudos preliminares sobre a BL, os micélios foram inoculados em meios de cultura com composição idêntica à otimizada anteriormente pelo grupo para a espécie *G. viridilucens* (Mendes et al. 2008). Neste caso, o meio consistiu em 2% de ágar, 0,1% de extrato de levedura e 1% de melaço de cana de açúcar em água destilada, sendo todas as concentrações em m:m.

Os meios de cultura foram preparados em pH 4, 6 e 8, tamponados e não-tamponados, tanto nos estudos preliminares quanto em estudos posteriores. Para o pH 6 não-tamponado, os meios foram preparados pela simples pesagem de todos os componentes e verificação do pH que, neste caso, permanece naturalmente no valor desejado, sem necessitar de maiores ajustes. Para pH 4 e 8, entretanto, foram feitas adaptações para evitar a hidrólise do ágar durante o processo de esterilização na autoclave, o que impede a sua solidificação após esfriamento. Desta forma, para 300 g de meio de cultura, 6 g de ágar foram pesados separadamente em 100 g de água destilada. Em outro frasco, o extrato de levedura e o melaço de cana de açúcar foram pesados com o restante da água necessária, e seus pHs foram ajustados para 3,5 e 11 com NaOH 0,1M ou H_2SO_4 0,1M. Apenas após a esterilização, o ágar foi adicionado e misturado aos demais componentes dos meios, que adquiriram respectivos pH finais em torno de 4 e 8. Os valores de pH ajustados antes da autoclavagem foram identificados empiricamente, sendo determinados anteriormente pelo grupo. Os procedimentos para preparo

dos meios tamponados foi idêntico aos descritos acima, apenas substituindo-se a água destilada pelas soluções tampão.

Por último, foram variadas também as concentrações de extrato de levedura e melaço (fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente), mantendo o pH 6 não tamponado. Neste caso, os componentes foram pesados em um mesmo frasco de forma semelhante ao descrito no primeiro parágrafo desta seção, variando apenas as suas proporções.

3.3.3 Diluentes para os agentes tóxicos

Foram preparadas as seguintes soluções em água ultrapura, a fim de testar possíveis diluentes para os agentes tóxicos avaliados nos bioensaios de toxicidade: Triton X-100 0,05% (m:v); DMSO 0,1% (v:v) e Triton X-100 0,01% ou 0,05% (m:v) tamponado com MES 9,8 gL^{-1} (50 mM). Os pHs foram ajustados em 5,7 com soluções 0,1M de NaOH ou H_2SO_4.

3.3.4 Soluções de fenóis e cátions metálicos

Foram preparadas soluções estoque de Cu^{+2}, Cd^{+2}, fenol e 4-nitrofenol pela sua solubilização na solução de Triton X-100 0,01% (m:v) tamponada com MES 50 mM (pH 5,7). Alíquotas destas soluções foram diluídas no mesmo solvente para serem aplicadas sobre o micélio nos testes de toxicidade (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações das soluções estoque e faixas de concentração das soluções de teste, às quais os micélios foram expostos.

Agente tóxico	Sal de origem	Soluções estoque	Faixas de concentração: soluções de teste
Cu^{+2}	$CuSO_4.5H_2O$	12,5 gL^{-1} (50 mM)	$2,5\times10^{-3}$-6,2 gL^{-1} (0,01-25 mM)
Cd^{+2}	$3CdSO_4.8H_2O$	15,3 gL^{-1} (20 mM)	$7,7\times10^{-4}$-0,38 gL^{-1} (0,001-0,5 mM)
fenol	-	0,94 gL^{-1} (10 mM)	$0,94\times10^{-3}$-0,94 gL^{-1} (0,01-10 mM)
4-nitrofenol	-	2,8 gL^{-1} (20 mM)	$1,4\times10^{-3}$-1,4 gL^{-1} (0,01-10 mM)

3.3.5 Soluções para o método de quantificação dos fenóis em meios de cultura

Para esta etapa paralela, utilizou-se como diluente uma solução de Triton X-100 0,05% (m:v) em água ultrapura, com pH ajustado em 5,5 com NaOH 0,1M ou H_2SO_4 0,1M. Este é o mesmo diluente adotado por Mendes e Stevani (2010) no bioensaio desenvolvido para o fungo *G. viridilucens*, razão pela qual foi adotado nesta seção de experimentos. Do mesmo modo, foram preparados meios de cultura com pH 6, na composição otimizada por Mendes et al. (2008), vide descrição na seção 3.3.2. Para os testes que buscaram avaliar a absorção dos analitos pelos meios, foram preparadas soluções individuais de 6 fenóis, cuja toxicidade foi testada anteriormente pelo grupo (Tabela 4). As faixas de concentração foram selecionadas por estarem ao redor do EC_{50} encontrado para a espécie supracitada.

Tabela 4. Concentrações das soluções estoque e faixas de concentração das soluções de teste aplicadas sobre os meios de cultura não inoculados.

Agente tóxico	**Soluções estoque**	**Faixas de concentração: soluções de teste**
fenol	1,9 gL^{-1} (20 mM)	0,09-1,5 gL^{-1} (1-16 mM)
4-nitrofenol	2,8 gL^{-1} (20 mM)	0,14-1,4 gL^{-1} (1-10 mM)
2,4,6-triclorofenol	2,0 gL^{-1} (10 mM)	0,04-0,40 gL^{-1} (0,2-2 mM)
4-metoxifenol	6,2 gL^{-1} (50 mM)	0,19-4,3 gL^{-1} (1,5-35 mM)
4-clorofenol	12,8 gL^{-1} (100 mM)	0,38-9,0 gL^{-1} (3-70 mM)
4-cianofenol	2,4 gL^{-1} (20 mM)	0,12-1,2 gL^{-1} (1-10 mM)

Para a reação colorimétrica que permitiu a quantificação dos fenóis, 27 gL^{-1} (0,1 M) de $FeCl_3.6H_2O$ e 2,6 gL^{-1} (8 mM) de $K_3[Fe(CN)_6]$ foram dissolvidos, respectivamente, em solução aquosa de HCl 0,1 M e água ultrapura. Curvas de calibração utilizadas na quantificação dos analitos foram feitas pela diluição dos fenóis no diluente Triton X-100 0,05% (pH 5,5). Tais soluções foram preparadas em concentrações 1000 vezes menores do que as faixas de concentração da Tabela 4, considerando as etapas de diluição necessárias

para a aplicação do método de quantificação. Para isso, foram preparadas novas soluções estoque, 100 vezes mais diluídas do que as soluções estoque especificadas na Tabela 4.

3.4 Procedimentos de inoculação

Logo após a esterilização na autoclave, os meios de cultura e os materiais para inoculação (fura-rolhas e pinça) foram transferidos para o fluxo laminar, previamente limpo com álcool 70% e descontaminado internamente com luz UV durante 30 min – esta foi incidida por 5 min também em toda a área da sala onde fica alocado o equipamento, por meio de uma lâmpada externa. Placas de Petri descartáveis foram adquiridas já esterilizadas, dentro de embalagens plásticas fechadas. Ainda assim, o exterior destas embalagens foi limpo com álcool 70% e exposto à radiação UV antes da sua abertura. Quando utilizadas, placas de vidro foram esterilizadas na autoclave.

Tanto os materiais quanto os meios de cultura foram mantidos no fluxo laminar fechado, sob luz UV, por um período de 40-50 min, para que resfriassem e pudessem ser manipulados. Os meios (resfriados até 40-50ºC após autoclavar) foram transferidos para placas de Petri esterilizadas com diâmetros de 100 mm (utilizadas na manutenção e preparo de novas culturas) e de 35 mm ou 60 mm (para as leituras de BL). O período necessário para a solidificação do ágar, cerca de 15-20 min, também ocorreu sob incidência de luz UV, para evitar contaminações.

A inoculação de novas culturas foi feita a partir de um micélio incubado durante 14 dias em uma placa de 100 mm. Este foi perfurado com um fura-rolhas de 35 mm de diâmetro interno, adicionalmente esterilizado na chama de um bico de Bünsen. O inóculo foi, então, transferido para o meio recém-preparado com o auxílio de uma pinça metálica, também esterilizada na chama antes de ser utilizada. As placas foram vedadas com filme plástico de PVC e mantidas no escuro em câmaras climáticas com controle de temperatura e umidade.

Para evitar variações de BL, causadas pela ambientação do fungo a novas condições, todas as culturas cuja emissão de luz foi quantificada foram feitas a partir de micélios já incubados em condições idênticas de cultivo (ou seja, mesmas temperaturas, pH, umidade e concentração de nutrientes).

3.5 Estudos preliminares sobre a BL

Em estudos iniciais, foram variados alguns parâmetros relacionados aos procedimentos e materiais para a inoculação do fungo *N. gardneri* e medição da BL. Entre eles:

a. Desenvolvimento de suportes em madeira para o luminômetro de microplacas, específicos para comportar apenas uma placa de Petri por vez, com diâmetros de 35 mm ou 60 mm. Os suportes foram feitos pela equipe de manutenção do IQ-USP, sendo utilizados em substituição a outro suporte desenvolvido anteriormente pelo grupo, o qual permite a leitura simultânea de 4 placas de 35 mm fechadas (Figura 7).

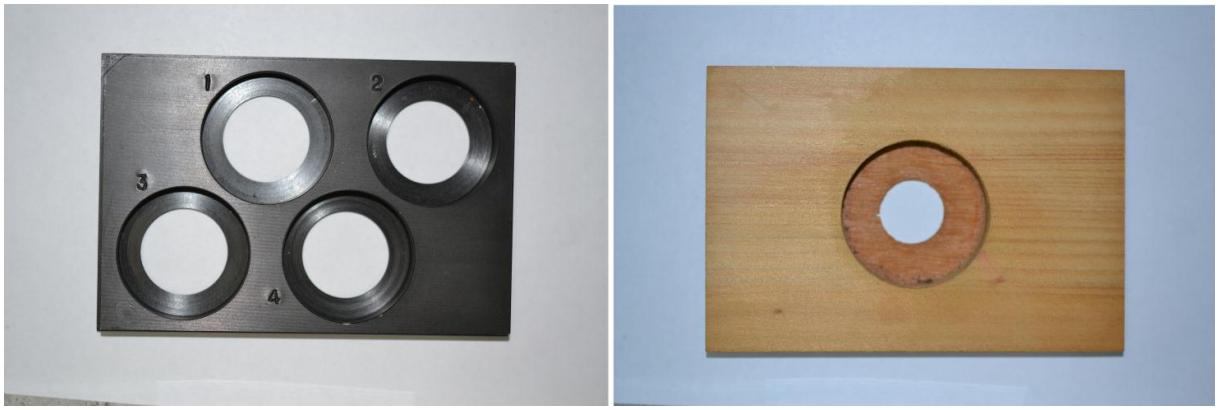


Figura 7. Suportes utilizados nas medições de BL das placas. À esquerda: suporte para 4 placas, utilizado anteriormente pelo grupo para medir a BL da espécie *G. viridilucens*. À direita: suporte adaptado para medição individual das placas com o fungo *N. gardneri*.

O luminômetro supracitado quantifica a luz por poços individuais, abrangendo uma área que cobre não apenas a superfície dos micélios, mas também toda a região sobre o suporte. Desta forma, a substituição foi feita para testar se a leitura individual das culturas é melhor

para a espécie *N. gardneri*, uma vez que sua BL é mais elevada do que a de outras espécies cultivadas pelo grupo.

b. Variação preliminar das temperaturas de incubação, mantendo as culturas sob 18ºC; 25ºC e 32ºC, e do pH dos meios 4, 6 e 8, com e sem adição do tampão ácido cítrico/fosfato.

c. Adição de 500 µL de água ultrapura esterilizada sobre cada meio de cultura no momento da inoculação.

d. Medição da BL em placas de 35 mm utilizando um luminômetro de tubo, que quantifica os fótons emitidos em toda a superfície do micélio e fornece diretamente o valor da luz total emitida.

e. Alteração do material e tamanho das placas de Petri, substituindo o plástico por vidro e medindo a BL também em placas de 60 mm de diâmetro.

f. Alteração na procedência do melaço, utilizando os melaços comercialmente disponíveis da Superbom® e Homemade® ao invés do melaço da usina São José da Estiva, Novo Horizonte, SP.

Em todos os casos descritos acima, a BL foi medida em triplicata ao longo de períodos entre 7 e 30 dias, seguindo os procedimentos descritos anteriormente para inoculação e preparo dos meios de cultura (vide itens 3.3.2 e 3.4). Foi mantida a composição de 2% de ágar; 0,1% de extrato de levedura e 1% de melaço de cana de açúcar, adotando cada uma das temperaturas e valores de pH descritos no item b. Com exceção do item d, todas as medições foram feitas no luminômetro de microplacas utilizando o suporte mostrado à direita na Figura 7.

3.6 Efeito das condições de cultura sobre a BL

Em uma primeira etapa, foram variadas as temperaturas e o pH dos meios em placas de

Petri descartáveis de 35 mm, incubando as culturas em 25, 30 e 35ºC em meios não tamponados com pH 4, 6 e 8. Posteriormente, nas condições mais favoráveis de temperatura e pH, foram variadas as concentrações das fontes de carbono (melaço 0,2%, 1% e 5%, em m:m) e nitrogênio (extrato de levedura 0,02%, 0,1% e 0,5%, em m:m). Todos os fatores foram variados individualmente, com a alteração de apenas um parâmetro por vez, mantendo a concentração de ágar em 2% (m:m). A BL foi quantificada ao longo de 13 dias de incubação em quatro replicatas. Gráficos de BL em função do tempo de incubação foram feitos para obtenção dos perfis de BL em cada condição.

Para as medições da emissão de luz, as culturas foram acondicionadas e transportadas em caixas de isopor fechadas, com temperatura interna igual à temperatura de incubação. As culturas foram mantidas por, no máximo, 10 min fora das câmaras climáticas, a fim de evitar variações de luz em virtude de diferenças na temperatura. As medições de BL foram feitas sempre no mesmo horário, levando em consideração um possível ritmo na emissão de luz, proposto por Berliner (1961) e confirmado por Oliveira et al. (2015). Ainda para evitar alterações na BL, evitou-se ao máximo expor as culturas do bioensaio à luminosidade, uma vez que algumas diferenças no crescimento e BL de micélios expostos à luz durante o período de inoculação foram encontradas por Bermudes et al. (1990). Os mesmos cuidados foram tomados para os procedimentos do bioensaio, descritos a seguir.

Variações no pH dos meios de cultura, causadas pela secreção de metabólitos ao longo do tempo de incubação, foram monitoradas dentro das condições de cultivo que resultaram na maior emissão de luz e no melhor perfil de BL. Para isso, os meios de cultura foram separados do micélio com um bisturi e segmentados horizontalmente ao meio com uma lâmina metálica de micrótomo. Para cortes uniformes e mais precisos, foi utilizado um molde fabricado pela equipe de manutenção do IQ-USP, construído a partir de uma placa de petri de 35 mm cortada ao meio. As seções superiores e inferiores dos meios foram transferidas separadamente com

um pinça metálica para frascos de vidro, onde foram liquefeitas com o auxílio de uma chapa de aquecimento. O líquido resultante foi então avolumado para 2,0 mL com água deionizada, a fim de medir, na temperatura ambiente, o pH dos meios em cada uma das seções.

3.7 Desenvolvimento do bioensaio

O micélio foi cultivado durante 7 dias nas condições ideais em placas de Petri descartáveis de 35 mm de diâmetro. Para avaliar a influência do ar atmosférico sobre a emissão de luz, as placas permaneceram abertas durante 15 s, sendo novamente fechadas em seguida. Para determinar o diluente mais adequado para os agentes tóxicos, foram individualmente adicionados sobre o micélio 500 µL das soluções especificadas no item 3.3.3. As emissões de luz foram medidas após 0,5; 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h de exposição, em triplicata. Os resultados da BL nas placas expostas ao ar e aos diluentes foram comparados entre si e com a emissão de luz em culturas expostas a 500 µL de soluções individuais de cobre e de fenol em água ultrapura (respectivamente, 50 mM e 10 mM; pH 5,7). Estes dados também foram critério para estabelecer o tempo necessário de exposição para o bioensaio.

Os bioensaios de toxicidade foram realizados para Cu^{2+}, Cd^{2+}, fenol e 4-nitrofenol nas concentrações descritas no item 3.3.4. O procedimento consistiu em, primeiramente, medir a BL de todas as placas antes da sua abertura, no 7º dia de incubação, para verificar a precisão na emissão de luz do conjunto de culturas. No mesmo dia, foram aplicados 500 µL de soluções individuais dos agentes tóxicos sobre os micélios. Na aplicação, as culturas foram levemente agitadas por 15 s para espalhar uniformemente as soluções por toda a superfície do micélio. A BL foi medida após 24 h de exposição – neste período, as culturas foram mantidas fechadas e no escuro, nas mesmas câmaras climáticas onde foram incubadas.

A inibição da bioluminescência foi determinada pela comparação com placas controle, onde foram aplicados 500 µL de diluente (solução tampão de MES 50 mM em solução aquosa

de Triton X-100 0,01%; pH 5,7). As placas controle e as placas de teste foram escolhidas de modo a sempre possuírem emissões de luz semelhantes antes da sua abertura, apresentando desvios inferiores a 15% entre si. Algumas placas foram mantidas fechadas, para avaliação de quaisquer mudanças no perfil de BL não relacionadas ao bioensaio e que pudessem influenciar os resultados finais. Os valores de EC_{50} foram calculados com base na curva de toxicidade, representada por um gráfico de concentração em escala log *versus* BL inibida.

3.8 Quantificação de fenol e fenóis substituídos em meios de cultura

Um volume de 500 µL das soluções de fenóis descritas no item 3.3.5 foram aplicadas individualmente em meios de cultura não inoculados, mantidos nas mesmas condições especificadas por Mendes et al. (2008) e Mendes e Stevani (2010) para a incubação da espécie *G. viridilucens* – ou seja, meios com pH 6 contendo 2% de ágar, 0,1% de extrato de levedura e 1% de melaço, mantidos em 25ºC em placas de 35 mm por 10 dias.

Os experimentos foram feitos em triplicatas e, após 24 horas, a superfície dos meios de cultura foi lavada com 4,5 mL de diluente (Triton X-100 0,05% em água ultrapura, o mesmo usado para os bioensaios com o fungo *G. viridilucens).* Os meios de cultura foram, então, cortados horizontalmente ao meio com uma lâmina metálica de micrótomo. Para cortes uniformes e mais precisos, foi utilizado um molde fabricado pela equipe de manutenção do IQ-USP, construído a partir de uma placa de Petri de 35 mm cortada exatamente na metade da altura total dos meios de cultura. Para padronização dessa altura, os meios foram adicionados nas placas sempre em um volume de 3 mL. As seções superiores e inferiores foram transferidas para frascos de vidro, onde foram fundidas em chapa de aquecimento. Em todos os procedimentos, os meios foram manipulados com uma pinça metálica para evitar contaminações. Controles foram preparados aplicando 500 µL das soluções individuais dos fenóis sobre meios de cultura e lavando-as com 4,5 mL de diluente logo em seguida. As

soluções resultantes foram armazenadas em frascos de vidro no mesmo local que as placas de Petri onde os fenóis mantiveram-se expostos aos meios, para análise de todas as amostras no mesmo período de tempo.

Os fenóis nas duas seções dos meios cortados e nas soluções lavadas da sua superfície foram quantificados pelo método espectrofotométrico denominado "Azul da Prússia", proposto por Budini (1980). Para isso, alíquotas de 125 µL (para o 2,4,6-triclorofenol) ou 25 µL (para o restante dos analitos) dos meios de cultura liquefeitos ou das soluções lavadas das suas superfícies foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 100 µL de $FeCl_3$ 0,1M em HCl 0,1M; 100 µL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 8mM e uma quantidade suficiente de diluente para completar um volume final de 2,5 mL. A quantificação foi feita em 700 nm após estabilização da cor da solução, em períodos de 120, 90, 30 e 10 min para, respectivamente, fenol, 4-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol e 4-metóxifenol. Para o 4-nitrofenol e 4-cianofenol, as reações não ocorreram, mesmo após 2 h de espera. A absorbância dos analitos foi obtida após subtração da absorbância dos respectivos brancos (preparados de acordo com os mesmos procedimentos, mas sem adição dos fenóis).

A quantificação foi feita a partir de curvas de calibração construídas em triplicata para cada composto, pela diluição em Triton X-100 0,05% dentro da faixa de concentração obtida após os procedimentos envolvidos na aplicação do método, conforme mencionado no item 3.3.5.

3.9 Tratamento dos dados

O programa Microsoft Excel 2010® foi utilizado na aquisição dos dados. O software Origin® 7.0 foi empregado para construir os gráficos de perfis de BL e curvas de toxicidade. Os valores de BL foram obtidos pela somatória dos 384 pontos individuais medidos pelo luminômetro de microplacas sobre toda a área do suporte deste equipamento, onde são

colocadas as placas de Petri com as culturas. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão, analisando também os desvios percentuais entre as replicatas (desvio padrão dividido pela média, multiplicado por 100). Para o estudo do efeito das condições de cultura sobre a BL, os gráficos foram melhor ajustados utilizando o modelo sigmoidal de Boltzmann, para crescimento exponencial, exceto para as culturas inoculadas em meios de pH 6 com 2% de ágar, 1% melaço e 0,02% ou 0,5% de extrato de levedura, mantidas sob 25ºC. Neste caso, o ajuste mais adequado foi o de modelo de Edgeworth-Cramer (ECS). A forma das curvas no perfil de BL foi determinante para seleção das melhores condições de cultura a serem adotadas nos procedimentos posteriores.

Para o ajuste das curvas de toxicidade do bioensaio, foi utilizado um modelo de concentração-resposta, utilizando a função Logistic, a partir da qual o EC_{50} foi calculado de acordo com a equação 1 apresentada abaixo. Nesta equação, BL_{inib} é o valor da BL inibida pela interação com o agente tóxico na concentração C, BL^{baixa}_{inib} e BL^{alta}_{inib} são os valores mínimos e máximos de inibição da BL, n_H é o número de Hill, que equivale à inclinação da curva de toxicidade, e EC_{50} é a concentração mediana efetiva (Mendes & Stevani 2010).

$$BL_{inib} = \frac{BL^{baixa}_{inib} - BL^{alta}_{inib}}{1 + \left(\frac{C}{EC_{50}}\right)^{n_H}} + BL^{alta}_{inib} \qquad \text{eq. 1}$$

Quando necessário, o eventual descarte de valores de BL foi feito utilizando um teste t Weisberg (intervalo de confiança de 95%), apropriado para a identificação de outliers em pequenos conjuntos de dados (Seely et al. 2003).

As concentrações dos fenóis analisados por espectrofotometria foram calculadas a partir da equação da reta das curvas de calibração, com R^2 (coeficiente de determinação) > 0,98, de

acordo com a equação $A = I \times C + B$, onde: A é a absorbância; I é a inclinação da reta; C é a concentração de fenol e B é o ponto onde a reta intercepta o eixo y.

3.10 Resíduos

Os resíduos químicos gerados nos experimentos foram segregados por compatibilidade e estado físico, sendo acondicionados em embalagens plásticas para posterior envio à central de resíduos do IQ-USP para reaproveitamento ou descarte. Os micélios foram mortos com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2,0-2,5% (água sanitária de uso doméstico) e os meios de cultura, inoculados e não inoculados, foram posteriormente descartados como lixo biológico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares

O micélio do fungo *N. gardneri* foi isolado em meios de cultura no ano de 2008, a partir de corpos de frutificação encontrados em Altos, PI. Por se tratar de uma espécie de ocorrência atualmente conhecida apenas em território nacional e com cultivo relativamente recente em laboratório, não existem ainda trabalhos publicados sobre o comportamento e a intensidade da sua BL em diferentes condições de inoculação e cultivo. Neste contexto, para ampliar os conhecimentos na respectiva área de estudo, o micélio da espécie supracitada foi inicialmente cultivado variando a temperatura de incubação (18, 25 e 32ºC) e o pH dos meios de cultura (4, 6 e 8, com e sem adição de tampão de ácido cítrico/fosfato). Nesta primeira etapa do trabalho, foi mantida a composição 2% de ágar-ágar (m:m), 0,1% de extrato de levedura (m:m) e 1% de melaço de cana de açúcar (m:m), conforme descrito na seção de materiais e métodos. A não ser quando mencionado de outro modo, no momento da inoculação foram adicionadas 10 gotas (≈500 µL) de água destilada esterilizada sobre os meios de cultura solidificados, seguindo os procedimentos adotados pelo ex-aluno do grupo, Dr. Luiz Fernando Mendes (2010). Com isso, buscou-se manter umidade constantemente elevada no interior das placas de Petri onde o fungo é inoculado, evitando possíveis flutuações na BL devido à desidratação do organismo.

O micélio não se desenvolveu quando incubado a 18ºC ou em meios tamponados de pH 6 e 8, razão pela qual não foram realizadas medições nestes casos. Por outro lado, foram obtidos valores de BL com altos desvios experimentais (superiores a 20%) em cada uma das demais condições. Devido à baixa precisão dos dados, não foi possível, em um primeiro momento, obter resultados conclusivos que permitissem o ajuste das condições de cultivo para o posterior desenvolvimento do bioensaio de toxicidade. Como consequência, foi necessário incluir no presente trabalho uma nova etapa de experimentos para compreender melhor algumas das características da espécie - ou, mais especificamente, identificar a origem dos

desvios padrão elevados e reduzir a variabilidade na emissão de luz entre as replicatas.

Em virtude do exposto acima, antes de prosseguir com os objetivos principais do estudo, foram preliminarmente alterados alguns parâmetros relacionados aos procedimentos, materiais e condições de cultivo. A seguir serão apresentados os resultados de cada uma das alterações realizadas, até a efetiva diminuição nos desvios padrão, que permitiu a continuidade dos estudos com a espécie. Nem todas as modificações propostas mostraram-se eficazes para aumentar a precisão das medidas, mas, ainda assim, todas as possibilidades testadas são mostradas e discutidas nesta seção, para evidenciar o trabalho realizado.

4.1.1 Alteração do equipamento de quantificação

Um luminômetro de microplacas foi originalmente empregado para medir a BL da espécie *N. gardneri* devido à sua utilização anterior em trabalhos com o fungo *G. viridilucens* (Mendes et al. 2008, Mendes & Stevani 2010). Tal equipamento quantifica os fótons emitidos em até 384 pontos, localizados sobre um suporte que comporta as placas de Petri. Como essa leitura por “poços” não permite a medição da BL sobre toda a área do micélio, foi investigado se esta técnica de aquisição de dados seria, especificamente para a espécie em estudo, uma possível fonte de erros experimentais. Neste caso, a posição e/ou o número limitado de pontos quantificados pelo luminômetro de microplacas poderiam interferir na intensidade da luz medida em cada replicata - por exemplo, se a BL fosse mais ou menos intensa de acordo com a região do micélio.

Um luminômetro de tubo (Berthold Sirius) foi testado como método alternativo de análise, por permitir a leitura da BL em sua totalidade – neste caso, os resultados são fornecidos não pela somatória de pontos individuais, mas pela quantificação homogênea dos fótons totais oriundos de toda a superfície das placas. Ainda assim, os dados obtidos ao longo de 9 dias de incubação (vide apêndices A e B) evidenciaram que os desvios permaneceram

elevados nas leituras realizadas em ambos os equipamentos - a variação percentual na BL em triplicata foi de 10-238% e 3-200% para os luminômetros de tubo e de microplacas, respectivamente.

Tais dados indicam que o método de medição não foi a principal causa da falta de precisão nas análises. Portanto, ainda que a quantificação da BL em toda a área do micélio seja mais vantajosa do ponto de vista analítico, as leituras com o luminômetro de microplacas foram mantidas nos experimentos posteriores. Isso se deve à inviabilidade de uso do outro equipamento nos bioensaios de toxicidade, pois seria necessário inverter a posição das placas para realizar as leituras (a detecção de luz é feita por baixo). Inevitavelmente, as soluções aplicadas sobre o micélio nos procedimentos do bioensaio seriam derramadas sobre as tampas das placas, afetando as medidas. Alternativamente, o descarte de tais soluções antes das medições implicaria em possíveis alterações na BL quando as placas fossem abertas, devido ao contato direto do micélio com o ar atmosférico externo.

Outra razão para a continuidade de uso do luminômetro de microplacas é dada em virtude da grande quantidade de fótons emitidos pelo fungo *N. gardneri*: em casos com maior emissão de luz (intensidade superior a 20 milhões RLU - “Relative Light Unit”), há uma saturação do detector do luminômetro de tubo, que é mais sensível em relação ao luminômetro de microplacas. Com isso, a intensidade da BL seria limitada em função do equipamento, comprometendo a quantificação dos fótons emitidos nas condições otimizadas para o bioensaio de toxicidade.

4.1.2 Adaptação do suporte de placas do luminômetro

Em estudos anteriores do grupo as medições da BL do fungo *G. viridilucens* foram feitas com o auxílio de um suporte (Mendes et. al 2008, Mendes & Stevani 2010, Mendes 2010), que permite a leitura simultânea de 4 placas de 35 mm fechadas (Figura 7, à esquerda). Este

foi inicialmente utilizado também para o fungo *N. gardneri*, mas a sua BL visivelmente mais intensa (Figura 8) levantou dúvidas quanto à propagação dos fótons em áreas vizinhas, correspondentes a regiões ocupadas por diferentes micélios.

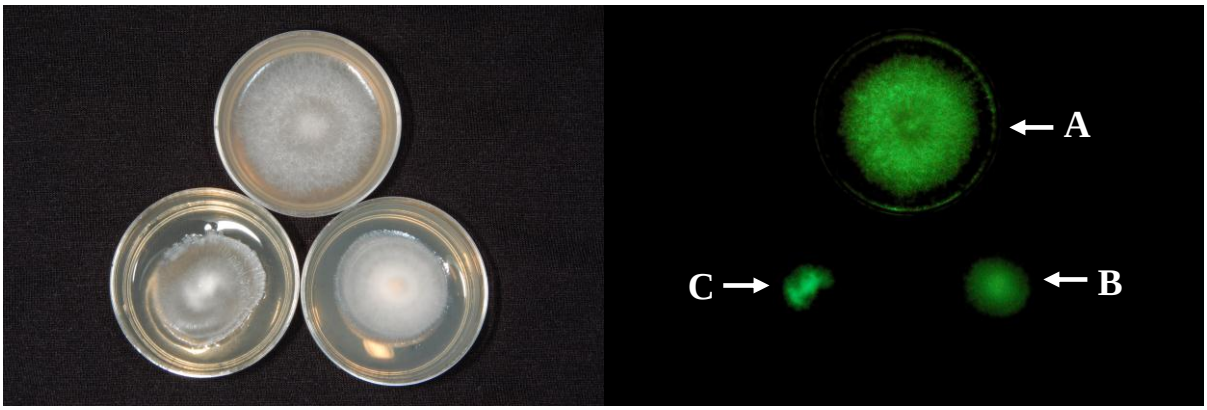


Figura 8. Micélios dos fungos *N. gardneri* (A), *G. viridilucens* (B) e *Mycena lucentipes* (C) com idades idênticas, inoculados nas mesmas condições de cultura. Fonte: adaptado de Ventura et al. (2015).

A possibilidade de interferência entre as culturas foi confirmada com a fabricação de um novo suporte, elaborado para comportar apenas uma placa de 35 mm na posição centralizada (Figura 7). A BL da espécie *N. gardneri* se propaga ao longo de uma área considerável do suporte (cerca de 30-35%, vide Figura 9). Tal fato mostra que a análise individual das culturas é preferencial para evitar interferências ou perdas de fótons na quantificação da BL, sendo mais confiável do que a medição simultânea dos micélios em posições não centralizadas. Por esse motivo, todos os experimentos das seções a seguir foram conduzidos utilizando o suporte individual de placas, somando todos os 384 pontos sobre o mesmo para obter uma BL total.

Apesar disso, os desvios padrão ainda altos na maior parte dos casos (>20%, chegando a 148%, conforme Apêndice C) indicaram que um fator adicional estaria envolvido na baixa precisão das medidas. Portanto, os experimentos para diminuir ainda mais a variabilidade nos valores de BL prosseguiram, conforme descrito a seguir.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	60	150	130	290	240	220	140	90	150	170	130	170	150	140	140	210	170	190	290	200	130	70	220	120
B	70	150	110	200	180	180	220	240	220	100	90	160	150	190	250	230	220	210	230	250	150	160	220	150
C	220	170	140	180	210	190	250	230	320	290	2060	4771	3730	1140	330	230	260	280	140	170	220	230	150	90
D	120	100	240	240	200	230	170	290	2360	20299	30003	32906	30003	21703	10728	610	310	280	230	270	210	150	200	190
E	130	160	220	240	260	290	350	2000	29180	45868	44198	40848	41622	38012	26429	14324	710	190	290	210	220	280	100	280
F	190	220	240	230	190	360	480	21532	48717	36645	40697	52394	40315	33539	41944	27363	7283	310	300	280	340	320	200	130
G	220	230	220	250	250	300	1330	40335	39440	51648	206534	372044	233332	52545	33700	41511	17762	400	430	310	150	290	190	200
H	120	150	270	190	350	330	3300	47076	33620	123422	515007	990913	654843	117614	33127	46110	20279	840	350	300	170	260	110	120
I	130	220	300	160	200	270	3270	47167	32534	110114	480384	966938	550918	89859	30064	46623	18905	830	170	210	310	140	160	160
J	300	230	350	190	220	370	770	36001	35569	43000	149204	256062	143823	38273	31671	39188	13212	390	350	280	340	140	120	180
K	200	240	180	300	320	270	490	13192	42839	30094	37409	44590	33790	26831	46774	22405	3831	280	230	220	320	210	100	180
L	180	230	260	280	230	330	430	770	17521	42719	37157	35197	35670	41773	26780	7914	370	180	280	220	280	150	220	70
M	140	210	200	250	180	240	370	400	600	6673	19878	24121	21803	13953	3871	470	290	300	370	330	310	260	170	130
N	120	120	200	280	190	280	350	340	530	560	630	1010	780	510	420	350	280	350	150	300	240	180	170	230
O	200	120	160	220	290	180	270	400	380	310	380	360	320	360	350	430	310	350	220	190	120	260	190	120
P	130	180	130	180	260	140	310	220	330	230	280	310	380	320	350	260	280	260	210	250	170	90	140	130

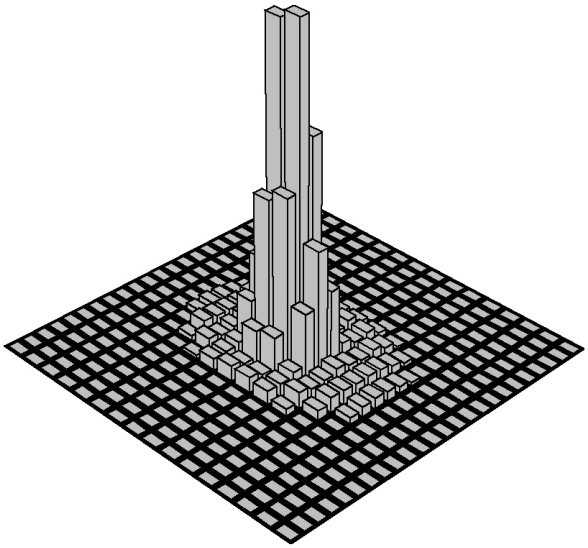


Figura 9. Matriz da distribuição média da BL sobre o suporte individual para placas de 35mm, cultivando o micélio em 32ºC e pH 6. Nota-se que maior parte da luz vem do centro da cultura.

4.1.3 Alteração no tamanho e material das placas

As inoculações para as medidas de BL foram feitas também em placas de 60 mm, para verificar se, crescendo em uma área maior, as culturas sofreriam menos interferência do suposto acúmulo de CO_2 produzido pelo organismo. Adicionalmente, buscou-se avaliar se o perfil de emissão de luz se manteria em patamar máximo mais constante em virtude da maior superfície para a expansão do micélio. O que foi observado desde o início, mesmo com os desvios padrão elevados, é que a BL apresenta um crescimento rápido, decrescendo também abruptamente em um período de 24 horas (usualmente). Esta oscilação de valores em curto prazo é imprevisível, impedindo uma condição estável o suficiente para a realização de um bioensaio (Apêndices A-D).

Com base no exposto acima, foi levantada a hipótese de o maior volume de ar no interior das placas de 60 mm resultar em um acúmulo menor ou mais demorado do CO_2 - este gás poderia diminuir a disponibilidade do O_2 para o fungo, diminuindo a BL e influenciando, desta forma, na sua intensidade e precisão. Além disso, as placas maiores contêm mais meio de cultura, o que poderia favorecer a disponibilidade de nutrientes por períodos mais prolongados, além de diluir em maior escala os subprodutos eliminados em processos metabólicos, que poderiam causar diminuição na BL em concentrações altas.

Para as análises, foi fabricado outro suporte individual, específico para as placas de 60 mm, e as leituras foram feitas com as culturas incubadas somente na temperatura intermediária de 25ºC, como forma de teste inicial. Os dados obtidos evidenciaram que o aumento no diâmetro das placas não foi favorável à resolução do problema com os altos desvios, cujos valores percentuais se mantiveram superiores a 20% na maior parte dos casos, variando de 7,1% a 115,2% (Apêndice E). Em comparação com os resultados anteriores, a alteração proposta também não causou uma mudança visível no comportamento da BL (Apêndice F). Foi considerado, então, que a inoculação nas placas de 60 mm não proporciona uma alteração suficiente no volume e área dos meios de crescimento ou na concentração de gases em contato direto com o micélio – ou, ainda, estes fatores não são determinantes para que o fungo passe a emitir luz de forma constante e com precisão entre replicatas.

A alteração no material das placas foi feita de modo paralelo ao aumento de diâmetro, substituindo-se o plástico por vidro. Neste caso, foi levantada a possibilidade do vidro permitir uma menor troca com o ambiente externo, no sentido de impedir mais eficientemente que o vapor de água saia das placas (por exemplo, por difusão). Desta forma, seria mantida uma maior umidade interna em contato com o micélio ao longo da incubação, favorecendo, em teoria, a sua emissão de luz.

Um teste inicial foi feito com placas de vidro de 60 mm, incubando o fungo na

temperatura de 25ºC e em meios com pH 6. Os resultados indicaram que os desvios foram, em média, menores do que nos demais casos com as placas de mesmo diâmetro. Ainda assim, as variações percentuais mantiveram-se acima de 20% na metade dos casos (variando de 11,7% a 40,5%, conforme Apêndice E).

Por se tratar de um material de uso menos prático e quantidade mais limitada no laboratório, em um primeiro momento não foram testadas mais condições além da supracitada. No entanto, para uma resposta conclusiva acerca da melhoria ou não na precisão das medidas com as placas de vidro, seria necessário repetir os procedimentos testando mais condições de cultura. Entretanto, antes que tais experimentos pudessem ser continuados, o melaço utilizado nos trabalhos, doado gentilmente pela Usina São José da Estiva (USJE, Novo Horizonte – SP), foi totalmente consumido e necessitou ser substituído. O prosseguimento da investigação sobre as causas da variabilidade na BL passou a depender, então, da adaptação e teste de novas fontes de carbono, conforme abordado na seção 4.1.4.

Em todo caso, as placas de 35 mm continuaram a ser utilizadas nos ensaios posteriores, já que com estas havia menor tempo de espera para crescimento. Além disso, a emissão de luz para locais fora da área do suporte (ou seja, fora da área de alcance do detector do equipamento) era mais comum nas placas de 60 mm. Consequentemente, a sua aplicação em bioensaios se tornaria mais desvantajosa, devido à possível diminuição na intensidade da BL quantificada pelo luminômetro.

4.1.4 Alteração no melaço

O melaço de cana doado pela USJE é a fonte de carbono utilizada em todos os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Bioluminescência de Fungos do IQ-USP (LBF). Por não ser um produto comumente comercializado, após o seu consumo total buscou-se outras fontes de carbono que fossem mais acessíveis aos que tivessem interesse em reproduzir as metodologias

desenvolvidas no LBF. Como alternativa, foram testados melados de cana alimentícios.

Para fins de nomenclatura, a ANVISA (2005) define melado como “o produto obtido pela concentração do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) ou a partir da rapadura derretida”. O melaço, por sua vez, é definido pela mesma agência como “um subproduto resultante da produção de açúcar” (ANVISA 2005). Apesar dessa diferenciação, optou-se por utilizar os melados de cana nos meios de cultura porque estes são facilmente encontrados no mercado e, em comparação com outras fontes de carbono, possuem características mais semelhantes às do melaço utilizado originalmente. Além disso, esses produtos são fabricados dentro de especificações padronizadas, com maior controle na sua composição e concentração total de açúcares. Foram testados os produtos das marcas Superbom® e Homemade®, mas ambos resultaram em crescimentos menores, acompanhados de uma diminuição na BL e um aumento brusco na produção de melanina (Figura 10).

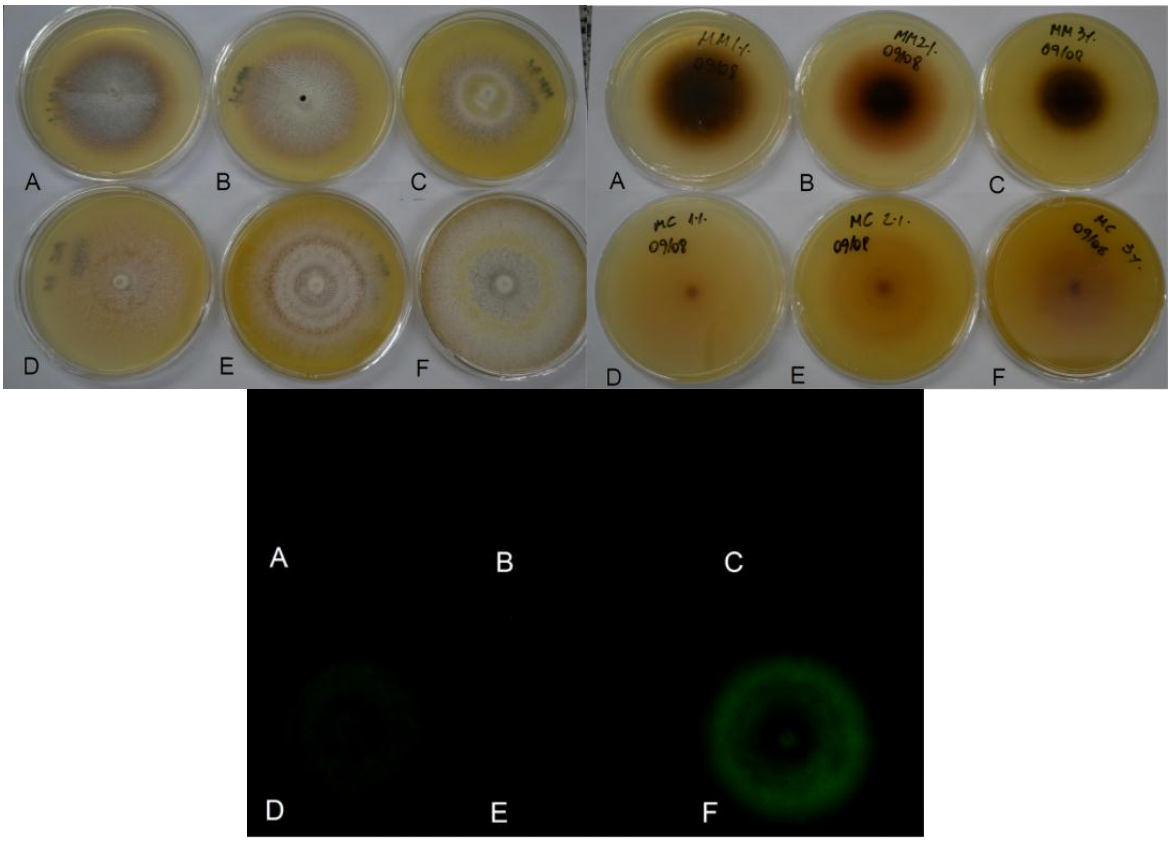


Figura 10. Culturas de *N gardneri* após 14 dias de inoculação sob 25ºC em meios de pH 6 contendo melado da Homemade® nas concentrações de 1% (A), 2% (B) e 3% (C) e melado da USJE nas concentrações de 1% (D), 2% (E) e 3% (F).

A melanina é um pigmento liberado pelo fungo como indicativo visível de estresse e auxilia na sobrevivência dos organismos em condições consideradas agressivas (Gadd 1993). Apesar da forte pigmentação, o pH do meio, que é um dos fatores que poderiam implicar na produção do composto supracitado como mecanismo de defesa, não foi alterado significativamente entre os produtos testados: manteve-se em cerca de 5,5 para os melados comerciais e 6,02 para o melaço doado pela USJE. Na tentativa de adaptar o fungo à nova composição dos meios de cultura, foram feitas mais de quatro inoculações a cada 15 dias, não havendo diminuição na pigmentação e crescimento mais acentuado do micélio. Isso indica que algum outro componente, em excesso ou em falta, pode ter causado a reação de defesa no fungo.

Os melados, voltados ao consumo humano, são visivelmente menos viscosos e possuem uma coloração mais clara do que o melaço utilizado originalmente neste trabalho. Isso indica que o produto doado pela USJE, naturalmente considerado um subproduto de processo, provavelmente não passou pelos mesmos procedimentos de refino e tratamento. Este fator pode implicar em diferenças na pureza e, consequentemente, na concentração de nutrientes em ambos os produtos (melados e melaço). Neste sentido, uma possível explicação para os resultados obtidos com os melados é a sua composição, que para atender às especificações de consumo humano, pode conter quantidades diferentes de sacarose e/ou outros compostos essenciais ao desenvolvimento fúngico. Vale ressaltar, ainda, que de acordo com a ANVISA (1978; 2005) não há especificação para a quantidade de sacarose em melados. Em consulta às empresas, apenas a Homemade® deu retorno, confirmando que essa característica não é utilizada como controle de qualidade.

Com os resultados apresentados acima, ficou evidente que não seria possível utilizar os melados como fontes de carbono. Pela mesma razão, dado que o estresse nas culturas era evidente, não foram conduzidas medições de BL com os produtos comerciais. Para o

prosseguimento do trabalho, optou-se pela utilização de um novo melaço com especificações semelhantes ao empregado originalmente, novamente doado pela USJE. Foram controlados o BRIX (sólidos solúveis, 83,40%); POL (teor de sacarose aparente, 49,21%); acidez (5,6 gL^{-1}); pureza (relação POL/Brix, 59%) e A.R.T. (açúcares redutores totais, 60,65%) – para melados alimentícios, as características físico-químicas mínimas geralmente controladas são diferentes, consistindo em umidade, acidez em solução, sólidos solúveis (BRIX), glicídios totais e resíduos minerais.

4.1.5 Diminuição do teor de água sobre os meios

Os ambientes com umidade elevada são geralmente mais favoráveis ao crescimento e sobrevivência fúngica. De forma compatível, Deheyn e Latz (2007) argumentam que a água pode ser um fator limitante no que diz respeito à solubilidade de reagentes envolvidos no processo de emissão de luz pelos fungos. Resultados apresentados pelos mesmos autores mostraram que, de fato, a BL aumenta significativamente e de forma instantânea com a adição de água sobre micélios encontrados na superfície de lascas de madeira. Do mesmo modo, no bioensaio desenvolvido para a espécie brasileira *G. viridilucens*, a adição de 500 µL de água destilada sobre os meios de cultura no momento da inoculação mostrou-se essencial para a repetitividade do método, indicando que a hidratação do micélio é essencial para evitar variações na emissão de luz (Mendes 2010, Mendes & Stevani, 2010).

Com base nos resultados obtidos por estes últimos autores, assumiu-se em um primeiro momento que a necessidade de hidratação da espécie *N. gardneri* era semelhante à do fungo *G. viridilucens*. Entretanto, progressivamente, os micélios passaram a crescer menos e com maior assimetria radial. Isso se tornou mais evidente após as alterações no melaço, especialmente nos casos em que havia maior quantidade de água não evaporada em contato direto com o micélio em desenvolvimento.

Levando em consideração tais observações, foram realizadas medições da BL em micélios cultivados à 25ºC e pH 6, desta vez sem a adição de água sobre os meios de cultura no momento da inoculação. Os resultados mostraram, finalmente, um aumento na precisão das medidas (Tabela 5). A diminuição dos desvios a valores usualmente inferiores a 15% foi um indício de que a hidratação excessiva foi a principal causa da variabilidade na emissão de luz entre replicatas. Uma possível explicação para isso é que a água em excesso, ao ser absorvida pelo fungo, pode ter causado a ruptura de paredes e/ou membranas celulares, influenciando negativamente na emissão de luz e sua repetitividade (Carlile et al. 2001).

Tabela 5. Valores de BL e respectivos desvios percentuais obtidos ao longo de 33 dias (n = 4), incubando o micélio em placas de 35 mm à 25ºC e pH 6 sem adição de água.

Dia	(BL ± SD)x10^6	SD (%)
0	0,3 ± 0,1	17,1
4	1,3 ± 0,1	6,8
5	2,3 ± 0,3	11,3
7	9,5 ± 0,9	9,4
11	19,5 ± 1,2	6,1
12	20,1 ± 2,0	9,8
13	20,6 ± 2,1	10,4
15	25,7 ± 1,7	6,8
18	19,5 ± 2,5	12,9
19	20,6 ± 1,6	7,7
20	17,0 ± 1,8	10,5
24	19,7 ± 2,0	10,4
25	19,4 ± 2,4	12,2
26	20,8 ± 2,2	10,6
28	24,3 ± 1,4	5,9
32	30,0 ± 6,3	21,1
33	31,8 ± 4,3	13,4

Além da diminuição dos desvios experimentais, foram observadas também mudanças no

perfil da BL. Ao contrário do que era obtido anteriormente, a BL apresentou flutuações menores em função do tempo de inoculação, o que configura uma condição mais estável e previsível (Figura 11). Este comportamento, combinado com a intensidade da BL, representa uma característica favorável ao desenvolvimento do bioensaio. Com adição de água, a emissão de luz cessa a partir do 7º dia, em média. Nas mesmas condições, porém sem a adição de água, é possível quantificar uma grande quantidade de fótons mesmo após 30 dias, e a luz mantém-se relativamente constante entre os dias 11 e 26.

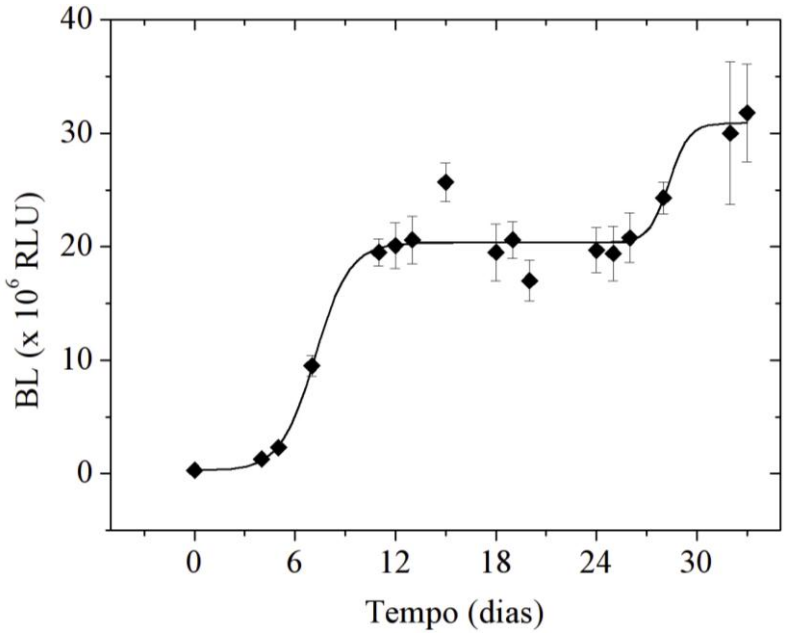


Figura 11. Perfil de bioluminescência do micélio inoculado em placas de 35 mm e cultivado à 25ºC sem adição de água sobre os meios de pH 6 (n = 4).

Vendo o resultado obtido, é possível tentar racionaliza-lo em termos do habitat que vivem as duas espécies de fungos. Enquanto o fungo *G. viridilucens*, que necessita da adição de água, cresce na Mata Atlântica, onde a umidade é bastante alta e a precipitação média é também elevada; o fungo N. gardneri cresce na Mata dos Cocais, cujo ambiente é muito mais árido. Com uma elucidação inicial acerca das características do fungo em estudo, medições da BL em outras condições de incubação foram conduzidas em uma próxima etapa, que será abordada nos tópicos a seguir.

4.2 Efeitos das condições de cultura sobre a BL

A composição dos meios de cultura e as condições ideais de inoculação variam de acordo com as características intrínsecas de cada espécie. Diante da diversidade de possibilidades para cultivo em laboratório, avaliar a resposta dos fungos em diferentes meios e ambientes é uma etapa essencial para determinar, entre outros fatores, a condição mais propícia ao desenvolvimento da espécie de interesse e entender melhor a fisiologia fúngica e suas características em cada uma das condições testadas, visando o desenvolvimento mais aprimorado de aplicações de interesse (Bermudes et al. 1990, Mendes et al. 2008, Weitz et al. 2001). Para fungos bioluminescentes, estudos nessa área são menos comuns do que os trabalhos desenvolvidos para outros emissores de luz (por exemplo, bactérias). Por esse motivo, conhecimentos acerca das características bioquímicas e fisiológicas ainda são necessários para ampliar a compreensão sobre esses organismos (Deheyn & Latz 2007).

Uma vez identificada a origem da alta variabilidade na BL, foi possível monitorar a emissão de luz variando as temperaturas de incubação, os pHs dos meios e as concentrações de nutrientes. As diferentes condições de cultura foram testadas e ajustadas com base na aplicação específica do fungo em ensaios de toxicidade. Estes são intrinsicamente dependentes dos valores de BL, razão pela qual é necessário um controle mais rígido nos procedimentos de inoculação e incubação, além de um conhecimento prévio acerca do perfil de emissão de luz e demais especificidades da espécie – algumas das quais já previamente identificadas nos ensaios preliminares, abordados na seção anterior.

Flutuações na BL causadas por fatores não relacionados aos efeitos tóxicos dos agentes químicos (por exemplo, associados ao ambiente de crescimento) podem levar a interpretações incorretas dos resultados nos bioensaios. Em função disso, os efeitos das condições de cultura sobre a BL do fungo *N. gardneri* foram avaliados tanto para estabelecer o cenário mais favorável à emissão de luz, quanto para evitar erros que comprometessem os dados de

toxicidade obtidos para a espécie. Por esse motivo, foi avaliado não somente a intensidade da luz emitida, mas também o seu comportamento em cada condição de cultivo.

Buscou-se um perfil onde a BL se mantivesse previsivelmente constante ao longo do tempo – ou seja, em uma fase estacionária. Esta, por não apresentar mudanças acentuadas na intensidade, representa uma potencial vantagem no estudo com fungos bioluminescentes, em especial quando se trata de espécies pouco estudadas, cujas especificidades não são amplamente conhecidas. Assim, na fase estacionária é mais fácil identificar variações atípicas nos níveis da BL e impedir que as alterações de luz normalmente causadas pela exposição do micélio a compostos tóxicos sejam confundidas com o perfil natural de emissão de luz - ou com oscilações relacionadas a quaisquer outros fatores que possam influenciar a BL do fungo e não estejam associados à sua resposta no bioensaio. Além disso, nas fases de crescimento ou decrescimento da BL, a forma como a luz aumenta ou diminui pode ser mais dificilmente prevista e reproduzida entre diferentes séries de experimentos, podendo afetar a exatidão ou a interpretação dos resultados.

Na fase estacionária, por outro lado, ainda que a intensidade não seja exatamente a mesma entre diferentes experimentos, a inclinação da curva no perfil de BL é menos sujeita a variações e, desta forma, há um controle mais eficaz de possíveis erros na representação dos resultados. De fato, os principais bioensaios de toxicidade conhecidos atualmente com fungos bioluminescentes foram conduzidos em fases tardias do crescimento exponencial (logo antes da BL decrescer) ou no período em que a emissão de luz manteve-se relativamente estável (Weitz et al. 2002, Mendes & Stevani 2010).

Em relação às condições de cultivo, o pH dos meios de cultura e a temperatura de incubação foram identificados como os dois fatores mais significativos na variação da BL da espécie *G. viridilucens* (Mendes et al. 2008). De modo semelhante, estes fatores também foram apontados como relevantes para a alteração dos valores de BL fúngica das espécies

Armillaria mellea, *Mycena citricolor*, *Omphalotus olearius* e *Panelus stipticus* (Weitz et al. 2001). Desta forma, tais condições foram as primeiras a serem analisadas neste estudo, sendo variadas individualmente e em todas as combinações possíveis. Desta vez, foram testadas as temperaturas de 25, 30 e 35ºC e pH 4, 6 e 8 não tamponados. Os perfis de BL (Figura 12) mostram que praticamente não há emissão de luz em 35ºC em todos os pHs avaliados. Do mesmo modo, não foi observado crescimento do fungo nesta condição. Nas demais temperaturas, os valores de BL foram maiores, principalmente nos meios com pH 6.

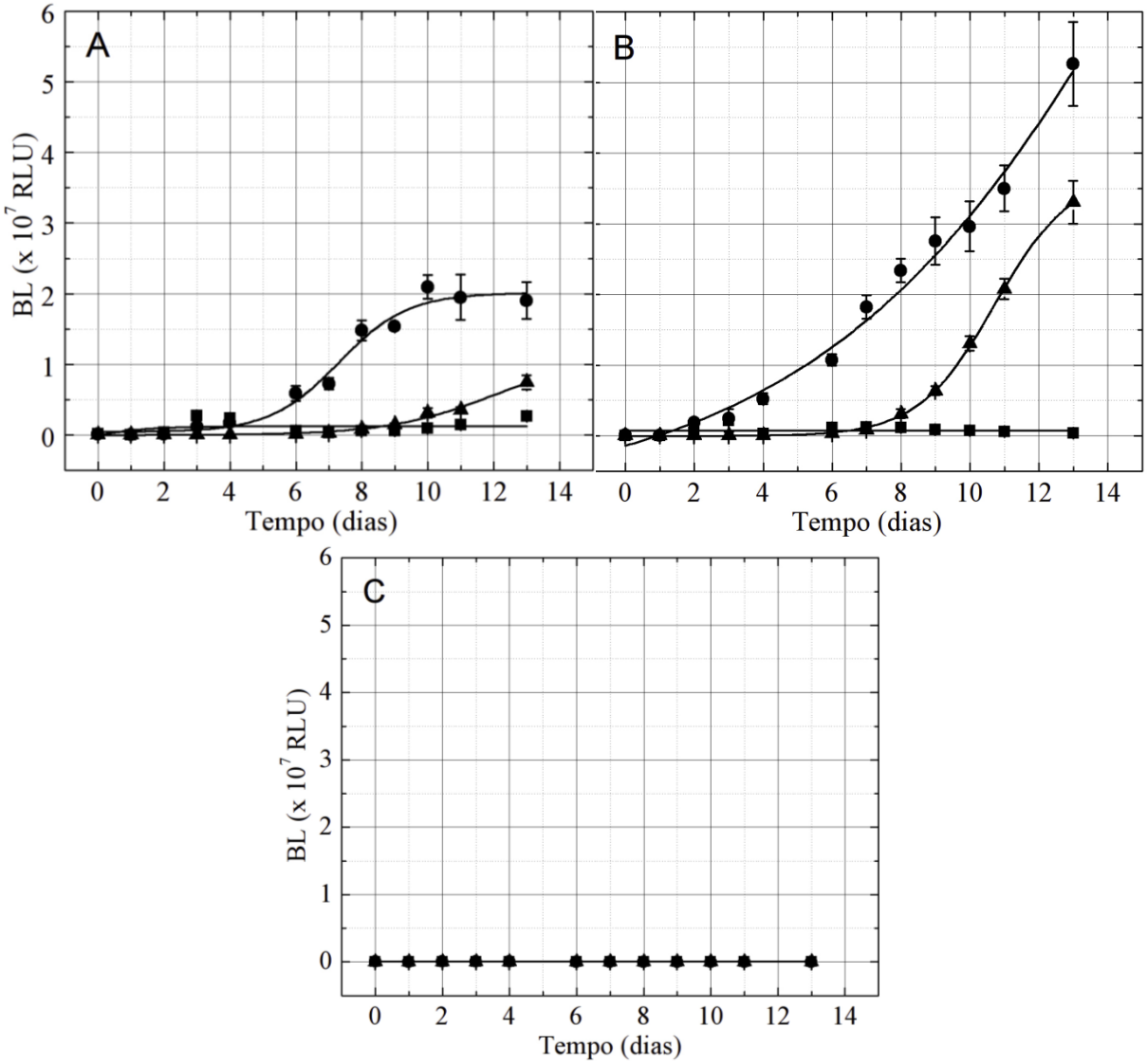


Figura 12. Perfis de BL da espécie *N. gardneri* em 25ºC (A), 30ºC (B) e 35ºC (C) e meios de cultura não tamponados com pH 4 (■), 6 (●) e 8 (▲), mantendo-se 1% de melaço de cana e 0,1% de extrato de levedura (n=4). Fonte: Ventura et al. (2015).

Os maiores desvios percentuais entre as replicatas foram encontrados nos meios de pH 4 (Apêndice G), e estão possivelmente associados à resposta de defesa do micélio à acidez dos meios. Nesta condição, observou-se uma produção intensa de melanina, de forma semelhante ao que era obtido também nos experimentos preliminares conduzidos neste mesmo pH (com e sem tampão) a 25ºC ou 32ºC. Conforme já discutido anteriormente (seção 4.1.4), a pigmentação indica uma reação visível de estresse nas culturas que, em complemento com a menor emissão de luz pelo fungo, pode ter ocasionado os desvios mais elevados encontrados em algumas das medições. Pelas mesmas observações, os meios tamponados de pH 4 não foram testados nos experimentos desta seção, considerando, ainda, que a melanina secretada neste caso poderia ser prejudicial ao bioensaio, já que poderia diminuir a biodisponibilidade dos metais testados.

Tendo em vista os resultados mostrados acima, as análises seguintes foram conduzidas mantendo o pH dos meios de cultura em 6 e as temperaturas de 25ºC e 30ºC. Estas condições foram utilizadas no prosseguimento do estudo por favorecerem uma emissão de luz maior ou dentro de um perfil mais comportado (de acordo com o pretendido para a finalidade em questão). Assim, dentro deste raciocínio, enquanto que os fótons foram emitidos mais intensamente nos micélios incubados em 30ºC e pH 6, o perfil de BL do fungo apresentou uma fase estacionária entre o 10º e o 13º dia de incubação quando cultivado sob 25ºC no mesmo pH. Nesta condição, a luz manteve-se em uma média de $(2{,}0 \pm 0{,}1) \times 10^7$ RLU ao longo do período supracitado, implicando em uma maior estabilidade na BL. Esta, por sua vez, permite associar mais facilmente e de modo mais direto quaisquer alterações na luz aos possíveis efeitos tóxicos dos agentes químicos testados nos bioensaios, conforme já discutido anteriormente. Em pH 4 ou 8, por outro lado, a intensidade ou as características de emissão da luz não mostraram as mesmas vantagens para a aplicação de interesse – nestes casos, os desvios também foram maiores com maior frequência.

Dentro das condições selecionadas de pH e temperatura, os parâmetros variados em seguida para avaliar o comportamento da BL foram as concentrações das fontes de nitrogênio (0,02%; 0,1% e 0,5% de extrato de levedura) e de carbono - 0,2%; 1% e 5% de melaço de cana (Figura 13).

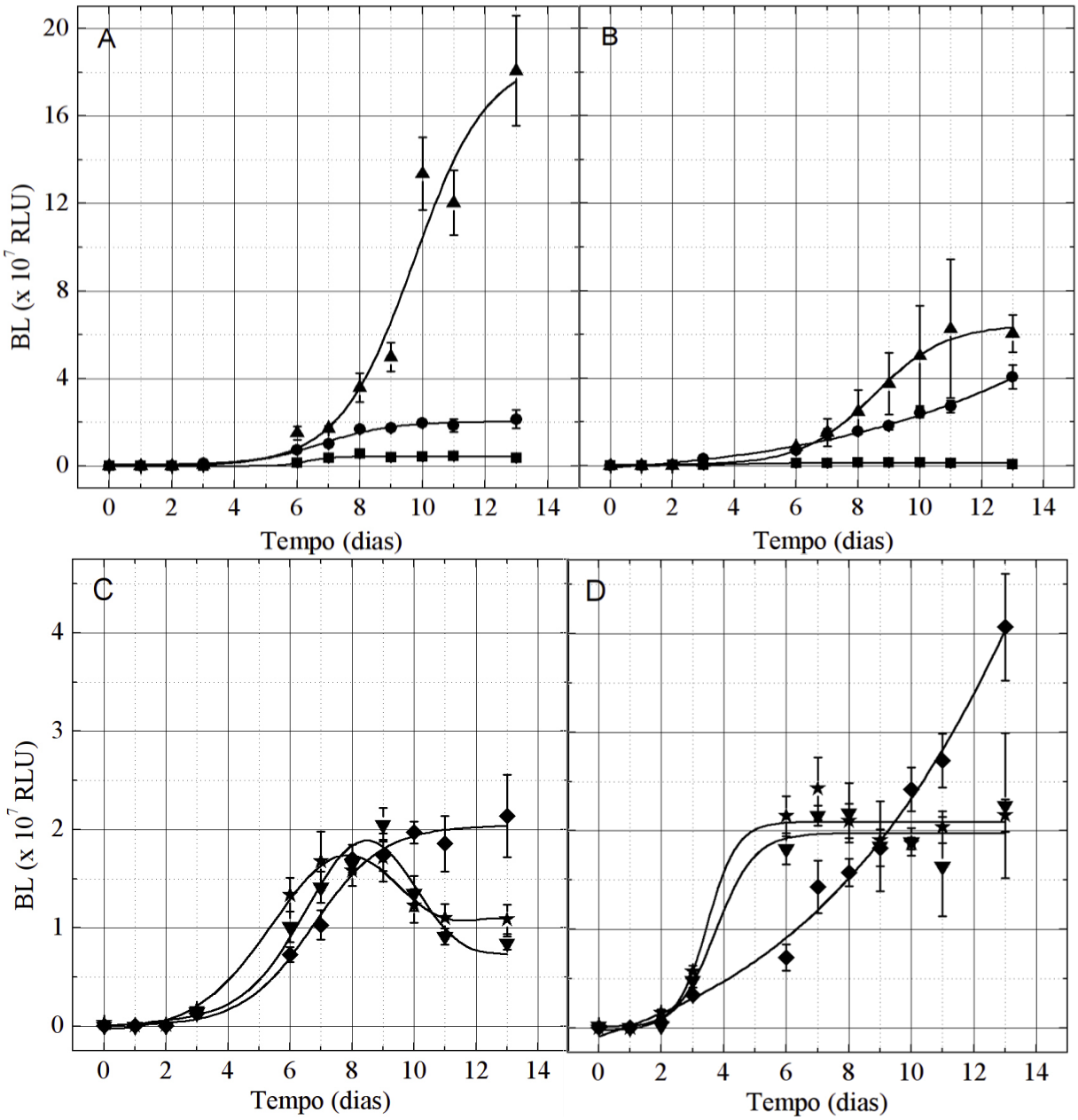


Figura 13. Perfis de BL da espécie *N. gardneri* em meios de pH 6 a 25ºC (A e C) e 30ºC (B e D), variando a concentração de melaço em 0,2% (■), 1% (●) e 5% (▲) e extrato de levedura em 0,02% (★), 0,1% (♦) e 0,5% (▼) (n=4). Fonte: Ventura et al. (2015).

Os perfis de BL evidenciam que, do ponto de vista da intensidade de emissão de luz, a

melhor condição foi encontrada incubando o micélio sob 25ºC em meios de pH 6 contendo 5% de melaço e 0,1% de extrato de levedura (Figura 13A). Apesar disso, com base na aplicação específica de interesse, as condições mais favoráveis foram encontradas no cultivo do fungo em meios com 0,02% ou 0,5% de extrato de levedura, mantendo a temperatura em 30ºC e a concentração de melaço em 1% (Figura 13D) – em ambas as situações, a BL foi mantida em um platô entre o 6º e o 13º dia de cultivo (Apêndice H).

Na fase estacionária correspondente à maior concentração da fonte de nitrogênio, a BL média entre os dias foi de $(2,0 \pm 0,2) \times 10^7$ RLU, enquanto que na concentração menor, de 0,02%, este valor foi mantido em cerca de $(2,1 \pm 0,2) \times 10^7$ RLU. Nestas duas condições, foi observado também que, apesar da intensidade ser menor do que em outros perfis de BL, a fase estacionária se inicia em menos tempo quando comparada com a condição mostrada nas Figuras 12A e 13A, equivalentes ao cultivo do fungo sob 25ºC em pH 6 e meios contendo 1% de melaço e 0,1% de extrato de levedura. Apesar de a intensidade da BL não apresentar grandes variações entre as duas condições com o melhor perfil, optou-se por desenvolver o bioensaio de toxicidade cultivando o fungo a 30ºC em meio com pH 6, 1% de melaço e 0,02% de extrato de levedura (Figura 14). Neste caso, os desvios percentuais foram menores ao longo da fase estacionária. Além disso, ainda que de modo sutil, há menor gasto de matéria prima em relação à outra condição possível, que requer 0,5% do extrato de levedura.

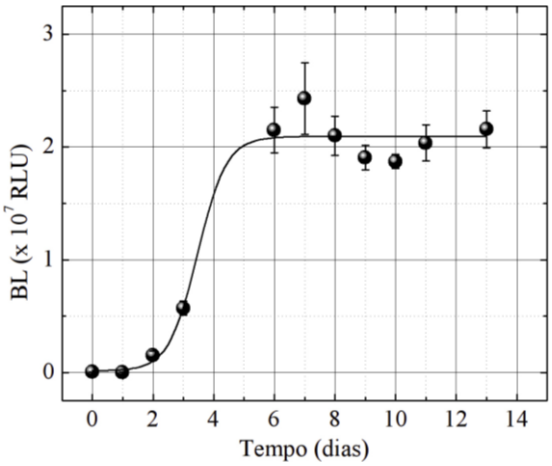


Figura 14. Perfil de BL da espécie *N. gardneri* inoculada a 30ºC, em meio com pH 6, 1% de melaço; 2% de ágar e 0,02% de extrato de levedura. Fonte: Ventura et al. (2015).

Em alguns dos cenários testados foram observados desvios superiores a 20%, em especial quando foram variadas as concentrações de melaço em 30ºC (Apêndice G). Considerando que não foram observados desvios semelhantes em todas as situações, essa variação nos valores de emissão de luz pode ter sido o resultado de uma baixa adaptação do fungo às condições tanto de falta quanto de excesso de melaço na temperatura em questão. Alternativamente, pode ter sido decorrência de uma variabilidade natural dentro das condições nutricionais e ambientais específicas às quais o fungo foi submetido. Os demais casos de desvios mais elevados, superiores a 20%, foram pontuais, sendo geralmente obtidos no início ou no fim do período de incubação. Quando no início, os mesmos podem ter ocorrido em função da adaptação do fungo após um estresse inicial causado pela manipulação do micélio e das placas nos procedimentos de inoculação e medição da BL. Já no final, podem ser resultado de uma resposta natural da exposição aos metabólitos acumulados nos meios e/ou ao consumo de nutrientes após certo período de crescimento.

Embora menos usuais, alguns dos trabalhos publicados para fungos bioluminescentes são destinados ao estudo dos efeitos das condições de cultura sobre a emissão de luz e, em alguns casos, também o crescimento. Nestes estudos, os fatores mais comumente variados na otimização de meios de cultura são o pH, a temperatura de cultivo e alguns nutrientes que atuam como fontes de carbono e de nitrogênio (Tabela 6). De modo compatível com as condições gerais de crescimento fúngico expostas nas seções 1.3.1 e 1.3.2, tais trabalhos indicam uma maior emissão de luz em meios mais ácidos ou neutros, com pH entre 3 e 6 e temperaturas ótimas amenas, em torno de 22-25ºC. As fontes de carbono mais utilizadas incluem melaço de cana, dextrose de batata e extrato de malte, entre outros açúcares, geralmente monossacarídeos e dissacarídeos. Já os demais nutrientes, adicionados como fontes de nitrogênio, consistem em extrato de levedura; fosfato de amônio dibásico; peptona e asparagina (Weitz et al. 2001, Bermudes et al. 1990, Mendes et al. 2008, Prasher et al. 2012,

Stevani et al. 2013).

Tabela 6. Condições de cultivo otimizadas em trabalhos publicados sobre os efeitos da sua variação na emissão de luz.

Espécie	Nutrientes	pH	Temp.	Meio de cultura	Ref.
Panellus stipticus	C: extrato de malte N: peptona	3,5 (T)	22ºC	Líquido	Weitz et al. (2001)
Omphalotus olearius	C: extrato de malte N: peptona	3,0 (T)	15ºC	Líquido	
Mycena citricolor	C: extrato de malte N: peptona	5-6 (T)	22ºC	Líquido	
Armillaria mellea	C: extrato de malte N: peptona	3,5 (T)	22ºC	Líquido	
P. stipticus	C: pectina, lactose, maltose, glicose, celobiose ou trealose N: amônio ou L-asparagina.	3,8 (T)	22ºC	Sólido	Bermudes et al. (1990)
G. viridilucens	C: melaço de cana N: extrato de levedura	6,0 (S)	25ºC	Sólido	Mendes et al. (2008)
P. stipticus	C: glicose N: peptona	4,0 (T)	24ºC	Sólido e Líquido	Prasher et al. (2012)
N. gardneri	C: melaço de cana N: extrato de levedura	6,0 (S)	30	Sólido	Ventura et al. (2015)

C: Fontes de carbono; N: Fontes de nitrogênio; (T): meios tamponados; (S): meios sem tampão.

O melaço de cana é menos usualmente empregado para o cultivo de fungos bioluminescentes, mas foi mantido neste trabalho em decorrência da riqueza de nutrientes em sua composição. Além de possuir sacarose, frutose, glicose e rafinose como fontes de carbono, são encontrados neste produto minerais (entre eles, fósforo, sódio e enxofre), metais em níveis traço e vitaminas (Walker & White 2005). No entanto, apesar dessa variedade, os compostos de nitrogênio presentes no melaço são não assimiláveis pelo fungo, havendo a necessidade de suplementar os meios de cultura com fontes adicionais deste elemento essencial. Para esse propósito, foi utilizado o extrato de levedura, já que o mesmo possui

também uma série de constituintes celulares, entre enzimas, proteínas e compostos presentes em paredes celulares de leveduras, incluindo glucano e glicoproteínas (Murphy & Horgan 2005).

Em comparação com os trabalhos já publicados sobre a otimização das condições de cultivo para fungos bioluminescentes, a espécie *N. gardneri* possui características parecidas quanto à maior emissão de luz em temperaturas amenas – neste caso, em torno de 25ºC. O seu desenvolvimento intenso também em temperaturas maiores, de 30-32ºC, indica uma adaptação natural em função do seu habitat de origem, de clima tropical e semiárido. De forma compatível, em Teresina, PI, próximo de onde o fungo é encontrado, a temperatura média compensada anual entre 1961 e 1990 foi de 27 ± 1ºC. Para os meses tipicamente mais quentes do ano, de agosto a janeiro, a média no mesmo período manteve-se em 28 ± 1ºC (Ramos et al. 2009).

Quanto ao pH, de forma semelhante ao mostrado na Tabela 6, os meios ácidos, apesar de serem mais próximos da neutralidade, favoreceram uma maior BL do fungo *N. gardneri*. Entretanto, diferentemente da predominância de pHs ótimos iguais ou inferiores a 4, a espécie não apresentou a mesma emissão de luz ótima nestas condições. De fato, em experimentos preliminares conduzidos pelo grupo na Fazenda Cana Brava (em Altos, PI), onde os cogumelos da espécie *N. gardneri* foram efetivamente localizados e coletados, o pH medido com um pHmetro de solo permaneceu na faixa de 5-6, indicando certa compatibilidade entre o habitat natural da espécie e os resultados obtidos no presente trabalho.

Uma explicação para a menor emissão de luz em pH 4 não-tamponado pode ser dada também em função da acidificação adicional dos meios, comumente causada pela secreção progressiva de metabólitos (*e.g.*, ácidos orgânicos, como o ácido oxálico) que se acumulam à medida que o fungo se desenvolve (Walker & White 2005). Neste sentido, uma variação no pH dos meios de cultura ao longo do tempo de incubação foi encontrada também para o fungo

G. viridilucens, apesar de ter sido observada uma diminuição na acidez ao invés de um aumento, possivelmente devido à secreção de amônia ou outros compostos alcalinos como característica específica desta espécie (Mendes et al. 2008). Os autores obtiveram um aumento de uma unidade do pH e, após 12 dias de incubação, esse valor manteve-se constante, em um platô que foi associado ao decréscimo da BL, uma vez que ambos ocorreram em períodos de tempo coincidentes.

Com base nisso, mediu-se o pH das seções superiores e inferiores dos meios de cultura para verificar se os produtos secretados pelos fungos resultariam em um aumento ou em um decréscimo da acidez dos meios e se seriam difundidos homogeneamente pelo ágar (Tabela 7). Como resultado, foi obtida uma acidificação gradual na condição correspondente à maior emissão de luz do fungo (25ºC, pH 6, 1% de melaço e 0,1% de levedura). O pH, neste caso, atingiu o valor médio de 5,28 ± 0,02 em 13 dias de incubação. O mesmo foi observado na condição considerada como mais adequada para o bioensaio (30ºC; pH 6; 0,02% de extrato de levedura e 1% de melaço), onde o pH obtido no mesmo período foi de 4,97 ± 0,07. A acidificação gradual verificada também nas seções inferiores dos meios de cultura indica que os metabólitos responsáveis pela diminuição do pH são difundidos ao longo do meio de ágar. Além disso, os valores medidos nas seções superiores e inferiores são também próximos entre si, em especial na condição de incubação a ser adotada para o bioensaio, indicando certa homogeneidade na diluição dos metabólitos.

Certa difusão de componentes ácidos pelo ágar foi observada também por outros autores, que atribuíram a acidificação local dos meios de cultura à liberação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular e de dióxido de carbono como consequência da atividade biológica dos organismos. A acidificação pode ser influenciada por fatores como as fontes de nitrogênio e carbono adicionadas ao meio e as características de cada espécie, além do teor de minerais e o pH do substrato em que o fungo é inoculado (Rosling et al. 2004).

Tabela 7. Mudanças no pH dos meios de cultura ao longo do período de incubação (n=3) nas condições em que foi obtida a maior emissão de luz (25ºC com 0,1% de extrato de levedura; 1% de melaço e 2% de ágar) e o melhor perfil de BL para o bioensaio (30ºC com 0,02% de extrato de levedura; 1% de melaço e 2% de ágar).

Dia	pH do meio: condição com maior emissão de luz		pH do meio: condição escolhida para o bioensaio	
	Seção superior	**Seção inferior**	**Seção superior**	**Seção inferior**
0	5,70 ± 0,02	5,70 ± 0,03	5,77 ± 0,04	5,77 ± 0,03
3	5,74 ± 0,09	5,71 ± 0,06	5,68 ± 0,05	5,66 ± 0,05
6	5,33 ± 0,03	5,09 ± 0,10	4,87 ± 0,04	4,80 ± 0,03
7	5,31 ± 0,08	4,91 ± 0,20	4,41 ± 0,04	4,41 ± 0,08
8	5,02 ± 0,02	5,14 ± 0,11	4,50 ± 0,07	4,52 ± 0,05
9	5,15 ± 0,12	4,93 ± 0,11	4,69 ± 0,11	4,64 ± 0,07
13	5,28 ± 0,02	4,92 ± 0,24	4,97 ± 0,07	4,85 ± 0,02

Dentro dos resultados obtidos, admite-se que os meios poderiam se tornar ainda mais ácidos no crescimento em pH 4, desfavorecendo o desenvolvimento do micélio. Entretanto, mesmo quando cultivado em pH 4 tamponado, o fungo mostrou uma visível produção de melanina, indicando que, de todo modo, este nível de acidez não é considerado ideal para o fungo em estudo. Adicionalmente, o uso de tampões para meios ácidos não é prático do ponto de vista experimental, devido à necessidade de autoclavar o ágar separadamente dos demais nutrientes, a fim de evitar a sua hidrólise, o que gera maiores etapas nos procedimentos de preparo dos meios. Há, ainda, uma maior possibilidade de contaminação na manipulação adicional, necessária para a homogeneização de todos os componentes após a autoclavagem.

4.3 Desenvolvimento do bioensaio de toxicidade

4.3.1 Seleção de solventes

O ajuste das condições de cultivo, conforme mostrado na seção anterior, permitiu conhecer o comportamento da emissão de luz da espécie *N. gardneri* dentro do cenário mais favorável à condução do bioensaio. Como próxima etapa, foi necessário estabelecer um

solvente adequado para a diluição dos compostos químicos a serem avaliados quanto à toxicidade na aplicação da metodologia em desenvolvimento. Assim, os experimentos seguintes destinaram-se a conhecer a resposta do fungo em decorrência da exposição a alguns potenciais diluentes, observando os efeitos destes sobre o perfil de BL após o cultivo do micélio durante 7 dias em placas de Petri fechadas. Este tempo de incubação foi selecionado porque, dentro do que foi evidenciado na seção 4.2, é em torno deste período que ocorre uma estabilização na intensidade da luz emitida, sendo obtido um platô com desvios experimentais abaixo de 18% nas medições tanto interdias quanto intradias – conforme já discutido anteriormente, é nesta fase que os testes de toxicidade com o fungo em questão serão conduzidos.

Dentro desta etapa de desenvolvimento do bioensaio, buscou-se no início identificar um composto que dissolvesse satisfatoriamente os agentes químicos sem provocar oscilações ou inibições consideráveis na BL do fungo, visando evitar que os resultados do bioensaio fossem distorcidos e/ou limitados pela variação de luz provocada especificamente pelo solvente adotado. A BL foi monitorada também quando o fungo foi exposto somente ao ar externo às placas de Petri, considerando que este poderia afetar a luz emitida no momento de abertura das placas para a aplicação de soluções. Sem conhecimentos prévios sobre a resposta fúngica nesta situação específica, possíveis variações na emissão de luz em decorrência do contato do micélio com o oxigênio no ar poderiam ser confundidas com eventuais efeitos tóxicos causados pelos diluentes e demais compostos testados, provocando erros de interpretação nos resultados do bioensaio.

Como opções de solventes, foram testadas soluções aquosas de Triton X-100 nas concentrações de 0,01% (com adição de MES 50 mM) ou 0,05% (com e sem adição do mesmo tampão) e uma solução de DMSO, diluído somente em água na concentração de 0,1%. Para evitar maiores variações na BL, todos os procedimentos foram conduzidos abrindo as

placas por cerca de 10-15 segundos apenas para aplicação e espalhamento das soluções sobre os micélios, mantendo-as fechadas ao longo de todo o período de exposição.

A escolha pelo Triton X-100 foi feita para diminuir a tensão superficial da água, aumentando a molhabilidade das soluções aplicadas sobre o fungo, que desta forma são mais facilmente espalhadas por toda a superfície do micélio. Este surfactante foi utilizado com o mesmo propósito para a espécie *G. viridilucens*, não apresentando toxicidade para a mesma (Mendes & Stevani 2010). O MES, por sua vez, é comumente utilizado como tampão biológico não complexante (Kandegedara & Rorabacher 1999), e por tais características foi avaliado para facilitar os procedimentos do bioensaio em caso de ser necessário ajustar o pH das soluções antes de aplicá-las sobre o fungo – variações na acidez poderiam influenciar na luz emitida pela espécie ou na biodisponibilidade dos agentes químicos testados. Já o DMSO foi estudado como alternativa para a diluição de compostos mais lipofílicos, que não sejam solubilizados na solução com Triton X-100 - este solvente é uma opção usual em bioensaios com compostos orgânicos menos solúveis em água, sendo utilizado inclusive para fungos (Haap et al. 2008, Gamliel et al. 1989).

A resposta do fungo quando exposto a cada um dos diluentes e ao ar foi monitorada em diversos períodos dentro de 24h, avaliando os efeitos causados sobre os micélios a partir de alterações no perfil de BL (Figura 15 e Apêndice I). Os resultados mostraram que, após a exposição ao ar atmosférico externo às placas, o fungo apresenta uma diminuição intrínseca na emissão de luz, diferentemente do observado para a espécie *G. viridilucens*, cuja BL aumentou cerca de 50% em 8 horas. A elevação na intensidade da luz emitida é, de fato, o que se esperaria de um organismo que depende de oxigênio para a reação de emissão de luz. Embora não sejam hermeticamente fechadas e, portanto, permitam certa troca com o ambiente externo, a abertura das placas favoreceria uma maior dispersão de gases produzidos pelo metabolismo fúngico e um consequente aumento na disponibilidade de oxigênio, presente no

ar atmosférico externo (Mendes & Stevani 2010).

Não existem estudos que comprovem exatamente o que pode ter ocorrido no caso específico da espécie *N. gardneri*, mas uma hipótese é que a diminuição da BL neste fungo tenha ocorrido devido a uma reação particular de adaptação à mudança da atmosfera de vapores e gases no ambiente de crescimento do micélio. Um exemplo disso seria a substituição de um ar com uma umidade maior, lentamente acumulada em função da evaporação da água homogeneizada nos meios de cultura, por um ar externo mais seco no momento de abertura das placas. A espécie *G. viridilucens*, por outro lado, não teria sofrido o mesmo impacto, possivelmente devido à aplicação de 500 µL de água na superfície dos meios de cultura deste fungo no momento da inoculação, mantendo o organismo em um ambiente constantemente hidratado.

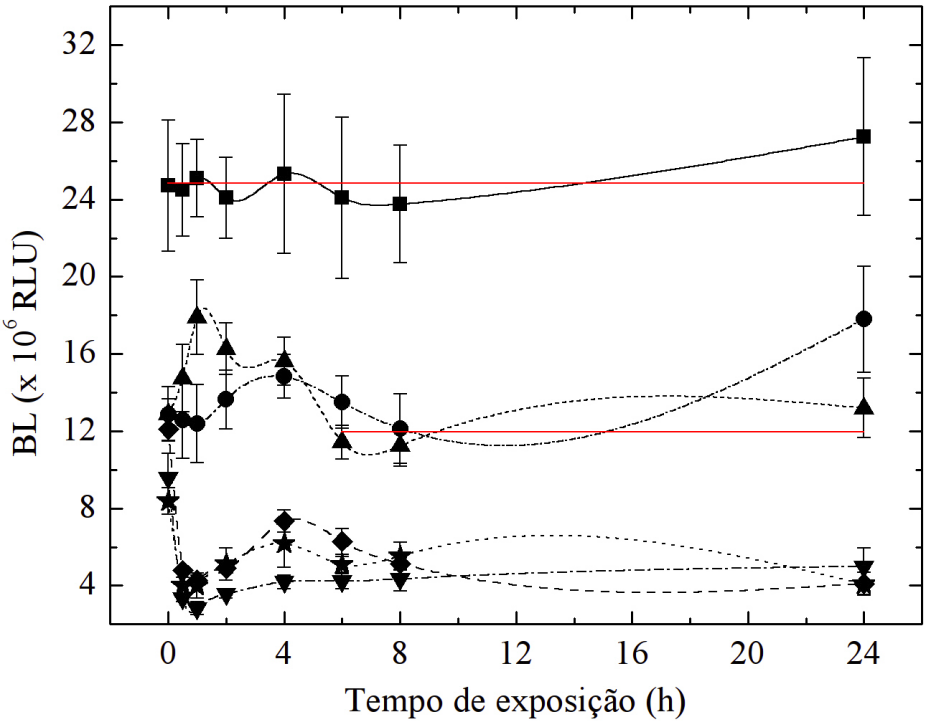


Figura 15. Variação da BL em função do tempo de exposição, avaliando-se as placas sem abri-las (■); após abertura seguida de fechamento com exposição somente ao ar (●) e após aplicação de 500 µL de soluções aquosas de Triton X-100 0,05% (▼), MES 50 mmolL^{-1} em Triton X-100 0,05% (♦), MES 50 mmolL^{-1} em Triton X-100 0,01% (▲) e DMSO 0,1% (★). Em vermelho, a tendência de estabilização da luz nas placas fechadas e na solução de MES em Triton X-100 0,01% (n = 9 para as placas fechadas ou expostas ao ar e n = 3 para as demais).

Apesar da diminuição de cerca de 50% da BL em 30 min após a abertura e fechamento das placas, a intensidade da luz emitida não sofreu mudanças mais bruscas ao longo de 8 h, mantendo-se entre $(12,1 \pm 1,8)\times10^6$ RLU e $(14,8 \pm 1,1)\times10^6$ RLU (Apêndice I e Figura 15). No ponto de 24h, a BL obtida foi de $(17,8 \pm 2,8)\times10^6$ RLU, permanecendo menor em comparação com as placas fechadas, mas subindo a ponto de atingir 65,28% da luz quantificada nestas culturas. Os resultados mostrados na Figura 15 tanto para as placas fechadas quanto para as placas expostas ao ar constituem uma junção dos dados de três experimentos realizados em datas distintas ao longo de 2 meses, totalizando 9 replicatas no total (n = 9). Os desvios percentuais mantiveram-se geralmente abaixo de 16% (Apêndice I), mostrando certa repetitividade da BL ao longo de diferentes inoculações. Neste caso, como a BL se manteve com uma intensidade ainda favorável à condução do bioensaio e com desvios experimentais satisfatórios, a princípio a diminuição observada não impediu o prosseguimento do estudo para o desenvolvimento do bioensaio.

Em relação aos diluentes, foi verificada uma forte diminuição da BL em decorrência da exposição às soluções contendo Triton X-100 0,05% e DMSO 0,1% (Figura 15 e Apêndice I). Em ambos os casos, a luz foi inibida cerca de 77% em 24 horas, utilizando o micélio exposto ao ar como parâmetro de comparação (controle). No perfil de BL dentro do período avaliado, é possível observar uma diminuição visível na intensidade da luz após 30 min, o que demonstra que estes solventes provocam efeitos tóxicos significativos à espécie, e, portanto, não podem ser utilizados nos bioensaios.

O DMSO em concentrações da mesma ordem de grandeza da utilizada neste estudo não causou efeitos tóxicos perceptíveis a diversas espécies de microorganismos, entre fungos, bactérias, protozoários e microalgas (Jay 1996, Gamliel et al. 1989, Bonnet et al. 2008). No entanto, no caso da espécie *N. gardneri*, foi observada uma maior sensibilidade a este solvente. A ação tóxica observada ao organismo é um possível resultado da interação do

DMSO com as membranas celulares, aumentando a permeabilidade das mesmas. Neste caso, a toxicidade pode ter sido potencializada pela sua aplicação direta sobre o micélio ao invés da sua dispersão nos meios com ágar, de forma similar ao encontrado para algumas espécies de fungos ascomicetos (Sharma & Sharma 2011).

Quanto ao Triton X-100, o efeito observado sobre a BL pode ser atribuído à sua quantidade em solução (0,05%, ou 0,80 $mmolL^{-1}$), que está acima da concentração micelar crítica (CMC) de 0,22-0,24 $mmolL^{-1}$ (Sigma-Aldrich). Em valores superiores à CMC, um surfactante passa a formar micelas e não há mais alterações significativas na tensão superficial da solução. Neste caso, entretanto, a parte apolar e hidrofóbica do surfactante pode interagir com grupos de características semelhantes em proteínas e lipídeos de membranas celulares, causando a ruptura destas (Lodish et al. 2014).

O uso do MES impede que haja alterações no pH que possam levar a variações na BL ou na biodisponibilidade dos compostos, e parece não influenciar na toxicidade do diluente - a luz quantificada não foi significativamente alterada com e sem a adição deste composto nas soluções de Triton X-100 0,05% (Figura 15). Por essa razão, o mesmo tampão foi mantido nos testes com as soluções contendo uma concentração menor de surfactante (0,01%, ou 0,16 $mmolL^{-1}$, abaixo da CMC).

Neste caso, a BL quantificada foi comparativamente maior em relação aos outros diluentes testados, confirmando a ação tóxica do Triton X-100 quando aplicado em quantidades acima da CMC. A intensidade da BL manteve-se próxima da luz emitida nas placas expostas ao ar, mas atingiu cerca de 75% em relação a estes controles no tempo de 24h. Uma possibilidade para explicar este resultado, embora não tenha sido acompanhado de um aumento expressivo dos desvios padrão da BL, está associada ao contato do fungo com a água na fase líquida, que em longo prazo mostrou-se pouco favorável ao desenvolvimento da espécie. Além disso, em comparação com as placas onde não houve aplicação de quaisquer

soluções, o recobrimento total do micélio com o diluente pode ter limitado o teor de oxigênio efetivamente disponível para a reação de BL. Adicionalmente, o aumento de luz entre 8h e 24h nas placas expostas ao ar, que contribuiu para a discrepância em relação aos organismos em contato com o diluente, pode ter sido favorecido por um novo acúmulo de vapor de água dentro das placas, ainda que de modo sutil, reestabelecendo uma porção da atmosfera interna original existente no meio de crescimento fúngico.

Com o exposto acima, considerando o cenário em que há a maior BL possível dentro de um comportamento adequado, optou-se por dissolver os agentes químicos em solução de MES com Triton X-100 0,01%. Com este diluente, a luz permanece em uma tendência estacionária a partir de 6 h de exposição (Figura 15), indicando que não há efeitos tóxicos mais significativos no período em que se estima conduzir todos os procedimentos do bioensaio. Antes deste período, entretanto, a maior oscilação na BL poderia potencializar os erros experimentais, representando uma desvantagem à futura aplicação dos testes de toxicidade.

Diferentemente do bioensaio com a espécie *G. viridilucens* (Mendes & Stevani 2010), o fato de a intensidade da BL não ter retornado aos valores iniciais com o fungo *N. gardneri* inviabilizou que as placas fossem controles de si mesmas para a metodologia em desenvolvimento no presente trabalho. Ainda assim, esta desvantagem experimental é compensada, comparativamente, pelo comportamento mais estável do organismo em estudo frente às alterações no equilíbrio das culturas, causadas pela exposição do micélio ao ar ou às soluções aplicadas sobre o mesmo. Como a emissão de luz da espécie é naturalmente elevada, o desenvolvimento do bioensaio foi viabilizado mesmo com as reduções de intensidade da BL observadas no contato do micélio com o ar e com o diluente selecionado. Entretanto, para aumentar a confiabilidade dos resultados, é necessário conduzir os testes com um controle externo, que indique exatamente a variação da BL causada ao fungo pela exposição específica

ao diluente em cada experimento.

É possível perceber que os valores médios de BL em 7 dias de cultivo são próximos entre si ao longo de sucessivas inoculações: com 425 replicatas medidas em 7 experimentos diferentes, conduzidos durante 8 meses, a média dos valores de BL nas placas fechadas foi de $(2,5 \pm 0,2)\times10^7$ RLU (ou seja, desvio de 8,75%). Nas mesmas condições em 8 dias de cultivo, a BL média de 52 replicatas correspondentes a 5 experimentos conduzidos também durante 8 meses foi de $(2,5 \pm 0,4)\times10^7$ RLU (13,93% de desvio). Estes resultados indicam que não houve alterações significativas no perfil de BL no período de incubação adotado para a condução do bioensaio. De modo similar, na exposição ao diluente escolhido para os testes de toxicidade, em 32 replicatas medidas durante 5 experimentos conduzidos em 4 meses, a BL média foi de $(1,7 \pm 0,3)\times10^7$ RLU - ou seja, desvios de 15,89%. Como a luz emitida apresenta valores próximos entre as replicatas, inclusive entre experimentos conduzidos em diferentes datas e com micélios provenientes de diferentes séries de inoculação, o uso de um controle externo foi considerado como viável.

4.3.2 Determinação do tempo de exposição

A determinação do tempo ideal de exposição para o bioensaio foi feita com base na avaliação do período necessário para que um agente tóxico em dada concentração cause 100% de inibição na BL fúngica – ou seja, buscou-se identificar o tempo de contato mínimo requerido para que os efeitos tóxicos resultem na resposta máxima do fungo. Deste modo, a presente etapa de experimentos foi destinada a evitar subestimar a toxicidade dos agentes químicos testados, que poderiam ser considerados menos agressivos ao fungo caso o tempo de exposição fosse insuficiente para uma interação total entre o organismo e o composto aplicado.

Pretendeu-se testar a aplicação do bioensaio com alguns metais e fenóis, lançados no

ambiente principalmente por atividades antropogênicas, conforme abordado na seção de introdução. Por esse motivo, para testar o tempo de resposta da espécie em estudo, foram aplicadas soluções Cu(II) 50mM e fenol 10 mM, representantes de ambas as classes químicas de interesse (Figura 16 e Apêndice J).

Para o composto orgânico, obteve-se uma rápida diminuição da BL, cuja inibição foi de 94% em apenas 30 min de exposição. Entre 4 e 24 horas, essa inibição manteve-se com variações médias inferiores a 1%, sugerindo que o bioensaio poderia ser conduzido em 6 h. Entretanto, os resultados com a solução de Cu(II) mostraram que tal período não é suficiente para que os efeitos tóxicos sejam completos, uma vez que a intensidade da luz continuou a cair mesmo após 6 horas de exposição. Dentro deste cenário, o comportamento da BL inibida mostrou-se como uma característica essencial da espécie na percepção sobre a evolução dos efeitos tóxicos e na escolha do tempo ideal de 24 h de exposição, onde a resposta máxima do fungo foi enfim verificada.

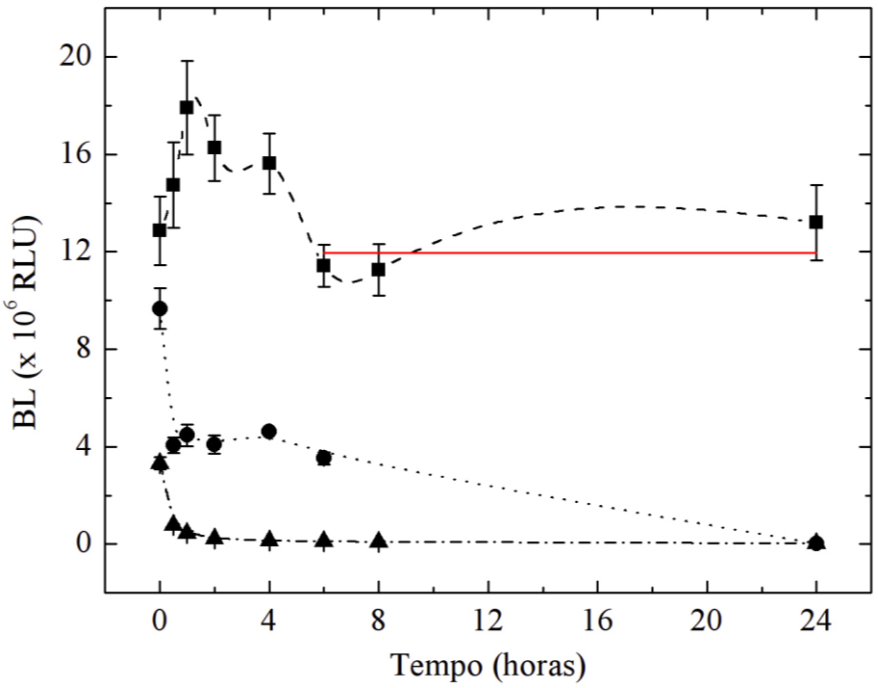


Figura 16. Variação da BL em função do tempo, avaliando-se as placas após aplicação de 500 µL de solução aquosa de MES 50 mmolL^{-1} em Triton X-100 0,01% (■), Cu(II) 50 mM (●) e fenol 10 mM (▲). Em vermelho, a tendência de estabilização da BL com o diluente após 6 h de exposição (n = 3).

A duração do bioensaio com o fungo *N. gardneri* é compatível com a metodologia desenvolvida para as culturas de *G. viridilucens*, cujas características de emissão de luz determinaram um período idêntico de exposição (Mendes & Stevani 2010). Neste caso, entretanto, apesar de a inibição do Cu(II) ser total após apenas 4h, a emissão de luz do micélio exposto ao diluente (controle) não se manteve em um nível estacionário: ao contrário do observado com a espécie em estudo, a luz cresce abruptamente (cerca de 5 vezes em 1 hora) e decresce lentamente, levando 24h para retornar ao valor obtido antes da abertura das placas – daí a escolha por este tempo de exposição.

Para o bioensaio desenvolvido com os fungos bioluminescentes em meios líquidos, por outro lado, o tempo de exposição satisfatório para fenóis e metais foi de apenas 1 h, período a partir do qual não foram obtidas mudanças adicionais nos valores de BL dos fungos expostos aos agentes tóxicos (Weitz et al. 2002). O fato de os meios de crescimento serem diferentes daqueles utilizados para as espécies *G. viridilucens* e *N. gardneri* dificulta uma comparação direta entre os tempos de exposição em cada caso. Todavia, a diferença pode ter ocorrido tanto em função das especificidades de cada espécie quanto por uma questão de maior facilidade de dispersão dos compostos em meios líquidos. Além disso, a forma globular dos micélios utilizados no método desenvolvido e a agitação dos meios antes das análises pode ter viabilizado um contato mais efetivo entre os fungos e os poluentes, gerando uma resposta mais rápida dos organismos.

Em relação aos bioensaios convencionais, que avaliam os efeitos tóxicos principalmente por meio de inibições na biomassa ou diâmetro, uma comparação direta é ainda mais difícil, uma vez que o tempo de exposição aos agentes tóxicos está intrinsicamente relacionado ao período total de cultivo do fungo, que varia em função da magnitude de desenvolvimento do micélio – esta, por sua vez, é alterada também de acordo com os nutrientes nos meios de cultura e as características individuais das espécies, conforme já abordado anteriormente.

4.3.3 Realização do bioensaio de toxicidade

Uma vez estabelecidas as condições de cultivo mais favoráveis à incubação do fungo, assim como identificado um diluente adequado para o preparo de soluções e selecionado o tempo de exposição necessário entre o agente tóxico e o micélio, buscou-se testar a metodologia para a obtenção das curvas de toxicidade de dois fenóis (4-nitrofenol e fenol) e dois metais, Cu(II) e Cd(II). A partir das curvas ajustadas com a função Logistic (Microcal Origin), foi possível calcular o EC_{50} de cada composto, cuja ordem crescente de toxicidade foi fenol < Cu(II) < 4-nitrofenol < Cd(II) (Figura 17 e Apêndice K).

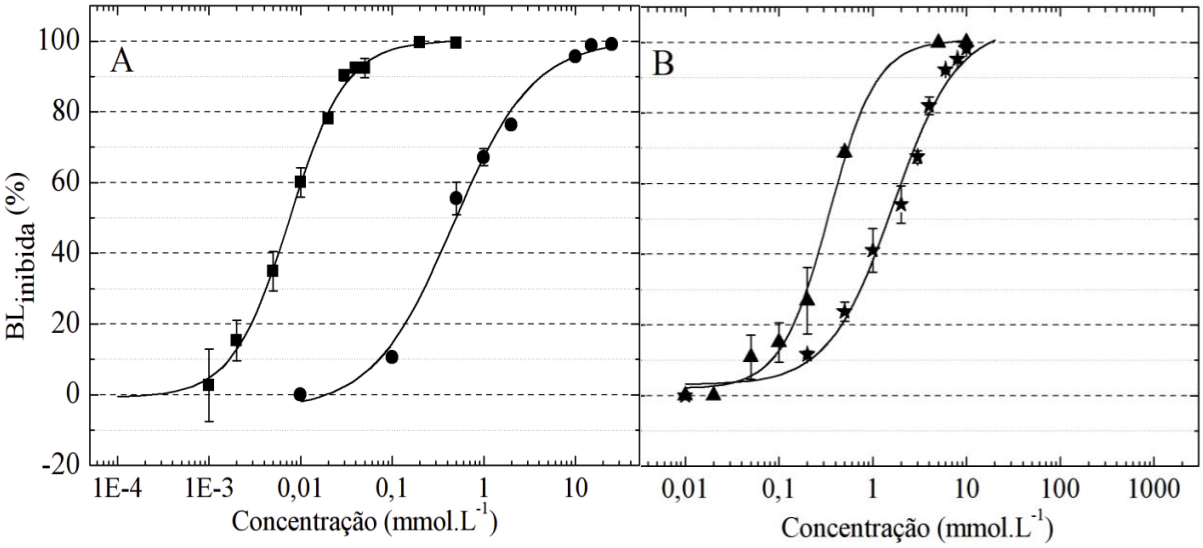


Figura 17. Curvas de toxicidade para os metais (A) e fenóis (B), avaliando cádmio (■), cobre (●), fenol (★) e 4-nitrofenol (▲) (n = 3).

No pH das soluções aplicadas sobre o micélio (pH 6), tanto o fenol (pk_a = 9,98) quanto o 4-nitrofenol (pk_a = 7,16) encontram-se predominantemente na forma protonada. Com isso, há um desfavorecimento de ações tóxicas diretas causadas por reações com íons fenolato ou por ligações iônicas reversíveis com biomoléculas. Neste caso, portanto, um possível mecanismo de toxicidade para estes compostos é dado em função de reações de oxirredução com os constituintes de sistemas biológicos e formação de ligações covalentes entre os fenóis ou seus

derivados (e.g., quinonas) e as biomoléculas (por exemplo, por afinidade com grupos tiol de proteínas e DNA). Tais reações, por sua vez, podem também levar à formação de radicais livres, que afetam as atividades enzimáticas, além de promover a peroxidação lipídica de membranas e a quebra de cadeias de DNA em organismos eucariontes (Appel 1993, Shadnia & Wright 2008).

A lignina possui grupos fenólicos em sua constituição, de modo que é de se esperar que a maior capacidade de decomposição enzimática deste material pelos fungos de podridão branca represente um mecanismo vantajoso na resistência de tais organismos a certos fenóis, entre outros compostos orgânicos. De modo compatível, esta capacidade de degradação foi associada a uma tolerância maior do basidiomiceto *Trametes versicolor* ao fenol, cuja concentração inibitória mínima de crescimento foi de 20 $mmolL^{-1}$ – em comparação com o fungo de podridão parda *Coniophora puteana*, que produz enzimas lacase em menor quantidade, essa concentração foi reduzida pela metade, para 10 $mmolL^{-1}$ (Voda et al. 2003).

O fenol não possui substituintes adicionais que possam aumentar a toxicidade da molécula e que já não estejam normalmente presentes, ainda que em menor escala, no material orgânico decomposto pelo fungo. O grupo nitro do 4-nitrofenol, por outro lado, além de reagir diretamente com as biomoléculas, pode ser reduzido para gerar um grupo nitroso mais reativo. Um estresse oxidativo por geração de radicais livres na reação com grupos tiol e amino em biomoléculas pode ocorrer, então, tanto pela reação direta com o 4-nitrofenol quanto pela reação com o grupo nitroso supracitado. Este agente químico apresenta também maior lipofilicidade, o que, a princípio, potencializaria a sua interação com lipídios constituintes de membranas celulares e mitocondriais, favorecendo a absorção pelo organismo e podendo influenciar, deste modo, na permeabilidade celular e na fosforilação oxidativa (Appel 1993, Michałowicz & Duda 2007, Spycher et al. 2005).

O cálculo de íons livres (aquo-complexos) realizado com o auxílio do software Visual

MINTEQ (versão 3.0) indicou que há uma predominância dos metais na forma iônica, 99,93% como Cd(II) e 94,64% como Cu(II), contribuindo para uma maior biodisponibilidade destes elementos ao fungo. O Cu(II), conforme já mencionado anteriormente, é um cátion essencial, requerido para as atividades enzimáticas relacionadas à degradação de lignina e obtenção de nutrientes para a sobrevivência fúngica, o que poderia explicar, em teoria, uma maior tolerância pelo fungo. Cabe ressaltar que quando as culturas foram submetidas às soluções mais concentradas de Cu(II), foi observada uma coloração marrom entre os micélios após 24h de exposição. O mesmo resultado foi obtido também por outros autores, que indicaram a possível produção de melanina como mecanismo de defesa (Guillén & Machuca 2008). Este pigmento pode ter sido liberado como forma de complexar o metal e, pela consequente diminuição da sua biodisponibilidade, amenizar os efeitos tóxicos. Outros autores, de forma complementar, discutem que a exposição ao cobre estimula a bioessíntese da enzima lacase de alguns fungos. Esta, por sua vez, pode contribuir para a síntese da melanina pela polimerização de compostos nos meios de crescimento (Henson et al. 1999, Baldrian 2003).

Metais com maior polarização, como Cd(II) e Cu(II), interagem facilmente com grupos contendo enxofre (por exemplo, tióis) em moléculas e enzimas que têm a função de proteger os organismos contra as EROs, contribuindo desta forma para o estresse oxidativo (Gadd 1993, Mendes & Stevani 2010). Além disso, o cádmio e o cobre exercem seus efeitos tóxicos diretamente sobre as membranas plasmáticas, interferindo no transporte de solutos para as células. Tais metais provocam alterações na permeabilidade das membranas, alterando também a sua composição. Ambos possuem, ainda, afinidade por resíduos de aminoácidos aromáticos em enzimas, e, de forma compatível com o exposto acima, causam danos às proteínas fúngicas pela indução ao estresse oxidativo, associado à produção de EROs – neste caso, principalmente radicais hidroxila e ânion-superóxido (Baldrian et al. 2003).

Diferentemente do cobre (II), o Cd(II) não possui uma função biológica conhecida, e seu efeito tóxico foi mais intenso do que o dos demais agentes químicos testados para a espécie em estudo, evidenciando um mecanismo de defesa menos desenvolvido para este elemento. Assim, os resultados obtidos poderiam ser consequência de uma menor adaptação da espécie a este agente químico, que não é naturalmente encontrado no seu ambiente de crescimento. Pela sua característica não essencial, o Cd(II) não é conhecidamente utilizado de forma direta em processos que favoreçam o desenvolvimento do organismo, mesmo quando em baixas concentrações. Pelo contrário, os seus efeitos estão associados à substituição de elementos essenciais e bloqueio de grupos funcionais em biomoléculas, além de outros efeitos tóxicos causados, por exemplo, por alterações na integridade de membranas de células e organelas ou reações diretas com biomoléculas (Baldrian 2003, Gadd 1993).

A maior toxicidade do Cd(II) em relação ao Cu(II) foi anteriormente relacionada a diferenças nos mecanismos de biossorção de ambos os elementos – por exemplo, o cobre tem maior afinidade por grupos carboxila, enquanto que o cadmio é atraído mais fortemente por carboxilatos. O mesmo estudo apontou que, em comparação com o Cd(II), o Cu(II) interage mais prontamente com polifosfatos, resultando em uma transferência mais lenta destes cátions para as células que sofreriam os danos na interação com os metais (Lam et al. 1998). Apesar de o trabalho ter sido conduzido com algas, os fatores levantados pelos autores poderiam, a princípio, ser extendidos também aos fungos, dado que as moléculas supracitadas poderiam ser encontradas também entre estes organismos. Quanto aos fenóis, por sua vez, uma maior toxicidade do Cd(II) está possivelmente associada à capacidade especial de degradação da lignina pelos basidiomicetos, cujas enzimas são não específicas e, portanto, favoreceriam a degradação de determinados poluentes orgânicos fenólicos.

Embora os mecanismos de emissão de luz e de toxicidade para fungos bioluminescentes ainda não sejam amplamente conhecidos, a despolarização de membranas e o desacoplamento

da fosforilação oxidativa podem ser dois dos principais mecanismos relacionados à inibição na BL, comumente observada em decorrência da exposição dos fungos aos agentes tóxicos. Isso porque, para garantir uma fonte de energia para os processos metabólicos, os fungos utilizariam mais NADH na tentativa de sintezar ATP em quantidades suficientes. Consequentemente, menos deste cofator estaria disponível para ser utilizado na reação enzimática de redução da luciferina, envolvida no mecanismo de reação bioluminescente. (Stevani et al. 2013).

O NADPH, alternativamente utilizado na reação bioluminescente, pode ser produzido a partir do $NADP^+$ (forma oxidada), sintetizado pelos organismos a partir da fosforilação de NAD^+ pela enzima NAD^+ quinase. Entretanto, em condições onde a produção de ATP é limitada, é de esperar uma maior quantidade de NAD^+ sendo utilizada na produção de NADH para a biossíntese de ATP. Como este também é utilizado na conversão do NAD^+ em $NADP^+$, é esperada, da mesma forma, uma menor produção do NADPH. Assim, uma menor quantidade de $NADP^+$ sendo produzida pelo fungo em função de danos causados por agentes químicos orgânicos ou inorgânicos resultaria também em uma menor disponibilidade de cofatores para a reação de bioluminescência fúngica (Stevani et al. 2013).

Os bioensaios já desenvolvidos para os fungos bioluminescentes avaliam a toxicidade de metais e alguns fenóis substituídos, em especial clorofenóis. Para metais, o fungo *N. gardneri* mostrou-se menos tolerante do que a espécie *G. viridilucens*, mas mais resistente em comparação com as espécies *A. mellea e M. citricolor.* Em relação aos resultados obtidos por Weitz et al. (2002), por exemplo, o EC_{50} do cobre apresentou uma ordem de grandeza cerca de 100 vezes menor em comparação com o obtido no presente trabalho (Tabela 8).

Dadas as diferenças entre os parâmetros dos diferentes bioensaios, como as características intrínsecas das espécies utilizadas (incluindo os mecanismos de defesa e de interação com os agentes tóxicos); a composição dos meios de cultura; o tempo de exposição com o agente

tóxico e as condições de inoculação, os valores de EC_{50} para um mesmo composto serão logicamente variados de acordo com a metodologia adotada.

Tabela 8. Diferentes parâmetros adotados na avaliação da toxicidade de compostos para espécies fúngicas bioluminescentes e respectivos valores de EC_{50}.

Espécie	Meios de cultivo	Agente químico	EC_{50} (mM)	$T_{exposição}$ (h)	Referência
N. gardneri	ágar	Cd(II)	$(8,0 \pm 0,5).10^{-3}$*	24	Presente estudo
		Cu(II)	0,53 ± 0,09*	24	
		fenol	1,7 ± 0,3	24	
		4-nitrofenol	0,34 ± 0,04	24	
G. viridilucens	ágar	Cd(II)	2,4 ± 0,1	24	Mendes & Stevani (2010)
		Cu(II)	5,7 ± 0,2		
A. mellea	líquido	Cu^{+2}	$1,3\times10^{-3}$	1	Weitz et al. (2002)
M. citricolor			$36,0\times10^{-3}$	1	
G. viridilucens	ágar	fenol	5,8 ± 0,3	24	Dados do grupo não publicados
		4-nitrofenol	1,8 ± 0,1		

* EC_{50} para os metais na forma de íon livres, cuja concentração foi calculada com o software Visual MINTEQ. Os valores nominais de EC_{50}, desconsiderando especiações, são de $(8,0 \pm 0,5)\times10^{-3}$ mM e (0,56 ± 0,1) mM para os sais de cádmio e de cobre, respectivamente.

Assim, por exemplo, um EC_{50} de 1,3 $\mu molL^{-1}$ foi obtido para o Cu(II) exposto ao fungo *A. mellea*, enquanto que para a espécie *M. citricolor* o mesmo elemento apresentou toxicidade cerca de 30 vezes menor, necessitando de uma concentração de 36 $\mu molL^{-1}$ para inibir 50% da luz emida pelo micélio (Weitz et al 2002). Com o fungo *G. viridilucens*, por outro lado, foi obtida uma diferença ainda maior para o Cu(II), com um EC_{50} equivalente a 5,7 $mmolL^{-1}$ (Mendes & Stevani 2010). Ainda avaliando o mesmo cátion, porém em ensaios convencionais (ou seja, medindo-se geralmente diâmetro ou biomassa e incorporando os agentes tóxicos diretamente nos meios de cultura antes da inoculação), essa diferença de toxicidades é também obtida: por exemplo, valores de EC_{50} em torno de 10 $mmolL^{-1}$ e 3 $mmolL^{-1}$ foram obtidos para as espécies *Laetiporus sulfurous* e *Ophiostoma sp.*, respectivamente, avaliando a

inibição do diâmetro em meios sólidos (Guillén e Machuca 2008). Ainda em ensaios tradicionais, a medição de biomassa em meios líquidos para o Cd(II) resultou em valores de EC_{50} de 12,6 µmolL^{-1} e 0,008 µmolL^{-1} para as respectivas espécies *Suillus variegatus* e *Suillus granulatus* (Hartley et al 1997).

Comparativamente com os metais, os trabalhos buscando avaliar os valores de EC_{50} para fenol ou 4-nitrofenol para fungos são escassos, não sendo encontrados tantos estudos voltados aos testes de toxicidade. Ainda assim, bioensaios conduzidos com ascomicetos indicaram valores de EC_{50} em torno de 0,5 mmolL^{-1} para o 4-nitrofenol exposto durante 20 dias às culturas de *Aspergillus fumigatus, A. flavus e A. tamarii*, avaliando-se a inibição de biomassa dos micélios cultivados em meios líquidos (Bharathi et al. 2009). Ainda em meios líquidos, outro estudo avaliando a inibição do crescimento de 24 espécies de ascomicetos pela medição do diâmetro dos micélios expostos a fenol durante 15 dias resultou em valores de EC_{50} na faixa de <1,1 - 9,0 mmolL^{-1} (Guiraud et al. 1995). Novamente foi observada, pelos dados supracitados, uma aparente maior tolerância das espécies fúngicas ao fenol em relação com o 4-nitrofenol.

Em bioensaios com bactérias, mais usuais para microorganismos, o 4-nitrofenol apresentou valores de EC_{50} de 63 µmolL^{-1} para a espécie *Photobacterium phosphoreum*, adotando os procedimentos do teste Microtox® com tempo de exposição igual a 30 min (Ricco et al. 2004). O fenol, por sua vez, é um composto tóxico utilizado como referência no Microtox® e tem seu EC_{50} padronizado entre 0,14 e 0,28 mmolL^{-1} para a bactéria *A. ficheri*, considerando 15 min de exposição (AZUR Environmental 1998). No que diz respeito aos metais, essa diferença na ordem de grandeza dos valores de EC_{50} permanece, em especial para o Cu(II), tendo sido obtidos valores de EC_{50} de 1,62 µmolL^{-1} e 27 µmolL^{-1} para Cu(II) e Cd(II), respectivamente, mantendo 15 min como tempo de exposição (McCloskey et al. 1996). Neste sentido, o fungo *N. gardneri* apresentou uma resposta na mesma ordem de

grandeza apenas no bioensaio conduzido para o Cd(II) – para o cobre, a sensibilidade da espécie foi cerca de 300 vezes menor, enquanto que para os fenóis foram obtidas toxicidades cerca de 5-10 vezes mais baixas.

Essas diferenças observadas nas ordens de magnitude entre os resultados dos bioensaios com diferentes tipos de microorganismos em meios sólidos e líquidos indicam a importância de expandir os estudos com os fungos, no sentido de refletir da melhor forma possível o desenvolvimento e a resposta de organismos específicos. As espécies fúngicas são de especial interesse tanto por serem representantes do compartimento ambiental terrestre, quanto por ocuparem uma posição estratégica na base da cadeia alimentar, reforçando a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a toxicidade de compostos para tais organismos. Desta forma, pelo crescimento fúngico característico em solos, o desenvolvimento das metodologias em meios de cultura sólidos representaria melhor o seu crescimento e a sua resposta nos habitats naturais, apesar de não necessariamente refletirem a biodisponibilidade dos compostos nestes locais devido à complexidade dos ambientes de origem.

Além disso, a emissão de luz em culturas submersas nos meios líquidos é menor, não sendo possível a sua visualização a olho nú, conforme evidenciado pelo nosso grupo com a espécie *N. gardneri* e confirmado, em contato com a pesquisadora responsável pelo desenvolvimento dos bioensaios em meios líquidos, para as culturas dos fungos *A. mellea, O. Ollearius, P. stipticus* e *M. Citricolor* (Weitz, comunicação pessoal). Consequentemente, nestes meios pode haver uma diminuição da BL quantificada, representando uma possível desvantagem para os bioensaios. Por outro lado, quanto mais intensa for a BL, mais facilmente os resultados são obtidos e interpretados, permitindo avaliar a toxicidade de compostos em faixas mais amplas de concentração com menores erros nas medidas – principalmente porque, neste caso, a emissão de luz é bem maior do que o sinal da linha base do equipamento. Pela BL visivelmente menor em meios líquidos, seria interessante avaliar

futuramente se esta seria uma explicação adicional para as diferenças de sensibilidade entre os bioensaios. Isso porque, quando a emissão de luz é significativamente menor, qualquer variação de intensidade causada pela interação dos organismos com os agentes tóxicos poderia resultar também em um maior impacto na comparação com as culturas utilizadas como controle (considerando que $BL_{Inibida} = BL_{Pós\text{-}exposição}/BL_{Controle}$). Os meios de cultura líquidos, dentro do que já foi abordado na introdução, favorecem uma maior biodisponibilidade dos metais. Mesmo com a aplicação direta dos agentes químicos sobre o micélio dos fungos em meios sólidos, uma possível difusão das soluções pelo ágar poderia reduzir em maior escala a biodisponibilidade dos compostos, conforme será evidenciado na próxima seção. Um maior contato das espécies fúngicas com os contaminantes testados nos bioensaios de Weitz et al (2002) pode ter sido potencializado também pela forma globular dos micélios (com diâmetros de 3-5 mm), que possuem, teoricamente, uma maior área superficial para contato. Estes glóbulos foram retirados dos meios de cultura e lavados com água antes de serem transferidos para cubetas contendo apenas os agentes tóxicos, diluídos também em água – mais uma vez, a biodisponibilidade seria menos influenciada por interações dos metais com quaisquer componentes do meio de cultura. Adicionalmente, as soluções com os agentes tóxicos foram agitadas antes das medições de BL, já em contato direto com o micélio, o que pode ter aumentado o contato das espécies fúngicas com os compostos testados.

As semelhanças nos meios de cultura e procedimentos de bioensaio permitem fazer uma comparação mais direta entre o fungo *N. gardneri* e a espécie *G. viridilucens*. Neste caso, como seria de se esperar pela proximidade maior entre os métodos, as ordens de grandeza dos valores de EC_{50} de ambos os bioensaios foram mais próximas entre si quando em comparação com os resultados em meios líquidos. Ainda assim, a espécie em estudo mostrou maior sensibilidade tanto aos metais quanto aos fenóis. Isso poderia ser explicado, a princípio, pelo habitat de origem dos fungos: as primeiras culturas de *G. viridilucens* foram preparadas a

partir de corpos de frutificação encontrados no PETAR, cujas atividades de mineiração resultaram na contaminação da região, principalmente por chumbo, mas também por cádmio e cobre (Cotta et al. 2006). Assim, o crescimento do fungo nesse tipo de ambiente pode ter colaborado para uma maior resistência do organismo aos agentes tóxicos e para o desenvolvimento mais aperfeiçoado de mecanismos de defesa específicos para metais, de alguma forma herdados pelos micélios cultivados em laboratório. Para fenóis, entretanto, a princípio as diferenças de sensibilidade parecem ser menores, possivelmente pela característica em comum dos basidiomicetos de secretar enzimas lignolíticas capazes de interagir também com este grupo de moléculas orgânicas.

Conforme já mencionado, além do fator ambiental discutido acima, as diferenças no EC_{50} foram provavelmente causadas também pelas demais especificidades de cada espécie. Neste caso, as distinções mais notáveis entre os fungos *G. viridilucens e N. gardneri* são seus perfis de BL dentro de condições de incubação distintas. Exemplos disso são as particularidades nas concentrações da fonte de nitrogênio requeridas em cada bioensaio, embora os micélios tenham sido cultivados utilizando os mesmos materiais para o preparo dos meios de cultura, e as reações particulares de cada espécie em contato com o ar e soluções aplicadas sobre os micélios. Do mesmo modo, o desenvolvimento ótimo do *N. gardneri* em temperaturas mais elevadas e sob uma concentração de melaço 5 vezes maior em relação ao *G. viridilucens* corrobora para a percepção de diferenças nas características entre as duas espécies, que naturalmente influenciariam os seus mecanismos de interação com os agentes tóxicos.

Com o exposto nesta seção, embora o bioensaio proposto no presente trabalho ainda seja limitado aos compostos que são solúveis no solvente testado e as placas não sejam controles de si mesmas, a metodologia desenvolvida até aqui apresenta vantagens principalmente em relação ao crescimento rápido do micélio, à maior sensibilidade frente aos compostos testados e à luz elevada emitida pela espécie estudada, que permite avaliar a toxicidade dos agentes

químicos em uma maior faixa de concentrações. Do mesmo modo, o perfil estável de BL, com um platô onde a luz é mantida de forma previsível, é outro fator que indica uma vantagem da espécie para a aplicação de interesse. A medição da BL é, ainda, mais prática e rápida do que a avaliação de alterações do diâmetro ou biomassa nos ensaios convencionais e há menor interferência dos meios de cultura na biodisponibilidade em relação aos métodos convencionais, porque o tempo de contato com os agentes químicos é menor. Assim, o bioensaio com a espécie *N. gardneri* representa mais uma opção viável para espécies de habitat terrestre, podendo ser utilizado como complemento com as análises químicas de amostras ambientais e demais bioensaios desenvolvidos com outros organismos terrestres e/ou aquáticos.

4.4 Absorção de fenol e fenóis substituídos em meios de cultura

Nesta etapa adicional de experimentos, a absorção de fenol e fenóis substituídos em meios de cultura foi determinada visando verificar se a concentração dos agentes tóxicos poderia sofrer alterações em função de diluições pelo ágar. Os compostos avaliados, neste caso, foram os mesmos testados previamente com a espécie *G. viridilucens*, razão pela qual se buscou reproduzir as condições de incubação utilizadas para este fungo.

Inicialmente, foram medidas as concentrações das soluções individuais de fenóis aplicadas sobre os meios não inoculados e recuperadas após o tempo de exposição de 24 horas. Para isso, a superfície dos meios foi lavada com o diluente (solução aquosa de Triton X-100 0,05%), e uma alíquota da solução final obtida neste processo foi utilizada para a reação, seguindo o método colorimétrico adotado. Os dados evidenciaram que as recuperações dos fenóis foram, em geral, inferiores a 50% do valor original, indicando uma possível absorção dos analitos (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração de fenóis recuperada (não absorvida) após exposição por 24 h ao meio de cultura. Em negrito, os valores que mais se aproximam do EC_{50}, calculado em ensaio toxicológico com a espécie *G. viridilucens* (n = 3).

Conc. nominal (mM)	4-metóxifenol	4-clorofenol	2,4,6-triclorofenol	Fenol
0,2	-	-	0,00 ± 0,00	-
0,4	-	-	0,00 ± 0,00	-
0,6	-	-	0,00 ± 0,00	-
0,8	-	-	**0,09 ± 0,01**	-
1	-	-	0,34 ± 0,01	0,02 ± 0,00
1,2	-	-	0,54 ± 0,02	-
1,4	-	-	1,16 ± 0,05	-
1,5	0,03 ± 0,00	-	-	-
1,6	-	-	1,89 ± 0,03	-
2	0,00 ± 0,00	-	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
2,5	0,35 ± 0,01	-	-	-
3	-	4,8 ± 0,6	-	0,00 ± 0,00
4	-	-	-	0,00 ± 0,00
5	0,76 ± 0,05	4,9 ± 0,4	-	0,00 ± 0,00
6	-	-	-	**0,00 ± 0,00**
7	-	-	-	0,97 ± 0,07
7,5	-	3,0 ± 0,1	-	-
8	-	-	-	0,80 ± 0,05
10	2,2 ± 0,3	**5,8 ± 0,3**	-	0,02 ± 0,00
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	3, 6 ± 0,4	-	-	-
16	-	-	-	0,27 ± 0,03
20	4,8 ± 1,0	7,4 ± 0,7	-	-
25	5,8 ± 0,8	-	-	-
30	**6,8 ± 0,1**	7,2 ± 0,4	-	-
35	7,4 ± 0,6	-	-	-
40	-	10,9 ± 0,7	-	-
50	-	13,3 ± 0,5	-	-
60	-	14,0 ± 1,7	-	-
70	-	15,8 ± 0,9	-	-

Os resultados obtidos ressaltaram a necessidade de analisar se os fenóis seriam identificados nos meios de cultura e se a diluição destes compostos seria homogênea ou não. Deste modo, em uma próxima etapa, foi feita a quantificação dos fenóis não somente nas soluções lavadas da superfície, mas também nas seções inferiores e superiores dos meios, fundindo ambas as partes separadamente. Para impedir a gelificação do ágar, uma alíquota destas seções foi imediatamente diluída nos tubos onde ocorreu a reação colorimétrica requerida pela metodologia adotada. Como forma de controle, foram analisadas também soluções aplicadas sobre os meios de cultura e imediatamente lavadas da sua superfície. Para reproduzir ao máximo as condições de armazenamento, estas foram mantidas pelo mesmo período de 24h em um mesmo ambiente que os meios expostos aos analitos durante todo o tempo de exposição. As concentrações dos fenóis aplicados diretamente nos meios de cultura foram escolhidas, conforme já mencionado, em função do valor do EC_{50} estabelecido anteriormente em ensaio de toxicidade para a espécie supracitada, abrangendo uma faixa ao redor de 0,5 a 30 mM.

Os experimentos confirmaram a quantificação dos fenóis nas partes inferiores e superiores dos meios não inoculados, indicando que, de fato, ocorre uma difusão dos compostos pelo ágar (Tabela 10). As médias de concentração incluindo ambas as seções (superior e inferior, somando 6 replicatas) mantiveram-se com desvios inferiores a 15% entre si, comprovando certa distribuição homogênea dos fenóis pelos meios. Isso significa que a concentração nominal adicionada sobre o micélio no bioensaio pode diminuir por efeito de diluição, dependendo da área e da permeabilidade do micélio. Para a espécie *G. viridilucens*, foi considerado aceitável que os valores de EC_{50} dos fenóis (alguns dos quais mostrados na Tabela 8) sejam divididos por 6, a fim de corrigir os efeitos dessa diluição dos compostos, que durante o bioensaio acabam entrando em contato direto com uma região dos meios não ocupada pelo fungo, além de também atingirem uma área sob o micélio já desenvolvido.

Tabela 10. Concentração nominal dos fenóis aplicada na superfície do meio de cultura com ágar, a concentração determinada imediatamente após a aplicação (controle), na lavagem da superfície e nas partes cortadas do ágar (superior e inferior) após 24 h da exposição.[a]

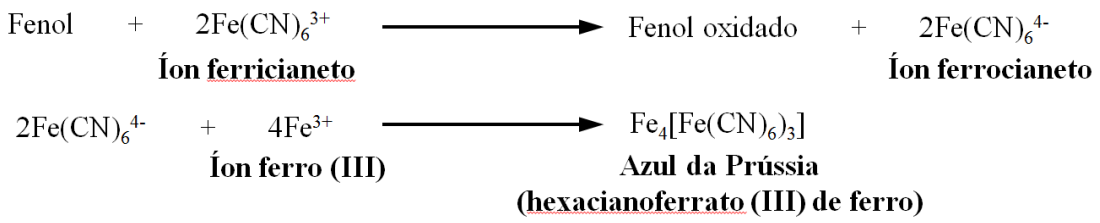
Concentração nominal (mM)	Controle	Lavagem	Ágar superior	Ágar inferior
	4-metóxifenol (mM)			
20	20,3 ± 1,8	1,4 ± 0,1	17,9 ± 3,1	19,3 ± 1,7
30	29,3 ± 2,4	2,4 ± 0,2	28,2 ± 3,9	29,2 ± 1,8
40	40,1 ± 5,2	7,1 ± 0,9	36,3 ± 3,0	39,9 ± 2,1
	4-clorofenol (mM)			
6	6,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	6,4 ± 0,9	6,0 ± 0,7
12	11,9 ± 1,9	1,7 ± 0,1	13,2 ± 1,1	12,8 ± 1,2
24	23,9 ± 2,0	5,3 ± 0,6	26,4 ± 1,2	24,1 ± 3,4
	2,4,6-triclorofenol			
0,5	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
0,9	0,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,1 ± 0,0
1,5	1,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
	Fenol			
2	1,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,2
6	6,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0	5,4 ± 0,3	6,8 ± 0,5
20	20,6 ± 1,3	1,2 ± 0,1	20,9 ± 2,9	19,8 ± 2,6

[a] Experimentos realizados em triplicata (n = 3).

A metodologia, entretanto, precisa ser aperfeiçoada, uma vez que apresenta limitações principalmente quanto ao tratamento de amostras, sendo necessário manipular diretamente os meios de cultura para cortá-los em seções. Adicionalmente, interferentes presentes na composição dos meios elevam o sinal do branco, preparado a partir da aplicação de apenas diluente. Além disso, esse tópico ainda requer maior aprofundamento, sendo necessário englobar mais contaminantes e também realizar a determinação do teor de analitos absorvidos pelos meios quando o micélio já está desenvolvido sobre os mesmos, a fim de comparar com a absorção na ausência de fungo. Cabe ressaltar, entretanto, que tal estudo é ainda inédito para os compostos em questão, não havendo na literatura dados científicos publicados a respeito da

taxa de absorção de tais fenóis aos meios de cultura sólidos a base de ágar.

O método do azul da Prússia (Budini 1980) foi testado com outros dois fenóis, 4-nitrofenol e 4-cianofenol, cujas toxicidades para a espécie *G. viridilucens* também foram estudadas previamente pelo grupo. No entanto, a reação não ocorreu e o produto final de coloração azul não pôde ser quantificado. Neste caso, o método de quantificação utilizado consiste em uma reação de oxirredução entre o ferrocianeto de ferro (produzido através da reação entre cloreto de ferro (III) em meio ácido e ferricianeto de potássio) e os fenóis, gerando como produto final um composto de coloração azul, denominado hexacianoferrato férrico – popularmente denominado azul da prússia (Esquema 1). Como se trata de uma oxirredução, a reação depende da capacidade dos fenóis de doar elétrons e do ferricianeto de potássio de recebê-los (Graham 1992). Os grupos ciano e nitro ligados ao anel aromático são considerados fortes sacadores de elétron, diminuindo a densidade eletrônica no anel aromático, de modo que a reação pode ter sido inviabilizada devido a uma diferença de potencial insuficiente entre os produtos para viabilizar a oxirredução.



Esquema 1. Reação de oxirredução envolvida no método do azul da prússia para quantificação de fenol e fenóis substituídos. Fonte: traduzido e adaptado de Graham (1992).

Os testes cujos resultados foram mostrados nesta seção foram conduzidos enquanto se aguardava o reparo de câmaras climáticas, antes da otimização dos meios de cultura e desenvolvimento do bioensaio com a espécie *N. gardneri*. Portanto, os mesmos não foram ainda repetidos nas condições de incubação do fungo em estudo. Entretanto, considerando as propriedades dos compostos testados e as similaridades dos solventes aquosos utilizados, é de

se esperar que uma diluição semelhante ocorra nos procedimentos com o fungo utilizado neste trabalho. Adicionalmente, a diminuição no pH observada também de modo homogêneo entre as seções inferiores e superiores dos meios de cultura é outro fator que reforça a capacidade de difusão pelo ágar neste caso.

Assim, considerando os resultados apresentados e extrapolando-os para os metais e para a espécie *N. gardneri*, os valores de EC_{50} obtidos no presente trabalho também poderiam ser divididos por 6, levando em conta a diluição das soluções aplicadas sobre o micélio (500 µL) em 3 mL de meios de cultura - este é o volume de meio de cultura adicionado em média a cada placa (Tabela 11). Todavia, seria ideal aprofundar os estudos nesta área e confirmar a diluição supracitada por procedimentos e técnicas analíticas mais precisas, a fim de sanar as limitações do método espectrofotométrico e quantificar também os metais, além de estabelecer o período requerido para a diluição total das soluções pelos meios de cultura, visando avaliar se o EC_{50} obtido precisaria de ajustes adicionais em função do tempo.

Tabela 11. Valores de EC_{50} para as espécies *N. gardneri* e *G. viridilucens* considerando a diluição das soluções pelos meios de cultura.

Composto	**EC_{50} – *N. gardneri***	**EC_{50} – *G. viridilucens***
Cd^{+2}	1,3 ± 0,08 µmolL^{-1}	0,4 ± 0,02 mmolL^{-1}
Cu^{+2}	88 ± 15 µmolL^{-1}	0,95 ± 0,03 mmolL^{-1}
fenol	0,28 ± 0,05 mmolL^{-1}	0,97 ± 0,05 mmolL^{-1}
4-nitrofenol	57 ± 7 µmolL^{-1}	0,30 ± 0,02 mmolL^{-1}

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram obtidas informações essenciais para conhecer o comportamento do fungo *N. gardneri* em diferentes cenários. Os estudos preliminares para identificar a fonte da alta variabilidade na BL entre replicatas permitiram uma compreensão básica acerca de algumas das especificidades da espécie e do método de medição. Somente após essa etapa inicial de investigação, foi possível ajustar as condições de cultura; estabelecer o melhor diluente para dissolução dos agentes químicos a serem testados e definir o tempo de exposição do bioensaio. Por fim, as toxicidades de dois metais e dois fenóis puderam ser obtidas para a espécie, pelo cálculo dos respectivos valores de EC_{50}, utilizando a BL inibida como parâmetro de medição dos efeitos tóxicos.

Os resultados apresentados demonstraram a viabilidade de aplicação do bioensaio com o fungo *N. gardneri*, que apresentou características favoráveis principalmente quanto à emissão intensa de luz, crescimento rápido do micélio, comportamento estável da BL em condições ajustadas e sensibilidade razoável frente aos agentes tóxicos avaliados. Não existem ainda outros estudos publicados envolvendo ensaios toxicológicos para a espécie supracitada, de modo que a metodologia desenvolvida neste trabalho pode contribuir com uma expansão de conhecimentos nesta área. Assim, considerando que o tema ainda é pouco estudado e a abrangência das pesquisas neste campo de conhecimento são amplas, espera-se que os procedimentos propostos no presente trabalho possam ser utilizados também como base para trabalhos futuros, visando o aperfeiçoamento dos ensaios de toxicidade com a espécie em questão. Desta forma, por exemplo, poderiam ser investigados novos diluentes, além de testadas as toxicidades de outros compostos ou amostras de interesse.

No futuro, pretende-se avaliar novos parâmetros associados à variação de BL pelo fungo *N. gardneri* dentro das condições ajustadas para o bioensaio (*e.g.*, teor de gases como O_2 e CO_2 na atmosfera interna das placas de Petri e sua variação ao longo do tempo) e identificar

técnicas/equipamentos de análise mais adequados para a quantificação da luz emitida, que permitam a medição homogênea de fótons em toda a superfície do micélio.

Como etapa adicional de experimentos, foi paralelamente demonstrado que os fenóis dissolvidos em soluções aquosas de Triton X-100 são diluídos de forma homogênea entre as seções inferior e superior de meios de cultura não inoculados, preparados a base de ágar e dispostos em placas de 35 mm. Isso é um indicativo de que, no tempo de exposição de 24h, a dispersão de compostos pelos meios de cultura pode diminuir as concentrações de agentes tóxicos aos quais os fungos são expostos. Este efeito seria de 6 vezes na concentração nominal, uma vez que o protocolo do bioensaio utiliza 500 µL da solução contendo o agente tóxico para 3 mL de ágar. A metodologia utilizada, no entanto, possui algumas limitações, tais como a necessidade de solubilizar o agente tóxico em solução aquosa, com pH entre 5 e 6. Por essa razão, há a necessidade de estudos mais aprofundados, inclusive para incluir os metais e demais compostos de interesse.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10520:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011.

ACALGARO. 2013. Disponível em: < http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Manganese_peroxidase_mechanism.png> Acesso em: 07 abr. 2015.

AIRTH, R.L.; FOERSTER, E. The Isolation of Catalytic Components Required for Cell-free Fungal Bioluminescence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, n. 3, p. 567-573, 1962.

APPEL, H.M. Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 7, p. 1521-1552, 1993.

AZUR ENVIRONMENTAL. **Microtox acute toxicity test**, 1998. Disponível em: <http://www.coastalbio.com/images/Acute_Overview.pdf> Acesso em: 13 mar. 2015.

BAI, Z.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Oxidative Stress in Submerged Cultures of Fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 267-302, 2003.

BALASOIU, C.F.; ZAGURY, G.J.; DESSCHÊNES, L. Partitioning and speciation of chromium, copper, and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil composition. **The Science of the Total Environment**, v. 280, n. 1-3, p. 239-255, 2001.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 78-91, 2003.

BELGERS, J.D.M.; AALDERINK, G.H.; DEN BRINK, V. Effects of four fungicides on nine non-target submersed macrophytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 2, p. 579-584, 2009.

BENDING, G.D.; FRILOUX, M.; WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 1, p. 59-63, 2002.

BERLINER, M.D. Diurnal periodicity of luminescence in three Basidiomycetes. **Science**, v. 134, v. 3481, p. 740-740, 1961.

BERMUDES, D.; GERLACH, V.L.; NEALSON, K.H. Effects of culture conditions on mycelial growth and luminescence in *Panellus stipticus*. **Mycologia**, v. 82, n. 3, p. 295-305, 1990.

BERMUDES, D.; PETERSEN, R.H.; NEALSON, K.H. Low-level bioluminescence detected in *Mycena haematopus* basidiocarps. **Mycologia**, v. 84, n. 5, p. 799-802, 1992.

BHARATHI, P.M.; SRILATHA, P.; REVATHI, M.; VENKATESWARLU, K. Effect of nitrophenols on growth and heterotrophic nitrification in soil isolates of *Aspergillus spp.* **Ecology, Environment and Conservation**, v. 15, n. 1, p. 39-45, 2009.

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

BLAUDEZ, D.; BOTTON, B.; CHALOT, M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **Microbiology**, v. 146, n. 5, p. 1109-1117, 2000.

BONNET, J.L.; BONNEMOY, F.; DUSSER, M.; BOHATIER, J. Toxicity Assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, n. 4, p. 576-583, 2008.

BOUTET, E. 2002. Disponível em: < http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hyaloperonospora-parasitica-conidiophore.jpg> Acesso em> 07 abr. 2015.

BUDINI, T. TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1236-1238, 1980.

BUGG, T.D.H.; AHMAD, M.; HARDIMAN, E.M.; RAHMANPOUR, R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883-1896, 2011.

BULICH, A.A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In: MARKIN, L.L.; KIMERLE, R.A. **Aquatic Toxicology: Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology**. 1st. ed. Baltimore: ASTM International, 1979.

BULYONKOVA, T. 2010. Disponível em: < https://www.flickr.com/photos/ressaure/4793348879/in/photolist-dS9P4N-8izaCc-gtuYq3-dmCget-dmCg54-dmCisu-dmCihU-dkEX8Q-mD6JtD> Acesso em: 07 abr. 2015.

BROVKO, L. **Bioluminescence for Food and Environmental Microbiological Safety**. 1st. ed. Washington: SPIE, 2007.

CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S.D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 751-758, 2000.

CAPELARI, M.; DESJARDIN, D.E.; Perry, B.A.; Assai,T.; STEVANI,C.V. Neonothopanus gardneri: a new combination for a bioluminescent agaric from Brazil. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1433-1440, 2011.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. **The Fungi**. 2nd. Ed. London: Academic Press, 2001.

CARRIS, L.M.; LITTLE, C.R.; STILES, G.M. Introduction to Fungi. **The Plant Health Instructor**, 2012. Disponível em: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroFungi.aspx>. Acesso

em: 25 Nov. 2014.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma técnica L5.228:** Teste de toxicidade aguda utilizando spirillum volutans: método de ensaio. São Paulo, 1988.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ECO_HELP.htm>. Acesso em: 17 Dez. 2014.

CHEW, A.L.; TAN, C.Y.; DESJARDIN, D.E.; MUSA, M.Y.; SABARATNAM, V. Four new bioluminescent taxa of Mycena sect. Calodontes from Peninsular Malaysis. **Mycologia**, v. 106, n. 5, p. 976-988, 2014.

CORREIA, D.S.; SANTOS, F.H.R.; SOARES, L.H.B.; CORREIA, M.E.F. **Enzimas oxidativas na biodegradação da lignocelulose: produção, características bioquímicas e importância biotecnológica**. 1ª ed. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011.

COTTA, J.A.O.; REZENDE, M.O.O.; PIOVANI, M.R. Avaliação do teor de metais em sedimento do rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR, São Paulo, Brasil. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 40-45, 2006.

DAMBOLENA, J.S.; LÓPEZ, A.G.; MERILES, J.M.; RUBINSTEIN, H.R.; ZYGADLO, J.A. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 163-170, 2012.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; SYED, T.A.; QIN, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36-50, 2010.

DEACON, J.W. **Fungal Biology**. 4th. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2006.

DEHEYN, D.D.; LATZ, M.I. Bioluminescence characteristics of a tropical terrestrial fungus (Basidiomycetes). **Luminescence**, v. 22, n. 5, p. 462-467, 2007.

DESJARDIN, D.E.; CAPELARI, M.; STEVANI, C.V. A New Bioluminescent Agaric from São Paulo, Brazil. **Fungal Diversity**, v. 18, p. 9-14, 2005.

DESJARDIN, D.E.; CAPELARI, M.; STEVANI, C.V. Bioluminescent Mycena Species from São Paulo, Brazil. **Mycologia**, v. 99, n. 2, p. 317-331, 2007.

DESJARDIN, D.E.; OLIVEIRA, A.G.; STEVANI, C.V. Fungi bioluminescence revisited. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 170-182, 2008.

DESJARDIN, D.E.; PERRY, B.A.; LODGE, D.J. STEVANI, C.V. NAGASAWA, E. Luminescent Mycena: new and noteworthy species. **Mycologia**, v. 102, n. 2, p. 459-477, 2010.

DEVAPPA, R.K.; RAJESH, S.K.; KUMAR, V.; MAKKAR, P.S.; BECKER, K. Activities of Jatropha curcas phorbol esters in various bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 57-62, 2012.

DONLAPORN, S.; SUNTORNSUK, W. Antifungal Activities of Ethanolic Extract from Jatropha curcas Seed Cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 319-324, 2010.

EVANS, C.S.; HEDGER, J.N. Degradation of plant cell wall polymers, In: GADD, G. M. (Ed.). **Fungi in Bioremediation**. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. 5th. ed. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, 1993.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, 2003.

FERREIRA, A.V.B. Fungos: Os primórdios do sexo. **Ciência hoje**, v. 37, n. 218, p. 34-41, 2005.

FUGE, R. Anthropogenic sources. In: SELINUS, O (Ed.). **Essentials of Medical Geology**. Revised ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.

GADD, G.M. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 271-279, 2000.

GADD, G.M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, n.1, p. 3-49, 2007.

GADD, G.M. Interactions of Fungi with Toxic Metals. **New Phytologist**, v. 124, n. 1, p. 25-60, 1993.

GADD, G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 609-643, 2010.

GADD, G.M. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. **Mycologist**, v. 18, n. 2, p. 60-70, 2004.

GADD, G.M. The use of solid medium to study effects of cadmium, copper and zinc on yeasts and yeast-like fungi: applicability and limitations. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, n. 1, p. 57-62, 1983.

GADD, G.M.; BURFORD, E.P.; FOMINA, M; MELVILLE, K. Mineral transformations and biogeochemical cycles: a geomycological perspectiveIn: GADD, G.M.; VATKINSON, S.C.; DYER, P.S. (Ed.). **Fungi in the Environment**. 1st. ed. New York: Cambridge University Press, 2007.

GAMLIEL, A.; KATAN, J.; COHEN, E. Toxicity of chlotonitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. **Phytoparasitica**, v. 17, n. 2, p. 101-106, 1989.

GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation

of heavy metal contaminated soils. **Current Science**, v. 86, n. 4, p. 528-534, 2004.

GRAHAM, H.D. Stabilization of the Prussian Blue Color in the Determination of Polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology.** 2nd. ed. New York: Wiley-Liss, 1994

GUILLÉN, Y.; MACHUCA, A. The effect of copper on the growth of wood-rotting fungi and a blue-stain fungus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 31-37, 2008.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J.L. Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 32, n. 1, p. 29-33, 1995.

GUPTA, R. **A Textbook of Fungi.** 1st. ed. New Delhi: S.B. Nangia for APH Publishing Corporation, 2004.

HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.R. Acute effects of diclofenac and DMSO to Daphnia magna: Immobilisation and hsp70-induction. **Chemosphere**, v. 73, n. 3, p. 353-359, 2008.

HARTLEY, J.; CAIRNEY, J.W.G.; SANDERS, F.E.; MEHARG, A.A. Toxic interactions of metal ions (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} and Sb^{3-}) on in vitro biomass production of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 137, n. 3, p. 551-562, 1997.

HARVEY, E.N. **A History of Luminescence: From the Earliest Times Until 1900.** 1st. ed. Philadelphia: The American Philosophical Society, 1957.

HARVEY, P.J.; THURSTON, C.F. Biochemistry of ligninolytic fungi. In: GADD, G. M. (Ed.). **Fungi in Bioremediation**. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

HATAKKA, A. Biodegradation of Lignin. In: STEINBÜCHEL, A. (Ed.). **Biopolymers Online**, v.1. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol1005/full> Acesso em: 27 Nov. 2014.

HAWKSWORTH, D.L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2425-2433, 2012.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 447-471, 1999.

HERRING, P.J. Luminous fungi. **Mycologist**, v. 8, n. 4, p. 181-183, 1994.

HOUSEMAN, J.; FORD, M. 2014. Disponível em: < http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Basi1001.jpg> Acesso em: 07 abr. 2015.

HOYOS-HERNANDEZ, C.; HOFFMANN, M.; GUENNE, A.; MAZEAS, L. Elucidation of the thermophilic phenol biodegradation pathway via benzoate during the anaerobic digestion of municipal solid waste. **Chemosphere**, v. 97, p. 115-119, 2014.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 6341**: Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test. Geneva, 2012.

KANDEGEDARA, A.; RORABACHER, D.B. Noncomplexing tertiary amines as "better" buffers covering the range of pH 3-11. Temperature dependence of their acid dissociation constants. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 15, p. 3140-3144, 1999.

JAY, A. Toxic effects of organic solvents on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, n. 2, p. 191-198, 1996.

JONES, D.; MUEHLCHEN, A. Effects of the potentially toxic metals, aluminium, zinc and copper on ectomycorrhizal fungi. **Journal of Environmental Science and Health. Part A**, v. 29, n. 5, p. 949-966, 1994.

KEISOTYO. 2008. Disponível em: < http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hypha_Lentinula_edodes_siitake_00.jpg> Acesso em: 07 abr. 2015.

KELLNER, T. 2012. Disponível em: < http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Oyster_mushroom_(Pleurotus_ostreatus)_mycelium_on_coffee_grounds.JPG> Acesso em: 07 abr. 2015.

KENT, C. **Basics of Toxicology**. 1st. ed. New York: John Willey & Sons, 1998.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 10th. ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KULKARNI, G.T. **Biotechnology and Its Application in Pharmacy**. 1st. ed. New Delhi: Jaypee Brothers Publishers, 2002.

LAIHO, R. Decomposition in peatlands: Reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2011-2024, 2006.

LAM, P.K.S.; WUT, P.F.; CHAN, A.C.W.; WU, R.S.S. Individual and combined effects of cadmium and copper on the growth response of *Chlorella vulgaris*. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 3, p. 347-353, 1999.

LANDIS, W.G.; YU, M. **Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems**. 3rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995.

LEE,Y.G.; HWANG, S.H.; KIM, S.D. Predicting the Toxicity of Substituted Phenols to Aquatic Species and Its Changes in the Stream and Effluent Waters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 213-219, 2006.

LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. **Mycorrhiza**, v. 7, n. 3, p. 139-153, 1997.

LINGLE, W.L. Effects of veratryl alcohol on growth and bioluminescence of Panellus stypticus. **Mycological Society of America Newsletter**, v. 40, n. 1, p. 36, 1989.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia Celular e Molecular**. 7ª ed. Porto Alegre: Armed, 2014.

LOVEJOY, T.E. Biodiversity: What is it? In: REAKA-KUDLA, M.L.; WILSON, D.E.; WILSON, E.O. (Eds.). **Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources**. Washington: Joseph Henry Press, 1997.

MADAN, M.; THIND, K.S. **Physiology of Fungi**. 1st. ed. New Delhi: S.B. Nangia for APH Publishing Corporation, 1998.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MCCLOSKEY, J.T.; NEWMAN, M.C.; CLARK, S.B. Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox® bioluminescence assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 1730-1737, 1996.

MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; BENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environment International**, n. 37, v. 8, p. 1362-1375, 2011.

MEHARG, A.A. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. **Mycological Research**, v. 107, n. 11, p. 1253-1265, 2003.

MENDES, L.F.; BASTOS, E.L.; DESJARDIN, D.E.; STEVANI, C.V. Influence of culture conditions on mycelial growth and bioluminescence of *Gerronema viridilucens*. **FEMS Mycrobiology Letters**, v. 282, n. 1, p. 132-139, 2008.

MENDES, L.F. **Desenvolvimento de ensaio bioluminescente de toxicidade com o fungo *Gerronema viridilucens***. 2010. 138f. Tese (Doutorado em química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MENDES, L.F.; STEVANI, C.V. Evaluation of metal toxicity by a modified method based on the fungus *Gerronema viridilucens* bioluminescence in agar medium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 320-326, 2010.

MENDES, L.F.; BASTOS, E.L.; STEVANI, C.V. Prediction of metal cation toxicity to the bioluminescent fungus Gerronema viridilucens. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 2177-2181, 2010.

MICHALOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols – Sources and Toxicity. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 3, p. 347-362, 2007.

MURPHY, R.A.; HORGAN, K.A. Antibiotics, enzymes and chemical commodities from fungi. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: Biology and Applications**. 1st. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2005

NAIDU, R.; SEMPLE, K.T.; MEGHARAJ, M.; JUHASZ, A.L.; BOLAN, N.S.; GUPTA, S.K.; CLOTHIER, B.E.; SCHULIN, R. Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. In: NAIDU, R. (Ed.). **Chemical bioavailability in terrestrial environments**. Vol. 32. Oxford: Elsevier, 2008.

NAKAMURA, H.; KISHI, Y.; SHIMOMURA, O. Panal: A possible precursor of fungal luciferin. **Tetrahedron**, v. 44, n. 6, p. 1597-1602, 1988.

OLIVEIRA, A.G.; CARVALHO, R.P.; WALDENMAIER, H. E.; STEVANI, C.V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. **Química nova**, v. 36, n. 2, p. 314-319, 2013.

OLIVEIRA, A.G.; DESJARDIN, D. E.; PERRY, B.A.; STEVANI, C.V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 5, p. 848-852, 2012.

OLIVEIRA, A.G.; STEVANI, C.V. The enzymatic nature of fungal bioluminescence. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 10 , p. 1416-1421, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; STEVANI, C.V.; WALDENMAIER, H.E.; VIVIANI, V.; EMERSON, J.M.; LOROS, J.J.; DUNLAP, J.C. Circadian control sheds light on fungal bioluminescence. **Current Biology**, v. 25, n. 7, p. 964-968, 2015.

PIERZYNSKI, G.M.; VANCE, G.F.; SIMS, T. **Soils and Environmental Quality**. 3rd . ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 20-33, 2001.

PRASHER, I.B.; CHANDEL, V.C.; AHLUWALIA, A.S. Influence of culture conditions on mycelial growth and luminescence of Panellus stipticus (bull.) P. Karst. **Journal of Research in Biology**, v. 2, n. 3, p. 152-159, 2012.

RAMOS, A.M.; SANTOS, L.A.R; FORTES, L.T.G. **Normais climatológicas do Brasil 1961-1990**. Edição revista e ampliada. Brasília: Instituto Nacional de Meteorologia, 2009. Disponível em: < http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas> Acesso em: 07 abr. 2015.

REID, B.J.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments -- a perspective on mechanisms, consequences and assessment, v. 108, n. 1, p. 103-112, 2000.

RICCO, G.; TOMEI, C.; RAMADORI, R.; LAERA, G. Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox®. **Water Research**, v. 38, n. 8, p. 2103-2110, 2004.

RIEUWERTS, J.S.; THORNTON, I.; FARAGO, M.E.; ASHMORE, M.R. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. **Chemical Speciation and Bioavailability**, v. 10, n. 2, p. 61-75, 1998.

ROSLING, A.; LINDAHL, B.D.; TAYLOR, A.F.S.; FINLAY, R.D. Mycelial growth and substrate acidi¢cation of ectomycorrhizal fungi in response to di¡erent minerals. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 1, p. 31-37, 2004.

RUGGIERO, P. Abiotic transformations of organic xenobiotics in soils: a compounding factor in the assessment of bioavailability. In: BAVEYE, P.; BLOCK, J.-C.; GONCHARUK, V.V. (Ed.). **Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment: Practical Consequences for the Environment**. Vol. 64. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999.

RUGGIERO, P.; PIZZIGALO, M.D.R.; CRECCHIO, C. Effects of soil abiotic processes on the bioavailability of anthropogenic organic residues. **Developments in Soil Science**, v. 28, n.2, p. 95-133, 2002.

SANTOS, V.L.; LINARDI, V.R. Phenol degradation by yeasts isolated from industrial effluents. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 213-221, 2001.

SEELY, R.J.; MUNYAKAZI, L.; HAURY, J.; SIMMERMAN, H.; RUSHING, W.H.; CURRY, T.F. Demonstrating the Consistency of Small Data Sets: Application of the Weisberg t-test for Outliers. **BioPharm International**, v. maio, 2013.

SEMPLE, K.T.; MORRISS, W.J.; PATON, G.I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 809-818, 2003.

SHADNIA, H.; WRIGHT, J.S. Understanding the toxicity of phenols: Using Quantitative Structure-Activity Relationship and enthalpy changes to discriminate between possible mechanisms. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 6, p. 1197-1204, 2008.

SHARMA, A.; SHARMA, K. Should Solubility and Zone of Inhibition Be the Only Criteria for Selection of Solvent in Antimicrobial Assay? **Advances in Biological Research**, v.5, n.5, p. 241-247, 2011.

SHARMA, O.P. **Textbook of Fungi.** 15th reprint. New Delhi: Tata McGraw Hill Publishing Company, 2006.

SHIMOMURA, O. **Bioluminescence: Chemical Principles and Methods.** Revised ed. Toh Tuck Link, Singapura: World Scientific Publishing, 2012.

SHIMOMURA, O.; SATOH, S.; KISHI, Y. Structure and non-enzymatic light emission of two luciferin precursors isolated from the luminous mushroom *Panellus stipticus.* **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, v. 8, n. 4, p. 201-205, 1993.

SIGMA-ALDRICH product information. Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/x100pis.pdf> Acesso em: 13 mar. 2015.

SIVINSKI, J. Arthropods attracted to luminous fungi. **Phyche**, v. 88, n. 3-4, p. 383-390, 1981.

SIVINSKI, J. Phototropism, bioluminescence, and the diptera. **Florida Entomologist**, v. 81, n. 3, p. 282-292, 1998.

SMITH, D. Culture and preservation. In: HAWKSWORTH, D.L.; KIRSHOP, B.E. (Ed.). **Living Resources for Biotechnology: Filamentous Fungi**. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

SPYCHER, S.; PELLEGRINI, E.; GASTEIGER, J. Use of structure descriptors to discriminate between models of toxic action of phenols. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, n. 1, p. 200-208, 2005.

STEINBERG, S.M.; POZIOMEK, E.J.; ELGELMANN, W.H.; ROGERS, K.R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. **Chemosphere**, v. 30, n. 11, p. 2155-2197, 1995.

STEPHENSON, G.L.; KUPERMAN, R.G.; LINDER, G.L.; VISSER, S. Toxicity tests for assessing contaminated soils and ground water. In: SUNAHARA, G.I. (Ed.). **Environmental Analysis of Contaminated Sites**. 1st. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

STEVANI, C.V.; OLIVEIRA, A.G.; MENDES, L.F.; VENTURA, F.F.; WALDENMAIER, H.E.; CARVALHO, R.P; PEREIRA, T.A. Current Status of Research on Fungal Bioluminescence: Biochemistry and Prospects for Ecotoxicological Application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 6, p. 1318-1326, 2013.

STOKES, J.D.; PATON, G.I.; SEMPLE, K.T. Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. **Soil Use and Management**, v. 21, n. supplement s2, p. 475-486, 2006.

VENTURA, F.F.; SILVA, R.T.P.; STEVANI, C.V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (Neonothopanus gardneri) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2015.

VODA, K.; BOH, B.; VRTACNIK, M. A quantitative structure–antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 10, n. 1, p. 76-84, 2004.

VODA, K.; BOH, B.; VRTACNIK, M.; POHLEVEN, F. E ect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 1, p. 51-59, 2003.

WALKER, G.M.; WHITE, N.A. Introduction to Fungal Physiology. In: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: Biology and Applications.** 1st. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2005

WEITZ, H.J.; BALLARD, A.L.; CAMPBELL, C.D.; KILLHAM, K. The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 2, p. 165-170, 2001.

WEITZ, H.J. Bioluminescence-based fungal biosensors. In: ROBSON, G.D.; VAN WEST, P.; GADD, G.M. (Ed.). **Exploitation of Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

WEITZ, H.J.; CAMPBELL, C.D.; KILLHAM, K. Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 422-429, 2002.

WEITZ, H.J. Naturally bioluminescent fungi. **Mycologist**, v. 18, n. 1, p. 4-5, 2004.

WILSON, T.; HASTINGS, J.W. **Bioluminescence: Living Lights, Lights for Living**. 1st. ed. Cambridge: Harvard University Press, 2013.

WILSON, T.; HASTINGS, J.W. Bioluminescensce. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 197-230, 1998.

WONG, D.W.S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

XU, F. Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7608-7614, 1996.

APÊNDICE A – Valores de BL medidos nos luminômetros de tubo e de microplacas.*

			Luminômetro de Tubo		Luminômetro de Microplacas	
Dia	**pH**	**Temp. (ºC)**	**$BL_{média}$ x 10^5 (RLU)**	**RSD (%)**	**$BL_{média}$ x 10^5 (RLU)**	**RSD (%)**
0	4(T)	25	0,06 ± 0,08	124,4	0,05 ± 0,00	3,2
2	4(T)	25	0,30 ± 0,32	105,7	0,05 ± 0,01	23,4
3	4(T)	25	11,5 ± 7,7	67,2	0,54 ± 0,36	65,9
4	4(T)	25	8,9 ± 6,3	70,5	0,36 ± 0,24	67,7
5	4(T)	25	8,5 ± 8,9	105,6	0,29 ± 0,24	81,6
6	4(T)	25	2,1 ± 4,1	195,7	0,11 ± 0,16	143,6
9	4(T)	25	0,05 ± 0,04	77,0	6,8 ± 13,4	198,7
0	4	25	0,17 ± 0,10	61,1	0,08 ± 0,00	6,4
2	4	25	4,9 ± 2,8	56,5	0,30 ± 0,16	54,5
3	4	25	25,0 ± 17,9	71,8	0,80 ± 0,74	93,2
4	4	25	15,0 ± 14,9	98,9	0,64 ± 0,82	128,6
5	4	25	9,7 ± 16,8	173,0	0,32 ± 0,49	150,2
6	4	25	0,16 ± 0,29	182,5	0,02 ± 0,00	13,7
9	4	25	0,13 ± 0,09	74,0	0,03 ± 0,01	23,5
0	6	25	21,4 ± 7,1	32,9	2,6 ± 0,4	14,5
2	6	25	85,7 ± 24,8	28,9	5,1 ± 1,8	34,7
3	6	25	167 ± 17,4	10,4	8,3 ± 2,5	29,9
4	6	25	103,3 ± 46,0	44,5	3,4 ± 2,1	60,6
5	6	25	27,1 ± 8,0	29,6	0,34 ± 0,06	15,9
6	6	25	0,06 ± 0,02	34,8	0,02 ± 0,00	11,2
9	6	25	1,0 ± 2,5	237,4	0,16 ± 0,35	222,1
0	8	25	3,0 ± 0,7	23,8	0,22 ± 0,05	23,4
2	8	25	0,9 ± 0,5	50,8	0,09 ± 0,04	38,5
3	8	25	5,9 ± 6,7	112,7	0,38 ± 0,52	134,8
4	8	25	43,7 ± 21,7	49,7	1,7 ± 1,1	63,0
5	8	25	57,8 ± 24,4	42,2	1,9 ± 1,2	64,2
6	8	25	1,6 ± 3,6	223,3	0,03 ± 0,02	44,9
9	8	25	0,53 ± 1,25	238,2	0,03 ± 0,01	33,0
0	4(T)	32	0,12 ± 0,04	39,9	0,06 ± 0,00	4,3
2	4(T)	32	15,7 ± 30,3	192,9	0,94 ± 1,72	183,0

Continua

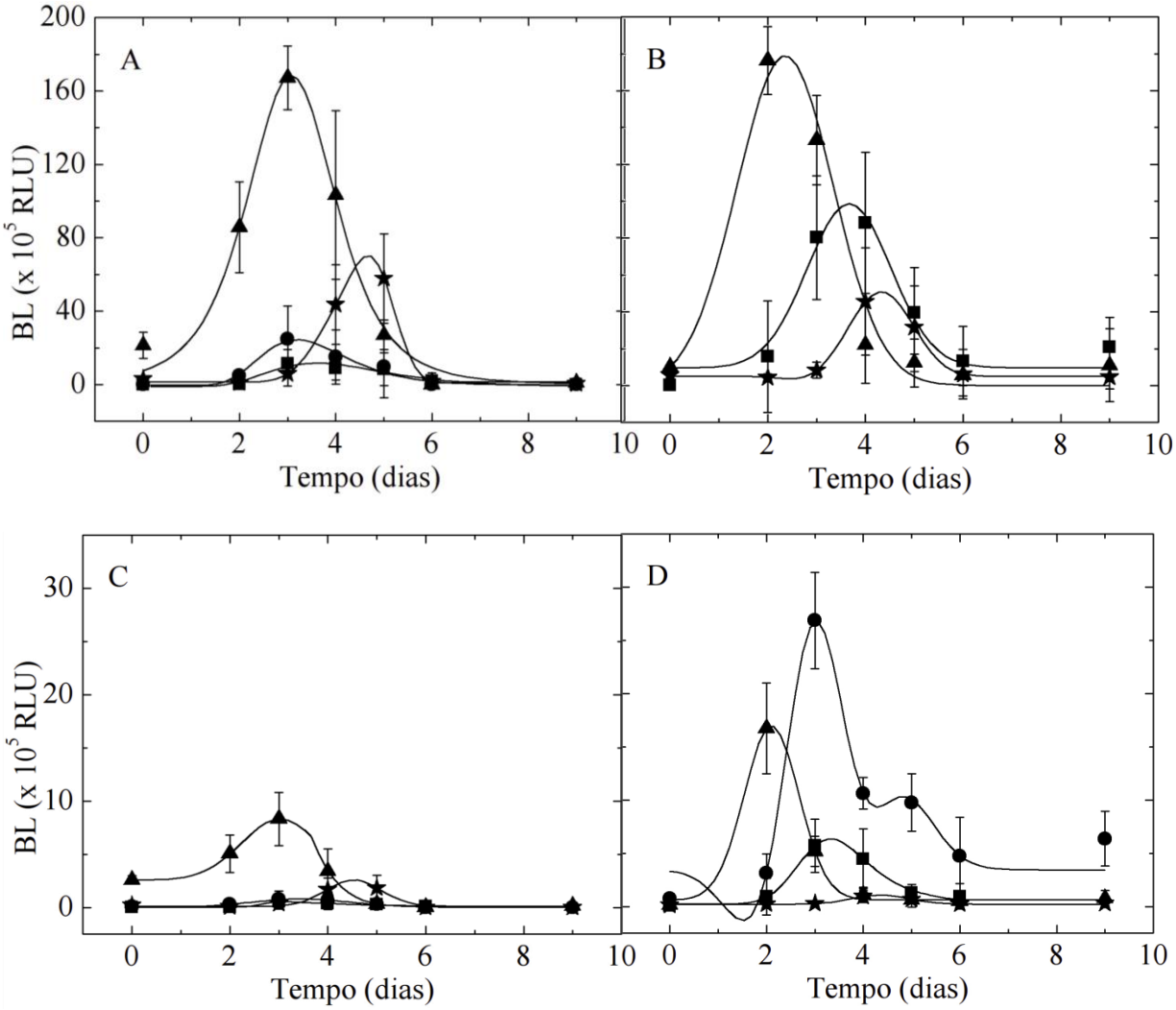
Conclusão

3	4(T)	32	80,3 ± 33,5	41,7	5,7 ± 2,5	43,9
4	4(T)	32	88,4 ± 38,3	43,4	4,5 ± 2,8	62,8
5	4(T)	32	39,6 ± 14,4	36,5	1,3 ± 0,8	60,1
6	4(T)	32	13,2 ± 18,9	143,7	1,0 ± 1,2	125,7
9	4(T)	32	21,0 ± 16,1	77,0	-	-
0	4	32	9,5 ± 2,7	29,0	0,74 ± 0,20	26,6
2	4	32	52,0 ± 26,7	51,4	3,2 ± 1,8	56,7
3	4	32	**Saturação**	**Saturação**	26,9 ± 4,5	16,8
4	4	32	136,2 ± 17,4	12,8	10,6 ± 1,5	14,0
5	4	32	125,8 ± 17,0	13,5	9,8 ± 2,7	27,6
6	4	32	51,0 ± 52,6	103,2	4,7 ± 3,6	77,1
9	4	32	58,5 ± 31,4	53,6	6,4 ± 2,6	40,3
0	6	32	10,2 ± 1,3	12,6	0,15 ± 0,01	6,2
2	6	32	176,3 ± 18,4	10,4	16,8 ± 4,3	25,5
3	6	32	133,1 ± 24,2	18,2	5,2 ± 1,4	27,6
4	6	32	22,2 ± 21,0	94,5	1,1 ± 0,7	63,3
5	6	32	12,4 ± 4,7	38,2	0,65 ± 0,33	50,9
6	6	32	5,7 ± 5,7	100,2	0,51 ± 0,36	69,6
9	6	32	11,1 ± 19,8	178,6	0,78 ± 0,72	91,9
0	8	32	5,6 ± 2,4	43,0	0,13 ± 0,02	18,6
2	8	32	4,4 ± 1,8	41,4	0,25 ± 0,14	58,3
3	8	32	8,5 ± 4,3	50,9	0,30 ± 0,22	76,1
4	8	32	45,7 ± 29,2	63,9	0,95 ± 0,57	59,7
5	8	32	31,6 ± 32,4	102,4	0,67 ± 0,74	111,1
6	8	32	6,2 ± 13,3	215,9	0,23 ± 0,34	147,9
9	8	32	4,7 ± 6,4	136,9	0,30 ± 0,38	127,7

4(T): meios de pH 4 tamponados

* Experimentos feitos com adição de 10 gotas de água destilada (500 µL) esterilizada sobre os meios de cultura no momento da inoculação (n = 3).

APÊNDICE B – Perfis de BL construídos com os valores do apêndice A.*



* As medidas foram feitas nos luminômetros de tubo (A e B) e de microplacas (C e D) incubando o fungo sob 25ºC (A e C) e 32ºC (B e D) em meios de pH 4 tamponado (■) ou 4 (●), 6 (▲) e 8 (★) não tamponados (n = 3). Na Figura B, a curva correspondente ao perfil de BL no pH 4 não tamponado foi oculta devido à saturação do sinal do detector no ponto mais alto do gráfico. Na Figura C, foi omitido o dia 9 da curva correspondente à incubação em pH 4 tamponado, porque o desvio padrão estava alto a ponto de dificultar a visualização dos dados no gráfico.

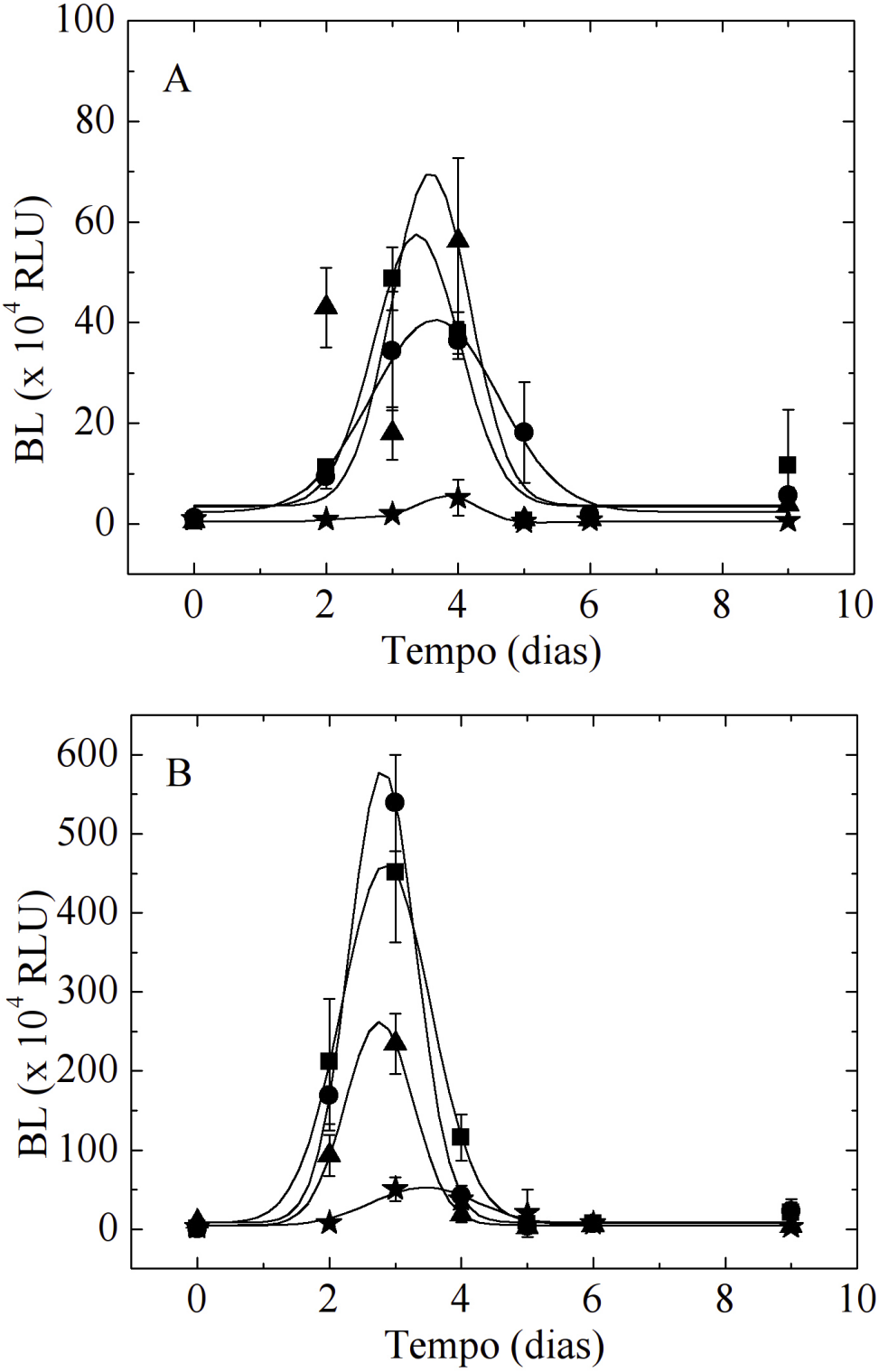
APÊNDICE C – Valores de BL medidos no luminômetro de microplacas utilizando um suporte individual de placas de 35 mm.*

		Temperatura 25ºC		Temperatura 32ºC	
Dia	**pH**	**$BL_{média}$ x 10^4 (RLU)**	**RSD (%)**	**$BL_{média}$ x 10^4 (RLU)**	**RSD (%)**
0	4(T)	0,53 ± 0,08	14,5	0,73 ± 0,22	30,2
2	4(T)	11,2 ± 1,2	11,0	212 ± 79	37,4
3	4(T)	48,7 ± 6,2	12, 8	451 ± 88	19,6
4	4(T)	37,9 ± 4,2	11,0	116 ± 29	25,3
5	4(T)	0,64 ± 0,04	6,1	6,4 ± 4,3	67,1
6	4(T)	1,8 ± 0,3	29,1	6,9 ± 7,6	110,8
9	4(T)	11,6 ± 11,1	96,3	21,2 ± 17,0	80,2
0	4	1,2 ± 0,3	26,4	0,28 ± 0,09	31,0
2	4	9,3 ± 2,4	25,4	169 ± 45	26,4
3	4	34,4 ± 11,8	34,4	539 ± 61	11,3
4	4	36,4 ± 3,7	10,2	42,5 ± 12,1	28,4
5	4	18,2 ± 10,0	55,3	3,7 ± 3,1	84,7
6	4	1,8 ± 1,1	59,4	6,6 ± 5,2	78,0
9	4	5,7 ± 1,6	28,6	23,0 ± 10,7	46,6
0	6	0,49 ± 0,07	14,1	9,2 ± 1,1	11,7
2	6	43,8 ± 7,9	18,0	92,8 ± 26,0	28,0
3	6	18,5 ± 5,2	28,2	234 ± 38	16,3
4	6	56,3 ± 16,4	29,2	18,5 ± 10,2	55,2
5	6	0,27 ± 0,08	29,2	1,8 ± 2,4	130,5
6	6	0,89 ± 0,15	17,2	4,8 ± 4,3	90,4
9	6	3,8 ± 3,2	85,4	4,2 ± 2,9	69,9
0	8	5,0 ± 0,9	18,5	2,2 ± 0,7	32,9
2	8	0,85 ± 0,08	9,1	7,7 ± 3,4	43,2
3	8	2,0 ± 0,6	29,7	50,5 ± 15,4	30,4
4	8	5,2 ± 3, 6	68,4	37,3 ± 14,7	39,5
5	8	0,39 ± 0,10	27,2	20,0 ± 29,8	148,4
6	8	0,70 ± 0,07	9,6	7,4 ± 8,7	119,9
9	8	0,62 ± 0,09	14,1	2,8 ± 2,7	99,0

4(T): meios de pH 4 tamponados

* (n=3)

APÊNDICE D – Perfis de BL construídos com os valores do apêndice C.*



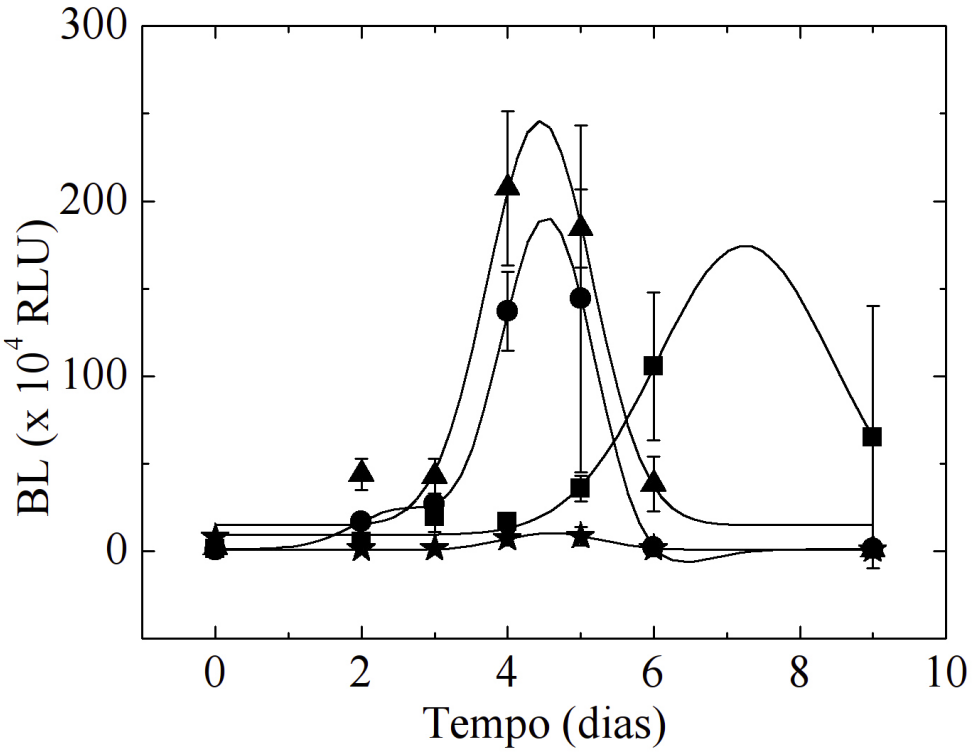
* Gráficos obtidos na medição individual do micélio inoculado em placas de 35 mm à 25ºC (A) e 32ºC (B), em pH 4 tamponado (■) ou 4 (●), 6 (▲) e 8 (★) não tamponados (n=3).

APÊNDICE E – Valores de BL medidos no luminômetro de microplacas utilizando um suporte individual de placas de 60 mm.*

		Placas de plástico		Placas de vidro	
Dia	**pH**	**$BL_{média}$ x 10^4 (RLU)**	**RSD (%)**	**$BL_{média}$ x 10^4 (RLU)**	**RSD (%)**
0	4	1,3 ± 5,6	41,1	-	-
2	4	5,3 ± 6,3	11,9	-	-
3	4	19,4 ± 8,4	43,5	-	-
4	4	16,7 ± 5,5	32,8	-	-
5	4	35,8 ± 7,3	20,4	-	-
6	4	106 ± 42	39,9	-	-
9	4	65,1 ± 74,9	115,2	-	-
0	6	0,70 ± 0,37	53,0	2,0 ± 0,2	11,7
2	6	27,5 ± 3,2	11,6	43,8 ± 8,8	20,1
3	6	17,6 ± 1,3	7,2	42,9 ± 9,9	23,0
4	6	137 ± 23	16,4	207 ± 44	21,3
5	6	144 ± 99	68,8	184 ± 22	12,1
6	6	2,2 ± 1,6	75,5	38,3 ± 15,5	40,5
9	6	1,6 ± 0,6	37,6	0,9 ± 0,1	11,7
0	8	7,9 ± 1,8	23,2	-	-
2	8	1,4 ± 0,2	16,5	-	-
3	8	1,5 ± 0,3	18,7	-	-
4	8	7,2 ± 4,1	57,2	-	-
5	8	8,6 ± 5,1	59,5	-	-
6	8	1,5 ± 0,6	42,7	-	-
9	8	0,81 ± 0,10	12,2	-	-

* Em todos os casos, o fungo foi incubao sob 25ºC em meios de pH 4, 6 e 8 não tamponados (n=3).

APÊNDICE F – Perfis de BL construídos com os valores do apêndice E.*



* Gráficos obtidos na medição individual do micélio incubado à 25ºC em placas de plástico com meios de pH 4(■), 6 (●) e 8 (★) não tamponados e em placas de vidro com meios de pH 6 (▲) (n=3).

APÊNDICE G – Valores de BL do fungo *N. gardneri* cultivado em placas de petri de 35mm, variando as condições de temperatura e pH.*

		25ºC		30ºC		35ºC	
Dia	**pH**	**BL ± SD ($x10^5$)**	**RSD (%)**	**BL ± SD ($x10^5$)**	**RSD (%)**	**BL ± SD ($x10^5$)**	**RSD (%)**
0	4	1,2 ± 0,2	18,4	0,22 ± 0,01	4,2	0,23 ± 0,01	6,2
1	4	0,12 ± 0,01	7,0	0,14 ± 0,01	6,7	0,19 ± 0,00	2,0
2	4	3,1 ± 0,3	9,6	4,6 ± 1, 0	21,7	0,20 ± 0,01	3,9
3	4	26,9 ± 1,7	6,3	21,3 ± 16,0	75,3	0,26 ± 0,00	1,7
4	4	23,3 ± 3,7	15,9	2,9 ± 0,1	4,4	0,22 ± 0,00	2,2
6	4	5,3 ± 0,7	12,6	11, 6 ± 2,0	16,8	0,18 ± 0,03	15,6
7	4	2,8 ± 0,5	18,8	11,8 ± 5,7	48,3	0,22 ± 0,05	23,3
8	4	5,4 ± 1,0	18,0	11,5 ± 1,6	14,4	0,27 ± 0,11	41,9
9	4	5,8 ± 1,6	27,7	8,5 ± 0,7	8,5	0,19 ± 0,06	33,3
10	4	9,0 ± 2,3	25,2	7,3 ± 1,1	14,5	0,36 ± 0,36	101,2
11	4	13,8 ± 3,4	24,4	5,6 ± 0,2	4,5	0,76 ± 1,28	167,8
13	4	26,4 ± 4,6	17,3	3,4 ± 0,9	26,3	-	-
0	6	0,66 ± 0,05	7,5	1,2 ± 0,1	8,4	0,94 ± 0,18	19,2
1	6	0,30 ± 0,02	7,0	0,33 ± 0,05	14,3	0,23 ± 0,00	1,6
2	6	1,1 ± 0,1	9,3	18,9 ± 1,5	8,1	0,34 ± 0,06	16,2
3	6	11,6 ± 0,8	6,9	24,1 ± 1,5	6,1	0,49 ± 0,07	14,6
4	6	17,1 ± 2,2	13,0	52,2 ± 7,7	14, 8	0,39 ± 0,06	14,8
6	6	58,4 ± 10,7	18,3	107 ± 8	7,8	0,28 ± 0,06	21,1
7	6	72,3 ± 8,1	11,2	182 ± 17	9,3	0,25 ± 0,03	11,5
8	6	148 ± 14	9,7	234 ± 17	7,2	0,23 ± 0,03	11,7
9	6	153 ± 4	2,8	275 ± 33	12,1	0,18 ± 0,01	7,4
10	6	209 ± 17	8,0	296 ± 35	11,9	0,19 ± 0,01	2,7
11	6	194 ± 32	16,5	350 ± 32	9,2	0,14 ± 0,00	1,5
13	6	190 ± 26	13,8	526 ± 60	11,3	-	-
0	8	0,22 ± 0,01	4,9	0,26 ± 0,01	3,2	0,29 ± 0,01	3,4
1	8	0,19 ± 0,02	9,6	0,20 ± 0,01	6,0	0,24 ± 0,02	7,3
2	8	0,11 ± 0,01	8,7	0,19 ± 0,01	4,2	0,25 ± 0,01	4,5
3	8	0,13 ± 0,01	7,2	0,47 ± 0,07	14, 9	0,31 ± 0,01	3,8
4	8	0,13 ± 0,01	5,2	0,43 ± 0,02	4,6	0,25 ± 0,01	2,6

Continua.

Conclusão.

6	8	0,61 ± 0,14	23,0	3,0 ± 0,8	27,4	0,17 ± 0,00	0,24
7	8	2,0 ± 0,3	15,8	8,4 ± 0,7	8,1	0,20 ± 0,00	1,1
8	8	8,2 ± 1,0	12,4	31,0 ± 6,2	19,9	0,21 ± 0,00	0,28
9	8	14,8 ± 1,4	9,2	63,5 ± 6,4	10,1	0,17 ± 0,00	2,9
10	8	30,8 ± 6,8	22,1	130 ± 10	7,8	0,19 ± 0,00	2,3
11	8	35,3 ± 3,6	10,3	207 ± 14	7,0	0,14 ± 0,01	4,8
13	8	74,2 ± 9,9	13,3	330 ± 30	9,2	-	-

* (n = 4)

APÊNDICE H – Valores de BL do fungo *N. gardneri* cultivado em placas de petri de 35 mm, variando as concentrações de extrato de levedura e melaço.*

			Temperatura 25ºC		**Temperatura 30ºC**	
Dia	**M (%)**	**L (%)**	**BL ± SD ($x10^5$)**	**RSD (%)**	**BL ± SD ($x10^5$)**	**RSD (%)**
0	0,2	0,1	0,36 ± 0,08	23,4	0,41 ± 0,04	10,2
1	0,2	0,1	0,34 ± 0,06	16,7	0,31 ± 0,04	14,0
2	0,2	0,1	0,67 ± 0,20	29,5	2,8 ± 2,0	70,8
3	0,2	0,1	2,0 ± 0,3	13,7	4,4 ± 1,7	39,3
6	0,2	0,1	16,4 ± 2,1	12,6	12,0 ± 2,0	17,0
7	0,2	0,1	36,6 ± 5,9	16,2	13,8 ± 2,6	18,9
8	0,2	0,1	56,0 ± 5,4	9,7	15,9 ± 2,8	17,7
9	0,2	0,1	39,8 ± 2,0	5,1	15,3 ± 2,6	17,0
10	0,2	0,1	44,6 ± 4,6	10,2	16,0 ± 3,6	22,6
11	0,2	0,1	45,6 ± 4,5	9,8	13,6 ± 4,6	34,3
13	0,2	0,1	36,8 ± 3,2	8,6	7,9 ± 4,9	62,1
0	1,0	0,1	0,54 ± 0,13	23,5	0,58 ± 0,06	10,2
1	1,0	0,1	0,32 ± 0,05	15,7	0,24 ± 0,02	6,6
2	1,0	0,1	0,80 ± 0,24	29,7	5,3 ± 0,5	9,2
3	1,0	0,1	13,2 ± 0,8	6,4	33,3 ± 2,9	8,8
6	1,0	0,1	72,9 ± 7,4	10,2	71,4 ± 13,2	18,4
7	1,0	0,1	103 ± 15	14,5	143 ± 27	18,7
8	1,0	0,1	170 ± 14	8,4	158 ± 14	8,7
9	1,0	0,1	174 ± 16	9,1	183 ± 19	10,2
10	1,0	0,1	197 ± 11	5,6	242 ± 22	9,2
11	1,0	0,1	186 ± 28	15,3	271 ± 27	10,1
13	1,0	0,1	214 ± 36	17,0	407 ± 54	13,3
0	5,0	0,1	0,49 ± 0,04	8,2	0,73 ± 0,06	7,6
1	5,0	0,1	0,32 ± 0,02	5,8	0,20 ± 0,00	2,0
2	5,0	0,1	0,53 ± 0,06	12,2	0,28 ± 0,03	12,2
3	5,0	0,1	5,6 ± 0,3	5,3	14,9 ± 1,5	10,2
6	5,0	0,1	151 ± 32	20,9	86,6 ± 4,7	5,5
7	5,0	0,1	172 ± 13	7,7	153 ± 63	41,5
8	5,0	0,1	360 ± 66	18,3	248 ± 98	39,4

Continua.

Conclusão.

9	5,0	0,1	499 ± 65	13,0	376 ± 141	37,6
10	5,0	0,1	1336 ± 166	12,4	503 ± 229	45,4
11	5,0	0,1	1204 ± 148	12,3	627 ± 317	50,7
13	5,0	0,1	1807 ± 251	13,9	605 ± 85	14,0
0	1,0	0,02	3,3 ± 0,7	22,5	0,49 ± 0,04	8,4
1	1,0	0,02	0,78 ± 0,09	11,5	0,21 ± 0,00	1,7
2	1,0	0,02	1,4 ± 0,2	13,3	15,4 ± 3,6	23,6
3	1,0	0,02	17,4 ± 2,4	13,6	57,2 ± 6,2	10,8
6	1,0	0,02	134 ± 17	12,9	215 ± 20	9,5
7	1,0	0,02	168 ± 30	17,8	243 ± 32	13,1
8	1,0	0,02	158 ± 15	9,5	210 ± 17	8,3
9	1,0	0,02	172 ± 24	14,1	191 ± 11	5,7
10	1,0	0,02	122 ± 17	14,0	187 ± 6	3,3
11	1,0	0,02	110 ± 14	13,1	204 ± 16	7,9
13	1,0	0,02	109 ± 15	13,8	216 ± 17	7,7
0	1,0	0,5	0,19 ± 0,01	7,6	1,8 ± 0,3	19,0
1	1,0	0,5	0,23 ± 0,02	6,5	0,26 ± 0,03	12,3
2	1,0	0,5	0,29 ± 0,04	13,4	2,3 ± 0,4	15,7
3	1,0	0,5	14,7 ± 1,0	7,0	48,2 ± 7,2	14,9
6	1,0	0,5	101 ± 15	15,1	182 ± 16	8,6
7	1,0	0,5	142 ± 16	11,3	216 ± 10	4,7
8	1,0	0,5	165 ± 8	5,1	218 ± 30	13,8
9	1,0	0,5	205 ± 17	8,4	185 ± 46	24,7
10	1,0	0,5	135 ± 18	13,0	189 ± 14	7,5
11	1,0	0,5	91,5 ± 8,2	8,9	164 ± 51	30,9
13	1,0	0,5	84,7 ± 7,0	8,2	226 ± 73	32,5

Legenda - M: concentração de melaço (%); L: concentração de levedura (%).

* (n = 4)

APÊNDICE I – Valores de BL do fungo *N. gardneri* em placas fechadas e após exposição ao ar e aos diluentes testados no desenvolvimento do bioensaio.*

T (h)	Placas fechadas		Ar		DMSO 0,1%		Triton X-100 0,05%		MES 50 mM + Triton X-100 0,05%		MES 50 mM + Triton X-100 0,01%	
	BL ± SD ($x10^6$)	RSD (%)	BL ± SD ($x10^6$)	RSD (%)	BL ± SD ($x10^6$)	RSD (%)	BL ± SD ($x10^6$)	RSD (%)	BL ± SD ($x10^6$)	RSD (%)	BL ± SD ($x10^6$)	RSD (%)
0	24,7 ± 3,4	13, 7	12,9 ± 0,8	6,2	8,4 ± 0,7	8,2	9,6 ± 1,3	13,2	12,1 ± 0,6	4,9	12,9 ± 1,4	10,9
0,5	24,5 ± 2,4	9,8	12,6 ± 2,0	15,8	4,0 ± 0,4	10,2	3,4 ± 0,2	5,3	4,8 ± 0,1	2,6	14,8 ± 1,8	11,8
1	25,1 ± 2,0	7,9	12,4 ± 2,0	16,2	4,0 ± 0,6	16,4	2,8 ± 0,3	11,5	4,3 ± 0,2	5,9	17,9 ± 1,9	10,8
2	24,1 ± 2,1	8,7	13,6 ± 1,5	11,1	5,1 ± 0,8	16,4	3,6 ± 0,2	6,5	4,9 ± 0,1	2,3	16,3 ± 1,3	8,3
4	25,3 ± 4,1	16,3	14,8 ± 1,1	7,5	6,2 ± 1,2	19, 9	4,2 ± 0,4	8,3	7,3 ± 0,6	8,0	15,6 ± 1,2	8,0
6	24,1 ± 4,2	17,3	13,5 ± 1,4	10,0	5,1 ± 0,4	8,0	4,2 ± 0,4	9,0	6,3 ± 0,7	10,6	11,4 ± 0,9	7,6
8	23,8 ± 3,0	12,8	12,1 ± 1,8	14,9	5,5 ± 0,7	13,0	4,3 ± 0,6	13,9	5,1 ± 0,3	6,0	11,2 ± 1,1	9,4
24	27,2 ± 4,1	15,0	17,8 ± 2,8	15,4	4,1 ± 0,6	14,7	5,0 ± 1,0	19,0	4,1 ± 0,6	14, 0	13,2 ± 1,5	11,6

T: tempo de exposição

* n = 9 para as placas fechadas ou expostas ao ar e n = 3 para as demais

APÊNDICE J – Valores de BL do fungo *N. gardneri* após exposição a uma solução de cobre 50mmol.L^{-1} e de fenol 10mmol.L^{-1}.*

T (h)	Diluente		Cu^{+2} 50 mmolL^{-1}			Fenol 10mmolL^{-1}		
	BL ± SD (x10^6)	RSD (%)	BL ± SD (x10^6)	RSD (%)	$BL_{inibida}$ ± SD (%)	BL ± SD (x10^6)	$BL_{inibida}$ ± SD (%)	RSD (%)
0	12,9 ± 1,4	10,9	9, 7 ± 0,8	8,7	24,9 ± 2,2	3,3 ± 0,2	74,2 ± 5,5	7,4
0,5	14,8 ± 1,8	11,8	4,0 ± 0,3	8,0	72,6 ± 5,8	0,79 ± 0,03	94,7 ± 3,1	3,2
1	17,9 ± 1,9	10,8	4,5 ± 0,45	10,2	75,0 ± 7,6	0,46 ± 0,09	97,5 ± 18,4	18,8
2	16,3 ± 1,4	8,3	4,1 ± 0,4	9,4	74,8 ± 7,0	0,23 ± 0,02	98,6 ± 7,4	7,5
4	15,6 ± 1,2	8,0	4,6 ± 0,1	2,2	70,4 ± 1,5	0,14 ± 0,01	99,1 ± 4,7	4,7
6	11,4 ± 0,9	7,6	3,5 ± 0,2	6,9	69,1 ± 4,8	0,11 ± 0,01	99,1 ± 10,0	10,1
8	11,2 ± 1,1	9,4	-	-	-	0,10 ± 0,01	99,2 ± 5,6	5,6
24	13,2 ± 1,5	11,6	0,02 ± 0,00	7,6	99,8 ± 7, 6	0,03 ± 0,00	99,8 ± 5,2	5,2

* Foram inclusos na tabela os respectivos valores percentuais da BL inibida (n=3).

APÊNDICE K - Valores de BL e de $BL_{inibida}$ do fungo *N. gardneri* após exposição de 24 h aos agentes tóxicos na aplicação bioensaio.*

Fenol		
Concentração ($mmolL^{-1}$)	**$BL_{inibida}$ ± SD (%)**	**RSD (%)**
0,01	0,03 ± 0,00	8,2
0,2	11,7 ± 1,4	11,5
0,5	23,8 ± 2,8	11,9
1,0	41,1 ± 6,2	15,1
2,0	54,1 ± 5,3	9,8
3,0	67,6 ± 1,8	2,6
4,0	82,1 ± 2,5	3,0
6,0	92,3 ± 0,4	0,49
8,0	95,3 ± 0,6	0,65
10,0	98,3 ± 0,2	0,22
4-nitrofenol		
Concentração ($mmolL^{-1}$)	**$BL_{inibida}$ ± SD (%)**	**RSD (%)**
0,01	0,01 ± 0,00	3,0
0,02	0,08 ± 0,01	10,5
0,05	10,8 ± 0,8	7,1
0,1	15,0 ± 1,5	9,9
0,2	26,8 ± 3,5	12,9
0,5	68,9 ± 1,3	1,9
5,0	99,8 ± 0,0	0,01
10	100,2 ± 2,2	2,2
Cu^{+2}		
Concentração ($mmolL^{-1}$)	**$BL_{inibida}$ ± SD (%)**	**RSD (%)**
0,01	0,02 ± 0,00	10,5
0,1	10,6 ± 1,5	14,1
0,5	55,3 ± 0, 8	1,4
1,0	67,2 ± 2,4	3,5
2,0	76,3 ± 0,9	1,1

Continua.

Conclusão.

10,0	95,6 ± 0,2	0,2
15	98,8 ± 0,4	0,4
25	99,1 ± 0,2	0,2
	Cd^{+2}	
Concentração ($mmolL^{-1}$)	**$BL_{inibida}$ ± SD (%)**	**RSD (%)**
1.10^{-3}	2,6 ± 0,3	10,5
2.10^{-3}	15,3 ± 1,0	6,7
5.10^{-3}	35,0 ± 5,6	16,0
0,01	60,1 ± 4,1	6,9
0,02	78,0 ± 0,7	0,9
0,03	90,2 ± 1,4	1,6
0,04	92,5 ± 0,7	0,74
0,05	92,4 ± 2,8	3,0
0,2	99,6 ± 0,4	0,35
0,5	99,4 ± 0,4	0,38

* (n = 3)

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernanda de Freitas Ventura

Local e data de nascimento: Guarulhos, 24 de outubro de 1989

2. EDUCAÇÃO

2004: Ensino médio, colégio Torricelli, Guarulhos – SP.

2005-2006: Ensino médio, colégio Sir Isaac Newton, São Paulo – SP.

2007-2010: Graduação em química (bacharelado), Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo - SP

2011-presente: Mestrado em química, Universidade de São Paulo (Instituto de Química), São Paulo – SP.

3. OCUPAÇÃO

2012-presente: Técnica, Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO).

2011-2012: Bolsista de mestrado, CNPq, vigência da bolsa: agosto/2011-abril/2012.

2010-2011: Técnica de laboratório, Colégio da Polícia Militar.

2008-2009: Estagiária, Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho (FUNDACENTRO).

4. TRABALHOS PUBLICADOS

4.1. Artigos publicados em periódicos

VENTURA, F.F.; SILVA, R.T.P.; STEVANI, C.V. História do Fungo Bioluminescente Flor-de-Coco (Neonothopanus gardneri) e Efeitos das Condições de Cultura Sobre a Emissão de Luz. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2015.

SANTOS, K.T. ; FLORENZANO, J.; RODRIGUES, L.; FÁVARO, R.R.; VENTURA, F.F.; RIBEIRO, M.G.; TEIXEIRA, S.A.; FERREIRA, H.H.A.; BRAIN, S.D.; DAMAZO, A.S.; ZORN, T.M.; CÂMARA, N.O.; MUSCARÁ, M.N.; PERON, J.P.; COSTA, S.K. Early postnatal, but not late, exposure to chemical ambient pollutant 1,2-naphthoquinone increases susceptibility to pulmonary allergic inflammation at adulthood. **Archives of Toxicology**, v.

88, n. 8, p. 1589-1605, 2014.

STEVANI, C.V.; OLIVEIRA, A.G.; MENDES, L.F. ; VENTURA, F. F. ; WALDENMAIER, H. E.; CARVALHO, R.P.; PEREIRA, T.A. Current Status of Research on Fungal Bioluminescence: Biochemistry and Prospects for Ecotoxicological Application. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 6, p. 1318-1326, 2013.

VENTURA, F.F.; Oliveira, J.J.; PEDREIRA FILHO, W.R; RIBEIRO, M.G. GC-MS quantification of organophosphorous pesticides extracted from XAD-2 sorbent tube and foam patch matrices. **Analytical Methods**, v. 4, n. 11, p. 3666-3673, 2012.

4.2. Participação em capítulos de livros

RIBEIRO, M.G.; VENTURA, F.F. Occupational Health and Safety Knowledge and Practice. In: RIBEIRO, M.G. (Ed.). In: **Frontiers in Occupational Health and Safety**. 1st volume. Sharjah, U.A.E.: Bentham Science Publishers, 2014.

4.3. Resumos e trabalhos em anais de congressos

STEVANI, C.V.; OLIVEIRA, A.G.; MENDES, L.F.; VENTURA,F. F.; WALDENMAIER, H.E.; CARVALHO, R.P.; PEREIRA, T.A. Importância da Bioluminescência de Fungos na Química Ambiental. In: **VII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil**, 2013, Manaus. Anais do VII Simpósio Internacional Sobre Cogumelos no Brasil, 2013. p. 166-170.

VENTURA,F. F.; MENDES, L.F.; BASTOS, E.L.; STEVANI, C.V. Evaluation of interactive toxic effects of binary metal mixtures to the bioluminescent fungus Gerronema viridilucens. In: **SETAC 6th World Congress**, 2012, Berlim. Abstract book. Bruxelas, 2012. p. 198-198.

OLIVEIRA, J.J.; VENTURA,F.F.; RIBEIRO, M.G.; PEDREIRA FILHO, W.R. Estudos de recuperação e efeito matriz para quantificação de pesticidas em estufas de flores. In: **15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica**, 2009, Salvador. Livro de Resumos do 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009.

VENTURA,F.F.; OLIVEIRA, J.J.; RIBEIRO, M.G.; PEDREIRA FILHO, W.. Otimização de Metodologia Analítica para Avaliação da Exposição Dérmica Ocupacional a Pesticidas. In: **32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009, Fortaleza. Livro de Resumos da 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009. p. 196-196.

COLASSO, C.G.; MONTEIRO, P.P. ; OLIVEIRA J.J.; PEDREIRA FILHO, W.R; RIBEIRO, M.G.; VENTURA, F.F. Exposição ocupacional a praguicidas em estufas de flores. In: **XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2009, Belo Horizonte. Revista Brasileira de Toxicologia, 2009. v. 22. p. 35-35.