ELLEN CRISTINA MIRANDA LACERDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO POR FUNGOS
FILAMENTOSOS PRESENTES EM ÁREAS DE PROCESSAMENTO DE COBRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2017

ELLEN CRISTINA MIRANDA LACERDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO POR FUNGOS
FILAMENTOSOS PRESENTES EM ÁREAS DE PROCESSAMENTO DE COBRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dr(a) Elen Aquino Perpetuo

Coorientador: Prof(a) Dr(a) Luciana Jandelli Gimenes

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lacerda, Ellen Cristina Miranda

Avaliação do potencial de biorremediação por
fungos filamentosos presentes em áreas de
processamento de cobre / Ellen Cristina Miranda
Lacerda; orientadora Elen Aquino Perpetuo;
coorientadora Luciana Jandelli Gimenes. -- São
Paulo, 2017.
120 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microrganismos. 2. Metais. 3. Tolerância. 4.
Remoção de íons. I. Perpetuo, Elen Aquino,
orientador. II. Gimenes, Luciana Jandelli,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): ELLEN CRISTINA MIRANDA LACERDA

Titulo da Dissertação: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO POR FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EM ÁREAS DE PROCESSAMENTO DE COBRE.

Orientador: PROF^a DR^a ELEN AQUINO PERPETUO

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 720/15 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação do potencial de biorremediação de fungos presentes em áreas de processamento de cobre*" sob a responsabilidade de **Ellen Cristina Miranda Lacerda**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 24 de março de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Já que nada do que fazemos é possível sem um conjunto de lugares e pessoas, que colaboram direta ou indiretamente para a realização de um sonho, não poderia deixar de registrar os meus agradecimentos àqueles que fizeram parte dessa jornada tão intensa!

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, por terem me concedido a oportunidade da realização do meu mestrado.

À Vale S.A. e ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), pelo apoio financeiro para a execução dos trabalhos.

À Elen Aquino Perpetuo, por ter sido uma peça chave para que o mestrado fosse uma realidade. Obrigada por toda a ajuda e disponibilidade!

À Luciana Jandelli Gimenes, por ter sido essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa. Obrigada pela orientação, pela parceria, pela troca e até pelas broncas! A nossa experiência me permitiu crescer e amadurecer científica e pessoalmente, e sou profundamente grata por isso!

Ao Profº Benedito Côrrea e ao Laboratório de Micotoxinas ICB/USP, lugar onde a maior parte dos experimentos foi realizado. Obrigada por ter permitido que eu usasse o espaço por todo esse tempo e por toda a ajuda que recebi!

Ao Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA Poli USP), lugar onde uma parte dos ensaios de remoção foi executado e a digestão e análise no ICP foi realizada. Obrigada por terem permitido o uso do local e dos equipamentos! Obrigada também ao técnico de laboratório Nilson Roman, pelas análises no ICP, envio dos resultados e pela ajuda quando as dúvidas surgiam!

Ao Profº Carlos Taborda e a todos do Laboratório de Micologia ICB/USP, que emprestaram gentilmente o shaker para que os ensaios de remoção pudessem ser

feitos. Obrigada por terem cedido o equipamento sempre que eu precisei e sempre com muita gentileza!

À Tatiana Alves e Marcela Galluzzi, que me ajudaram ativamente no dia-a-dia e não sei como tudo poderia ter dado certo sem elas. Obrigada por toda a ajuda (e foi muita mesmo!), pela paciência e pelo interesse!

A todos os colegas do Laboratório de Micotoxinas ICB/USP e do CEPEMA, por terem tornado esse caminho mais simples, principalmente ao Rodrigo Cardoso, pelo auxílio e por sempre prestativo e atencioso! Obrigada pelos cafés (que foram essenciais para me manter alerta e acordada por tantas vezes!) e pelas conversas, longas ou curtas, para a distração ou ampliação e compartilhamento de experiências e conhecimento. Obrigada por todo o suporte e ajuda sempre que precisei!

Ao meu amigo Luís Penereiro, pela revisão do inglês do artigo e pela sua pronta disponibilidade em ajudar.

Aos meus grandes amigos! Sem esse conjunto de pessoas especiais, cada um com as suas exclusivas palavras de incentivo, pela torcida, pelo interesse, por terem até simpatizado pelos funguinhos, por me apoiarem a cada novo passo, por compreenderem a minha ausência em tantos eventos e encontros, e por serem exatamente como são! Obrigada por tudo, sempre!

Aos meus pais, por serem a minha base, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, por sempre estarem presentes nas minhas vitórias e derrotas, por me amarem incondicionalmente, por entenderem a minha ausência em tantos finais de semana (nem sempre, né mamis?). Obrigada por me tornarem quem eu sou e pelo seu amor, tão essencial!

Ao meu marido, por ser o meu porto seguro, a minha força quando a minha própria falhava, por me lembrar diariamente de que eu era capaz, por aguentar todos os meus surtos e crises, por sempre me colocar de volta nos eixos, por entender a minha “ausência” em infindáveis dias. Obrigada pelo seu amor sincero, ogor, apaixonado, carinhoso e companheiro!

AGRADECIMENTO

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado, que permitiu a minha dedicação integral a essa pesquisa.

“Tudo depende do quanto estamos dispostos”

Erika Jardim

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não
existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz”

Ayrton Senna

RESUMO

LACERDA, E. C. M. **Avaliação do potencial de biorremediação por fungos filamentosos presentes em área de processamento de cobre.** 2017. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Resíduos e locais contaminados com cobre se tornam um problema para o meio ambiente, já que em níveis elevados podem causar diversos danos a todo ecossistema. A interação entre fungos e metais, utilizada pela biorremediação em locais contaminados, pode resultar na remoção ou na biotransformação do metal. Os objetivos desse trabalho foram investigar a tolerância, o crescimento e o comportamento de nove espécies de fungos filamentosos isolados de local contaminado com Cu^{2+} , selecionar aquela com resistência diferenciada e avaliar a sua capacidade de remoção de Cu^{2+} . Por meio da inoculação das nove espécies em meio de cultura sólido contendo diferentes concentrações de Cu^{2+} verificou-se que a concentração inibitória mínima variou entre as espécies, que apresentaram valores de 370 a >4.000 ppm. Além disso, foi verificado que o crescimento de todas as espécies pouco foi afetado até a concentração de 94 ppm, com exceção de *A. fumigatus*. A partir de 187 ppm, o crescimento de todas as espécies diminuiu, com exceção de *F. solani*, *R. microsporus* e *A. flavus*. A presença do Cu^{2+} causou diferentes efeitos aos aspectos visíveis das colônias fúngicas e eles se acentuaram com o aumento da concentração de Cu^{2+} , como intensificação da pigmentação do micélio de *A. fumigatus* e surgimento de pigmentação no meio de cultura no qual *A. fumigatus* e *F. solani* foram cultivados, além de inibição da esporulação em altas concentrações. Como a espécie *P. ochrochloron* apresentou tolerância e crescimento superior às outras espécies nas concentrações mais altas, além de ter sido capaz de crescer em 4.000 ppm, foi selecionada para os testes de remoção Cu^{2+} . O crescimento da biomassa em meio de cultura líquido foi maior na presença de Cu^{2+} . A capacidade de remoção de Cu^{2+} praticamente não sofreu alteração em 50, 100 e 150 ppm, mas aumentou a partir de 150 ppm com a elevação da concentração. A maior capacidade de remoção ocorreu em 250 ppm, $7,69 \text{ mg.g}^{-1}$. A remoção iniciou-se a partir do terceiro dia e aumentou com o aumento do período de incubação. A maior remoção ocorreu após sete dias em todas as concentrações testadas, de 50 a 250 ppm, e ficou entre 20% e 12%. Utilizando biomassa morta, seca e pulverizada, uma rápida bioissorção foi apurada nos primeiros 20 minutos. De 75% a 45% de Cu^{2+} foi removido em solução contendo de 50 a 200 ppm. Enquanto a remoção diminuiu, a capacidade de remoção aumentou com a elevação da concentração e entrou em equilíbrio em 200 ppm. A maior capacidade de remoção foi observada em 200 ppm, $7,78 \text{ mg.g}^{-1}$, e a maior remoção foi verificada em 50 ppm, com 75% do Cu^{2+} removido. A capacidade de remoção utilizando 0,2 g de biomassa foi maior do que o dobro quando 0,5 g foi testada. Com os resultados obtidos, ficou evidente que os fungos apresentam potencial a ser explorado pela biorremediação e que os avanços de pesquisas nesse campo são importantes para o desenvolvimento de eficientes processos de recuperação ambiental, visando a melhoria da qualidade de vida e do meio ambiente.

Palavras-chave: Microrganismos. Metais. Tolerância. Remoção de íons.

ABSTRACT

LACERDA, E. C. M. **Evaluation of the bioremediation potential by filamentous fungi present in copper processing sites.** 2017. 120 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Wastes and sites contaminated with Cu^{2+} have become a problem for the environment, because high levels of Cu^{2+} can cause several damages for the whole ecosystem. The interaction between fungi and metals, used by bioremediation in the contaminated sites, can result in the removal or biotransformation of the metal. The aims of this study were to investigate the tolerance, growth and behavior of nine filamentous fungi species isolated from Cu^{2+} contaminated location, select the species which demonstrated differentiated resistance and evaluate its Cu^{2+} removal capacity. The species were inoculated in solid culture medium with different Cu^{2+} concentrations and the minimum inhibitory concentration of Cu^{2+} varied among the species from 370 to 4,000 ppm. The growth of all fungal species was practically not affected until 94 ppm Cu^{2+} , with the exception of *A. fumigatus*. However, starting from 187 ppm Cu^{2+} the growth of all species decreased, except for *F. solani*, *R. microsporus* and *A. flavus*, which showed 100% of tolerance. The presence of Cu^{2+} caused different effects on the visible aspects of the fungal species colonies, which became accentuated with the increase of the Cu^{2+} concentration, such as the intensification of the mycelium pigmentation of *A. fumigatus* and the appearance of pigmentation on the culture medium where *A. fumigatus* and *F. solani* were cultivated, besides the sporulation inhibition in high Cu^{2+} concentrations. The species *P. ochrochloron* showed superior tolerance to other species in high Cu^{2+} concentrations and was able to grow in 4,000 ppm, demonstrating distinct growth and behavior, and then being selected for the Cu^{2+} removal tests. The biomass growth in liquid culture medium was higher in the presence of Cu^{2+} . The Cu^{2+} removal capacity did not change in 50, 100 and 150 ppm, but increased starting from 150 ppm with the increase of the concentration. The highest removal capacity occurred in 250 ppm, 7.69 mg.g^{-1} . The removal started from the third day and increased with the incubation period increase. The highest removal rate occurred after seven days in concentrations from 50 to 250 ppm, between 20% and 12%. When using pulverized, dried and died biomass, a fast biosorption was observed in the first 20 minutes. 45% to 75% of the Cu^{2+} was removed in solution containing 50 to 200 ppm. While the removal decreased, the removal capacity increased with the concentration increase and reached the equilibrium in 200 ppm. The highest removal capacity was observed in 200 ppm, 7.78 mg.g^{-1} , and the highest removal rate was verified in 50 ppm, with 75% of Cu^{2+} removed. The removal capacity was around 219% higher with the use of 0.2 g of biomass than 0.5 g. With the results obtained, it was evident that the fungi showed a potential to be explored in the bioremediation and that the researches advancements in this field are important for the development of efficient environmental recovery processes, aiming the improvement of both life and environmental quality.

Keywords: Microorganisms. Metals. Tolerance. Removal of ions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Índice de tolerância (IT) das espécies inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), em até 370 ppm	50
Figura 2 - Índice de tolerância (IT) das espécies que demonstraram maior tolerância ao Cu^{2+} , inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), entre 541 e 4.000 ppm	51
Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>F. solani</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 10 dias de incubação	51
Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>R. microsporus</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 4 dias de incubação	52
Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>P. citrinum</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação	53
Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>A. flavus</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação	53
Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>A. fumigatus</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação...	54
Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>E. shearii</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação	55
Figura 9 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>P. lilacinum</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação ...	56
Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>A. pullulans</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação ...	57
Figura 11 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de <i>P. ochrochloron</i> , inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação	58
Figura 12 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>F. solani</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 10 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	59
Figura 13 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>F. solani</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 10 dias de incubação, em comparação ao controle (reverso da placa de Petri)	60
Figura 14 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>R. microsporus</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 4 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	61
Figura 15 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>P. citrinum</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	62

Figura 16 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>A. flavus</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	63
Figura 17 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>A. fumigatus</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	64
Figura 18 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>A. fumigatus</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (reverso da placa de Petri)	65
Figura 19 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>E. shearii</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	66
Figura 20 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>P. lilacinum</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	67
Figura 21 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>A. pullulans</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	68
Figura 22 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na morfologia visível das colônias de <i>P. ochrochloron</i> , inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri)	70
Figura 23 – Efeito da concentração inicial de Cu^{2+} (ppm) na capacidade de remoção do metal pela biomassa e no crescimento de <i>P. ochrochloron</i> (período de incubação: 7 dias; temperatura: 27 °C; pH inicial: 4,15 ± 0,15; agitação: 125 rpm)	72
Figura 24 - Biomassa produzida durante 7 dias de incubação em meio de cultura BD acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), além do controle (sem o metal) (temperatura: 27 °C; pH inicial: 4,15 ± 0,15; agitação: 125 rpm)	73
Figura 25 - Efeito do período de incubação na remoção do Cu^{2+} pela biomassa em crescimento de <i>P. ochrochloron</i> , em diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) (temperatura: 27 °C; pH inicial: 4,15 ± 0,15; agitação: 125 rpm)	74
Figura 26 – Efeito do tempo de contato na capacidade de remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada de <i>P. ochrochloron</i> (concentração inicial: 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} ; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: 5,0 ± 0,15; agitação: 125 rpm)	75

Figura 27 – Efeito do tempo de contato na remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* (concentração inicial: 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} ; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: 5,0 ± 0,15; agitação: 125 rpm) 76

Figura 28 - Efeito da concentração inicial de Cu^{2+} (ppm) na remoção do metal pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* (tempo de contato: 60 minutos; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: 5,0 ± 0,15; agitação: 125 rpm) 77

Figura 29 – Efeito da quantidade de biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* na remoção do Cu^{2+} (concentração inicial: 200 ppm Cu^{2+} ; tempo de contato: 60 minutos; temperatura: 27 °C; pH: 5,0 ± 0,15; agitação: 125 rpm) 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) de Cu^{2+} (ppm)	48
Tabela 2 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), em cm.dia^{-1} , das espécies inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), em até 735 ppm	49
Tabela 3 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), em cm.dia^{-1} , das espécies que demonstraram maior tolerância ao Cu^{2+} , inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} , entre 870 ppm e 4.000 ppm	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C. – antes de Cristo

AG – ácidos graxos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATPase - adenosinatrifosfatase

As⁵⁺ - íon arsênio (V)

BD – batata dextrose

BDA – Batata dextrose ágar

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

Ca²⁺ - íon cálcio (II)

Cd²⁺ - íon cádmio (II)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cm – centímetro

cm.dia⁻¹ – centímetro por dia

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cr²⁺ - íon crômio (II)

Cr⁺⁴ – íon crômio (IV)

Cu⁺ - íon cobre (I)

Cu²⁺ - íon cobre (II)

CuCl₂ – cloreto de cobre

CuS – sulfeto de cobre

CuSO₄ – sulfato de cobre

DHN - melanina dihidroxinaftaleno

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

ERO – espécies reativas de oxigênio

FL - fosfolipídios

g - grama

g.L⁻¹ – grama por litro

h - hora

HCl – ácido clorídrico

HNO₃ – ácido nítrico

IBRAM – Instituto Brasileiro de Mineração

ICP-OES – *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*
(espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado)

IT – Índice de Tolerância

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

IVCM – Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

K⁺ - íon potássio (I)

L - litro

LPG – extrato de levedura, peptona e glicose

mg.g⁻¹ – miligrama por grama

mg.kg⁻¹ – miligrama por quilograma

mg.L⁻¹ – miligrama por litro

mL – mililitro

mm – milímetro

MP – membrana plasmática

NaOH – hidróxido de sódio

Na⁺ - íon sódio (I)

Ni²⁺ - íon níquel (II)

nm - nanômetro

PC – parede celular

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

rpm – rotações por minuto

S.A. – sociedade anônima

SOD – superóxido dismutase

USP – Universidade de São Paulo

Zn²⁺ - íon zinco (II)

ZnS – sulfeto de zinco

μL – microlitro

μg.dia⁻¹ – micrograma por dia

μm – micrometro

°C – grau Celsius

± - mais ou menos

% - porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
<u>2.1 OBJETIVO GERAL</u>	23
<u>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	23
3 JUSTIFICATIVA	24
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
<u>4.1 O COBRE</u>	25
<u>4.2 OS FUNGOS</u>	28
<u>4.3 A BIORREMEDIAÇÃO</u>	30
4.3.1 A biorremediação em resíduos e locais contaminados com metais	32
<u>4.4 A INTERAÇÃO ENTRE OS FUNGOS E OS METAIS NA BIORREMEDIAÇÃO</u>	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
<u>5.1 MATERIAL BIOLÓGICO</u>	41
<u>5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CULTIVADOS NA PRESENÇA DE Cu^{2+}</u>	41
5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima	42
5.2.2 Medição do diâmetro de crescimento das colônias	42
5.2.3 Determinação do índice de velocidade de crescimento micelial	42
5.2.4 Determinação do índice de tolerância	42
5.2.5 Análise da macromorfologia das colônias	43
<u>5.3 REMOÇÃO DE Cu^{2+} PELA ESPÉCIE SELECIONADA</u>	43
5.3.1 Biomassa viva em crescimento	43
5.3.2 Preparação da biomassa morta, seca e pulverizada	44
5.3.3 Biomassa morta, seca e pulverizada	45
5.3.4 Digestão das amostras	45
5.3.5 Análise das amostras em espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado	46
5.3.6 Determinação do Cu^{2+} removido	46
5.3.7 Determinação da capacidade de remoção de Cu^{2+} pela biomassa	46
6 RESULTADOS	48
<u>6.1 INOCULAÇÃO DAS ESPÉCIES EM BDA ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Cu^{2+}</u>	48

6.1.1 Efeito no crescimento	48
6.1.2 Efeito na macromorfologia das colônias	58
6.1.2.1 <i>Fusarium solani</i>	58
6.1.2.2 <i>Rhizopus microsporus</i>	60
6.1.2.3 <i>Penicillium citrinum</i>	61
6.1.2.4 <i>Aspergillus flavus</i>	62
6.1.2.5 <i>Aspergillus fumigatus</i>	63
6.1.2.6 <i>Eupenicillium shearii</i>	65
6.1.2.7 <i>Purpureocillium lilacinum</i>	66
6.1.2.8 <i>Aureobasidium pullulans</i>	67
6.1.2.9 <i>Penicillium ochrochloron</i>	69
6.2 REMOÇÃO DE Cu^{2+} PELA ESPÉCIE <i>P. ochrochloron</i>	70
6.2.1 Biomassa viva em crescimento	71
6.2.1.1 Efeito da concentração inicial de Cu^{2+}	71
6.2.1.2 Efeito do período de incubação	73
6.2.2 Preparação da biomassa morta, seca e pulverizada	74
6.2.3 Biomassa morta, seca e pulverizada	74
6.2.3.1 Efeito do tempo de contato	75
6.2.3.2 Efeito da concentração inicial de Cu^{2+}	76
6.2.3.3 Efeito da quantidade de biomassa	77
7 DISCUSSÃO	79
7.1 COMPORTAMENTO, CRESCIMENTO E TOLERÂNCIA DAS ESPÉCIES EM CONTATO COM Cu^{2+}	79
7.2 REMOÇÃO DO Cu^{2+} PELA BIOMASSA VIVA EM CRESCIMENTO DE <i>P.</i> <i>ochrochloron</i>	89
7.3 REMOÇÃO DO Cu^{2+} PELA BIOMASSA MORTA, SECA E PULVERIZADA DE <i>P. ochrochloron</i>	93
8 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	99
ANEXOS	113
A – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>F. solani</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 10 dias de incubação	113
B – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>R. microsporus</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 4 dias de incubação	113

C – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>P. citrinum</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	113
D – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>A. flavus</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	114
E – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>A. fumigatus</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	114
F – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>E. shearii</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	114
G – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>P. lilacinum</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	115
H – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>A. pullulans</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	115
I – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de <i>P. ochrochloron</i> , inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação	116
J – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 327,395 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa viva em crescimento de <i>P. ochrochloron</i> nas concentrações de 50 e 100 ppm Cu^{2+}	117
K – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 327,395 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa viva em crescimento de <i>P. ochrochloron</i> nas concentrações de 150, 200 e 250 ppm Cu^{2+}	117
L – Capacidade da remoção do Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa de <i>P. ochrochloron</i> e crescimento da biomassa (g.L^{-1}) em diferentes concentrações iniciais de Cu^{2+} (ppm) (período de incubação: 7 dias; temperatura: 27 °C; pH inicial: $4,15 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm)	118
M – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 324,754 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada nas concentrações de 50 e 100 ppm Cu^{2+}	118
N – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 324,754 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada nas concentrações de 150, 200 e 250 ppm Cu^{2+}	119

- O** – Capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* em diferentes tempos de contato (concentração inicial: 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} ; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm) 119
- P** – Capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* em diferentes concentrações de Cu^{2+} (tempo de contato: 60 minutos; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm) 120
- Q** – Capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* utilizando diferentes quantidades de biomassa (concentração inicial: 200 ppm Cu^{2+} ; tempo de contato: 60 minutos; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm) 120

1 INTRODUÇÃO

O advento da industrialização, aliado à melhora na qualidade de vida, colaboraram com o crescimento da população, que vem aumentando a cada ano. Com isso, intensifica-se a necessidade do aumento da produção e da diversificação de processos para atender a essa demanda, resultando em uma maior quantidade de indústrias e maior variedade de produtos e processos. Desse modo, resíduos industriais e urbanos são gerados e descartados no meio ambiente, muitas vezes sem o devido tratamento ou com um tratamento ineficaz.

Diferentemente do que ocorria no início da industrialização, atualmente a conscientização ambiental já é uma realidade. Por conta disso, pesquisas voltadas para o tratamento de resíduos e efluentes e a recuperação de locais já contaminados vêm sendo desenvolvidas.

Muitos metais são essenciais para o equilíbrio da vida, porém, em altas concentrações, podem ser tóxicos para os organismos em diversos níveis, causando prejuízos para o ecossistema como um todo. O maior desafio da recuperação de locais contaminados com metais encontra-se no fato deles não serem degradados nem química nem biologicamente, sendo necessária a busca por estratégias para a sua remoção. Um método que vem ganhando destaque é a biorremediação, que se utiliza de organismos, como fungos, bactérias, algas e plantas, para realizar esse processo.

Em parceria com a Universidade de São Paulo (USP), e com o financiamento da mineradora Vale S.A. e do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), um amplo projeto está sendo desenvolvido com o propósito de recuperar áreas contaminadas com metais e extrair minerais de rejeitos da Mina de Sossego, localizada na cidade de Canaã dos Carajás, no estado do Pará, Brasil, sendo este um local de mineração e processamento de cobre.

Uma das propostas do projeto principal é isolar e identificar microrganismos do próprio local contaminado, e investigar o seu potencial para uso em processos de biorremediação. Como uma ramificação desse enredo, a Dr^a Luciana Jandelli Gimenes coletou na Mina de Sossego amostras sólidas e líquidas e, a partir delas, isolou espécies de fungos que foram identificadas pelo método clássico (macro e micromorfologia) e molecular (através do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal).

Para o desenvolvimento dessa dissertação de mestrado, nove espécies de fungos filamentosos foram selecionadas para avaliação de sua tolerância ao Cu^{2+} e o seu comportamento em diferentes concentrações desse metal. A partir dessa análise, a espécie que apresentou tolerância diferenciada foi selecionada para a apuração do seu potencial para uso em processos de biorremediação, por meio de ensaios de remoção de Cu^{2+} .

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a tolerância e o comportamento de espécies de fungos filamentosos na presença de Cu^{2+} e, a partir dos resultados obtidos, selecionar aquela com resistência diferenciada e avaliar a sua capacidade de remoção de Cu^{2+} .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando nove espécies de fungos filamentosos isolados de local contaminado com Cu^{2+} , os objetivos específicos foram:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de Cu^{2+} para cada espécie;
- Verificar o crescimento de cada espécie em diferentes concentrações de Cu^{2+} e determinar o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM);
- Determinar o índice de tolerância (IT) de cada espécie em diferentes concentrações de Cu^{2+} ;
- Analisar os aspectos macromorfológicos das colônias cultivadas em diferentes concentrações de Cu^{2+} ;
- Selecionar a espécie que apresentar tolerância e comportamento diferenciados na presença de Cu^{2+} ;
- Avaliar a produção de biomassa e a remoção de Cu^{2+} da espécie selecionada quando cultivada em diferentes concentrações do metal;
- Avaliar a capacidade de remoção de Cu^{2+} utilizando biomassa morta (seca e pulverizada) da espécie selecionada com variação da concentração do metal, do tempo de contato e da quantidade de biomassa utilizada.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos que visam remediar locais contaminados por metais, dentre eles o cobre, são de grande valia, visto que a contaminação é um problema ambiental da nossa realidade e pode causar sérios danos, tanto à fauna e flora quanto aos seres humanos.

Comprovadamente, algumas espécies de fungos, com destaque para aqueles encontrados no próprio local da contaminação, possuem mecanismos de tolerância e remoção de metais, apresentando potencial para o seu uso em processos de biorremediação desses locais.

Uma vez que a presente pesquisa se baseia na investigação do comportamento e do potencial de fungos filamentosos isolados de local contaminado com Cu^{2+} , gerando dados que colaborarão com o desenvolvimento de posterior processo de biorremediação, mostra-se, dessa forma, de grande valia para subseqüentes pesquisas nessa área, revelando-se significativa na contribuição com avanços científicos no que tange às reparações ambientais.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O COBRE

Grande parte do progresso da civilização depende do desenvolvimento de novos materiais, que por sua vez geram novas tecnologias, e os metais têm sido utilizados como matéria-prima por mais de 10 mil anos. Os metais de transição estão entre os metais muito reativos e os metais pouco reativos, sendo a sua capacidade de permanecer em diferentes estados de oxidação responsável por muitas de suas propriedades químicas especiais e desempenhando papel importante na ação de muitas biomoléculas (ATKINS; JONES, 2012).

O cobre é classificado como um metal de transição, sendo amplamente distribuído na natureza e moderadamente abundante. Ele é suficientemente pouco reativo para ser encontrado na forma nativa, as pepitas de cobre naturais, porém é mais comumente encontrado na forma de minérios, como calcopirita (CuFeS_2), calcocita (Cu_2S), malaquita ($\text{CuCO}_3 \times \text{Cu(OH)}_2$), cuprita (Cu_2O) e bornita (Cu_5FeS_4). O cobre possui dois estados de oxidação, Cu^+ e Cu^{2+} , sendo esse último o mais estável. Em água, esse metal forma íons cobre (II), na forma dos íons $[\text{Cu(OH}_2)_6]^{2+}$, de cor azul pálido (ATKINS; JONES, 2012; LEE, 1999; SHRIVER; ATKINS, 2003).

O cobre é um metal bastante inerte, rígido, resistente à corrosão e excelente condutor elétrico e de calor. Esse metal é empregado na construção de veículos e edifícios, na fabricação de moedas, na composição de mais de mil ligas metálicas, como o bronze e o latão, e como fungicida em alguns tipos de plantações, na forma de compostos de cobre. Além disso, é amplamente utilizado em condutores elétricos, por possuir elevada condutividade, e em tubulações de água, por conta de sua inércia química (LEE, 1999; RUSSELL, 1981; SHRIVER; ATKINS, 2003).

Segundo dados publicados em 2015, no estudo da Bloomberg Intelligence, realizado por Zhou Zhang e Kenneth Hoffman e divulgado pelo Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM, 2015a), nos primeiros meses de 2015 a produção de cobre mundial aumentou 3,5%, indo para 7,8 milhões de toneladas. Para o ano todo a expectativa é que o metal registre alta de 4,5% na produção. Vale destacar que o estudo de International Copper Study Group prevê um crescimento da capacidade global de produção de cobre em mina de 8% ao ano, até 2017, também divulgado pelo IBRAM (2014).

A produção de cobre brasileira em 2014 foi de 219.000 toneladas (IBRAM, 2015b). As principais empresas produtoras do Brasil são: Vale S.A., com a maior produção brasileira, seguida de Mineração Macará (Yamana), Mineração Caraíba e, com apenas 1%, Votorantim Metais Níquel e Prometalica Mineração Centro Oeste. Das reservas brasileiras, 84,99% está localizada no estado do Pará (IBRAM, 2012).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) recomenda, como forma preventiva, uma concentração de 60 mg.kg^{-1} de Cu^{2+} em peso seco de solo, e um limite de 200 mg.kg^{-1} para áreas agrícolas, 400 mg.kg^{-1} para áreas residenciais e 600 mg.kg^{-1} para áreas industriais (CONAMA, 2009). O CONAMA também estabeleceu como concentração máxima de cobre dissolvido $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ presente em efluentes lançados diretamente no corpo receptor, proveniente de qualquer fonte poluidora (CONAMA, 2011).

O Ministério da Saúde estipulou como padrão de potabilidade para a água um limite de cobre de 2 mg.L^{-1} (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), sendo considerada imprópria para o consumo alimentar a água com teor de cobre superior a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, conforme resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1978). A recomendação diária para ingestão de cobre, segundo a ANVISA, é de $900 \text{ } \mu\text{g.dia}^{-1}$ (ANVISA, 2004).

O cobre é essencial para o metabolismo de todos os organismos vivos conhecidos, inclusive o ser humano e faz parte da composição de diversas enzimas e proteínas, além de participar do metabolismo na geração de energia. Nos mamíferos, enzimas de cobre são essenciais para os nervos e tecidos conjuntivos saudáveis. Em alguns animais, como o polvo e alguns artrópodes, ele é responsável pelo transporte de oxigênio no sangue. A atividade do cobre nos organismos está fortemente ligada à sua capacidade de circular entre as formas oxidada (Cu^{2+}) e reduzida (Cu^{+}), característica essa que é usada por diversas proteínas envolvidas em reações redox (ATKINS; JONES, 2012; ATSDR, 2004; BREWER, 2010; CAMAKARIS; VOSKOBOINIK; MERCER, 1999).

Uma pequena parte do cobre encontrada no corpo humano está em sua forma livre, disponível para satisfazer necessidades celulares, como a incorporação em enzimas. Porém, é exatamente esse cobre livre que pode causar toxicidade, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem causar danos ao DNA e às proteínas, alterações funcionais na mitocôndria e peroxidação lipídica. A prevenção da toxicidade do cobre é realizada por mecanismos de controle

homeostático, porém, a exposição a níveis excessivos de cobre pode resultar em diversos efeitos tóxicos à saúde, como danos no rim e no fígado, anemia, imunotoxicidade, citotoxicidade, estando relacionados aos danos oxidativos causados pelas ERO. O sistema de defesa contra as ERO incluem enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione transferase, glutathione peroxidase, entre outras (BREMNER, 1998; BREWER, 2010; CAMAKARIS; VOSKOBOINIK; MERCER, 1999; TCHOUNWOU et al., 2008).

O excesso de cobre induz uma série de efeitos bioquímicos e distúrbios metabólicos também nas plantas, podendo interferir no seu crescimento e acarretar o desenvolvimento de anomalias, além de ser um potente inibidor da fotossíntese, tanto em plantas como em algas (FERNANDES; HENRIQUES, 1991; ROONEY; ZHAO; McGRATH, 2006). Além disso, o cobre também pode exercer efeitos tóxicos aos organismos aquáticos, como peixes, crustáceos e algas (BALDWIN et al., 2003; GRIFFIT et al., 2008).

A quantidade de Cu, em condições normais, é entre 1 e 140 mg.kg⁻¹ em solo e menor do que 1 até 3,53 µg.L⁻¹ em corpos d'água (KABATA- PENDIAS; MUKHERJEE, 2007). No entanto, esses valores variam de acordo com a localização. Por exemplo, em solos coletados nos arredores de fábricas e indústrias, a concentração de Cu²⁺ pode variar entre 6,4 e 3,62 ppm (SIHAM, 2008) e em lodo contaminado com metais essa concentração pode chegar a 215 ppm (ERRASQUÍN; VÁZQUEZ, 2003). Já nos arredores de local de mineração de ferro e cobre, foram encontrados níveis de 160 a 13.347 ppm, sendo 1.885 ppm a concentração mais presente (MARESCOTTI et al., 2010).

Quando o cobre é lançado no solo, se liga fortemente a materiais orgânicos e outros compostos; já quando lançado na água, o cobre dissolvido pode ser carregado pelas águas superficiais na forma de compostos de cobre ou como cobre livre, embora esteja mais frequentemente ligado a partículas em suspensão e sedimentos (ATSDR, 2004).

Efluentes domésticos, resíduos industriais e aterros sanitários podem ser fontes de contaminação de cobre, além de, principalmente, áreas agrícolas de vitivinicultura e de mineração e processamento desse metal (ANDREAZZA et al., 2013; ATSDR, 2004).

A intensa atividade industrial e os avanços tecnológicos afetam o meio ambiente, causando contaminação em solos, sedimentos e no ambiente aquático,

pelas mais diversas substâncias orgânicas e inorgânicas, dentre elas os metais. Nos locais contaminados eles são comumente encontrados como íons, seu estado mais tóxico. Também apresentam toxicidade quando ligados a cadeias curtas de carbono e pela sua afinidade com o enxofre. Diferenciam-se de compostos orgânicos por não serem biodegradáveis, mas podem passar por processos que os tornam biologicamente indisponíveis ou menos tóxicos (BAIRD; CANN, 2011; VOLESKY, 2007).

4.2 OS FUNGOS

Os fungos pertencem ao reino Fungi e são todos seres eucariotos. Embora a maioria seja multicelular, como os bolores ou fungos filamentosos e os cogumelos macroscópicos, também podem ser unicelulares, como as leveduras, variando amplamente em tamanho e morfologia. Além disso, também existem os fungos dimórficos, que podem assumir tanto a forma de levedura como filamentosa, dependendo das condições de cultivo. Os fungos multicelulares geralmente são compostos por hifas, tubos finos formados pela união das células, cujo conjunto forma o micélio (PELCZAR; REID; CHAN, 1980; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; WALKER; WHITE, 2011).

Os fungos, que podem ser encontrados nos mais diversos habitats, são essenciais para o equilíbrio do meio ambiente como um todo e possuem grande importância ecológica. Por serem decompositores primários de matéria orgânica, contribuem para a reciclagem de elementos, o que é essencial para o ciclo do carbono. Além disso, os fungos micorrízicos, em simbiose com plantas, auxiliam na absorção de minerais e água do solo (ELANDER; LOWE, 1992; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; WALKER; WHITE, 2011).

Desde o século 6 A.C. os fungos são utilizados pelo homem, mesmo sem o conhecimento de sua existência. Há registros do seu uso na Suméria e na Babilônia, na fermentação do suco de uva e na fabricação de alimentos. Atualmente, já se tem ciência de sua grande diversidade de benefícios, destacando-se em aplicações comerciais e industriais, como na produção de pães, queijos e bebidas alcólicas, antibióticos, fármacos, vacinas, cosméticos, pigmentos, enzimas, biocombustíveis, na engenharia genética, além do seu uso na biorremediação (ELANDER; LOWE,

1992; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; WALKER; WHITE, 2011).

Alguns fungos são associados a infecções em animais e plantas, sendo a maioria patógenos oportunistas. Todavia, das cerca de 100.000 espécies conhecidas, aproximadamente apenas 100 são patogênicas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; WALKER; WHITE, 2011).

A superfície celular fúngica é constituída pela membrana plasmática (MP), periplasma, parede celular (PC) e componentes estruturais extracelulares adicionais. A MP envolve o citoplasma como uma barreira seletiva e possui uma estrutura comum a todas às células eucarióticas, formada por uma dupla camada lipídica, na qual proteínas estão inseridas. O periplasma é a região compreendida entre a MP e a PC (ALBERTS et al., 2010; WALKER; WHITE, 2011).

A PC merece um maior destaque por possuir importantes funções relacionadas à proteção contra o ambiente, como uma barreira inicial. Por sua estrutura rígida, confere força mecânica à célula e colabora com a forma celular. Além disso, possui propriedades de interação com o meio externo através de porosidades, conferindo-lhe permeabilidade limitada e definida, e é provável que tenha eficientes mecanismos de transporte, já que a nutrição dos fungos é realizada por absorção. A sua presença é tão importante que os fungos não sobrevivem se ela for removida, tanto que alguns antifúngicos agem exatamente no seu rompimento. Atualmente, a PC já é considerada uma estrutura dinâmica, que está em constante mudança, atuando também em resposta às condições do meio externo (CASADEVALL et al., 2009; LATGÉ, 2007; WALKER; WHITE, 2011).

A composição da PC dos fungos filamentosos varia por grupos taxonômicos, formada por uma complexa rede interligada de diferentes polissacarídeos como quitina, glucana, nanoproteínas, quitosana, ácido poliglicurônico, celulose e uma pequena quantidade de proteínas e glicoproteínas (LATGÉ, 2007; WALKER; WHITE, 2011).

Nas células dos fungos, assim como das plantas, são encontrados vacúolos, organelas semelhantes aos lisossomos encontrados em células animais. Os vacúolos são vesículas muito grandes, que funcionam como reservatórios de aminoácidos, polifosfatos e íons metálicos, além de outras funções relacionadas ao controle do pH do citosol e à digestão de proteínas (ALBERTS et al., 2010; WALKER; WHITE, 2011).

Como já foi citado, os fungos podem ser encontrados nos mais diversos locais e associados à plantas e insetos, ou seja, a diversidade microbiana é imensa, e acompanhada a ela está a biotecnologia. A descoberta de novas espécies e o estudo de espécies já conhecidas, aliados ao melhoramento genético, aumentam as chances do desenvolvimento de novos produtos de valor biotecnológico que preencham finalidades desejadas, proporcionando o ambiente necessário para a exploração de todo o seu potencial (AZEVEDO, 1998).

4.3 A BIORREMEDIAÇÃO

A biotecnologia pode ser definida como um processo multidisciplinar, que reúne diversas áreas da pesquisa, agrupando técnicas e conhecimentos diversos que utilizam organismos vivos na sua totalidade ou partes deles, para desenvolvimento de produtos e processos que beneficiem o meio ambiente, os seres vivos e os processos industriais (BORZANI et al., 2001).

Processos biotecnológicos são utilizados há muitos anos, como para a fabricação de queijos, pães e bebidas alcóolicas. Atualmente a biotecnologia envolve a produção de antibióticos, drogas esteróides, insulina, solventes, produtos alimentícios; a extração de metais de minérios; o processamento de minérios de baixa qualidade; a detecção de vapores e a recuperação de óleo pela indústria do petróleo; e a biotecnologia ambiental, como na biorremediação de locais contaminados (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Com o emprego de algas, plantas, e principalmente bactérias e fungos, a biorremediação se utiliza da diversidade genética e versatilidade metabólica desses organismos para degradar, remover ou transformar poluentes e substâncias tóxicas. Os contaminantes podem ser orgânicos ou inorgânicos, provenientes de atividades antrópicas, como processos industriais, agrícolas e de mineração, e de locais que apresentem, naturalmente, altos níveis de metais tóxicos, como águas subterrâneas. Com o uso da biorremediação é possível recuperar locais contaminados e realizar o tratamento de resíduos e efluentes (GADD, 2008; GADD, 2010; KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998; MELO; AZEVEDO, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; UETA et al., 1999; VIJAYARAGHAVAN; BALASUBRAMANIAN, 2015; VOLESKY, 2007).

Pesquisas têm sido desenvolvidas visando a aplicação da biorremediação em áreas contaminadas com os mais diversos poluentes, como petróleo

(hidrocarbonetos), organoclorados, herbicidas, metais, compostos fenólicos, corantes de efluentes têxteis, entre outros (COLLA et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2005; (ISIKHUEMHEN; ANOLIEFO; OGHAE, 2003; OLIVEIRA et al., 2010; PARANHOS, 2011; SALVI, 2013; SILVA, 2009; SOUZA et al., 2008).

A biorremediação pode ocorrer *in situ*, quando realizada no próprio local da contaminação e não necessitando de escavação, dragagem ou remoção do solo ou resíduos aquosos, como nas técnicas de atenuação natural e bioaugmentação, ou *ex situ*, quando são necessários a retirada do material contaminado e do seu transporte para tratamento em outro local, como no uso de biorreatores. Os processos de biorremediação podem utilizar tanto biomassa viva, técnica dependente do metabolismo da célula, como biomassa morta, sendo independente do metabolismo do organismo e estando relacionada à interação do contaminante com a superfície celular (BISHNOI; GARIMA, 2005; JACQUES et al., 2007; KUMAR et al., 2011).

O crescimento e a multiplicação de organismos, com mais ou menos intensidade, estão relacionados às condições ambientais do local e às características desses organismos. A opção de utilizar a biorremediação, bem como a escolha do tipo, deve considerar as particularidades de cada contaminante e do local, como condições ambientais, volume do solo a ser tratado, concentração do contaminante, além do custo econômico e as limitações de cada microrganismo (JACQUES et al., 2007; UETA et al., 1999).

Para o uso da biorremediação é interessante a utilização de organismos encontrados no próprio local contaminado, por ocorrer uma seleção natural daqueles resistentes às substâncias tóxicas que estão no ambiente. Essas espécies devem ser isoladas e selecionadas as mais resistentes e capazes de interagir com o poluente, a fim de realizar a sua degradação, transformação ou remoção. Nem toda espécie é capaz de resistir e interagir com substâncias específicas, sendo essa uma característica peculiar de cada uma. Por conta disso, é de extrema importância o progresso nas pesquisas e estudos nessa área, a fim de que sejam obtidas as melhores com essas habilidades (ANDREAZZA et al., 2013; EZZOUHRI et al., 2009; HUIDROM; SHARMA, 2014).

4.3.1 A biorremediação em resíduos e locais contaminados por metais

Em um primeiro momento, o interesse da biorremediação estava voltado à contaminação por compostos orgânicos, que podem ser degradados pelo metabolismo dos microrganismos. Porém, com o desenvolvimento de diversas pesquisas, hoje já se tem conhecimento de que bactérias, fungos, plantas e algas também podem ser utilizados para remediar contaminações por metais, através da sua biotransformação ou remoção, uma vez que os metais não podem ser degradados nem por agentes químicos nem biológicos (LOVLEY; COATES, 1997).

As técnicas de remediação físico-químicas, como a precipitação química, a coagulação-flotação e a troca iônica, apresentam algumas complicações, como falta de especificidade associada a algumas resinas de troca iônica e a geração de grande quantidade de lodo. A biorremediação apresenta diversas vantagens no âmbito econômico e ambiental quando comparada a outras técnicas, por resultar em melhor custo-benefício, maior eficiência e na minimização da geração de resíduos secundários químicos e biológicos, além de ser potencialmente seletiva na remoção dos metais (FU; WANG, 2011; KRATOCHVIL; VOLESKY, 1998; KURNIAWAN et al., 2006; LLOYD, 2002; LLOYD; LOVLEY, 2001; VIJAYARAGHAVAN; BALASUBRAMANIAN, 2015).

Os processos de biorremediação utilizando microrganismos podem abordar a bioestimulação, estimulando o crescimento da população nativa; a bioaugmentação, introduzindo culturas ou consórcios microbianos exóticos; a bioacumulação, utilizando células vivas para a remoção do metal; e a biossorção, empregando biomassa morta (RAJENDRAN; MUTHUKRISHNAN; GUNASEKARAN, 2003). Além disso, alguns microrganismos possuem mecanismos que podem efetuar transformações nos metais, como a mobilização (solubilização) e a imobilização, com potencial para processos de tratamentos *in situ* e *ex situ*, tanto em resíduos sólidos como líquidos (GADD, 2000).

A biotransformação é uma das estratégias que podem ser adotadas para remediar locais ou resíduos contaminados por metais, através da qual alterações podem ser efetuadas na sua molécula ou estrutura atômica como resultado da sua interação com enzimas ou produtos metabólitos secretados pelos microrganismos. Esse processo pode atuar na mobilização do metal, o que aumenta a sua solubilidade ou biodisponibilidade, eleva a sua mobilidade e permite que eles sejam

removidos de matrizes sólidas mais facilmente. Além disso, a biotransformação também pode envolver a imobilização do metal, o que diminui a sua mobilidade e toxicidade e ocasiona a sua complexação, quelação ou precipitação ou a formação de uma nova molécula estável (GADD, 2000; GADD, 2009; TABAK et al., 2005).

A imobilização de metais também pode estar envolvida na sua captação, pela interação dos íons metálicos com componentes presentes na PC ou substâncias excretadas pelos organismos, que pode ocorrer na parte externa da célula, no caso da bioissorção, ou pela internalização do metal como parte da atividade celular, no caso da bioacumulação. Processos envolvendo a imobilização podem ser desenvolvimento *ex situ*, em sistemas de biorreatores, ou *in situ*, podendo até estar combinado à utilização de compostos orgânicos como doadores de elétrons para a redução do metal. Algumas bactérias, por exemplo, conseguem utilizar o processo de redução de metais como um suporte para o seu crescimento, interessante para abordagens *in situ* (GADD, 2000).

Na bioissorção ocorre a remoção de metais presentes em soluções por processo físico-químico, através de interações eletrostáticas que ocorrem extracelularmente, e podem envolver mecanismos de adsorção, troca iônica, complexação e precipitação extracelular. A adsorção envolve a ligação de íons metálicos à superfície da PC fúngica, que é possibilitada pela sua composição e que pode ser acompanhada pela biotransformação do metal (FAROOQ et al., 2010; GADD, 1993; GADD, 2004; GADD, 2009; VOLESKY, 2007).

Frequentemente a bioissorção está associada à biomassa morta, sendo independente do metabolismo celular e tornando a recuperação do metal mais simples. Todavia, também pode ser realizada com biomassa viva, uma vez que substâncias excretadas por seu metabolismo podem afetar a interação com os metais, e consequentemente, o seu sequestro e transformação (GADD, 1993; GADD, 2009).

A bioacumulação, ou seja, o acúmulo de metais dentro da célula, ocorre em duas fases. A primeira etapa é equivalente à bioissorção extracelular, ocorrendo de forma rápida através de adsorção na PC; já na segunda ocorre o transporte do metal para dentro da célula, sendo essa parte depende do metabolismo (CHOJNACKA, 2010; GADD, 1993; GADD, 2004).

As enzimas produzidas pelos microrganismos, como já foi citado diversas vezes, desempenham um papel muito importante na biorremediação. Elas

geralmente são sintetizadas em resposta à presença dos metais pelo sistema de defesa e proteção da célula, podendo envolver processos de detoxificação do metal, expulsão dos íons de dentro da célula, biotransformação do metal através da interação com substâncias excretadas pela célula ou presentes na PC (LLOYD, 2002).

Dependendo da matriz na qual o metal está presente, os passos utilizados para efetuar a biorremediação são diferentes. Se os metais se encontram em solos, lamas ou resíduos sólidos, eles precisam primeiro ser removidos da matriz por solubilização em fase líquida ou aumento da sua biodisponibilidade, o que pode ser realizado por lixiviadores biológicos. Uma vez que os metais estão solubilizados, ocorre a sua dissolubilização, finalmente efetuando a remoção do contaminante, que pode ser induzida pela adsorção à biomassa, através da interação com os componentes da superfície celular, ou pela ativação do metabolismo na presença dos metais, na biotransformação (DIELS et al., 1999).

Na fitorremediação de locais contaminados com metais, a principal estratégia adotada pelas plantas é evitar o acúmulo excessivo do metal no citosol, prevenindo-se de seus efeitos tóxicos. Para isso, elas se utilizam de diversos mecanismos, como a redução da captação do metal para dentro do citosol por aprisionamento em apoplastos; a sua quelação no citosol, efetuado por ligantes sintetizados pela célula e por efluxo dos íons do citosol (HALL, 2002).

O que fica evidente é que os organismos respondem ao estresse causado pelos metais ativando diferentes sistemas de defesa, como exclusão, adsorção, compartimentalização e produção de metabólitos. Eles possuem habilidades únicas, e o desenvolvimento de processos de biorremediação de locais contaminados com metais se baseia exatamente na exploração dessas características (DIELS et al., 1999; MEJÁRE; BÜLOW, 2001). Sendo assim, o avanço da biorremediação está ligado à investigação de espécies com alta especificidade para a remoção de metais e à condução de pesquisas que visem a investigação de seus mecanismos de interação e de defesa, em conjunto também com a biologia molecular e a bioquímica. Existe um grande potencial na atividade dos microrganismos que pode ser explorado; o grande desafio é implementar essa abordagem no campo (LLOYD, 2002; LLOYD; LOVLEY, 2001).

4.4 A INTERAÇÃO ENTRE OS FUNGOS E OS METAIS NA BIORREMEDIAÇÃO

Os microrganismos possuem estratégias que tornam possíveis a sua sobrevivência em locais contaminados com metais, além de poderem realizar a sua remoção ou a biotransformação. Esses mecanismos de interação podem ser desenvolvidos também pelos fungos, tornando-os interessantes para seu uso na biorremediação (ANAHID; YAGHMAEI; GHOBADINEJAD, 2011; CHOJNACKA, 2010).

Os resultados de diversos autores confirmam que a resposta à presença de metais varia de acordo com a espécie, o isolado, o grau de contaminação do local de isolamento e os metais, e que diferentes metais são tolerados e tratados de formas diferentes pelas espécies (FOMINA et al., 2005; GAZEM; NAZARETH, 2013; RASPANTI et al., 2009).

A exposição e o acúmulo de metais podem gerar e aumentar a produção de ERO, que nas células dos fungos também são capazes de executar uma série de oxidações espontâneas e indesejadas. Por serem fortes agentes oxidantes, as ERO podem oxidar qualquer composto orgânico da célula, incluindo proteínas, enzimas e lipídios da MP, causando danos aos componentes da célula, além de gerar um desequilíbrio redox. Algumas das enzimas que trabalham para destruir as ERO são a catalase e a superóxido dismutase (SOD), que geralmente atuam em conjunto, e as peroxidases (MADIGAN et al., 2010; XU et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Há estudos que sugerem que mecanismos de defesa podem ser ativados pela presença de metais, por conta da toxicidade e prejuízos que podem ocasionar à célula. Associado ao aumento das ERO pode ocorrer a produção de antioxidantes, como uma resposta ao dano oxidativo e uma tentativa da célula em restabelecer o seu equilíbrio. Um exemplo é o aumento da atividade da enzima SOD, que pode ser ainda mais estimulada na presença de maiores concentrações de metais, além também de poder causar altos níveis de peroxidação lipídica e aumento de proteínas contendo o grupo carbonil, a carbonilação proteica. A concentração da glutathione peroxidase pode variar na presença de metais, estando a sua diminuição provavelmente relacionada à diminuição do crescimento do micélio, e consequentemente da tolerância. Outro grupo de enzimas que pode estar relacionado à proteção contra o dano oxidativo são as adenilato-sulfato quinases. É um consenso que a presença de metais induz a altos níveis de enzimas

antioxidantes, podendo indicar que o aumento de sua atividade enzimática seria um mecanismo de detoxificação, por via da degradação das ERO (ABE et al., 2001; EGOROVA et al., 2015; GOMAA; AZAB, 2013; LUNA et al., 2015; OGGERIN et al., 2015; XU et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Além disso, há indícios da participação de polifosfatos na resposta ao estresse induzido pelo Cu^{2+} , com a atividade das fosfatases sendo positivamente influenciada pelo crescimento na presença do metal. Dessa forma, os resultados indicam que o fungo pode crescer na presença de metais, ativando mecanismos de adaptação e tolerância (LUNA et al., 2015). A atividade da lacase também já foi reportada como induzida por nanoCuO, e foi correlacionada com a adsorção de Cu e/ou Cu^{2+} (PRADHAN et al., 2014).

O aumento da concentração de proteínas e lipídios totais em resposta à presença de metais também pode apontar a síntese de proteínas envolvidas no sistema de detoxificação do fungo (LUNA et al., 2015). Além disso, esse aumento pode também ser importante para manutenção da integridade da MP e para retardar a entrada dos íons metálicos na célula. Porém, já foi observada a diminuição da quantidade total de proteínas e lipídios em concentrações mais elevadas de metais, acompanhada de intensa diminuição do crescimento do fungo. Esses resultados indicam que pode haver uma ligação direta entre a composição lipídica e a tolerância aos metais por fungos (HEFNAWY; ALI; ABDUL-GHANY, 2010).

A dupla camada lipídica da MP fornece a estrutura básica para a sua fluidez, sendo formada abundantemente por fosfolipídios (FL). Características como comprimento e saturação dos ácidos graxos (AG) que compõem as moléculas de FL são importantes para a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 2010). Sendo assim, alterações acentuadas na composição dos FL na presença de metais podem estar envolvidas no mecanismo de tolerância e de reparo de danos da MP (HEFNAWY; ALI; ABDUL-GHANY, 2010). Já foi reportado que a presença de metais no meio de cultura pode causar aumento na maioria dos AG e diminuição da taxa de insaturação deles, indicando que a MP se torna menos fluída ou mais rígida, controlando a entrada de metais na célula. No entanto, em níveis mais altos de metais, comumente é observada uma diminuição da concentração de AG e aumento da taxa de insaturação, agregada à diminuição do crescimento e da tolerância. Esses efeitos podem significar que a MP se torna mais fluída ou menos rígida, incapaz de controlar a entrada dos íons metálicos na célula e ficando desordenada.

Dessa forma, os AG provavelmente possuem função importante na tolerância do fungo, já que são afetados quando a célula está em contato com metais e interferem na sua resistência (ABBOUD; ALAWLAQI, 2011; GAZEM; NAZARETH, 2012; HEFNAWY; ALI; ABDUL-GHANY, 2010).

Os metais influenciam muito na biossíntese de ácidos orgânicos, podendo ativar a sua excreção, como o ácido oxálico, o ácido cítrico e o ácido málico. A propriedade desses ácidos na complexação dos metais auxilia tanto na nutrição do fungo quanto na determinação da especiação e da mobilidade do metal no ambiente. Os oxalatos de metais formados podem ser moderadamente solúveis, precipitar como cristais ou sólidos anamórficos e aumentar a tolerância, possibilitando a sobrevivência dos fungos em locais contaminados com metais. A produção do ácido oxálico é dependente do metabolismo e a formação do oxalato pode provocar a detoxificação do metal e a sua inativação no ambiente extracelular (BELLION et al., 2006; GADD, 1999; OHNO et al., 2015). Os ácidos orgânicos podem ter o seu papel na resistência de fungos à metais, mas isso não vale para todos os fungos e depende do metal e da sua habilidade em formar complexos estáveis com ácidos aniônicos, das condições de cultivo das espécies, da fonte de nitrogênio e da concentração do metal (SAZANOVA et al., 2015).

A presença de algumas proteínas secretadas pelos fungos no meio de cultura já foi relacionada à hidrólise de precursores metálicos para formar óxidos extracelularmente, sintetizando e estabilizando nanopartículas de cobre bastante uniformes e com formato esférico (HONARY et al., 2012).

Além da capacidade dos fungos de imobilizar metais por meio de transformações, eles também apresentam a habilidade de solubilizá-los. A solubilização dos metais pode estar conectada ao pH, ao crescimento e à tolerância do fungo, sendo o meio ácido um importante mecanismo de dissolução mineral. Já foram reportados fungos capazes de solubilizar, por meio de ácidos orgânicos, fosfato de Cd e Cu, cuprita (CuO_2) (FOMINA et al., 2005) e a espécie mineral piromorfita ($\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), refletindo em significantes implicações na mobilidade do metal e na transferência para outros ambientes e organismos, enfatizando assim a importância de considerar processos microbianos no desenvolvimento de técnicas de remediação para metais em solos (SAYER et al., 1999). Além do que, processos de solubilização de metais também apresentam potencial para a sua recuperação a

partir de resíduos sólidos contaminados, solos e minérios de baixo teor (GADD, 1999).

O fungo também possui a capacidade de realizar o acúmulo dos íons metálicos dentro da célula e compartimentalizá-los em organelas celulares, em grandes vacúolos e no citoplasma de esporos, e muitas vezes a quantidade de íons internalizada aumenta com o aumento da concentração do metal. Essa pode ser mais uma estratégia dos fungos para sobreviver em ambientes contaminados com metais em excesso (ABE et al., 2001; CORNEJO et al., 2013; OGGERIN et al., 2015; ZHAN et al., 2016). A fase de transporte ativo do metal requer atividade metabólica da célula, ou seja, esse processo ocorre apenas em biomassa viva, sendo necessária a disponibilidade de nutrientes e o controle das condições do meio de cultura, como temperatura e pH, para propiciar o seu crescimento. Porém altas concentrações de metal podem ser um fator limitante, inibindo o desenvolvimento do fungo (CHOJNACKA, 2010; GADD, 2004).

Já foi sugerido o envolvimento da ATPase na expulsão de íons metálicos em níveis tóxicos de dentro da célula, indicando que o aumento da expressão da ATPase seria uma fase adaptativa do fungo exposto ao ambiente rico em metal (OHNO et al., 2015).

Além de alterações bioquímicas, também modificações morfológicas microscópicas já foram visualizadas quando o fungo cresce na presença de metais, como alargamento, engrossamento e septação do micélio. Geralmente a intensidade das alterações são proporcionais à concentração do metal no meio de cultura, o que deixa evidente a toxicidade que causa à célula (GAZEM; NAZARETH, 2012; LUNA et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

Algumas mudanças ocorridas quando o fungo está em contato com metais, como engrossamento da PC e apresentação de superfície altamente enrugada, podem estar relacionadas ao aumento dos níveis de quitina em resposta ao estresse gerado na PC, enquanto que o arredondamento da célula pode ser devido a formação insuficiente de quitina. Além disso, já foi comprovada a capacidade de bioissorção apresentada pela quitina e quitosana, que podem estar envolvidas no sequestro de metais (CHOJNACKA, 2010; FRANCO et al., 2004; GAZEM; NAZARETH, 2012; NAZARETH; MARBANIANG, 2008; RAM et al., 2004; VOLESKY, 2007).

Pigmentos, como a melanina, estão ligados ao sistema de defesa do fungo quando ele é exposto a ambientes conturbados, e possivelmente relacionados a sua sobrevivência em locais contaminados por metais. Além disso, a sua presença na PC aumenta os níveis de bioabsorção e a sua ligação aos íons metálicos é forte, provavelmente estando envolvida no processo de bioabsorção (BELL; WHEELER, 1986; FOGARTY; TOBIN, 1996; GADD, 2004; GADD; ROME, 1988).

A síntese de proteínas pertencentes à família das metalotioneínas e das fitoquelatinas, que também são capazes de interagir com os íons metálicos, pode ser induzida pela presença de metais no meio de cultura, indicando que elas podem estar envolvidas na detoxificação do metal. Além disso, essas proteínas exibem alta capacidade de ligação à metais, embora ainda esteja em apuração a sua relação com a bioacumulação. Fato é que já foi comprovado que algumas espécies, quando expostas à metais, acumulam íons em seu citoplasma e que essas proteínas podem sim ter um papel no armazenamento intracelular do metal, demonstrando que ela pode manifestar diferentes funções, relacionadas à proteção e à captação do metal (BLAUDEZ; BOTTON; CHALOT, 2000; GADD, 1993; JAECKEL et al., 2005; KERMASHA, 1993; LERCH, 1980; LOEBUS et al., 2013). Também já foi proposta uma possível co-relação entre o metabolismo da cisteína e a resposta à presença de metais pelos fungos (RASPANTI et al., 2009).

Diversas indicações já foram referidas sobre as interações químicas entre os íons metálicos e diferentes grupos funcionais presentes na PC, realizando o seu sequestro. Alguns dos grupos já descritos são hidroxil, amido, carboxil, amino, sulfato e fosfato (AKINKUNMI et al., 2016; GAZEM; NAZARETH, 2013; GOLLA et al., 2016; ZHAN et al., 2016).

Os grupos funcionais que estão envolvidos na ligação dos íons metálicos possuem uma maior afinidade aos metais de transição do que aos metais alcalinos terrosos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), apresentando superioridade às resinas de troca iônica das técnicas físico-químicas, que não conseguem distinguir entre essas duas classes (RAO et al., 2005). Comparando esses dois processos, pode-se usar os mesmos equipamentos, porém a remoção biológica apresenta custos mais baixos. O uso de bioabsorventes também se sobressaem no quesito econômico em comparação ao uso de carbono ativado (BISHNOI; GARIMA, 2005; VOLESKY; NAJA, 2005).

Essas interações entre fungos e metais dependem de algumas variáveis, como o estado químico e a disponibilidade dos sítios de ligação da PC, estado de

ionização do metal e afinidade entre o metal e o grupo químico componente da PC (GAZEM; NAZARETH, 2012; VIEIRA; VOLESKY, 2000). O controle do pH é uma condição essencial para a sua ocorrência, já que afeta a configuração dos grupos químicos e o estado iônico dos metais (VOLESKY, 2007).

Vale destacar a possibilidade de recuperação dos metais com o uso da bioissorção como fonte adicional da receita gerada. O processo de dessorção, além de regenerar o bioissorvente perto do estado original para ser reutilizado em um novo ciclo e colaborando, assim, para manter o custo da biorremediação baixo, também recupera o metal adsorvido na forma concentrada, que pode ser usado em outros processos. Isso aumenta a importância econômica da biorremediação, que é capaz de atribuir novamente ao metal, que se apresentava como um contaminante no ambiente, o seu valor econômico (ALLURI et al., 2007; VOLESKY; NAJA, 2005).

Há décadas que o potencial dos microrganismos como bioissorventes vem sendo investigado. Dentre eles estão os fungos, cuja capacidade de remover metais pode ser tão boa ou até melhor do que a de adsorventes convencionais, por serem capazes de acumular metais numa concentração maior do que necessitam. Tem-se hoje uma quantidade enorme de artigos reportando diversos gêneros e espécies capazes de remover diferentes metais. Embora a aplicação da bioissorção no contexto industrial seja ainda muito pouco explorada, diversos autores destacam a importância de prosseguir com as investigações inerentes ao desenvolvimento de processos de biorremediação para o tratamento de resíduos contaminados com metais. Tal interesse se deve, principalmente, por se tratar de uma alternativa vantajosa em diversos aspectos quando comparada às técnicas convencionais, além de já existirem casos de sucesso na aplicação de biorremediadores em locais contaminados com poluentes orgânicos, como o petróleo (ATLAS, 1995; BISHNOI; GARIMA, 2005; GADD, 2010; WANG; CHEN, 2009).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram selecionadas nove espécies de fungos filamentosos, previamente isoladas de amostras sólidas e líquidas coletadas na Mina de Sossego, pertencentes à mineradora Vale S.A., localizada na cidade de Canãa dos Carajás, no estado do Pará, sendo elas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans*, *Eupenicillium shearii*, *Fusarium solani*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium ochrochloron*, *Purpureocillium lilacinum* e *Rhizopus microsporus*.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CULTIVADOS NA PRESENÇA DE Cu²⁺

Por meio da dissolução do sal cloreto de cobre (CuCl₂) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA) em água ácida destilada estéril, com pH aproximadamente 3, foi preparada a solução estoque de CuCl₂, com concentração de 10.000 ppm de Cu²⁺, filtrada em membrana porosa tamanho 0,22 µm (MISHRA; MALIK, 2012). Tal solução foi utilizada tanto nos experimentos de tolerância quanto de remoção.

Foram preparadas placas de Petri contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (Difco, Sparks, USA) acrescido do antibiótico Cloranfenicol e diferentes concentrações de Cu²⁺, 44, 94, 187, 370, 541 e 735 ppm, obtidas utilizando-se a solução estoque de CuCl₂. Os fungos foram inoculados nas placas com BDA e Cu²⁺ por meio de uma gota de 5 µL de solução de suspensão de conídios, previamente preparada em microtubos de 1 mL, em água destilada estéril. Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 27±0,2 °C, em ausência de luz, durante 14 dias. Como controle foi utilizado o meio de cultura BDA sem o acréscimo de Cu²⁺.

Como algumas espécies apresentaram tolerância às concentrações previamente estabelecidas, elas foram inoculadas em meio de cultura BDA contendo gradualmente maiores concentrações de Cu²⁺, 870, 1.026, 1.177, 1.528, 1.776, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500 e 4.000 ppm, até ser alcançada a completa inibição visível do seu crescimento, em 14 dias de incubação. Por conta de problemas de solidificação do meio de cultura BDA, 4.000 ppm foi a mais alta concentração testada.

5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) das espécies foi determinada como a menor concentração de Cu^{2+} capaz de inibir o crescimento visível dos fungos após 14 dias de incubação (AKHTAR et al., 2013).

5.2.2 Medição do diâmetro de crescimento das colônias

O diâmetro das colônias foi utilizado para avaliar o crescimento das espécies nas diferentes concentrações de Cu^{2+} , que foi medido com uma régua graduada, em cm, traçando-se uma reta na parte inferior da placa (GAZEM; NAZARETH, 2013). Essas medições foram realizadas no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia após a inoculação.

5.2.3 Determinação do índice de velocidade de crescimento micelial

A média do diâmetro das colônias em cada dia de medição foi utilizada para analisar e comparar o crescimento das diferentes espécies submetidas a concentrações de Cu^{2+} variadas, determinando-se, assim, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), através da fórmula (ZORZETE; OLIVEIRA; CORRÊA, 2016):

$$\text{IVCM} = \sum \times \frac{(D - D_a)}{N}$$

Sendo:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial ($\text{cm} \cdot \text{dia}^{-1}$);

D = média do diâmetro médio atual da colônia (cm);

D_a = média do diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm);

N = número de dias após a inoculação (dia).

5.2.4 Determinação do índice de tolerância

Com a média do diâmetro das colônias após 14 dias de incubação foi determinado o índice de tolerância (IT) de cada espécie em cada concentração de Cu^{2+} testada, por meio da fórmula (VALIX; TANG; MALIK, 2001):

$$IT(\%) = \frac{D_{Cu^{2+}}}{D_{cont}} \times 100$$

Sendo:

IT = índice de tolerância (%);

$D_{Cu^{2+}}$ = média do diâmetro de crescimento na presença de Cu^{2+} após 14 dias de incubação (cm);

D_{cont} = média do diâmetro de crescimento na ausência de Cu^{2+} após 14 dias de incubação (cm).

5.2.5 Análise da macromorfologia das colônias

As espécies foram analisadas macroscopicamente, comparando-se o perfil apresentado nas placas controle com os das placas acrescidas de diferentes concentrações de Cu^{2+} , confrontando aspectos como forma, coloração, abundância e dimensão do micélio, pigmentação, esporulação, dentre outras características pertinentes, tanto do anverso quanto do reverso da placa de Petri (NAZARETH; MARBANIANG, 2008).

5.3 REMOÇÃO DE Cu^{2+} PELA ESPÉCIE SELECIONADA

Pela avaliação das nove espécies de fungos que foram inoculadas em meio de cultura BDA e diferentes concentrações de Cu^{2+} , foi selecionada a espécie que apresentou tolerância, crescimento e comportamento diferenciados, para verificar a sua capacidade de remoção de Cu^{2+} de meio aquoso, com o uso de biomassa morta, seca e pulverizada e biomassa viva em crescimento.

5.3.1 Biomassa viva em crescimento

Em Erlenmeyers de 250 mL foram dispostos 100 mL do meio de cultura batata dextrose (BD) (24 g.L^{-1}) e o antibiótico Cloranfenicol, acrescido de diferentes volumes da solução estoque de $CuCl_2$, resultando em meios de cultura contendo 50, 100, 150, 200 e 250 ppm de Cu^{2+} . Foram inoculados três discos de 5 mm de micélio fúngico jovem, cultivado em meio de cultura BDA por cinco dias (ISKANDAR; ZAINUDIN; TAN, 2011). Como controle da biomassa foi utilizado o meio de cultura

BD sem o acréscimo do metal e inoculado com três discos de micélio fúngico jovem (THIPPESWAMY; SHIVAKUMAR; KRISHNAPPA, 2012). Já como controle do metal foi utilizado o meio de cultura BD com acréscimo de CuCl_2 e sem a inoculação do fungo (JOSHI et al., 2011). Os ensaios foram realizados em triplicata e o pH do meio de cultura foi verificado antes da inoculação e ajustado para $4,15 \pm 0,15$, quando necessário, utilizando-se HCl 10% ou solução de NaOH 10%.

Os Erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora horizontal com controle de temperatura, a 125 rpm e 27 °C, durante sete dias. A cada 24 h, alíquotas de 1.000 μL foram coletadas, centrifugadas a 12.000 rpm durante 2 minutos e 500 μL do sobrenadante foi recolhido para análise (ANAND et al., 2006).

A biomassa produzida durante os sete dias de incubação foi filtrada em papel filtro qualitativo de 80 g, lavada em água destilada e colocada em estufa sob temperatura de 105 °C, até que a sua massa permanecesse constante (OKAMOTO; FUWA, 1974). Assim, a biomassa produzida foi quantificada com a sua pesagem em balança semi analítica.

5.3.2 Preparação da biomassa morta, seca e pulverizada

Para a realização do ensaio de bioissorção, primeiramente foi necessário preparar a biomassa morta, seca e pulverizada. Para isso, o fungo foi inoculado em Erlenmeyers de 1 L contendo 500 mL do meio de cultura LPG composto por extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (20 g.L^{-1}) e o antibiótico Cloranfenicol (SALVADORI et al., 2014). Os Erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora horizontal com controle de temperatura, a 125 rpm e 27 °C, durante sete dias.

Após sete dias de incubação, a biomassa foi autoclavada a 121 °C por 20 minutos e filtrada em papel filtro qualitativo de 80 g. A seguir, a biomassa obtida foi disposta em tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL, sendo submetida a subseqüentes lavagens com água destilada estéril e centrifugações, com descarte do sobrenadante, até que ele se tornasse claro. Para a secagem da biomassa morta foi utilizada a técnica de liofilização. A biomassa seca foi pulverizada, com o uso de almofariz e pistilo de porcelana, seguida de sua passagem em peneira de 18 mesh (1 mm) (AKAR; TUNALI, 2006; VERMA et al., 2013 - modificado).

5.3.3 Biomassa morta, seca e pulverizada

Os ensaios de bioissorção foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de solução de CuCl_2 nas concentrações de Cu^{2+} desejadas e acrescentada a biomassa morta, seca e pulverizada preparada previamente. Como controle, foi utilizada a solução metálica sem a biomassa. Os ensaios foram realizados em triplicata e o pH de todas as soluções de CuCl_2 foi verificado antes e após a adição da biomassa e após 20, 60 e 120 minutos de ensaio, e foi ajustado para $5 \pm 0,15$, quando necessário, utilizando-se HCl 10% ou solução de NaOH 10%. Os Erlenmeyers foram colocados em mesa agitadora horizontal com controle de temperatura, a 125 rpm e 27 °C (AKAR; TUNALI, 2006; SAY; DENIZLI; ARICA, 2001; VERMA et al., 2013).

O efeito do tempo de contato na captação de Cu^{2+} foi investigado adicionando 0,5 g de biomassa em solução contendo 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} , incubadas pelo período 120 minutos e amostras foram retiradas após 1, 3, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos (AKAR; TUNALI, 2006).

O efeito da concentração inicial de Cu^{2+} na captação de Cu^{2+} foi apurado adicionando 0,5 g de biomassa em soluções de 50, 100, 150, 200 e 250 ppm Cu^{2+} , que foram incubadas por 60 minutos (AKAR; TUNALI, 2006).

O efeito da dose de bioissorvente na captação do Cu^{2+} foi verificado adicionando 0,2 g e 0,5 g de biomassa em solução de 200 ppm Cu^{2+} , que foram incubadas por 60 minutos (KAHRAMAN et al., 2005).

Para determinação da concentração de Cu^{2+} residual em cada ensaio foram coletadas amostras de 1.000 μL nos tempos determinados, que foram filtradas, centrifugadas a 12.000 rpm durante 2 minutos e 500 μL do sobrenadante foi recolhido para análise.

5.3.4 Digestão das amostras

As amostras coletadas durante os ensaios de remoção de Cu^{2+} foram preparadas para análise em espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry* - ICP-OES). Para isso, uma alíquota de 100 μL de cada amostra foi diluída em 8,9 mL água destilada, adicionado HNO_3 10% e digerida em micro-ondas

de digestão (sistema de reação acelerada por micro-ondas, MARSX PRESS, modelo CEM), a 170 °C durante 10 minutos.

5.3.5 Análise das amostras em espectrômetro óptico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

As amostras digeridas foram analisadas no ICP-OES (modelo Varian 720) para determinação da quantidade de cobre residual das amostras.

5.3.6 Determinação do Cu²⁺ removido

A quantidade de Cu²⁺ removido foi determinada com a utilização da fórmula (ANAND et al., 2006):

$$R(\%) = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \times 100$$

Sendo:

R = capacidade de Cu²⁺ removido (%);

C_i = concentração inicial de Cu²⁺ na solução ou meio de cultura (mg.L⁻¹);

C_e = concentração de Cu²⁺ na solução ou meio de cultura no equilíbrio (mg.L⁻¹);

5.3.7 Determinação da capacidade de remoção de Cu²⁺ pela biomassa

A capacidade de Cu²⁺ removida pela biomassa foi determinada pela fórmula (AKAR; TUNALI, 2006):

$$q = \frac{(C_i - C_e) \times V}{M}$$

Sendo:

q = quantidade de Cu²⁺ removida, em mg, por grama de biomassa (mg.g⁻¹);

C_i = concentração inicial de Cu²⁺ na solução ou meio de cultura (mg.L⁻¹);

C_e = concentração de Cu²⁺ na solução ou meio de cultura no equilíbrio (mg.L⁻¹);

V = volume da solução ou meio de cultura (L);

M = quantidade de biomassa utilizada ou produzida durante o ensaio (g).

6 RESULTADOS

6.1 INOCULAÇÃO DAS ESPÉCIES EM BDA ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Cu^{2+}

6.1.1 Efeito no crescimento

Com a inoculação em meio BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} , foi possível avaliar o crescimento e a tolerância das nove espécies de fungos filamentosos selecionadas para essa pesquisa.

As espécies que apresentaram menor tolerância foram *F. solani*, *P. citrinum* e *R. microsporus*, que exibiram CIM de 370 ppm. Já as duas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *A. flavus* e *A. fumigatus*, bem como *E. shearii*, demonstraram tolerância moderada, com CIM de 541 ppm (Tabela 1).

Três espécies se destacaram por terem a capacidade de crescer em concentrações acima de 2.500 ppm Cu^{2+} . A CIM da espécie *P. lilacinum* foi de 3.000 ppm, já de *A. pullulans* foi de 3.500 ppm. Dentre todas, a espécie que revelou uma maior tolerância ao Cu^{2+} foi *P. ochrochloron*, que apresentou resistência em 4.000 ppm. A partir dessa concentração não foi possível solidificar o meio de cultura BDA utilizando-se o mesmo procedimento seguido anteriormente. Por conta disso, a CIM de *P. ochrochloron* ficou estabelecida como sendo maior do que 4.000 ppm (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Cu^{2+} (ppm)

Espécies	CIM (ppm)
<i>F. solani</i>	370
<i>R. microsporus</i>	370
<i>P. citrinum</i>	370
<i>A. flavus</i>	541
<i>A. fumigatus</i>	541
<i>E. shearii</i>	541
<i>P. lilacinum</i>	3.000
<i>A. pullulans</i>	3.500
<i>P. ochrochloron</i>	> 4.000

O crescimento das espécies nas diferentes concentrações de Cu^{2+} testadas, representado pelo IVC, estão apresentados nas tabelas 2 e 3. Esses resultados

demonstraram que o Cu^{2+} não afetou substancialmente a taxa de crescimento de nenhuma espécie em 44 e 94 ppm, com exceção de *A. fumigatus*. Entretanto, em 187 ppm o crescimento se tornou mais lento em quase todas as espécies, exceto em *F. solani*, *R. microsporus* e *A. flavus*, que demonstraram praticamente a mesma taxa de crescimento apresentada nas concentrações anteriores. Além disso, é importante acrescentar que *R. microsporus* apresentou um crescimento distinto das demais espécies, com expressivo desenvolvimento já no 1º dia após a inoculação, refletido no elevado valor apresentado pelo seu IVCm. Com isso, a medição do diâmetro da colônia de *R. microsporus* foi realizada diariamente, do 1º ao 4º dia após a inoculação.

A partir de 370 ppm, o IVCm de todas as espécies diminuiu com o aumento da concentração. No entanto, o IVCm de *P. ochrochloron* apresentou uma taxa de diminuição menor nas concentrações mais altas do que as demais, principalmente em até 1.776 ppm (Tabela 3).

Tabela 2 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), em cm.dia^{-1} , das espécies inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), em até 735 ppm.

Espécies	Concentração de Cu^{2+} (ppm)						
	Controle	44	94	187	370	541	735
<i>F. solani</i>	1,821	1,801	1,750	1,695	0,000	0,000	0,000
<i>R. microsporus</i>	5,058	5,125	5,194	4,894	0,000	0,000	0,000
<i>P. citrinum</i>	0,954	0,883	0,872	0,461	0,000	0,000	0,000
<i>A. flavus</i>	1,925	1,872	1,827	1,685	0,974	0,000	0,000
<i>A. fumigatus</i>	1,810	1,701	1,081	0,592	0,261	0,000	0,000
<i>E. shearii</i>	1,084	1,024	0,916	0,631	0,326	0,000	0,000
<i>P. lilacinum</i>	1,235	1,253	1,138	0,789	0,480	0,387	0,332
<i>A. pullulans</i>	1,341	1,351	1,313	0,947	0,529	0,432	0,382
<i>P. ochrochloron</i>	1,734	1,725	1,700	1,331	0,727	0,641	0,603

Tabela 3 - Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), em cm.dia^{-1} , das espécies que demonstraram maior tolerância ao Cu^{2+} inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} , entre 870 ppm e 4.000 ppm.

Espécies	Concentração de Cu^{2+} (ppm)								
	870	1.026	1.177	1.528	1.776	2.500	3.000	3.500	4.000
<i>P. lilacinum</i>	0,257	0,247	0,203	0,192	0,186	0,115	0,051	0,000	
<i>A. pullulans</i>	0,392	0,324	0,306	0,266	0,234	0,139	0,124	0,047	0,000
<i>P. ochrochloron</i>	0,589	0,602	0,591	0,582	0,569	0,315	0,227	0,207	0,206

Todas as espécies demonstraram IT maior do que 80% em 44 e 94 ppm, exceto *A. fumigatus*. No entanto, semelhante ao que foi demonstrado pelo IVCM, o IT de quase todas as espécies diminuiu a partir de 187 ppm. No entanto, *F. solani*, *R. microsporus* e *A. flavus* exibiram 100% de tolerância em 187 ppm, seguidos por *P. ochrochloron*, que também exibiu alta tolerância nessa concentração. Somente *A. flavus* apresentou alta tolerância em 370 ppm, já que as outras espécies apresentaram IT menor do que 60% (Figura 1).

Figura 1- Índice de tolerância (IT) das espécies inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), em até 370 ppm.

O IT das espécies mais tolerantes, inoculadas em concentrações de Cu^{2+} maiores, está exposto na figura 2. O IT das espécies diminuiu com o aumento da concentração de Cu^{2+} , exceto em *P. ochrochloron*, que apresentou IT acima de 40% até 1.776 ppm, e permaneceu próximo a 20% nas subsequentes concentrações, até mesmo na mais alta testada, 4.000 ppm. A tolerância demonstrada por *P. ochrochloron* superou a apresentada por todas as outras espécies testadas.

Figura 2- Índice de tolerância (IT) das espécies que demonstraram maior tolerância ao Cu^{2+} , inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), entre 541 e 4.000 ppm.

A espécie *F. solani* foi capaz de atingir o tamanho total da placa de Petri (8,0 cm de diâmetro) em até 10 dias de incubação (Figura 3, Anexo A) e o seu crescimento praticamente não se alterou mesmo em diferentes concentrações de Cu^{2+} , porém foi inibido em 370 ppm Cu^{2+} .

Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *F. solani*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 10 dias de incubação.

Conforme já foi descrito anteriormente, a espécie *R. microsporus* apresentou um crescimento muito acelerado, com alcance do diâmetro total da placa de Petri em quatro dias de incubação em todas as concentrações na qual se desenvolveu (Figura 4, Anexo B), atestando que a variação na concentração de Cu^{2+} não interferiu no seu crescimento.

Figura 4 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *R. microsporus*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 4 dias de incubação.

O crescimento de *P. citrinum* apresentou leve redução em 44 e 94 ppm Cu^{2+} a partir do 5º dia de incubação, quando comparado ao controle. Já em 187 ppm Cu^{2+} , a diminuição do seu crescimento ficou evidente desde os primeiros dias de incubação, repercutindo em uma colônia de diâmetro muito menor do que nas concentrações anteriores (Figura 5, Anexo C).

Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *P. citrinum*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

Entre o controle e a concentração de 187 ppm Cu^{2+} a colônia de *A. flavus* atingiu o tamanho máximo da placa de Petri em até de 10 dias após a inoculação e o seu crescimento teve pouca variação nesse período. Entretanto, em 370 ppm Cu^{2+} , o seu crescimento foi afetado pela presença do Cu^{2+} e ocorreu uma diminuição do tamanho da colônia (Figura 6, Anexo D). Nas concentrações subsequentes essa espécie não apresentou crescimento.

Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *A. flavus*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

Em 44 ppm Cu^{2+} o crescimento de *A. fumigatus* praticamente não sofreu alteração em comparação ao controle e a colônia atingiu praticamente toda a extensão da placa de Petri após 14 dias de incubação. No entanto, o mesmo não ocorreu nas concentrações posteriores e o seu crescimento foi diminuindo conforme a concentração de Cu^{2+} aumentava (Figura 7, Anexo E).

Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *A. fumigatus*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

Embora o crescimento de *E. shearii* pouco tenha de alterado em 44 ppm Cu^{2+} quando comparado ao controle, o mesmo não foi observado nas subsequentes concentrações. O seu crescimento sofreu sucessivos e acentuados decréscimos em a partir de 94 ppm Cu^{2+} (Figura 8, Anexo F), sendo inibido em 541 ppm.

Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *E. shearii*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

O crescimento de *P. lilacinum* foi muito parecido entre o controle e 94 ppm Cu^{2+} , todavia intensas diminuições foram observadas em 187 e 370 ppm Cu^{2+} . Em a partir de 541 ppm Cu^{2+} houveram sucessivos e graduais decréscimos no seu crescimento conforme a concentração de Cu^{2+} aumentou. Vale ressaltar que o diâmetro da colônia, com início em 1.528 ppm Cu^{2+} em diante, foi menor do que 1,0 cm mesmo após 14 dias de incubação, e que, apesar de 3.000 ppm Cu^{2+} não ter inibido o seu crescimento, permitiu que a colônia atingisse apenas 0,2 cm de diâmetro (Figura 9, Anexo G).

Figura 9 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *P. lilacinum*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

O perfil observado em *A. pullulans* foi muito similar ao demonstrado por *P. lilacinum*. O seu crescimento pouco se alterou em até 94 ppm Cu^{2+} , contudo o mesmo não aconteceu em 187 e 370 ppm Cu^{2+} e o diâmetro de crescimento diminuiu acentuadamente. Em a partir de 541 ppm Cu^{2+} o seu desenvolvimento foi diminuindo aos poucos a cada aumento na concentração de Cu^{2+} e foi praticamente nulo em 3.500 ppm Cu^{2+} (Figura 10, Anexo H).

Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *A. pullulans*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

O crescimento de *P. ochrochloron* também permaneceu estável em até 94 ppm Cu^{2+} , sofreu notável redução em 187 e 370 ppm Cu^{2+} , tênues e gradativas diminuições com o aumento da concentração de Cu^{2+} e um saliente declínio em 2.500 ppm Cu^{2+} . É interessante evidenciar que, mesmo com os decréscimos ocorridos em seu crescimento, a sua colônia foi capaz de atingir 1,4 cm de diâmetro após 14 dias de exposição a 4.000 ppm Cu^{2+} (Figura 11, Anexo I). Os resultados apresentados por *P. ochrochloron* na presença de altas concentrações de Cu^{2+} foram muito superiores aos exibiram pelas outras duas espécies mais tolerantes.

Figura 11 - Efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) no crescimento de *P. ochrochloron*, inoculado em meio de cultura BDA, durante 14 dias de incubação.

6.1.2 Efeito na macromorfologia das colônias

O Cu^{2+} causou diferentes efeitos nas colônias fúngicas das diferentes espécies analisadas e variou conforme a concentração do metal. Em algumas espécies as alterações foram mais intensas, enquanto que outras mantiveram o seu aspecto praticamente inalterado.

6.1.2.1 *Fusarium solani*

A colônia controle de *F. solani* apresentou micélio branco (Figura 12A), o qual se tornou mais escasso ao passo que a concentração de Cu^{2+} aumentou, que resultou em degeneração total do micélio em 187 ppm (Figura 12D). Além disso, notou-se o aparecimento de anéis nas colônias crescidas na presença de Cu^{2+} e de pigmentação de coloração marrom arroxeada no meio de cultura, que ficou mais intensa conforme a concentração de Cu^{2+} aumentou (Figura 13).

Figura 12 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *F. solani*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 10 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm.

Figura 13 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *F. solani*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 10 dias de incubação, em comparação ao controle (reverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm.

6.1.2.2 *Rhizopus microsporus*

A espécie *R. microsporus* exibiu características visuais muito similares entre o controle e todas as concentrações de Cu^{2+} nas quais se desenvolveu, apresentando micélio aéreo denso e cotonoso. No entanto, notou-se que a coloração do micélio variou do cinza escuro ao cinza claro entre o controle e na presença de diferentes concentrações de Cu^{2+} , ou seja, houve diminuição da esporulação (Figura 14). Vale acrescentar que o micélio da colônia controle, no primeiro dia após a inoculação, apresentou coloração cinza claro, e foi escurecendo com o passar dos dias de incubação.

Figura 14 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *R. microsporus*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 4 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm.

6.1.2.3 *Penicillium citrinum*

A colônia de *P. citrinum* apresentou margem irregular em 44 ppm Cu^{2+} (Figura 15B). Em 94 ppm Cu^{2+} foi percebido o surgimento da coloração azul mais intensa nas extremidades da colônia (Figura 15C). Já em 187 ppm Cu^{2+} , a colônia adquiriu uma coloração mesclada entre amarelo-alaranjado e cinza, sendo esta última a cor observada nas concentrações anteriores. Além disso, houve o aparecimento de vincos e a diminuição da dimensão da colônia (Figura 15D).

Figura 15 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *P. citrinum*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm.

6.1.2.4 *Aspergillus flavus*

A macromorfologia de *A. flavus* foi similar ao controle em todas as concentrações de Cu^{2+} (Figura 16A, 16B, 16C, 16D), exceto em 370 ppm Cu^{2+} , na qual a colônia exibiu margem irregular e deixou de apresentar anéis, característica observada nas concentrações anteriores (Figura 16E). Além disso, em 187 ppm Cu^{2+} foi observado um discreto declínio na altura e dimensão do micélio (Figura 16D).

Figura 16 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *A. flavus*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm.

6.1.2.5 *Aspergillus fumigatus*

A margem da colônia de *A. fumigatus* se tornou gradualmente irregular em a partir de 94 ppm Cu^{2+} . Em 187 ppm Cu^{2+} a colônia ficou estriada entre o centro e as extremidades e em 370 ppm Cu^{2+} apresentou o micélio aglomerado e concentrado no centro da placa de Petri. Também foi verificado que a pigmentação do micélio se tornou mais intensa ao passo que a concentração de Cu^{2+} aumentou (Figura 17).

Figura 17 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *A. fumigatus*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm.

O meio de cultura em que *A. fumigatus* se desenvolveu na presença de Cu^{2+} tornou-se pigmentado, com coloração marrom escura, e ficou mais acentuada com o aumento da concentração de Cu^{2+} . No entanto, em 370 ppm Cu^{2+} notou-se a pigmentação estava ausente no meio de cultura (Figura 18).

Figura 18 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *A. fumigatus*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (reverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm.

6.1.2.6 *Eupenicillium shearii*

As características da colônia de *E. shearii* não se alteraram em até 94 ppm Cu^{2+} , nas quais foram conservadas a coloração acinzentada no centro e branca na margem (Figura 19A, 19B e 19C). Todavia, em a partir de 187 ppm Cu^{2+} essa espécie passou a apresentar modificações significativas, apresentando marcantes vincos em sua colônia, e essas alterações ficaram ainda mais acentuadas em 370 ppm Cu^{2+} (Figura 19D e 19E).

Figura 19 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *E. shearii*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm.

6.1.2.7 *Purpureocillium lilacinum*

A espécie *P. lilacinum* apresentou brandas diferenças em suas características visíveis nas diferentes concentrações de Cu^{2+} . A placa contendo 44 ppm Cu^{2+} exibiu colônia de coloração mesclada entre lilás e branca, similar ao controle (Figura 20A e 20B). Em a partir de 370 ppm Cu^{2+} a colônia tornou-se mais espessa, com coloração branca e com crescimento compacto, propriedades de se intensificaram até 1776 ppm Cu^{2+} (Figuras 20E a 20L). Já nas duas concentrações antecessoras à inibitória, 2.500 e 3.000 ppm Cu^{2+} , o fungo exibiu micélio sem coloração e com desenvolvimento ínfimo (Figura 20M e 20N).

Figura 20 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *P. lilacinum*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm, F. 541 ppm, G. 735 ppm, H. 870 ppm, I. 1026 ppm, J. 1177 ppm, K. 1528 ppm, L. 1776 ppm; M. 2500 ppm; N. 3000 ppm.

6.1.2.8 *Aureobasidium pullulans*

Assim como no controle, as demais colônias de *A. pullulans* apresentaram-se aveludadas e com coloração lilás em até 735 ppm Cu^{2+} . Em a partir de 187 ppm Cu^{2+} , a colônia foi ficando mais densa conforme a concentração de Cu^{2+} aumentou e a margem tornou-se branca. A começar de 870 ppm Cu^{2+} em diante a coloração da colônia foi clareando aos poucos e em a partir de 1.528 ppm Cu^{2+} a colônia tornou

completamente branca, com ausência de esporulação. Entre 2.500 e 3,500 ppm Cu^{2+} , semelhante ao que foi observado em *P. lilacinum*, a colônia mudou totalmente os seus aspectos (Figura 21).

Figura 21 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *A. pullulans*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm, F. 541 ppm, G. 735 ppm, H. 870 ppm, I. 1026 ppm, J. 1177 ppm, K. 1528 ppm, L. 1776 ppm; ; M. 2500 ppm; N. 3000 ppm; O. 3500 ppm.

6.1.2.9 *Penicillium ochrochloron*

As características das colônias de *P. ochrochloron* se mantiveram as mesmas entre o controle e 94 ppm Cu^{2+} , conservando a coloração verde-acinzentado e o aspecto pulverulento (Figura 22A, 22B e 22C). Alterações perceptíveis ocorreram em 187 ppm Cu^{2+} , com o aparecimento da coloração branca, mesclada ao verde-acinzentado, margem irregular e colônia com aspecto ondulado (Figura 22D). Tais atributos se intensificaram com o aumento da concentração de Cu^{2+} , além de aglomeração do micélio no centro da colônia, margens menos densas e com vincos e diminuição da esporulação até a sua completa inexistência (Figura 20E a 20N). Marcantes alterações ocorreram nas duas concentrações mais altas, 3.500 e principalmente em 4.000 ppm Cu^{2+} , com a formação de colônia totalmente disforme.

Figura 22 - Efeito causado por diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) na macromorfologia das colônias de *P. ochrochloron*, inoculadas em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, em comparação ao controle (anverso da placa de Petri).

A. Controle (sem Cu^{2+}), B. 44 ppm, C. 94 ppm, D. 187 ppm, E. 370 ppm, F. 541 ppm, G. 735 ppm, H. 870 ppm, I. 1026 ppm, J. 1177 ppm, K. 1528 ppm, L. 1776 ppm; M. 2500 ppm; N. 3000 ppm; O. 3500 ppm; P. 4000 ppm.

6.2 REMOÇÃO DE Cu^{2+} PELA ESPÉCIE *P. ochrochloron*

Conforme mostrado pelos resultados obtidos por meio da inoculação das nove espécies de fungos em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} , *P. ochrochloron* se destacou. O seu crescimento, principalmente nas concentrações mais altas, foi superior ao de qualquer outra

espécie testada, além ser a única a exibir crescimento em 4.000 ppm Cu^{2+} , sendo inegável a sua distinta resistência a esse metal. Sendo assim, por conta de seus peculiares comportamento, crescimento e tolerância, *P. ochrochloron* foi a espécie selecionada para ter a sua capacidade de remover o Cu^{2+} testada.

6.2.1 Biomassa viva em crescimento

A espécie *P. ochrochloron* foi inoculada em meio de cultura BD contendo diferentes concentrações de Cu^{2+} . O efeito que a concentração inicial de Cu^{2+} causou ao seu crescimento, à capacidade de remoção pela biomassa e à quantidade de Cu^{2+} removido, após o período de sete dias de incubação, foram avaliados. Além disso, o efeito do período de incubação na quantidade de Cu^{2+} removido também foi apurado.

Foram utilizados os resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 327,395 nm e a curva de calibração obtida resultou em R^2 de 0,998, assegurando a exatidão dos resultados (Anexo J e K).

6.2.1.1 Efeito da concentração inicial de Cu^{2+}

O crescimento da biomassa no meio de cultura contendo 50 ppm foi praticamente igual ao controle (sem o metal). No entanto, na presença de 100 e 150 ppm o crescimento aumentou em 34% e 37% em relação ao controle, respectivamente. Em contato com 200 e 250 ppm não houve considerável variação na produção de biomassa entre essas duas concentrações, porém a quantidade diminuiu em relação às concentrações anteriores, no entanto ainda foi maior do que o controle. O maior crescimento ocorreu em 150 ppm Cu^{2+} , com produção de 5,43 g.L⁻¹ (Figura 23, Anexo L).

A capacidade de remoção de Cu^{2+} pela biomassa, após sete dias de incubação, praticamente não sofreu alteração entre 50 e 150 ppm, embora um leve aumento tenha sido observado em 150 ppm. Já com o aumento da concentração de Cu^{2+} para 200 e 250 ppm, foi verificada uma elevação gradativa e acentuada na capacidade de remoção pela biomassa. Não foi alcançado o equilíbrio na capacidade de remoção utilizando as concentrações testadas. O maior valor foi alcançado na presença de 250 ppm, 7,69 mg.g⁻¹ (Figura 23, Anexo L).

Figura 23 – Efeito da concentração inicial de Cu^{2+} (ppm) na capacidade de remoção do metal pela biomassa e no crescimento de *P. ochrochloron* (período de incubação: 7 dias; temperatura: 27 °C; pH inicial: $4,15 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

q: capacidade de remoção de Cu^{2+} pela biomassa (mg.g⁻¹); biomassa: crescimento (g.L⁻¹).

A biomassa produzida na presença de Cu^{2+} apresentou coloração mais escura em comparação ao controle. Além disso, enquanto que em 50, 100 e 150 ppm o formato da biomassa muito se assemelhou ao controle, notou-se que em 200 e 250 ppm a biomassa se tornou inchada (Figura 24).

Figura 24 – Biomassa produzida durante 7 dias de incubação em meio de cultura BD acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm), além do controle (sem o metal) (temperatura: 27 °C; pH inicial: $4,15 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

A. Controle (crescimento sem Cu^{2+}), B. 50 ppm, C. 100 ppm, D. 150 ppm, E. 200 ppm, F. 250 ppm.

6.2.1.2 Efeito do período de incubação

Entre os dois primeiros dias de incubação não foi constatada expressiva remoção de Cu^{2+} , que teve um início discreto a partir do terceiro dia e se tornou mais consistente a partir do quarto e quinto dia. Foi verificado que remoção oscilou, aumentando e diminuindo, entre os dias de incubação. A remoção da maior quantidade de Cu^{2+} ocorreu no sétimo dia, em todas as concentrações, variando entre 12% e 20%. A maior remoção foi observada na presença de 50 ppm, com 20% do Cu^{2+} removido. Não foi alcançada a saturação na remoção do Cu^{2+} em sete dias de incubação (Figura 25).

Figura 25 – Efeito do período de incubação na remoção do Cu^{2+} pela biomassa em crescimento de *P. ochrochloron*, em diferentes concentrações de Cu^{2+} (ppm) (temperatura: 27 °C; pH inicial: $4,15 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

6.2.2 Preparação da biomassa morta, seca e pulverizada

A espécie *P. ochrochloron* foi inoculada em um total de 6 L do meio de cultura LPG e após o período de incubação de sete dias, a biomassa produzida foi devidamente autoclavada, lavada, seca, triturada e peneirada, resultando em um total de 9,4 g de biomassa morta, seca e pulverizada.

6.2.3 Biomassa morta, seca e pulverizada

A capacidade de remoção de Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada produzida a partir da espécie *P. ochrochloron* foi testada contra o efeito causado pelo tempo de contato, concentração inicial do metal e quantidade de biomassa utilizada.

A adição da biomassa à solução de CuCl_2 causou acidificação do meio e por isso foi necessário ajuste do pH. Com o decorrer do processo de biossorção o pH precisou ser ajustado após 20 minutos de contato, e eventualmente passados 60 e 120 minutos.

Foram utilizados os resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 324,754 nm e a curva de calibração obtida resultou em R^2 de 0,999, assegurando a exatidão dos resultados (Anexo M e N).

6.2.3.1 Efeito do tempo de contato

A bioissorção iniciou-se rapidamente, e uma alta remoção de Cu^{2+} foi observada nos primeiros 20 minutos de contato entre a biomassa e a solução metálica, nas três concentrações testadas. A bioissorção atingiu o equilíbrio em a partir de 20 minutos em 50 e 200 ppm e de 60 minutos em 100 ppm. Após atingido o equilíbrio os níveis de bioissorção praticamente não sofreram alteração (Figura 26, Anexo O).

A maior capacidade de remoção ocorreu aos 20 minutos em 50 e 200 ppm, 2,97 e 7,87 mg.g^{-1} , respectivamente, e aos 60 minutos em 100 ppm, 5,31 mg.g^{-1} .

Figura 26 – Efeito do tempo de contato na capacidade de remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* (concentração inicial: 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} ; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

No primeiro minuto de contato mais de 38% já foi removido nas três concentrações testadas, sendo que em 50 ppm já houve remoção de 59% de Cu^{2+} . O equilíbrio da remoção também foi alcançado em a partir de 20 minutos em 50 e 200 ppm e de 60 minutos em 100 ppm. A maior quantidade de Cu^{2+} removido

ocorreu aos 60 minutos em 50, 100 e 200 ppm, com remoção de 75%, 63% e 45% do Cu^{2+} , respectivamente (Figura 27).

Figura 27 - Efeito do tempo de contato na remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* (concentração inicial: 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} ; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

6.2.3.2 Efeito da concentração inicial de Cu^{2+}

A capacidade de remoção pela biomassa aumentou com o aumento da concentração de Cu^{2+} , em até 200 ppm, a partir da qual houve saturação e a capacidade de remoção não se alterou, entrando em equilíbrio. O inverso foi percebido em relação a quantidade de Cu^{2+} removido, que diminuiu conforme a concentração de Cu^{2+} aumentou (Figura 28, Anexo P).

A maior capacidade de remoção foi constatada em 200 ppm, $7,78 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto que a maior quantidade de Cu^{2+} removido foi apurada em 50 ppm, com remoção de 75% do Cu^{2+} .

Figura 28 – Efeito da concentração inicial de Cu^{2+} (ppm) na remoção do metal pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* (tempo de contato: 60 minutos; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: 5,0 $\pm$ 0,15; agitação: 125 rpm).

q: capacidade de remoção de Cu^{2+} pela biomassa (mg.g^{-1}); R: remoção de Cu^{2+} (%).

6.2.3.3 Efeito da quantidade de biomassa

A capacidade de remoção de Cu^{2+} utilizando-se 0,2 g de biomassa foi de 17,03 mg.g^{-1} , sendo maior do que o dobro do valor atingido quando 0,5 g de biomassa foi usado, 7,78 mg.g^{-1} . No entanto, a remoção de Cu^{2+} foi maior por 0,5 g de biomassa, com 45% de Cu^{2+} removido, enquanto que 32% foi captado por 0,2 g, porém a diferença entre as quantidades removidas não foi tão acentuada quanto a constatada pela capacidade de remoção (Figura 29, Anexo Q).

Figura 29 – Efeito da quantidade de biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* na remoção do Cu^{2+} (concentração inicial: 200 ppm Cu^{2+} ; tempo de contato: 60 minutos; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

q: capacidade de remoção de Cu^{2+} pela biomassa (mg.g^{-1}); R: remoção de Cu^{2+} (%).

7 DISCUSSÃO

7.1 COMPORTAMENTO, CRESCIMENTO E TOLERÂNCIA DAS ESPÉCIES EM CONTATO COM Cu^{2+}

As nove espécies de fungos filamentosos foram inoculadas em meio de cultura BDA acrescido de diferentes concentrações de Cu^{2+} e foi percebido que cada espécie possui as suas particularidades de comportamento, refletidas em diferentes padrões de crescimento, alterações visíveis nas colônias e tolerância.

Velmurugan et al. (2010) verificaram que o Zn^{2+} não foi tóxico à *Fusarium* spp., pelo menos até a concentração de 5.000 ppm, alcançando uma bioadsorção de 60% em 100 ppm do metal, além da confirmação da formação de nanopartículas (ZnS). Já na comparação de Sen (2012), que colocou *F. solani* em contato com 500 ppm de Cr^{+4} , a máxima capacidade de remoção utilizando-se o fungo em crescimento foi de 71 mg.g^{-1} , contra 3,1 mg.g^{-1} utilizando-se biomassa morta. *F. solani* foi indicado por Vargas-García et al. (2012) como uns dos mais eficientes na remoção de diversos metais entre os isolados testados. Os seus resultados confirmaram que a eficiência de remoção varia entre os metais, as espécies e conforme o tipo de biomassa utilizada. Hong, Park e Gadd (2010) colocaram *F. solani* em contato com o Cu^{2+} e chegaram a resultados de capacidade de remoção variando entre 0,46 a 0,67 mg.g^{-1} , em meio contendo 952,5 ppm desse metal, após 4 semanas de incubação.

A espécie *F. solani* foi isolada de amostras de solo por Siham (2007), que inoculando essa espécie em diferentes concentrações de Cu^{2+} obteve um diâmetro de crescimento de 4,7 cm no controle, com diminuição gradual até a concentração de 762 ppm, na qual a colônia atingiu 3,0 cm de diâmetro. Enquanto o crescimento do isolado de Siham (2007) diminuiu a cada aumento de concentração, o do *F. solani* estudado na presente pesquisa se manteve praticamente o mesmo, porém, foi inibido em 370 ppm, demonstrando uma menor resistência ao metal.

Estando a melanina associada ao sistema de defesa do fungo (BELL; WHEELER, 1986), pode-se supor que o surgimento da pigmentação no meio de cultura no qual *F. solani* cresceu e a sua intensificação conforme a concentração de Cu^{2+} aumentou seja um mecanismo de resistência ativado pelo fungo. Nenhum artigo reportando a investigação referente a esse aspecto foi encontrado.

Já foi descrito por diversos autores que a atividade da lacase pode aumentar ou diminuir em diferentes níveis, de acordo com as condições de cultivo e a concentração de Cu^{2+} adicionada ao meio de cultura, podendo estar associada à tolerância ao metal (FARNET; GIL; FERRE, 2008; FOROOTANFAR et al., 2011; KANNAIYAN et al., 2012; THURSTON, 1994; ZHAO et al., 2012). Wu et al. (2010) reportou que a atividade dessa enzima produzida por *F. solani* foi inicialmente inibida em 31,75 ppm Cu^{2+} , chegando a uma inibição parcial em 1.270 ppm. De acordo com essas informações, pode-se supor que a lacase está associada a um possível mecanismo de tolerância desse fungo.

Mesmo *F. solani* estando entre as espécies com menor tolerância, apresentando CIM de 370 ppm de Cu^{2+} , todos os seus índices de crescimento se mantiveram similares nas concentrações em que se desenvolveu, exibindo IT de 100%. Contrastando com essa regularidade, exibiu intensas modificações no aspecto de suas colônias e produção de pigmento no meio de cultura. Por meio disso, pode-se propor que a presença do Cu^{2+} gere um ambiente conturbado para o seu desenvolvimento, com desajuste de suas características originais e de seu metabolismo, ativando mecanismos de tolerância que possibilite o seu crescimento.

Outra espécie que também apresentou CIM de 370 ppm de Cu^{2+} foi *R. microsporus*, e embora o seu crescimento praticamente não tenha sido afetado pelo Cu^{2+} , foi observado que o aparecimento da coloração cinza escura exibida pelo micélio no controle no 1º dia após a inoculação foi levemente retardado na presença de Cu^{2+} . Já foi reportado que o Cu^{2+} pode causar uma fase *lag* mais longa, retardando o crescimento dos fungos e representando uma fase de adaptação. Tal fato pode indicar uma fase de ambientação do fungo ao metal (ANAND et al., 2006; MISHRA; MALIK, 2012).

A espécie *R. microsporus* foi 100% tolerante até 187 ppm de Cu^{2+} e apresentou uma taxa de crescimento superior às demais espécies. Curiosamente, não é comumente reportada em artigos referentes a tolerância e biorremediação de locais contaminados com metais. Confrontando os resultados obtidos com os de Singh et al. (2016), foi percebido que a resistência apresentada pelos dois isolados foi diferente, já que a cepa de *R. microsporus* estudada por esse grupo alcançou uma tolerância de apenas 44% em 190,5 ppm. Todavia, a inibição do crescimento foi semelhante em ambos os isolados, que não foram capazes de crescer nas concentrações posteriores.

Já *P. citrinum*, a última dentre as três espécies com menor tolerância ao Cu^{2+} , obteve um padrão diferente das outras duas já descritas aqui. O crescimento dessa espécie foi afetado pela concentração de 187 ppm, que diminuiu o seu desenvolvimento, e em 370 ppm foi inibido. Resultado próximo foi encontrado por Martins et al. (2016), testando *P. citrinum* em meio líquido, que determinou como sendo 150 ppm de Cu^{2+} a sua máxima concentração tolerada e foi inibida em 250 ppm. Similar resistência também foi obtida por Ezzouhri et al. (2009), que isolaram fungos do gênero *Penicillium* de local contaminado com Cu^{2+} e encontraram 317,5 ppm como sendo a máxima concentração tolerada por alguns dos isolados. Nazareth e Marbaniang (2008) investigaram o crescimento de quatro isolados pertencentes ao gênero *Penicillium* e atestaram que um dos isolados não teve resistência ao Cu^{2+} , dois foram considerados resistentes a até 127 ppm e o isolado mais resistente cresceu em 317,5 ppm.

Da mesma forma que o diâmetro da colônia de *P. citrinum* diminuiu em contato com o Cu^{2+} , Nazareth e Marbaniang (2008) também perceberam tal fato. Além disso, o IT de *P. citrinum* foi superior a 70% nas concentrações nas quais se desenvolveu, conforme exibido nos resultados. Esses achados se enquadram nos constatados por Ezzouhri et al. (2009), que verificou IT das cepas do gênero *Penicillium* em contato com 63,5 ppm de Cu^{2+} variando entre 51 % e 98%. Sazanova et al. (2015), utilizando a concentração de 31,75 ppm de Cu^{2+} , também observaram que a presença do metal diminuiu o crescimento micelial de *P. citrinum*, evidenciando o seu efeito tóxico. Uma proposição feita tanto por Sazanova et al. (2015) como por Nazareth e Marbaniang (2008) para a baixa resistência ao Cu^{2+} demonstrada por *P. citrinum* foi a de que o metal é acumulado em uma grande quantidade no seu micélio, o que diminuiria a sua resistência.

Assim como foi observado o aparecimento de micélio azul na colônia de *P. citrinum* na presença do Cu^{2+} , tal peculiaridade já foi relatada por outros autores, que sugeriram acúmulo do metal pela biomassa (EZZOUHRI et al., 2009; ISKANDAR; ZAINUDIN; TAN, 2011; ZAPOTOCZNY et al., 2007).

Mesmo não estando entre as espécies com maior tolerância, é pertinente citar que Verma et al. (2013) analisaram a remoção utilizando biomassa morta produzida por *P. citrinum* e apuraram uma remoção de 84,5% do metal e uma capacidade de remoção da biomassa de $3,38 \text{ mg.g}^{-1}$, na concentração de 20 ppm. Segundo Akinkunmi et al. (2016), o mecanismo de bioissorção realizado por *P.*

citrinum seria a complexação dos íons metálicos dentro da PC e indicaram, especialmente, o envolvimento dos grupos hidroxil, amida e carboxil, já que ocorreram alterações neles que podem ser atribuídas a interações químicas entre os íons de Cu^{2+} e esses grupos funcionais.

Os resultados obtidos utilizando *A. flavus* foram superiores em todos os aspectos quando confrontados pelos reportados por outros autores. Essa espécie apresentou como CIM 541 ppm Cu^{2+} e foi tolerante a até 370 ppm, sendo essa última a única concentração que afetou o seu crescimento, embora o IT tenha se mantido acima de 90% em todas as concentrações. Nazareth, Gaitone e Marbaniang (2012) obtiveram 63,5 e 190,5 ppm de Cu^{2+} como máxima concentração tolerada pelos dois isolados de *A. flavus* analisados. Thippeswamy, Shivakumar e Krishnappa (2012) constataram que *A. flavus* teve uma diminuição de cerca de 30% na biomassa formada em meio líquido contendo 100 ppm de Cu^{2+} , tendo o seu crescimento inibido em a partir de 250 ppm. Já Gazem e Nazareth (2013) observaram crescimento em até 254 ppm de Cu^{2+} , sendo inibido em 317,5 ppm. Nos três isolados de *A. flavus* estudados por Gazem e Nazareth (2013), em 254 ppm houve variação no diâmetro da colônia entre 0,2 e 0,8 cm.

Thippeswamy, Shivakumar e Krishnappa (2012) apuraram que *A. flavus* foi capaz de remover 34% do Cu^{2+} presente no meio de cultura durante o seu crescimento em 100 ppm do metal após 5 dias de incubação. Gomaa e Azab (2013) encontraram dados pertinentes quanto à capacidade de *A. flavus* em acumular Cu^{2+} , ficando acima de 80% a concentração acumulada na parte citosólica quando o fungo cresceu em meio de cultura contendo 63,5 e 635 ppm do metal, indicando que o mecanismo de resistência de *A. flavus* realiza-se por bioacumulação. Além disso, também verificaram que houve polimorfismo genético na presença de Cu^{2+} e algumas alterações bioquímicas de acordo com a concentração do metal. Baseado nesses dados, os autores notaram que essa espécie foi capaz que acumular altas concentrações de Cu^{2+} intracelularmente sem alterar a viabilidade do fungo.

Fundamentado nos resultados obtidos e nas informações colhidas nessa revisão, possivelmente *A. flavus* foi capaz de ativar uma resposta metabólica eficiente na presença de Cu^{2+} , já que a sua viabilidade não foi modificada nas diferentes concentrações nas quais se desenvolveu. Porém, em 370 ppm mudanças foram exibidas, podendo sugerir que a resposta metabólica foi ineficiente e/ou a bioacumulação de Cu^{2+} alcançou níveis tóxicos, causando distúrbios na célula que

foram refletidos em alterações no seu crescimento e nos aspectos da colônia. Além disso, foi observado que a concentração de 541 ppm proporcionou um ambiente inóspito, cujo estresse causado não permitiu que houvesse uma resposta bioquímica eficiente do seu metabolismo.

Akar e Tunali (2006) verificaram uma capacidade de biossorção utilizando biomassa de *A. flavus* inativada por aquecimento de aproximadamente 10,82 mg.g⁻¹ em solução contendo 150 ppm de Cu²⁺. Gazem e Nazareth (2013), utilizando biomassa viva e úmida, constataram que a maior parte do Cu²⁺ bioissorvido pelas espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* foi encontrada na PC, indicando o envolvimento dos grupos funcionais carboxil, hidroxil, sulfato, fosfato e amino na biossorção do metal. Com todos esses dados referentes à *A. flavus*, pode-se notar que essa é uma espécie com características interessantes a serem exploradas na biorremediação.

A espécie *A. fumigatus* teve como CIM 541 ppm Cu²⁺ e o seu crescimento caiu consideravelmente a cada aumento de concentração. Iskandar, Zainudin e Tan (2011) encontraram resultados similares testando a resistência de *A. fumigatus* ao Cu²⁺ e verificaram que o seu crescimento baixou quase pela metade em 100 ppm, diminuiu ainda mais em 500 ppm e foi totalmente inibido em a partir de 800 ppm. Assim como Gazem e Nazareth (2013), que constataram baixa tolerância de *A. fumigatus* quando inoculado em meio contendo 127 ppm de Cu²⁺.

Rao et al. (2005) testaram a biomassa seca de *A. fumigatus* em solução contendo 1.587,5 ppm de Cu²⁺ e apuraram uma captação de 72% do metal. Utilizando uma solução em meio competitivo de metais, a remoção do Cu²⁺ foi a mais eficiente, alcançando cerca de 70%. Já Yin, Hu e Xiong (2011) estudaram a capacidade de remoção do Cu²⁺ utilizando substâncias poliméricas extracelulares extraídas da biomassa de *A. fumigatus*. A máxima capacidade de sorção determinada pelas isotermas de Langmuir foi de 40 mg.g⁻¹, indicando que os grupos carboxil, hidroxil, fosfato e amino estão predominantemente envolvidos na sorção dos íons de Cu²⁺. O grupo também sinalizou a participação do mecanismo de troca iônica na sorção do metal.

Já foi comprovado que a melanina é um importante agente contra o efeito adverso causado por estresse do ambiente, como altas concentrações de metais (GESSLER; EGOVA; BELOZERSKAYA, 2014) e isso se refletiu nas colônias de *A. fumigatus*, cuja pigmentação do micélio de coloração verde azulada, que é

atribuída à melanina dihidroxinaftaleno (DHN) (UPADHYAY; TORRES; LIN, 2013), tornou-se mais intensa conforme a concentração de Cu^{2+} no meio de cultura aumentou. Já foi reportada a ocorrência de acúmulo da melanina DHN na PC de *Gaeumannomyces graminis* quando exposta ao Cu^{2+} , além dos resultados indicarem que CuS foi formando e que estava associado à camada de melanina na PC (CAESAR-TONTHAT et al., 1995). Além disso, a melanina DHN também já foi associada à resistência ao Cd^{2+} apresentada por *Exophiala pisciphila*, sendo sugerido que ela desempenha um papel de proteção contra o estresse causado pelo metal, porém provavelmente não estando ligada à capacidade do seu acúmulo na PC (ZHAN et al., 2016).

Além da melanina DHN, o papel da histidina também já foi reportado, estando associada à resistência de *A. fumigatus* a alguns metais, dentre eles o cobre. Dietl et al. (2016) confirmaram o papel da histidina na resistência contra concentrações excessivas de cobre e a toxicidade causada por eles, além da histidina possuir grande afinidade por metais.

Conforme apresentado nos resultados, foi apurado que um pigmento de coloração marrom escuro surgiu no meio de cultura quando *A. fumigatus* cresceu em contato com o Cu^{2+} , e que essa coloração se intensificou ao passo que a concentração do metal aumentou. Sugere-se que esse pigmento possa ser a feomelanina, pigmento marrom produzido pela degradação da tirosina e que pode ser excretado no meio de cultura por *A. fumigatus*. Isso porque, uma vez que a feomelanina está associada à proteção da célula contra ERO e à manutenção da integridade da PC, e a célula dessa espécie estava sob condição crescente de estresse causado pelo aumento da concentração de Cu^{2+} , a produção de feomelanina pode ter sido ativada e ampliada, como uma forma de proteção à célula (SCHMALER-RIPCKE et al., 2009; VALIANTE et al., 2009).

Todos esses dados referentes à *A. fumigatus* sinalizam que ele possui refinados mecanismos de defesa contra a toxicidade criada pelo Cu^{2+} , porém a sua tolerância foi baixa e o efeito causado em seu crescimento ficou evidente. Mesmo assim, aparentemente *A. fumigatus* apresenta características celulares interessantes a serem exploradas na biorremediação.

Foi constatada a carência de artigos reportando a investigação da tolerância ou captação de metais por *E. shearii*. Goupil, Nkongolo e Nasserulla (2015) isolaram

essa espécie de local contaminado com metais, entre eles Ni^{2+} e Cu^{2+} , porém nenhuma análise referente a sua capacidade de interação com metais foi realizada.

As alterações macromorfológicas visualizadas por Nazareth e Marbaniang (2008) nas colônias pertencentes ao gênero *Penicillium* em contato com o Cu^{2+} foram semelhantes aos reproduzidos por *E. shearii*, como crescimento compacto, mudança de formato para ondulado e formação de margem irregular, além da inibição da esporulação e da pigmentação. Com isso, percebe-se que a toxicidade acarretada pelo Cu^{2+} pode imprimir efeitos análogos em diferentes gêneros e espécies.

Errasquín e Vázquez (2003) relataram que o crescimento de *Trichoderma atroviride* reduziu em 80% quando em contato com 350 ppm de Cu^{2+} , sendo inibido em 400 ppm. Zotti et al. (2014) verificaram que o IT de *Trichoderma harzianum* chegou a 24,2% quando crescido em meio de cultura contendo 400 ppm de Cu^{2+} . Tais resultados muito se assemelham aos exibidos por *E. shearii*, que em 370 ppm teve redução de cerca de 70% no seu crescimento e apresentou IT de 32%.

Aparentemente, a atenção voltada ao potencial de *P. lilacinum* para processos de biorremediação, associado à sua tolerância e capacidade de remoção de Cu^{2+} , iniciou-se recentemente, já que os artigos relatando tais questões são atuais. O seu crescimento em contato com o Cu^{2+} se destacou, estando entre as espécies que apresentaram alta tolerância ao metal. *P. lilacinum* exibiu capacidade de crescer em até 3.000 ppm, embora o seu desenvolvimento tenha sido visivelmente afetado em acima de 1.000 ppm.

Oggerin et al. (2015) constatou que *P. lilacinum* era capaz de tolerar altas concentrações de Cu^{2+} e remover considerável quantidade do metal, sendo que uma parte ficou retida na PC e outra parte foi internalizada em largos vacúolos. Além disso, ao que tudo indica, o Cu^{2+} desencadeou uma série de respostas a nível proteômico, aumentando a expressão de grupos de proteínas vinculados à manutenção da integridade da PC, à síntese de vesículas e à proteção contra o dano oxidativo. Reforçando a versatilidade metabólica de *P. lilacinum* quando em contato com íons metálicos, Oggerin et al. (2013) também indicaram que essa espécie era capaz de realizar a biomineralização de sulfato de ferro, característica essa até então só relatada em bactérias.

Gong et al. (2017) observou que a presença de *Purpureocillium* sp., fungo endofítico, promoveu o crescimento da planta mesmo sob condições de estresse de

diferentes concentrações de Cu^{2+} e que na sua ausência o desenvolvimento foi prejudicado. Também foi apurado que a presença do fungo reduziu a absorção do metal na planta e o pH, além de ter aumentado a concentração de complexos de cobre e diminuído a presença de Cu^{2+} no solo. O grupo foi sugerido que a diminuição do pH estava associada à secreção de compostos ácidos pelo fungo, o que pode ter contribuído para a formação dos complexos, sendo esse um possível mecanismo de tolerância utilizado por *Purpureocillium* sp.

Um isolado de *P. lilacinum* proveniente de solo contendo altas concentrações de Cu^{2+} testado por Egorova et al. (2015) revelou elevada resistência ao estresse oxidativo, associada ao aumento de proteínas contendo o grupo carbonil. A carbonilação de proteínas é considerada um indicador de dano oxidativo severo (DALLE-DONNE et al., 2006).

Embora a adsorção dos íons de Cu^{2+} na PC deva ter o seu papel na resistência de *P. lilacinum*, o que realmente parece desempenhar uma função de grande importância é a sua intensa e versátil atividade metabólica, por meio da internalização dos íons em vacúolos, excreção de substâncias que podem contribuir com diminuição da toxicidade do metal e uma efetiva resposta oxidativa.

Sendo *A. pullulans* um fungo polimórfico, Gadd e Mowll (1985) perceberam que a interação e a captação do Cu^{2+} realizada pelas suas diferentes formas ocorrem de forma distinta em cada formato. A condição mais tolerante foi indicada como o clamidósporo, e embora tenha sido observada uma rápida ligação à superfície da PC nas três formas citadas, a captação intracelular ocorreu apenas no formato de levedura e na filamentosa. Além disso, houveram indícios de que o Cu^{2+} acumulado intracelularmente estava na forma iônica ou ligado a compostos de baixo peso molecular.

Gadd e Griffiths (1980) relataram estimulação e aumento da síntese de um pigmento escuro, a melanina, quando *A. pullulans* em forma de levedura foi exposta ao Cu^{2+} e sugeriram que esse poderia ser um mecanismo de resistência que permitisse o seu crescimento em meio de cultura contendo o metal. No entanto, a espécie *A. pullulans* estudada nessa pesquisa sempre apresentou apenas o formato filamentoso e não houve o aparecimento de pigmento escuro em seu micélio. Notou-se uma carência de estudos a respeito da tolerância e captação de Cu^{2+} utilizando *A. pullulans* em sua forma filamentosa.

Bááth (1991), testando a tolerância de *A. pullulans* ao Cu^{2+} , constatou que o seu crescimento radial diminuiu em 50% na concentração de 160 ppm, e que a mais alta concentração na qual cresceu foi 200 ppm. Esse resultado está muito abaixo do atingido pela mesma espécie na presente pesquisa, cujo crescimento foi inibido apenas em 3.500 ppm.

Em estudo conduzido por Kartal, Katsumata e Imamura (2006), *A. pullulans* foi utilizado para a produção de ácido oxálico, que tem comprovado efeito quelador no sequestro de íons metálicos, e foi empregado como meio de extração de Cu^{2+} , Cr^{2+} e As^{5+} de serragem de madeira tratada com arseniato de cobre cromatado. O meio no qual *A. pullulans* cresceu e excretou ácido oxálico foi capaz de remover cerca de 80% do Cu^{2+} presente no material. Sazanova et al. (2015) sugeriram que o grande acúmulo de Zn^{2+} no micélio de *Aspergillus niger* e *P. citrinum* ocorreu por uma ligação extracelular dos íons com ácido oxálico e precipitação na superfície do micélio, associado a uma tolerância maior à presença do metal. Dessa forma, um possível mecanismo desenvolvido por *A. pullulans* para tolerar altas concentrações de Cu^{2+} pode estar associado à secreção de ácido oxálico ou outros ácidos orgânicos. Isso porque ácidos orgânicos podem ter o seu papel na resistência de fungos à metais, já que podem formar complexos estáveis e, dessa forma, reduzir a toxicidade do metal para o fungo (SAZANOVA et al., 2015).

Ao contrário do que foi notado com *P. lilacinum*, cujos artigos encontrados foram publicados recentemente, a eminente tolerância de *P. ochrochloron* ao Cu^{2+} já vem sendo estudada a algumas décadas. Entretanto, artigos atuais relatando novas descobertas acerca dos seus mecanismos de tolerância e captação estão escassos.

A espécie *P. ochrochloron* foi aquela que apresentou maior tolerância ao Cu^{2+} dentre as estudadas e cuja CIM foi determinada como maior do que 4.000 ppm. Além disso, o seu crescimento foi o menos afetado pelas diferentes concentrações de Cu^{2+} , principalmente a partir de 370 ppm. Esses resultados corroboram com o que outros autores se depararam. Testando a tolerância de *P. ochrochloron*, Okamoto et al. (1977) não conseguiram alcançar a concentração que inibisse totalmente o seu crescimento, já que essa espécie conseguiu se desenvolver mesmo em solução saturada de CuSO_4 , propondo assim que a toxicidade provocada pelos metais em *P. ochrochloron* fosse distinta entre as demais espécies. Stokes e Lindsay (1979), utilizando meio de cultura líquido, observaram crescimento de *P.*

ochrochloron até 5.000 ppm de Cu^{2+} , sendo inibido em 10.000 ppm. Já Mitani e Misic (1991) verificaram inibição de crescimento de *Penicillium* sp. em 3.000 ppm de Cu^{2+} .

Stokes e Lindsay (1979) também atestaram que, mesmo com o armazenamento dos isolados de *P. ochrochloron* entre um e cinco anos em meio de cultura ausente de Cu^{2+} , a sua capacidade para tolerar altas concentrações do metal não se alterou, sugerindo que a tolerância ao Cu^{2+} fosse uma característica estável dessa espécie. Gadd et al. (1984) constataram que *P. ochrochloron* foi capaz de crescer mesmo em meio de cultura com alta osmolalidade, causada por altas concentrações de Cu^{2+} , por meio da ativação de resposta com significativo efeito para a proteção osmótica da célula.

Gadd e White (1985) demonstraram a existência de um influxo de Cu^{2+} dependente de energia em *P. ochrochloron*. Já Gadd et al. (1984) e Okamoto et al. (1977) verificaram habilidade de *P. ochrochloron* em manter constante o nível de Cu^{2+} no micélio, característica que poderia estar relacionada à capacidade de controlar a quantidade de Cu^{2+} captada e assim, ligada à sua tolerância.

A partir dos resultados obtidos e fundamentado nas informações coletadas dos autores aqui citados, a destacada tolerância apresentada por *P. ochrochloron* aparentemente se deve a um sistema integrado tanto dependente quanto independente do seu metabolismo. Esse conjunto integrado parece atuar principalmente na manutenção dos íons do metal metálicos fora da célula, refletindo em destacada absorção na PC. Além disso, parece haver um controle da entrada dos íons dentro da célula, minimizando assim os efeitos tóxicos do Cu^{2+} ao fungo e lhe conferindo capacidade de crescer em ambiente com altos níveis do metal sem a interferência no seu desenvolvimento.

Uma característica expressiva observada nas três espécies mais tolerantes foi a ausência de esporulação durante o crescimento em concentrações mais altas de Cu^{2+} , o que também foi verificado por outros autores (ABBOUD; ALAWLAQI, 2011; GAZEM; NAZARETH, 2013; NAZARETH; GAITONDE; MARBANIANG, 2012).

A alta tolerância demonstrada pelas espécies *P. lilacinum*, *A. pullulans* e *P. ochrochloron* se distingue da reportada por outros autores, como Ezzouhri et al. (2009), que encontraram CIM entre isolados do gênero *Penicillium* de até 1.270 ppm Cu^{2+} ; Akhtar et al. (2013) reportaram resistência fúngica em até 1780 ppm Cu^{2+} ; Iskandar, Zainudin e Tan (2011) atestaram crescimento de *Aspergillus niger* e *Penicillium simplicissimum* em até 1.000 ppm Cu^{2+} . Já Zafar, Aqil e Ahmad (2007)

chegaram a resultados similares aos aqui relatados, atingindo CIM entre 600 e 9.000 ppm Cu^{2+} .

7.2 REMOÇÃO DO Cu^{2+} PELA BIOMASSA VIVA EM CRESCIMENTO DE *P. ochrochloron*

Embora já tenha sido relatado que a melhor captação de Cu^{2+} utilizando biomassa viva tenha ocorrido entre pH 4,5 e 5,0 (ANAND et al., 2006; DURSUN et al., 2003; USLU et al., 2003), Gadd e White (1985) apuraram que nem a captação nem a toxicidade do Cu^{2+} foram afetadas na faixa de pH entre 3,0 e 5,5 em *P. ochrochloron*.

Na maioria dos fungos, o crescimento diminui com o aumento da concentração de Cu^{2+} no meio de cultura, sendo menor em relação ao controle, conforme já foi reportado por diversos autores (DURSUN et al., 2003; ISKANDAR; ZAINUDIN; TAM, 2011; MOORE; DUNCAN; BURGESS, 2008; THIPPESWAMY; SHIVAKUMAR; KRISHNAPPA, 2012; TSEKOVA; TODOROVA, 2002; USLU et al., 2003).

Anand et al. (2006) verificaram que o crescimento da biomassa fúngica de *Trichoderma viride* foi semelhante ao controle em 50 e 100 ppm Cu^{2+} , porém diminuiu gradualmente quando 150 e 200 ppm estavam presentes no meio de cultura. Errasquín e Vázquez (2003) também constataram crescimento similar de *Trichoderma atroviride* entre o controle e subseqüentes aumentos na concentração de Cu^{2+} até 300 ppm, porém com abrupta queda em 350 ppm.

O crescimento de *P. ochrochloron* na presença de Cu^{2+} já foi reportado anteriormente seguindo um padrão diferente do verificado em outras espécies de fungos filamentosos. Okamoto et al. (1977) observaram que o crescimento de *P. ochrochloron* não diminuiu com o aumento da concentração de Cu^{2+} , se mantendo constante entre o controle e diferentes concentrações, e concluíram que a toxicidade dos metais à *P. ochrochloron* é distinta das demais espécies. Da mesma forma, Mitani e Misic (1991) também relataram crescimento praticamente constante de *Penicillium* sp. entre 0 e 2.000 ppm Cu^{2+} . Além disso, já foi reportado que o crescimento de *P. ochrochloron* foi estimulado na presença de 10 a 100 ppm Cu^{2+} , mas diminuiu em concentrações mais altas (500, 1.000, 5.000 ppm), mas ainda assim foi maior do que o controle, com exceção de em 5.000 ppm, e exibiu o melhor

crescimento em 100 ppm Cu^{2+} (STOKES; LINDSAY, 1979). Esses resultados corroboram com o crescimento apresentado por essa espécie na presente pesquisa, que foi estimulado na presença de Cu^{2+} em todas as concentrações testadas, entre 50 e 250 ppm, exibindo aumento de até 37% em comparação ao controle. Segundo Thippeswamy, Shivakumas e Krishnappa (2012) o aumento expressivo do crescimento na presença de metais pode indicar que eles possuam participação no desenvolvimento dos fungos. Stokes e Lindsay (1979) sugeriram que a estimulação do crescimento em baixos níveis de Cu^{2+} de *P. ochrochloron* poderia ser interpretada como uma maior exigência de Cu^{2+} do que é fornecido pelos níveis normais de micronutrientes.

A quantidade de Cu^{2+} removida varia entre as espécies fúngicas, porém é comumente relatada a sua diminuição com o aumento da concentração do metal. Moore, Duncan e Burgess (2008) reportaram remoção de 26,86% de Cu^{2+} em 50 ppm. Já Mishra e Malik (2012) apuraram que houve uma remoção de 77,5% de Cu^{2+} em 80 ppm por *Aspergillus lentulus*. Utilizando *Rhizopus arrhizus*, Uslu et al. (2003) constataram uma remoção de 22,4% de Cu^{2+} em 50 ppm, diminuindo para 7,8% em 100 ppm. Dursun et al. (2003) reportou remoção de 51,8% de Cu^{2+} em 50 ppm, reduzindo para 19,5% em 100 ppm por *A. niger*. Abboud e Alawlaqi (2011) verificaram que 5,47% e 6,53% de Cu^{2+} foi encontrado na célula fúngica de *Aspergillus terreus* quando crescido em 100 e 200 ppm Cu^{2+} , respectivamente. Thippeswamy, Shivakumar e Krishnappa (2012) constataram uma remoção de 34% em 100 ppm Cu^{2+} realizada por *A. flavus* e de 45% em 100 ppm Cu^{2+} e 23% em 250 ppm por *A. niger*. Tal grupo indicou que, com o aumento da concentração de metais, uma maior quantidade de íons metálicos competiria pelo mesmo sítio de ligação, o que causaria uma diminuição na remoção do metal. Já em baixas concentrações, um maior número de sítios de ligação estaria disponível para a complexação de íons metálicos com a parede celular, aumentando assim a quantidade de íons removidos. Em *P. ochrochloron*, embora a maior remoção de Cu^{2+} tenha ocorrido em 50 ppm (20%) e a quantidade removida tenha sofrido uma redução em 100 ppm em comparação à concentração anterior, manteve-se na mesma faixa, entre 12% e 14%, de 100 a 250 ppm Cu^{2+} .

Diferentemente do que foi apurado em *P. ochrochloron*, que iniciou discretamente a remoção do Cu^{2+} em apenas a partir do terceiro dia após a inoculação, Anand et al. (2006) notou que, utilizando *Trichoderma viride*, a remoção

do Cu^{2+} começou já nas primeiras 24 h, com cerca de 50% a 10% de remoção nas concentrações entre 50 e 200 ppm Cu^{2+} . A obtenção do equilíbrio da captação variou de acordo com as concentrações entre 72 e 120 h. Tsekova e Todorova (2002) também reportaram alto acúmulo de Cu^{2+} por *Aspergillus niger* em 12 h de incubação, porém a remoção diminuiu com o passar dos dias. No entanto, foi verificado por Stokes e Lindsay (1979) que o efeito do período de incubação na captação de Cu^{2+} por *P. ochrochloron* foi semelhante ao relatado nessa pesquisa, aumentando com o passar dos dias em todas as concentrações, com a captação mais eficiente ocorrendo após sete dias de incubação.

A captação de Cu^{2+} utilizando biomassa fúngica em crescimento já foi reportada por diversos autores, sob diferentes períodos de incubação. Após três dias de crescimento em 50 ppm Cu^{2+} , *Trichoderma atroviride* apresentou uma capacidade de remoção de $1,2 \text{ mg.g}^{-1}$ (ERRASQUÍN; VÁZQUEZ, 2003). Já em cinco dias de incubação, a capacidade de remoção de *A. lentulus* foi de $13,12 \text{ mg.g}^{-1}$ em 80 ppm Cu^{2+} e a capacidade de remoção da biomassa aumentou com a elevação da concentração (MISHRA; MALIK, 2012). Iskandar, Zainudin e Tan (2011) reportaram alta capacidade de remoção de Cu^{2+} demonstrada pelas espécies *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum* e *Trichoderma asperellum*, após sete dias de incubação, alcançando valores entre $3,790$ e $20,033 \text{ mg.g}^{-1}$ nas concentrações de 50 a 300 ppm. No entanto, a capacidade de remoção aumentou com a elevação da concentração de Cu^{2+} apenas em até 200 ppm Cu^{2+} , na qual a maior captação foi verificada, e diminuiu nas concentrações posteriores, 250 e 300 ppm.

Tsekova e Todorova (2002) averiguaram que a capacidade de remoção de *A. niger* diminuiu com o progresso do tempo de incubação, atingindo $2,2 \text{ mg.g}^{-1}$ em 50 ppm Cu^{2+} , $4,4 \text{ mg.g}^{-1}$ em 100 ppm e $11,5 \text{ mg.g}^{-1}$ em 200 ppm após três dias de crescimento. Uslu et al. (2003), utilizando biomassa previamente crescida durante três dias, relataram capacidade de remoção de *R. arrhizus* de $7,32 \text{ mg.g}^{-1}$ em 50 ppm Cu^{2+} ; $10,75 \text{ mg.g}^{-1}$ em 75 ppm, mas a captação diminuiu em 100 ppm para $9,27 \text{ mg.g}^{-1}$. Utilizando o mesmo procedimento usado por Uslu et al. (2003), Dursun et al. (2003) apurou que a capacidade de remoção de Cu^{2+} por *A. niger* aumentou com o aumento da concentração, sendo $10,4 \text{ mg.g}^{-1}$ em 50 ppm e $15,6 \text{ mg.g}^{-1}$ em 100 ppm, porém não houve crescimento em 150 ppm.

O padrão de captação demonstrado por *P. ochrochloron* foi análogo aos reportados previamente por outros autores utilizando essa mesma espécie, com

aumento da capacidade de remoção com aumento da concentração de Cu^{2+} . Okamoto et al. (1977), utilizando *P. ochrochloron*, e Mitani e Misic (1991), utilizando *Penicillium* sp., apuraram que a capacidade de remoção de Cu^{2+} aumentou com a elevação da concentração do metal, porém se manteve praticamente constante em a partir de 1.000 ppm, com valores de 1 mg.g^{-1} e 16 mg.g^{-1} , respectivamente. Okamoto et al. (1977) indicaram que a capacidade de estabilizar a captação de Cu^{2+} demonstrada por *P. ochrochloron* poderia estar relacionada à sua tolerância e habilidade em controlar a quantidade de Cu^{2+} captado. Stokes e Lindsay (1979) perceberam que o crescimento de *P. ochrochloron* foi menor, porém a captação de Cu^{2+} foi maior em condições de incubação estática do que sob agitação. Em experimento utilizando água de lago contaminado, *P. ochrochloron* também foi indicado como sendo capaz de crescer e remover Cu^{2+} (STOKES; LINDSAY, 1979).

Embora a capacidade de captação de Cu^{2+} por *P. ochrochloron* em crescimento tenha sido inferior aos da maioria aqui descritos, alguns detalhes merecem destaque. O crescimento dessa espécie foi estimulado na presença de diferentes concentrações de Cu^{2+} , efeito contrário ao causado à maioria das espécies de fungos. Além disso, demonstrou aumento na capacidade de remoção pela biomassa com o aumento da concentração, e essa capacidade não diminuiu em nenhuma das concentrações testadas, bem como a saturação não foi alcançada nessas concentrações, também revelando resultados opostos aos comumente repostados. Vale evidenciar que a saturação também não foi alcançada em sete dias de incubação, provavelmente com potencial para captar maior quantidade de Cu^{2+} em período de incubação mais prolongado.

Fukami, Yamazaki e Toda (1983) indicaram que a maior parte do Cu^{2+} acumulado por *P. ochrochloron* permaneceu na superfície celular, e que apenas uma pequena parcela entrou na célula, sugerindo que a tolerância apresentada por essa espécie poderia ser devido a esse mecanismo de controle do influxo de Cu^{2+} . Da mesma forma, Mitani e Misic (1991) relataram que a maior parte do Cu^{2+} , em 100 ppm, foi adsorvida na parede celular de *Penicillium* sp.

Além da importante função da parede celular na tolerância de *P. ochrochloron*, Gadd e White (1985) indicaram uma provável existência de influxo de Cu^{2+} dependente do metabolismo e que essa captação foi estimulada por glicose.

Analisando a biomassa formada no controle e nas diferentes concentrações de Cu^{2+} testadas, notou-se que ela ficou mais escura na presença de Cu^{2+} , o que

pode estar relacionado à captação do metal pelo micélio. Além disso, percebeu-se que em 200 e 250 ppm a biomassa ficou mais inchada, acompanhada pelo aumento da capacidade de captação de Cu^{2+} nessas concentrações, em comparação às anteriores e ao controle. Sazanova et al. (2015) relataram a formação de células inchadas, constituindo a maior parte do micélio, quando *P. citrinum* e *A. niger* cresceram na presença de Cu^{2+} e sugeriram que poderia ser ocasionado pelo acúmulo de Cu^{2+} dentro do micélio. Dessa forma, o inchaço verificado na biomassa também poderia estar fortemente relacionado à captação e acúmulo do Cu^{2+} no micélio de *P. ochrochloron*.

7.3 REMOÇÃO DO Cu^{2+} PELA BIOMASSA MORTA, SECA E PULVERIZADA DE *P. ochrochloron*

O pH afeta a solubilidade dos metais e o estado de ionização dos grupos funcionais da parede celular fúngica (SAY; DENIZLI; ARICA, 2001). Por conta disso, o pH é um parâmetro que representa grande importância em processos de bio sorção, já que altera a capacidade de remoção dos íons metálicos pela biomassa e a quantidade de íons metálicos removidos. Diversos autores já constataram que a bio sorção do Cu^{2+} aumenta com o aumento do pH, revelando a máxima remoção entre pH 5 (AKAR; TUNALI, 2005; AKAR; TUNALI, 2006; KAHRAMAN et al., 2005; VERMA et al., 2013; YAHAYA; DON; BHATIA, 2009) e 6 (LI et al., 2009; SAY; DENIZLI; ARICA, 2001), e que ocorre saturação e precipitação do Cu^{2+} acima desses valores.

O mesmo efeito verificado nesse estudo por *P. ochrochloron* causado tempo de contato na bio sorção do Cu^{2+} foi também revelado em estudos similares, com o desenvolvimento da remoção em duas fases. O primeiro estágio resulta em uma alta remoção do Cu^{2+} nos primeiros minutos de contato, entre 10 e 30. Em seguida, ocorre um estágio lento, após a captação atingir a máxima remoção e alcançar a saturação e o equilíbrio, entre 60 e 120 minutos, a partir do qual o nível de captação não sofre significantes alterações (AKAR; TUNALI, 2005; AKAR; TUNALI, 2006; BHAINSA; D'SOUZA, 2008; DURSUN, 2006; KAHRAMAN et al., 2005; LI et al., 2009; SAY; DENIZLI; ARICA, 2001; VERMA et al., 2013).

A diminuição na eficiência da remoção e o aumento na capacidade de remoção verificados com o aumento da concentração até o alcance da saturação,

momento no qual se tornam constantes, corroboram com o que já fora reportado anteriormente (LI et al., 2009; SAY; DENIZLI; ARICA, 2001; VERMA et al., 2013; YAHAYA; DON; BHATIA, 2009). Além disso, também já foi relatada diminuição na capacidade de remoção de Cu^{2+} após o alcance da saturação (KAHRAMAN et al., 2005), o que não foi observado com a utilização da biomassa de *P. ochrochloron*, cuja capacidade de remoção se manteve constante após atingir a saturação, em 200 ppm Cu^{2+} . A concentração de saturação da captação varia dependendo da espécie utilizada, e já foram noticiadas entre 150 e 300 ppm Cu^{2+} (AKAR; TUNALI, 2006; KAHRAMAN et al., 2005; SAY; DENIZLI; ARICA, 2001).

Em concentrações mais baixas existem mais sítios de ligação disponíveis na superfície celular, tornando a biossorção dos íons metálicos mais efetiva. No entanto, com o aumento da concentração do metal ocorre a elevação do número de íons metálicos competindo pelos locais de ligação disponíveis na parede celular, o que leva à diminuição da eficiência da captação, causada pela falta de locais de ligação para a complexação dos íons. (AKAR; TUNALI, 2006; DURSUN, 2006; VERMA et al., 2013). A capacidade de biossorção se mantém constante no alcance da saturação, já que os sítios de ligação estão completamente ocupados pelas ligações aos íons metálicos (AKAR; TUNALI, 2005).

A remoção de Cu^{2+} realizada pela biomassa de *P. ochrochloron* nas concentrações de 50 a 250 ppm revelou valores entre 75% e 37%, e se mostrou superior aos resultados reportados por outras pesquisas, que também utilizaram biomassa seca e pulverizada. Como Verma et al. (2013), que reportaram remoção de 60% de Cu^{2+} em 50 ppm e 50% em 90 ppm; Akar e Tunali (2006) relataram apenas 35,64% de remoção em 50 ppm e 8,65% em 250 ppm Cu^{2+} ; Kahraman et al. (2005) apuraram remoção entre 45% e 55% de Cu^{2+} em 50 ppm e queda para cerca de 10% de remoção em 200 ppm.

No entanto, a capacidade de remoção pela biomassa de *P. ochrochloron* foi inferior à reportada por Akar e Tunali (2006), que constataram uma capacidade de remoção pela biomassa de *A. flavus* entre 8,91 e 10,82 mg.g^{-1} nas concentrações de 50 a 300 ppm Cu^{2+} . Li et al. (2009) verificaram valores entre 8,23 e 12,08 mg.g^{-1} utilizando diferentes espécies fúngicas em 100 ppm de Cu^{2+} . Assim como os informados por Akar e Tunali (2005), que testando a biomassa de *Botrytis cinerea*, nas concentrações de 50 a 150 ppm, apuraram valores entre 4 e 9 mg.g^{-1} .

Já Kahraman et al. (2005) encontraram alguns valores próximos e outros inferiores aos obtidos por *P. ochrochloron*, com capacidade demonstrada pela biomassa das espécies estudadas em remover cerca de 5 e 6 mg.g⁻¹ de Cu²⁺ em 50 e 100 ppm, respectivamente, e entre 4 e 5 mg.g⁻¹ em 150 e 200 ppm. Com a biomassa de *Pycnoporus sanguineus* imobilizada em alginato de sódio, Yahaya, Don e Bhatia (2009) encontraram valores entre 1 e 3 mg.g⁻¹ quando testada nas concentrações de 50 a 300 ppm Cu²⁺, resultados também inferiores aos obtidos na presente pesquisa.

Tratamentos químicos realizados na biomassa fúngica geralmente são capazes de aumentar a captação de metais por realizar alterações nos grupos funcionais presentes na superfície celular, que podem ocasionar exposição dos sítios de ligação da parede celular ou modificações químicas nos seus componentes (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1998). Já foi reportado que tratamentos com detergente, dimetilsulfóxido, formaldeído e tratamento alcalino, com NaOH, elevaram acentuadamente a capacidade de bioabsorção em comparação à biomassa não tratada (AKAR; TUNALI, 2006; BHAINSA; D'SOUZA, 2008; DURSUN, 2006; GAZEM; NAZARETH, 2013). No entanto, Akar e Tunali (2006) observaram que os tratamentos ocasionaram uma perda considerável de biomassa, de até 40% da massa inicial.

Bhainsa e D'Souza (2008) reportaram uma capacidade de remoção pela biomassa com tratamento alcalino em 50 ppm Cu²⁺ de 21 mg.g⁻¹ e um aumento de mais de 50% em comparação à biomassa não tratada. Dursun (2006) também utilizou o tratamento alcalino e verificou capacidade de remoção entre 11,3 e 25,5 mg.g⁻¹ nas concentrações de 50 a 250 ppm Cu²⁺. Uma vez que tratamentos químicos efetuados na biomassa antes do processo de bioabsorção comprovadamente elevam a capacidade de remoção, essa é uma alternativa que pode ser utilizada para potencializar e ampliar a remoção demonstrada pela biomassa de *P. ochrochloron*.

A quantidade de biomassa é um fator determinante na remoção de Cu²⁺, conforme foi demonstrado por Verma et al. (2013) e Kahraman et al. (2005), que constataram alteração na remoção de Cu²⁺ quando diferentes doses de bioabsorventes foram utilizadas e que esses dados variam entre as espécies e o tipo de biomassa. Uma vez que as capacidades de bioabsorção aqui citadas, verificadas por outras pesquisas, utilizaram entre 0,1 e 0,2 g de biomassa, e que, o resultado

obtido por 0,2 g de biomassa de *P. ochrochloron* foi 17,03 mg.g⁻¹ em 200 ppm, percebe-se que esse resultado não foi apenas melhor do que o com 0,5 g, mas que também é superior aos anteriormente relatados. Além disso,

Vale ressaltar ainda que a utilização de diferentes tipos de biomassa, como úmida ou seca, pulverizada ou inteira, viva ou morta, inativada por aquecimento ou imersão em aldeído, imobilizada e tratada quimicamente interfere diretamente na eficiência e capacidade de remoção de metais (KAHRAMAN et al., 2005; KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1998; VERMA et al., 2013; YAHAYA; DON; BHATIA, 2009).

8 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, ficou evidente que a tolerância, o crescimento e a resposta à presença do Cu^{2+} variam entre as espécies fúngicas e são dependentes da concentração. Não apenas as espécies com alta tolerância, mas também as menos tolerantes mostraram interessantes aspectos quando cresceram na presença de Cu^{2+} . Com isso, foi possível comprovar a importância da verificação da tolerância dos fungos aos metais e da análise macromorfológica de suas colônias, pois podem demonstrar alterações relacionadas aos seus mecanismos de resistência, e essas particularidades apresentam potencial para serem exploradas em processos de biorremediação.

Foi notória a distinção da tolerância apresentada por *P. ochrochloron*, tanto em meio de cultura sólido e, principalmente, em líquido. O processo de remoção de Cu^{2+} pela biomassa viva foi estritamente ligado ao período de incubação e, em menor grau, à concentração inicial do metal. Com o uso de *P. ochrochloron* notou-se que foi necessário um tempo de incubação prolongado para início e desenvolvimento do processo, além da disponibilização de nutrientes para o seu crescimento. A concentração de Cu^{2+} não foi um fator limitante ao seu crescimento e nem à remoção do metal. Aparentemente, *P. ochrochloron* possui mecanismos de resistência muito eficientes, que podem estar relacionados à sua capacidade de remoção de Cu^{2+} .

O uso da biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* apresentou resultados significativos de remoção do Cu^{2+} e foi dependente do tempo de contato e da concentração inicial do metal. Além disso, também ficou evidente que a quantidade de biomassa utilizada afetou diretamente a sua capacidade de remoção, demonstrando uma capacidade destacadamente superior com o uso de menor quantidade. Essa observação se mostrou muito interessante, pois o uso de uma menor quantidade de biomassa tornou a capacidade de remoção mais eficiente, o que reflete na necessidade de uma menor produção de biomassa para o processo.

Com todos os resultados apresentados nesse trabalho, a expectativa é engrossar as informações pertinentes à tolerância de fungos e à remoção de Cu^{2+} , bem como contribuir com os avanços científicos e tecnológicos no que tange à

recuperação ambiental de áreas contaminadas com metais, visando a melhoria da qualidade de vida e do meio ambiente.

Finalmente, a importância do progresso das pesquisas no campo da biorremediação é evidente, já que serão através delas que eficientes processos de biorremediação poderão ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS *

- ABBOUD, M. A.; ALAWLAQI, M. Biouptake of copper and their impact on fungal fatty acids. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 11, p. 283-290, 2011.
- ABE, F.; MIURA, T.; NAGAHAMA, T.; INOUE, A.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K. Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the induction of superoxide dismutase activity by Cu²⁺. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 2027-2034, 2001.
- AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption performance of *Botrytis cinerea* fungal by-products for removal of Cd(II) and Cu(II) ions from aqueous solutions. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 1099-1109, 2005.
- AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1780-1787, 2006.
- AKHTAR, S.; MAHMOOD-UL-HASSAN, M.; AHMAD, R.; SUTHOR, V.; YASIN, M. Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. **Soil & Environment**, v. 32 n. 1, p. 55-62, 2013.
- AKINKUNMI, W. A.; HUSAINI, A. A. S. A.; ZULKHARNAIN, A.; GUAN, T. M.; ROSLAN, H. A. Mechanism of biosorption of lead (II) and copper (II) ions using dead biomass of *Fusarium equiseti* strain UMAS and *Penicillium citrinum* strain UMAS B2. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1-6, 2016.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- ALLURI, H. K.; RONDA, S. R.; SETTALLURI, V. S.; BONDILI, J. S.; SURYANARAYANA, V.; VENKATESHWAR, P. Biosorption: na eco-friendly alternative for heavy metal removal. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, 2007.
- ANAHID, S.; YAGHMAEI, S.; GHOBADINEJAD, Z. Heavy metal tolerance fungi. **Scientia iranica**, v. 18, p. 502-508, 2011.
- ANAND, P., ISAR, J.; SARAN, S.; SAXENA, R. K. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1018-1025, 2006.
- ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. de O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2013.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Resolução CNNPA Nº 12, 1978.
- ANVISA, Consulta pública Nº 80, de 13 de Dezembro de 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 317-327, 1995.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química**: Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 1026 p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological profile for copper**. Atlanta, 2004.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap. 8, p. 446-461.

BÄÄTH, R. Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil. **Mycological Research**, v.95, n. 9, p. 1140-1152, 1991.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.

BALDWIN, D. H.; SANDAHL, J. F.; LABENIA, J. S.; SCHOLZ, N. L. Sublethal effects of copper on coho salmon: Impacts on nonoverlapping receptor pathways in the peripheral olfactory nervous system. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2266-2274, 2003.

BELLION, M.; COURBOT, M.; JACOB, C.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, p. 173-101, 2006.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and fuctions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 411-451, 1986.

BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Removal of copper ions by the filamentous fungus, *Rhizopus oryzae* from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3829-3835, 2008.

BISHNOI, N. R.; GARIMA. Fungus – na 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, p. 1109-1117, 2000.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 3. 593 p.

BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 1069S-1073S, 1998.

BREWER, G. J. Risks of copper and iron toxicity during aging um humans. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 319-326, 2010.

CAESAR-TONTHAT, T.; KLOEKE, F. V. O.; GEESEY, G. G.; HENSON, J. M. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1968-1975, 1995.

CAMAKARIS, J.; VOSKOBOINIK, I.; MERCER, J. F. Molecular mechanisms of copper homeostasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261, p. 225-232, 1999.

CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.; WILLIAMSON, P.; RODRIGUES, M. L. Vesicular transport across the fungal cell wall. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 158-162, 2009.

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

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M. de; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução N° 420, de 28 de Dezembro de 2009.

CONAMA, Resolução N° 430, de 13 de Maio de 2011.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A. de; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. de F. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; VALDERAS, A.; BORIE, F.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 57, p. 925-928, 2013.

DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DIELS, L.; SMET, M. DE; HOOYBERGHS, L.; CORBISIER, P. Heavy metals bioremediation of soil. **Molecular Biotechnology**, v. 12, p. 149-158, 1999.

DIETL, A.; AMICH, J.; LEAL, S.; BECHMANN, N.; BINDER, U.; BEILHACK, A.; PEARLMAN, E.; HAAS, H. Histidine biosynthesis plays a crucial role in metal homeostasis and virulence of *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 465-476, 2016.

DURSUN, A. Y.; USLU, G.; CUCI, Y.; AKSU, Z. Bioaccumulation of copper (II), lead (II) and chromium (VI) by growing *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1647-1651, 2003.

DURSUN, A. Y. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper(II) and lead(II) ions onto pretreated *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 187-195, 2006.

EGOROVA, A. S.; GESSLER, N. N.; RYASANOVA, L. P.; KULAKOVSKAYA, T. V.; BELOZERSKAYA, T. A. Stress resistance mechanisms in the indicator fungi from highly radioactive Chernobyl zone sites. **Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 152-158, 2015.

ELANDER, R. P.; LOWE, D. A. Fungal biotechnology: an overview. In: ARORA, Dilip K.; ELANDER, Richard P.; MUKERJI, K.G.(edt). **Handbook of applied mycology: fungal biotechnology**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1992. cap. 1, 4 v., p. 1-34.

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

EZZOUHRI, L.; CASTRO, E.; MOYA, M.; ESPINOLA, F.; LAIRINI, K. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 2, p. 35-48, 2009.

FARNET, A. M.; GIL, G.; FERRE, E. Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. **Chemosphere**, v. 70, p. 895-900, 2008.

FAROOQ, U.; KOZINSKI, J. A.; KHAN, M. A.; ATHAR, M. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents – A review of the recent literature. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5043-5053, 2010.

FERNANDES, J. C; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. **The Botanical Review**, v. 57, n. 3. p. 246-273, 1991.

FOGARTY, R. V.; TOBIN, J. M. Fungal melanins and their interactions with metals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 311-317, 1996.

FOMINA, M. A.; ALEXANDER, I. J.; COLPAERT, J. V.; GADD, G. M. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 851-866, 2005.

FOROOTANFAR, H.; FARAMARZI, M. A.; SHAHVERDI, A. R.; YAZDI, M. T. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1808-1814, 2011.

FRANCO, L. O.; MAIA, R. C. C.; PORTO, A. L. F.; MESSIAS, A. S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 243-247, 2004.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 407-418, 2011.

FUKAMI, M.; YAMAZAKI, S.; TODA, S. Distribution of copper in the cells of heavy metal tolerant fungus, *Penicillium ochrochloron*, cultured in concentrated copper medium, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1367-1369, 1983.

GADD, G. M. Transley review nº 47 - Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v. 124, p. 25-60, 1993.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: Importance in metal speciation, physiology and biogeochemical process. **Advances in Microbial Physiology**, v. 41, p. 47-92, 1999.

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

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

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 13-28, 2008.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 13-28, 2009.

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

GADD, G. M.; CHUDEK, J. A.; FOSTER, R.; REED, R. H. The osmotic response of *Penicillium ochrochloron*: Changes in internal solute levels in response to copper and salt stress. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 1969-1975, 1984.

GADD, G. M.; GRIFFITHS, A. J. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, n. 2, p. 387-392, 1980.

GADD, G. M.; MOWLL, J. L. Copper uptake by yeast-like cells, hyphae, and chlamydospores of *Aureobasidium pullulans*. **Experimental Mycology**, v. 9, p. 230-240, 1985.

GADD, G. M.; ROME, L. de. Biosorption of copper by fungal melanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 610-617, 1988.

GADD, G. M.; WHITE, C. Copper uptake by *Penicillium ochro-chloron*. Influence of pH on toxicity and demonstration of energy-dependent copper influx using protoplasts. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 1875-1879, 1985.

GAZEM, M. A. H.; NAZARETH, S. Isotherm and kinetic models and cell surface analysis for determination of the mechanism of metal sorption by *Aspergillus versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2521-2530, 2012.

GAZEM, M. A. H.; NAZARETH, S. Sorption of lead and copper from an aqueous phase system by marine-derived *Aspergillus* species. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 503-511, 2013.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSHAYA, T. A. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 105-113, 2014.

GOLA, D.; DEY, P.; BHATTACHARYA, A.; MISHRA, A.; MALIK, A.; NAMBURATH, M.; AHAMMAD, S. Z. Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 388-396, 2016.

GOMAA, O. M.; AZAB, K. S. Biological indicators, genetic polymorphism and expression in *Aspergillus flavus* under copper mediated stress. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 6, p. 49-55, 2013.

GONG, B.; LIU, G.; LIAO, R.; SONG, J.; ZHANG, H. Endophytic fungus *Purpureocillium* sp. A5 protect mangrove plant *Kandelia candel* under copper stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017.

GOUPIL, K.; NKONGOLO, K. K.; NASSERULLA, S. Characterization of fungal communities in limed and unlimed lands contaminated with metals: phospholipid fatty acid (PLFA) analysis and soil respiration. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 45-56, 2015.

GRIFFIT, R. J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.; BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1972-1978, 2008.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HEFNAWY, M. A.; ALI, M. I.; ABDUL-GHANY, S. Influence of copper and cobalt stress on membrane fluidity of *Stachybotrys chartarum*. **Canadian Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1003-1009, 2010.

HONARY, S.; BARABADI, H.; FATHABAD, E. G.; NAGHIBI, F. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium waksmanii*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 3, p. 999-1005, 2012.

HUIDROM, P.; SHARMA, G. D. Microbial bioremediation of pesticide residues in tea soil. **Online International Interdisciplinary Research Journal**, v. 4, p. 261-275, 2014.

HONG, J. W.; PARK, J. Y.; GADD, G. M. Pyrene degradation and copper and zinc uptake by *Fusarium solani* and *Hypocrea lixii* isolated from petrol. Station soil. **Journal of applied microbiology**, v. 108, p. 2030-2040, 2010.

IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração. **Informação e análises da economia mineral brasileira**. 7^a ed., 2012.

Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002788.pdf>>.

IBRAM – Instituto Brasileiro de Mineração. **Extração de cobre crescerá 34% até 2017**, 2014.

Disponível em: <http://www.ibram.org.br/150/15001002.asp?ttCD_CHAVE=223950>.

IBRAM – Instituto Brasileiro de Mineração. **Produção global de cobre vai crescer 4,5% em 2015**, 2015a.

Disponível em: <http://www.ibram.org.br/150/15001002.asp?ttCD_CHAVE=252241>.

IBRAM – Instituto Brasileiro de Mineração. **SNL lança relatório sobre o cobre no período de 1990-2014**, 2015b.

Disponível em: <http://www.ibram.org.br/150/15001002.asp?ttCD_CHAVE=251158>.

ISIKHUEMHEN, O. S.; ANOLIEFO, G. O.; OGHAE, O. I. Bioremediation of crude oil polluted soil by the white rot fungus, *Pheurotus tuberregium* (Fr.) Sing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 10, n. 2, p. 108-112, 2003.

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

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. de O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JAECKEL, P.; KRAUSS, G.; MENGE, S.; SCHIERHORN, A.; RÜCKNAGEL, P.; KRAUSS, G. Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, p.150-155, 2005.

JOSHI, P. K.; SWARUP, A.; MAHESHWARI, S.; KUMAR, R.; SINGH, N. Bioremediation of heavy metals in liquid media through fungi isolated from contaminated sources. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 482-487, 2011.

KABATA-PENDIAS; A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2007.550 p.

KAHRAMAN, S.; ASMA, D.; ERDEMOGLU, S.; YESILADA, O. Biosorption of copper(II) by live and dead biomass of the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Funalia troglia*. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 1, p. 72-77, 2005.

KANNAIYAN, R.; MAHINPEY, N.; MANI, T.; MARTINUZZI, R. J.; KOSTENKO, V. Enhancement of *Dichomitus squalens* tolerance to copper and copper-associated laccase activity by carbon and nitrogen sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 140-147, 2012.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: effect of pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 109-113, 1998.

KARTAL, S. N.; KATSUMATA, N.; IMAMURA, Y. Removal of copper, chromium, and arsenic from CCA-treated wood by organic acids released by mold and staining fungi. **Forest Products Journal**, v. 56, n. 9, p. 33-37, 2006.

KERMASHA, S.; PELLERIN, F.; ROVEL, B.; GOETGHBEUR, M.; METCHE, M. Purification and characterization of copper-metallothioneins from *Aspergillus niger*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 9, p. 1420-1423, 1993.

KRATOCHVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 291-300, 1998.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

KURNIAWAN, T. A.; CHAN, G. Y. S.; LO, W.; BABEL, S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. **Chemical Engineering Journal**, v. 118, p. 83-98, 2006.

LATGÉ, J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 279-290, 2007.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999. 527 p.

LERCH, K. Copper metallothionein, a copper-binding protein from *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 284, p. 368-370, 1980.

LI, X.; XU, Q.; HAN, G.; ZHU, W.; CHEN, Z.; HE, X.; TIAN, X. Equilibrium and kinetic studies of copper(II) removal by three species of dead biomasses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 469-474, 2009.

LLOYD, J. R. Bioremediation of metals; the application of micro-organisms that make and break minerals. **Microbiology Today**, v. 29, p. 67-69, 2002.

LLOYD, J. R., LOVLEY, D. R. Microbial detoxification of metals and radionuclides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 248-253, 2001.

LOEBUS, J.; LEITENMAIER, B.; MEISSNER, D.; BRAHA, B.; KRAUSS, G.; DOBRITZSCH, D.; FREISINGER, E. The major function of a metallothionein from the aquatic fungus *Heliscus lugdunensis* is cádmium detoxification. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 127, p. 253-260, 2013.

LOVLEY, D. R.; COATES, J. D. Bioremediation of metal contamination. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 285-289, 1997.

LUNA, M. A. C.; VIEIRA, E. R.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; NASCIMENTO, A. E. Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 418-427, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. Microbial growth. In: **Brock Biology of microorganisms**. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2010. cap. 6, p. 136-165.

MARESCOTTI, P.; AZZALI, E.; SERVIDA, D.; CARBONE, C.; GRIECO, G.; CAPITANI, L.; LUCCHETTI, G. Mineralogical and geochemical spatial analyses of a waste-rock dump at the Libiola Fe-Cu sulphide mine (Eastern Liguria, Italy). **Environmental Earth Sciences**, v. 61, n. 1, p. 187-199, 2010.

MARTINS, L. R.; LYRA, F. H.; RUGANI, M. M. H.; TAKAHASHI, J. A. Bioremediation of metallic ions by eight *Penicillium* species. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 9, 2016.

MEJÁRE, M.; BÜLOW, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **TRENDS in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 67-73, 2001.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria Nº 2914, de 12 de Dezembro de 2011.

MISHRA, A.; MALIK, A. Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. **Water Research**, v. 46, p. 4991-4998, 2012.

MITANI, T.; MISIC, D. M. Copper accumulation by *Penicillium* sp. isolated from soil. **Soil, Science and Plant Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 347-349, 1991.

MOORE, B. A.; DUNCAN, J. R.; BURGESS, J. E. Fungal bioaccumulation of copper, nickel, gold and platinum. **Minerals Engineering**, v. 21, n. 1, p. 55-60, 2008.

NAZARETH, S.; GAITONDE, S.; MARBANIANG, T. Metal resistance of halotolerant fungi from mangroves and salterns of Goa, India. **Kavaka**, v. 40, p. 15-21, 2012.

NAZARETH, S.; MARBANIANG, T. Effect of heavy metals on cultural and morphological growth characteristics of halotolerant *Penicillium* morphotypes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 1-7, 2008.

OGGERIN, M.; TORNOS, F.; RODRÍGUEZ, N.; MORAL, C.; SÁNCHEZ-ROMÁN, M.; AMILS, R. Specific jarosite biomineralization by *Purpureocillium lilacinum*, an acidophilic fungi isolated from Rio Tinto. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 2228-2237, 2013.

OGGERIN, M.; ESCUDERO, C.; DEL MORAL, C.; RODRÍGUEZ, N.; AMILS, R. High copper tolerant *P. lilacinum* strain isolated from a rich environment in copper, Río Tinto (Sw, Spain). **Advanced Materials Research**, v. 1130, p. 157-160, 2015.

OHNO, K. M.; CLAUSEN, C. A.; GREEN III, F.; DIEHL, S. V. Insights into the mechanism of copper-tolerance in *Fibroporia radiculosa*: The biosynthesis of oxalate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 90-96, 2015.

OKAMOTO, K.; FUWA, K. Copper tolerance of a new strain of *Penicillium ochrochloron*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1405-1406, 1974.

OKAMOTO, K.; SUZUKI, M.; FUKAMI, M.; TODA, S.; FUWA, K. Uptake of heavy metals by copper-tolerant fungus, *Penicillium ochrochloron*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 17-22, 1977.

OLIVEIRA, L. H. dos S.; BARRETO, M. B.; VITALLI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. **Naturalia**, v. 33, p. 85-99, 2010.

PARANHOS, A. P. S. **Estudo dos compostos de baixa massa molar, redutores de ferro, produzidos por basidiomicetos com potencialidade em descolorir corantes da indústria têxtil**. 2011. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. 1 v. 573 p.

PELCZAR Jr, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2. 517 p.

PRADHAN, A.; SEENA, S.; DOBRITZSCH, D.; HELM, S.; GERTH, K.; DOBRITZSCH, M.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Physiological responses to nanoCuO in fungi from non-polluted and metal-polluted streams. **Science of The Total Environment**, v. 466-467, p. 556-563, 2014.

RAJENDRAN, P.; MUTHUKRISHNAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbes in heavy metals remediation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 935-944, 2003.

RAM, A. F. J.; ARENTSHORST, M.; DAMVELD, R. A.; VANKUYK, P. A.; KLIS, F. M.; VAN DEN HONDEL, A. M. J. J. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. **Microbiology**, v. 150, p. 3315-3326, 2004.

RAO, K. R.; RASHMI, K.; LATHA, J. N. L.; MOHAN, P. M. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 139-143, 2005.

RASPANTI, E.; CACCIOLA, S. O.; GOTOR, C.; ROMERO, L. C.; GARCÍA, I. Implications of cysteine metabolisms in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. **Chemosphere**, v. 76, p. 48-54, 2009.

ROONEY, C. P.; ZHAO, F.; McGRATH, S. P. Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 726-732, 2006.

RUSSELL, J. B. **Química geral**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981. 897 p.

SALVADORI, M. R.; RÔMULO, A. A.; do NASCIMENTO, C. A. O.; CORRÊA, B. Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

SALVI, M. B. **Otimização de biorremediação de solo contaminado com organoclorados utilizando basidiomicetos em biorreatores**. 2013. 189 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

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

SAYER, J. A.; COTTER-HOWELLS, J. D.; WATSON, C.; HILLIER, S.; GADD, G. M. Lead mineral transformation by fungi. **Current Biology**, v. 9, p. 691-694, 1999.

SAZANOVA, K.; OSMOLOVSKAYA, N.; SCHIPAREV, S.; YAKKONEN, K.; KUCHAEVA, L.; VLASOV, D. Organic acids induce tolerance to zinc- and copper-exposed fungi under various growth conditions. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 520-527, 2015.

SCHMALER-RIPCKE, J.; SUGAREVA, V.; GEBHARDT, P.; WINKLER, R.; KNIEMEYER, O.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 493-503, 2009.

SEN, M. A comparative study on biosorption of Cr(VI) by *Fusarium solani* under different growth conditions. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 2, p. 146-152, 2012.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2003. 816 p.

SIHAM, A. A. Effect of lead and copper on the growth of heavy metal resistance fungi isolated from second industrial city in Riyadh, Saudi Arabia. **Journal of Applied Science**, v. 7, n. 7, p.1019–1024, 2007.

SILVA, R. R. **Biorremediação em solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. 2009. 186 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SINGH, P.; PAUL, S.; SHIVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A.; GHOSH, A. K. Stress response in medically important Mucorales. **Mycoses**, v. 59, n. 10, p. 628-635, 2016.

SOUZA, J. I. de; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A.; SCHOENLEIN, N. C. Bioassorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Sabrolegnia subterranea* (Dissmann) R. L. Seym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes). **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n.1, p. 217-223, 2008.

STOKES, P. M.; LINDSAY, J. E. Copper tolerance and accumulation in *Penicillium ochrochloron* isolated from copper-plating solution. **Mycologia**, v. 71, n. 4, p. 796-806, 1979.

TABAK, H. H.; LENS, P.; van HULLEBUSCH, E. D.; DEJONGHE, W. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides – 1. Microbial process and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 4, p. 115-156, 2005.

TCHOUNWOU, P. B.; NEWSOME, C.; WILLIAMS, J.; GLASS, K. Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG₂) cells. **Metal Ions in Biology Medicine**, v. 10, p. 285-290, 2008.

THIPPESWAMY, B.; SHIVAKUMAR, C. K.; KRISHNAPPA, M. Bioaccumulation potential of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* for removal of heavy metals from paper mill effluent. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 1063-1068, 2012.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 825 p.

TSEKOVA, K.; TODOROVA, D. Copper (II) accumulation and superoxide dismutase activity during growth of *Aspergillus niger* B-77. **Zeitschrift für Naturforschung C, A Journal of Bioscience**, v. 57, n. 3-4, p. 319-322, 2002.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 10, p. 10-13, 1999.

UPADHYAY, S.; TORRES, G.; LIN, X. Laccases involved in 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* are regulated by developmental factors and copper homeostasis. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 12, p. 1641-1652, 2013.

USLU, G.; DURSUN, A. Y.; EKIZ, H. I.; AKSU, Z. The effect of Cd (II), Pb (II) and Cu (II) ions in the growth and bioaccumulation properties of *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 105-110, 2003.

VALIANTE, V.; JAIN, R.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetic and Biology**, v. 46, p. 909-918, 2009.

VALIX, M.; TANG, J. Y.; MALIK, R. Heavy metal tolerance of fungi. **Minerals Engineering**, v. 14, n. 5, p. 499-505, 2001.

VARGAS-GARCÍA, M. C.; LÓPEZ M. J.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals: *In vitro* selection. **Science of the total environment**, v. 431, p. 62-67, 2012.

VELMURUGAN, P.; SHIM, J.; YOU, Y.; CHOI, S.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K.-J.; KIM, H. J.; OH, B.-T. Removal of zinc by live, dead, and dried biomass of *Fusarium* spp. Isolated from abandoned-metal mine in South Korea and its perspective of producing nanocrystals, **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, p. 317-324, 2010.

VERMA, A.; SHALU; SINGH, A.; BISHNOI, N. R.; GUPTA, A. Biosorption of Cu(II) using free and immobilized biomass of *Penicillium citrinum*. **Ecological Engineering**, v. 61, p. 486-490, 2013.

VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution? **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 17-24, 2000.

VIJAYARAGHAVAN, K.; BALASUBRAMANIAN, R. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewater? A critical review on the state-of-the-art of biosorption process and future directions. **Journal of Environmental Management**, v. 160, p. 283-296, 2015.

VOLESKY, B. Biosorption and me. **Water Research**, v. 41, p. 4017-4029, 2007.

VOLESKY, B.; NAJA, G. Biosorption: application strategies. **International Biohydrometallurgy**, 2005.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, K (Ed). **Fungi: biology and applications**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. cap. 1, p. 1-34.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metal removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 195-226, 2009.

WU, Y.; LUO, Z.; CHOW, R. K.; VRIJMOED, L. L. P. Purification and characterization of extracellular laccase from the anthracene-degrading fungus *Fusarium solani* MAS2. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9772-9777, 2010.

XU, P.; ZENG, G.; HUANG, D.; LIU, L.; ZHAO, M.; LAI, C.; LI, N.; WEI, Z.; HUANG, C.; ZHANG, C. Metal bioaccumulation, oxidative stress and antioxidant defenses in *Phanerochaete chrysosporium* response to Cd exposure. **Ecological Engineering**, v. 87, p. 150-156, 2016.

YAHAYA, Y. A.; DON, M. M.; BHATIA, S. Biosorption of copper(II) onto immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution: Equilibrium and kinetic studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 189-195, 2009.

YIN, Y.; HU, Y.; XIONG, F. Sorption of Cu(II) and Cd(II) by extracellular polymeric substances (EPS) from *Aspergillus fumigatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 1012-1018, 2011.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2557-2567, 2007.

ZAPOTOCZNY, S.; JURKIEWICZ, A.; TYLKO, G.; ANIELSKA, T.; TURNAU, K. Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. **Microbiological Research**, v. 162, p. 219-228, 2007.

ZHAN, F.; HE, Y.; YANG, Y.; LI, Y.; LI, T.; ZHAO, Z. Effects of tricyclazole on cadmium tolerance and accumulation characteristics of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 235-241, 2016.

ZHANG, S.; ZHANG, X.; CHANG, C.; YUAN, Z.; WANG, T.; ZHAO, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y.; LA, G.; WU, K.; ZHANG, Z.; LI, X. Improvement of tolerance to lead by filamentous fungus *Pterotus ostreatus* HAU-2 and its oxidative responses. **Chemosphere**, v. 150, p. 33-39, 2016.

ZHAO, D.; ZHANG, X.; CUI, D.; ZHAO, M. Characterization of a novel white laccase from the deuteromycete fungus *Mycothecium verrucaria* NF-05 and its decolourization of dyes. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 2012.

ZORZETE P.; OLIVEIRA, R.C.; CORRÊA, B. Effects of conventional and high-oleic peanut medium on extracellular enzyme production and mycelial growth of *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Safety**, v. 36, n.4, p. 467-473, 2016.

ZOTTI, M.; SIMONE, P.; ROCCOTIELLO, E.; LUCCHETTI, G.; MARIOTTI, M. G.; MARESCOTTI, P. Microfungi in highly copper-contaminated soil from an abandoned Fe-Cu sulphide mine: Growth responses, tolerance and bioaccumulation. **Chemosphere**, v. 117, p. 471-476, 2014.

ANEXOS

A – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *F. solani*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 10 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)							
	Controle	DP	44	DP	94	DP	187	DP
3	3,0	0,2	3,0	0,2	2,8	0,1	2,6	0,1
5	5,1	0,3	5,1	0,2	4,8	0,1	4,6	0,1
7	7,6	0,1	7,4	0,1	7,1	0,2	6,7	0,2
10	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0

DP: desvio padrão.

B – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *R. microsporus*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 4 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)							
	Controle	DP	44	DP	94	DP	187	DP
1	3,0	0,1	3,0	0,0	3,1	0,1	2,5	0,0
2	5,7	0,2	5,8	0,1	6,0	0,2	5,9	0,1
3	7,7	0,1	7,9	0,1	8,0	0,0	8,0	0,0
4	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0

DP: desvio padrão.

C – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *P. citrinum*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)							
	Controle	DP	44	DP	94	DP	187	DP
3	1,8	0,1	1,8	0,1	1,7	0,0	0,7	0,1
5	2,5	0,1	2,4	0,1	2,3	0,1	1,0	0,0
7	2,9	0,1	2,8	0,1	2,8	0,0	1,2	0,0
10	3,6	0,1	3,3	0,1	3,4	0,0	1,8	0,2
12	4,1	0,1	3,7	0,1	3,7	0,0	2,3	0,2
14	4,7	0,1	4,1	0,1	4,1	0,0	2,9	0,0

DP: desvio padrão.

D – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *A. flavus*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)									
	Controle	DP	44	DP	94	DP	187	DP	370	DP
3	3,5	0,1	3,4	0,2	3,2	0,1	2,7	0,1	0,5	0,0
5	5,7	0,3	5,4	0,2	5,2	0,1	4,5	0,0	1,7	0,0
7	7,6	0,3	7,4	0,2	7,2	0,2	6,3	0,0	3,1	0,1
10	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	4,8	0,1
12	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	6,1	0,1
14	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	7,4	0,1

DP: desvio padrão.

E – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *A. fumigatus*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)									
	Controle	DP	44	DP	94	DP	187	DP	370	DP
3	3,6	0,1	3,4	0,1	2,3	0,2	1,2	0,1	0,5	0,0
5	5,0	0,1	4,8	0,2	2,7	0,3	1,5	0,1	0,7	0,1
7	6,1	0,1	5,6	0,2	3,2	0,3	1,9	0,1	0,9	0,1
10	7,5	0,1	6,7	0,3	4,0	0,4	2,3	0,1	1,0	0,1
12	7,9	0,1	7,3	0,3	4,5	0,3	2,6	0,1	1,1	0,1
14	8,0	0,0	7,5	0,1	5,1	0,3	2,8	0,1	1,2	0,1

DP: desvio padrão.

F – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *E. shearii*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)									
	Controle	DP	44	DP	94	DP	187	DP	370	DP
3	1,9	0,0	1,9	0,1	1,8	0,0	1,2	0,0	0,5	0,1
5	2,7	0,0	2,5	0,1	2,3	0,0	1,6	0,0	0,8	0,1
7	3,4	0,1	3,2	0,1	2,9	0,0	2,0	0,0	1,1	0,0
10	4,3	0,1	4,1	0,1	3,6	0,0	2,4	0,0	1,5	0,0
12	4,9	0,1	4,7	0,1	4,0	0,1	2,7	0,1	1,6	0,0
14	5,6	0,2	5,2	0,1	4,5	0,1	3,1	0,1	1,8	0,1

DP: desvio padrão.

G – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *P. lilacinum*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)																			
	C	DP	44	DP	94	DP	187	DP	370	DP	541	DP	735	DP	870	DP	1026	DP	1177	DP
3	1,7	0,1	1,7	0,1	1,5	0,0	1,0	0,1	0,7	0,0	0,6	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,4	0,0
5	2,8	0,1	2,8	0,1	2,4	0,1	1,5	0,1	1,1	0,1	0,9	0,0	0,8	0,1	0,6	0,1	0,6	0,0	0,5	0,0
7	3,8	0,1	3,9	0,2	3,5	0,2	2,2	0,2	1,4	0,1	1,1	0,0	1,0	0,0	0,7	0,1	0,7	0,0	0,6	0,0
10	5,4	0,2	5,6	0,1	5,0	0,1	3,5	0,0	2,0	0,0	1,6	0,0	1,4	0,1	0,9	0,0	0,9	0,0	0,8	0,0
12	6,4	0,3	6,6	0,1	6,0	0,1	4,4	0,1	2,4	0,1	1,9	0,0	1,7	0,1	1,2	0,1	1,0	0,1	0,9	0,0
14	7,2	0,3	7,5	0,0	6,9	0,1	5,2	0,1	2,9	0,1	2,2	0,1	1,9	0,0	1,4	0,1	1,3	0,0	1,0	0,0

C: controle; DP: desvio padrão.

H – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *A. pullulans*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu ²⁺ (ppm)																													
	C	DP	44	DP	94	DP	187	DP	370	DP	541	DP	735	DP	870	DP	1026	DP	1177	DP	1528	DP	1776	DP	2500	DP	3000	DP	3500	DP
3	1,8	0,1	1,8	0,0	1,7	0,0	1,1	0,1	0,8	0,0	0,7	0,1	0,6	0,1	0,6	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,4	0,1	0,3	0,0	0,1	0,0
5	2,9	0,1	3,0	0,0	2,8	0,1	1,9	0,2	1,2	0,0	1,0	0,1	0,9	0,1	0,9	0,0	0,8	0,0	0,8	0,1	0,6	0,0	0,6	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1
7	4,1	0,3	4,2	0,1	4,1	0,2	2,8	0,3	1,6	0,1	1,3	0,1	1,2	0,1	1,2	0,0	1,0	0,0	1,0	0,1	0,8	0,1	0,7	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1
10	6,0	0,2	6,1	0,0	6,0	0,2	4,3	0,3	2,3	0,0	1,9	0,1	1,6	0,1	1,7	0,1	1,4	0,1	1,3	0,0	1,0	0,1	0,9	0,1	0,5	0,0	0,4	0,0	0,2	0,1
12	7,2	0,2	7,3	0,0	7,3	0,1	5,2	0,3	2,7	0,0	2,2	0,1	2,0	0,1	2,0	0,0	1,6	0,1	1,5	0,0	1,2	0,1	1,0	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,2	0,1
14	8,0	0,1	7,9	0,1	7,9	0,1	6,1	0,4	3,1	0,0	2,5	0,0	2,3	0,1	2,3	0,1	1,8	0,1	1,6	0,0	1,4	0,0	1,1	0,1	0,5	0,1	0,5	0,1	0,2	0,1

C: controle; DP: desvio padrão.

I – Variação do diâmetro de crescimento (cm) da colônia de *P. ochrochloron*, inoculada em meio de cultura BDA com diferentes concentrações de Cu^{2+} , durante 14 dias de incubação.

Período de incubação (dias)	Concentração de Cu ²⁺ (ppm)																															
	C	DP	44	DP	94	DP	187	DP	370	DP	541	DP	735	DP	870	DP	1026	DP	1177	DP	1528	DP	1776	DP	2500	DP	3000	DP	3500	DP	4000	DP
3	2,9	0,1	2,9	0,0	2,8	0,1	1,9	0,0	1,1	0,0	0,9	0,1	0,9	0,0	0,9	0,06	1,0	0,1	0,9	0,0	0,9	0,1	0,8	0,2	0,4	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0
5	4,7	0,1	4,6	0,0	4,5	0,0	3,1	0,1	1,7	0,1	1,4	0,1	1,3	0,1	1,3	0,06	1,3	0,1	1,2	0,0	1,2	0,1	1,1	0,1	0,6	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0
7	6,5	0,0	6,4	0,1	6,4	0,0	4,2	0,1	2,2	0,1	1,9	0,1	1,8	0,0	1,7	0,06	1,7	0,0	1,8	0,1	1,7	0,1	1,8	0,1	0,8	0,1	0,6	0,1	0,5	0,0	0,5	0,1
10	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	5,7	0,0	3,0	0,1	2,7	0,0	2,5	0,1	2,5	0,06	2,5	0,0	2,4	0,1	2,4	0,0	2,4	0,1	1,3	0,0	1,0	0,1	0,9	0,1	1,0	0,2
12	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	6,8	0,0	3,5	0,0	3,3	0,1	3,1	0,1	3,0	0,00	3,0	0,0	3,0	0,1	2,9	0,1	2,9	0,1	1,7	0,1	1,2	0,2	1,2	0,2	1,2	0,1
14	8,0	0,0	8,0	0,0	8,0	0,0	7,7	0,0	4,2	0,1	3,8	0,1	3,6	0,1	3,5	0,00	3,5	0,0	3,5	0,0	3,5	0,1	3,5	0,1	2,0	0,1	1,6	0,2	1,5	0,1	1,4	0,1

C: controle; DP: desvio padrão.

J – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 327,395 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa viva em crescimento de *P. ochrochloron* nas concentrações de 50 e 100 ppm Cu^{2+} .

K – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 327,395 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa viva em crescimento de *P. ochrochloron* nas concentrações de 150, 200 e 250 ppm Cu^{2+} .

L – Capacidade da remoção do Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa de *P. ochrochloron* e crescimento da biomassa (g.L^{-1}) em diferentes concentrações iniciais de Cu^{2+} (ppm) (período de incubação: 7 dias; temperatura: 27 °C; pH inicial: $4,15 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

Variáveis	Concentração de Cu^{2+} (ppm)											
	0	DP	50	DP	100	DP	150	DP	200	DP	250	DP
q			2,76	0,50	2,78	0,47	3,17	1,13	5,86	1,56	7,69	0,54
Crescimento da biomassa	3,95	0,40	4,04	0,32	5,30	0,44	5,43	0,46	4,55	0,23	4,64	0,17

q: capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}); DP: desvio padrão.

M – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 324,754 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada nas concentrações de 50 e 100 ppm Cu^{2+} .

N – Curva de calibração construída a partir dos resultados gerados pelo ICP-OES pela intensidade do comprimento de onda do Cu em 324,754 nm, utilizada para análise dos resultados da remoção do Cu^{2+} pela biomassa morta, seca e pulverizada nas concentrações de 150, 200 e 250 ppm Cu^{2+} .

O – Capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* em diferentes tempos de contato (concentração inicial: 50, 100 e 200 ppm Cu^{2+} ; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

Tempo de contato (minutos)	Concentração de Cu^{2+} (ppm)					
	50	DP	100	DP	200	DP
1	2,69	0,13	4,17	0,89	7,43	0,37
3	2,71	0,08	4,07	0,72	7,41	0,47
10	2,65	0,11	4,04	0,63	7,03	0,44
20	2,97	0,00	4,90	0,48	7,87	0,30
30	2,95	0,00	4,68	0,55	7,67	0,29
60	2,97	0,00	5,31	0,35	7,78	0,18
120	2,83	0,00	5,17	0,37	7,53	0,11

DP: desvio padrão.

P – Capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* em diferentes concentrações de Cu^{2+} (tempo de contato: 60 minutos; quantidade de biomassa: 0,5 g; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

Concentração de Cu^{2+} (ppm)	q	DP
50	2,97	0,00
100	5,31	0,35
150	6,73	0,55
200	7,78	0,18
250	7,71	0,45

q: capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}); DP: desvio padrão.

Q – Capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}) pela biomassa morta, seca e pulverizada de *P. ochrochloron* utilizando diferentes quantidades de biomassa (concentração inicial: 200 ppm Cu^{2+} ; tempo de contato: 60 minutos; temperatura: 27 °C; pH: $5,0 \pm 0,15$; agitação: 125 rpm).

Quantidade de biomassa (g)	q	DP
0,2	17,03	0,45
0,5	7,78	0,18

q: capacidade de remoção de Cu^{2+} (mg.g^{-1}); DP: desvio padrão.