

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp.**

**Ana Paula de Souza Pallu**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento  
de Plantas

**Piracicaba**  
**2006**

**Ana Paula de Souza Pallu**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp.**

**Orientadora:**

**Prof.<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup>. SILVIA MARIA GUERRA MOLINA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento  
de Plantas

**Piracicaba**  
**2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pallu, Ana Paula de Souza

Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp. / Ana Paula de Souza Pallu. - -  
Piracicaba, 2006.  
69 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. *Aspergillus* 2. Cádmio 3. Impacto ambiental – Recuperação 4. Poluição do solo –  
Remediação 5. Tratamento biológico de águas residuárias I. Título

CDD 589.24

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**OFEREÇO**

A Deus pela proteção e aos meus pais

Ao meu pai, Dorivaldo Tadeu Pallu, cuja coragem, determinação, dedicação e honestidade  
construíram o exemplo que procuro seguir todos os dias de minha vida.  
À minha mãe, Zilda Maria Sabino de Souza Pallu, a quem devo tudo por sua renúncia, sacrifício  
e afeto aos quais jamais conseguirei retribuir na mesma intensidade.  
Ao meu querido e incomparável irmão André.  
Ao meu noivo e companheiro de todas as horas André.  
À memória dos meus três avós.  
À minha querida avó Doralice.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre ilumina e guia meu caminho.

À ESALQ/USP pela minha formação profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Maria Guerra Molina não apenas pela orientação, mas também pela paciência, amizade, carinho, compreensão, ensinamentos únicos dedicados desde a Iniciação Científica e principalmente por me fazer enxergar a vida de uma maneira diferente, meu muito obrigada.

À Daniele Del Rio pelos ensinamentos, apoio e auxílio na elaboração deste trabalho e pelas tardes de amizade que passamos juntas realizando as análises, as quais jamais esquecerei.

Aos amigos do Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais, Andréa Guelfi, Bruno, Felipe, Lígia, Luana, Marcos, Maurício pelos momentos de desabafos, estudos e principalmente pelos momentos de descontração e muita risada. Em especial à Luana, que além de companheira de trabalho é uma grande amiga.

Ao seu Marcos Gorga pela colaboração.

À minha amiga Bia que torna minha vida mais feliz à qual agradeço pelas grandes contribuições nesse trabalho, por todas nossas conversas, por toda nossa união e por essa amizade única e sincera. Levarei cada momento que passamos juntas para sempre em minha memória e em meu coração.

Ao meu amigo Uira, que desde a graduação me ajuda muito, pela paciência (e que paciência!!!) e a grande amizade.

Aos meus inesquecíveis amigos de graduação, os quais fazem parte da história da minha vida e principalmente fazem parte das boas recordações e de tempos bons de que terei saudades a vida toda: Taizinha, Bia – eh trio ternura, Luana, Glenan, Giu, Frigobar, Fiotão e Juruna.

Aos colegas, amigos e vizinhos do Laboratório de Genética de Microrganismos, especialmente, Aldo, Carol, Cris, Fernanda, Fernando (pela amizade e imensa colaboração), Frã, Joelma, Léa, Maira, Manu, Priscila, Rudão, Xico e Zezão.

Aos amigos da pós-graduação, pelos quais tenho um enorme carinho: Azeitona, Bek, Jair, Tostada, Tozado, Tubaína e Veia.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pelo apoio e amizade.

Aos professores do departamento de Genética pela colaboração e ensinamentos.

Aos funcionários do departamento de Genética que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente Valdir, Berdã, Fernando, Bete, Neuza, Léia e Glória.

Ao CNPq pela concessão das bolsas de estudo, desde a Iniciação Científica.

À minha família por todos os momentos de união, amor, compreensão e alegria partilhados. E principalmente por acreditarem nos meus sonhos.

Ao grande amor da minha vida, a quem eu admiro muito, pela sua presença constante na jornada de minha vida, ao qual agradeço por tornar minha vida mais feliz, André Camargo Tozadori, com todo meu carinho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão bibliográfica .....	11
2.1.1 Metais pesados .....	11
2.1.2 Cádmio.....	12
2.1.3 Biossorção.....	16
2.1.4 O fungo filamentoso <i>Aspergillus</i> sp. e suas características de biossorção .....	19
2.2 Material e métodos .....	23
2.2.1 Material biológico .....	23
2.2.2 Meios de cultura .....	24
2.2.2.1 Meio completo .....	24
2.2.2.2 Meio completo líquido .....	24
2.2.3 Soluções .....	25
2.2.3.1 Solução salina p/v 0,85 % .....	25
2.2.3.2 Solução de tween 80 v/v 0,1%.....	25
2.2.3.3 Solução de vitaminas .....	25
2.2.4 Obtenção de esporos.....	26
2.2.5 Obtenção da biomassa.....	26
2.2.5.1 Micélio .....	26
2.2.6 Solução de sal de cádmio.....	26
2.2.7 Vidrarias.....	27

2.2.8 Água .....	27
2.2.9 Determinação da bio sorção .....	27
2.2.10 Determinação da massa de cádmio na solução .....	29
2.2.11 Determinação da massa de cádmio bio sorvida pela biomassa.....	29
2.2.12 Determinação da bio sorção de cádmio por <i>Aspergillus</i> sp. em diferentes tempos de residência .....	30
2.2.13 Determinação da bio sorção de cádmio por <i>Aspergillus</i> sp. em diferentes valores de pH.....	30
2.2.14 Determinação da proteína total.....	30
2.2.15 Delineamento experimental .....	31
2.2.16 Destino do material contaminado .....	31
2.3 Resultados e discussão.....	31
3 CONCLUSÕES.....	57
3.1 Considerações finais .....	58
REFERÊNCIAS .....	59



## RESUMO

### **Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp.**

Os metais pesados representam o maior resíduo industrial contaminante de solos, plantas e animais no ecossistema, causando graves efeitos tóxicos ao homem principalmente devido a sua ampla distribuição no ambiente, que tem sido intensificado pela industrialização. Um dos metais pesados mais tóxicos é o cádmio, elemento bastante utilizado em processos industriais, o que o torna um importante contaminante ambiental. Pesquisadores preocupados com problemas associados à poluição ambiental por metais pesados iniciaram estudos com técnicas de biorremediação utilizando microrganismos explorando a capacidade desses na remoção de íons tóxicos do ambiente, dentre eles os fungos. Dentre os vários processos utilizados na remediação do cádmio dos efluentes industriais, um dos mais promissores é a biossorção. Essa técnica tem por base a propriedade dos metais se ligarem a vários materiais biológicos, tais como algas, leveduras, fungos, bactérias e plantas; para retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido. Dentro desse contexto o fungo *Aspergillus* sp. foi estudado quanto à sua capacidade de biossorção de cádmio. As pesquisas com *Aspergillus* sp. demonstram que linhagens dessa espécie possuem grande resistência ao cádmio. No presente trabalho foram avaliados parâmetros para a biossorção de cádmio em soluções artificiais com a utilização de biomassa de duas linhagens do fungo *Aspergillus* sp. (MSE e CadG1). Dentre estes parâmetros, foram avaliados capacidade de biossorção do micélio em diferentes condições fisiológicas do fungo (biomassa viva ou morta), tempo de residência ideal (0, 4, 8 e 12 horas) para as concentrações de sal de cádmio de 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L<sup>-1</sup> e os valores de pH 4,0, 7,0 e 10,0 da solução de sal de cádmio. Futuramente, estas linhagens deverão passar por programas de melhoramento genético para uma otimização da eficiência da biossorção. A linhagem MSE mostrou-se superior à linhagem CadG1 em relação a biossorção de cádmio. As biomassas viva e morta não apresentaram diferença estatística significativa entre as médias de biossorção, mostrando que ambas podem ser utilizadas com a obtenção de resultados de biossorção semelhantes, no entanto, na interação entre todos os fatores, os estados fisiológicos diferiram estatisticamente, sendo que a maioria apresentou maiores índices de biossorção de cádmio com a biomassa morta. O tempo de residência que apresentou melhor eficiência foi o de 4 horas para a linhagem MSE e o de 12 horas para a linhagem CadG1. A biossorção é maior, em valores absolutos, quanto maior é a concentração de cádmio na solução e menor, em valores percentuais, quanto maior essa concentração. O pH ótimo para o processo de biossorção é o 7 nas condições avaliadas.

Palavras chaves: *Aspergillus* sp.; cádmio, biorremediação; biossorção; tratamento biológico da água

## ABSTRACT

### **Biosorption of cadmium by *Aspergillus* sp. strains**

The heavy metals represent the major industrial residues contaminant of soils, plants and animals in the ecosystems, causing a toxic effect to humans, mainly due to the wide spread distribution in environment which is intensified by industrialization process. One of most toxic heavy metals is cadmium, commonly used in industrial process, what make it an important environmental contaminant. Researchers looking at to problems linked to environmental pollution by heavy metals have been studied bioremediation techniques using microorganism, among them, the fungi, exploring their ability in to remove toxic ions from environment. Form various remediation techniques used for cadmium in industrial effluents, the most promising is the biosorption. This methodology is based in the heavy metals linkage to biologic material, like algae, yeasts, fungi, bacteria or plant, to retention, removing or recovery of heavy metals from liquid environment. In this context, *Aspergillus* sp. was studied for it ability to biosorption of cadmium. Previous studies with *Aspergillus* sp. have revealed that strains from this species have a great resistance to cadmium. In the present work were evaluated parameters for biosorption of cadmium in artificial solutions, using two strains of *Aspergillus* sp. Among evaluated parameters, there were ability to biosorption of mycelia in different physiological condition (viable or non-living), ideal residence period (0, 4, 8 and 12 hours) in cadmium salt concentrations of 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L<sup>-1</sup> and the pH values of 4,0, 7,0 and 10,0. In the future such strains must be applied in genetic breeding programs, to optimize the efficiency in cadmium biosorption. The MSE strain revealed to be better than CadG1 strain for cadmium biosorption. Bioamass live and death do not presented statistical differences between values of biosorption, suggesting that both can be used with satisfactory results for cadmium biosorption. However, studying interactions among all factors, physiological state differ statistically, where the most of them presented bigger indices of cadmium biosorption for usage of death biomass. The best residence period was 4 hours in MSE e 12 hours in CadG1. The biosorption was bigger, in absolute values, as bigger is the cadmium concentration in solution and minor in percentual values, as bigger is this concentration. The best pH for biosorption process is 7,0.

Key words: *Aspergillus* sp.; cadmium, biorremediation; biosorption; biological treatment of water

## 1 INTRODUÇÃO

A contaminação por metais pesados é um problema mundial. Existem diversos estudos localizados ou regionais demonstrando que a contaminação por metais no Brasil caracteriza-se como um sério problema, como é o caso do estuário de Santos/São Vicente em São Paulo e das baías de Guanabara e Sepetiba no Rio de Janeiro (CARVALHO, LACERDA, GOMES, 1991; PERIN et al., 1997; AMADO FILHO et al., 1999; NETO, DUNHAM, ATKIN, 2000). O cádmio é o principal contaminante ambiental e um dos mais tóxicos dentre os metais pesados (CHEN e KAO, 1995) e está associado a diversos problemas de saúde, como osteomalácia, osteoporose, anormalidades nos órgãos reprodutivos, alterações no DNA, erros na duplicação e nos reparos do DNA e anormalidades cromossômicas.

A remoção desses metais pesados de águas residuais é usualmente realizada por processos físico-químicos, tais como precipitação, coagulação, processos de redução, troca iônica, processos de membrana e adsorção (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995). Entretanto, os altos custos, a complexidade dos processos e a baixa eficiência dos métodos de membrana têm limitado seu uso na remoção de metais pesados. Em face disso, vêm sendo realizadas muitas pesquisas com o objetivo de desenvolver e/ou viabilizar técnica e economicamente, processos de remoção de metais pesados com custos reduzidos, alta eficiência e sem agressões ao ambiente.

Estudos recentes no campo da biotecnologia incluem pesquisas com microrganismos biorremediadores de metais pesados, removendo estes via mecanismos ativos ou passivos. A bioadsorção é um processo no qual se emprega biomassa vegetal ou microbiana na retenção, remoção e recuperação de metais pesados em ambientes líquidos (VOLESKY, 2001). Fungos, bactérias, leveduras, algas e plantas podem remover metais pesados de soluções aquosas em quantidades substanciais (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; FENG e ALDRICH, 2004). O fungo *Aspergillus* sp. tem capacidade de retirar metais pesados da água, podendo ser usado como biorremediador desses metais, sendo uma ótima alternativa de descontaminação ambiental. Estudos sobre esse tema vêm colaborando para a descontaminação de ambientes aquáticos, contribuindo conseqüentemente para a redução de um dos grandes problemas mundiais, a escassez de água potável. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo compreender e avaliar os mecanismos envolvidos nos processos de bioadsorção do metal pesado cádmio por biomassa viva e morta de linhagens de *Aspergillus* sp. em ambientes líquidos.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão bibliográfica**

#### **2.1.1 Metais Pesados**

Os metais pesados representam o maior resíduo industrial contaminante de solos, plantas e animais no ecossistema. A importância de estudos relacionados aos metais pesados deve-se aos seus intensos efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos, assim como pela sua ampla liberação no ambiente.

Embora impreciso e mal definido, o termo “metal pesado” é comumente usado e aplicado a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semimetais e não metais que possuem número atômico maior que 20 ou peso específico maior que  $5 \text{ g.cm}^{-3}$  (MALAVOLTA, 1994). São também conhecidos como “elementos traço”, por serem naturalmente encontrados em concentrações de poucas partes por milhão (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994).

A poluição ambiental por metais pesados tóxicos é decorrente do aumento nas atividades industriais (DÖNMEZ e AKSU, 1999). Para ilustrar a importância da poluição por metais no ambiente, podemos citar o levantamento realizado em 2005 pela ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e pela EPA (*Environmental Protection Agency*) do governo dos Estados Unidos da América, no qual foi constatado que das 20 substâncias tóxicas com maior risco de causar danos aos seres humanos, em locais contaminados, três são metais (primeiro lugar para o chumbo, terceiro para o mercúrio e sétimo lugar para o cádmio).

Apesar do Brasil ser um país em desenvolvimento, não há motivos para se supor que o problema seja menor do que em países mais industrializados. No entanto, não existe um levantamento abrangente ou estimativas confiáveis da dimensão do problema da contaminação por metais pesados no país. A poluição por metais pesados ocorre em função do modelo de crescimento industrial bem como do tipo de indústrias instaladas no país, principalmente no estado de São Paulo. Para o estado de São Paulo, existem diversos estudos pontuais ou regionais que demonstram que a contaminação por metais é um sério problema em algumas regiões, como é o caso do estuário de Santos/São Vicente em São Paulo e as baías de Guanabara e de Sepetiba

no Rio de Janeiro (PERIN et al., 1997; AMADO FILHO et al, 1999; NETO, DUNHAM, ATKIN, 2000).

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) manifesta grande preocupação com metais pesados, em função do monitoramento que realiza nas águas superficiais do Estado de São Paulo (CETESB, 2001a). No último trabalho, das 37 substâncias estudadas, 18 são metais pesados. Além disso, dos 27 parâmetros químicos usados pela CETESB para avaliar a qualidade de águas superficiais do estado, 11 se referem à análise de metais pesados.

As principais fontes de poluição com metais pesados são as diversas atividades de metalurgia, incluindo a mineração, fundição e galvanoplastia (CHAOUI et al., 1997), curtumes (JORDÃO et al., 1999), gases liberados pela queima de combustíveis fósseis, pesticidas (GIMENO-GARCIA, ANDREU, BOLUDA, 1996; LAGRIFFOUL et al., 1998), utilização de lodo de esgoto como fertilizantes na agricultura (CHAOUI et al., 1997), aplicação de fertilizantes com impurezas (GALLI, SCHUEPP, BRUNOLD, 1996; IRETSKAYA, CHIEN, MENON, 1998; SCHICKLER e CASPI, 1999) e a fabricação e descarte de baterias (PRASAD, ANDERSON, STEWART, 1995; KEFALA, ZOUBOULIS, MATIS, 1999).

As plantas e microrganismos são bastante afetados pela contaminação com metais pesados, o que evidencia a importância de estudos de toxicidade a estes organismos. Além disso, também apresentam variações quanto à tolerância aos metais pesados, apresentando ainda bom potencial para a remediação de áreas contaminadas por meio de técnicas de biorremediação.

### **2.1.2 Cádmio**

O metal pesado cádmio foi descoberto como uma impureza do carbonato de zinco em 1817 por Fredrich Stromeyer. Pertence à classe II–B da tabela periódica, juntamente com o zinco (Zn) e o mercúrio (Hg). O cádmio é o principal contaminante ambiental e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (CHEN e KAO, 1995). Na natureza pode ser encontrado em dois estados de oxidação (0 e +2), no entanto, o zero (estado metálico) é raro de ser encontrado.

A concentração de cádmio na crosta terrestre é baixa, variando entre 0,15 e 0,20 mg Kg<sup>-1</sup> (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Está geralmente associado ao zinco na forma de depósito de sulfeto, de cor prata clara, dúctil e mole. Apresenta peso molecular 112,41 e número atômico 48, com ponto de fusão a 321 °C, ponto de ebulição a 767,2 °C e densidade de 8,64 g/m<sup>3</sup> (BERNARD

e LAUWERYS, 1984). Emite vapores, mesmo quando em temperaturas inferiores ao seu ponto de ebulição, e em seu estado sólido é insolúvel na água e nos solventes orgânicos usuais. Na presença de ar e umidade sofre oxidação.

O cádmio não tem função biológica essencial conhecida, mas foi detectado em mais de mil espécies da flora e da fauna aquática e terrestre (VIG et al., 2003). Segundo Adamis et al. (2003), os metais pesados não essenciais, como o cádmio, estão ligados a vias não seletivas de transporte de nutrientes. Por exemplo, uma membrana de transporte envolvida na remoção de  $Fe^{2+}$ , está associada ao acúmulo de cádmio em plantas (GUERINOT, 2000). Em outro estudo, Gomes et al. (2002), demonstraram que danos em semelhante membrana de *Saccharomyces cerevisiae* tornou esta levedura incapaz de remover cádmio do meio. Os dados obtidos nesse último trabalho sugerem que a remoção desse metal em *S. cerevisiae* é dependente do sistema de transporte de zinco.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) por meio da Resolução nº 20, 1986 estabeleceu os teores máximos permitidos das substâncias potencialmente prejudiciais presentes em diferentes tipos de águas. Esse estudo estabelece que para águas utilizadas para a irrigação de hortaliças e pastagens, abastecimento doméstico e aquicultura, sejam respeitados os valores entre 0,001 a 0,01 mg Cd.L<sup>-1</sup>. Os efluentes de indústrias ou outras atividades somente poderão ser lançadas em corpos de água (como rios) desde que obedeçam ao valor máximo de 0,2 mg Cd.L<sup>-1</sup>. No monitoramento realizado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) em 2000 os rios Capivari, Jundiá, Atibaia, Piracicaba, Piaçaguera, Mogi e o Alto e Médio Tietê apresentaram problemas de poluição com cádmio (GRATÃO, 2003).

O cádmio obteve a sétima colocação na classificação da lista de “substâncias mais perigosas” da CERCLA (*Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act*), da ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e também na EPA (*Environmental Protection Agency*). As substâncias são classificadas de acordo com sua toxicidade, potencial de risco à saúde e risco de associação a outros organismos vivos.

Elevadas quantidades desse metal vêm sendo introduzidas no ambiente a partir de fontes naturais, estando largamente distribuído na água e no ar contaminados. Sua principal aplicação está em revestimentos metálicos para as indústrias automobilística, espacial, militar e de telecomunicações, com 34% do total. Participa na produção de pigmentos com alta estabilidade térmica, usados principalmente em tintas, vernizes e cerâmicas (23%). É usado também nas

indústrias de PVC (policloreto de vinila) e na estabilização de plásticos. Existem ainda muitos outros usos para o cádmio, dentre eles, indústrias de baterias (KEFALA, ZOUBOULIS, MATIS, 1999), litografias, fotografias, fungicidas, pesticidas, associados a locais de mineração, indústrias de celulares e equipamentos eletrônicos, resíduos de siderurgia, lixo urbano, curtumes, cura da borracha, entre outros (PRASAD, ANDERSON, STEWART, 1995).

O destino final dos despejos líquidos domésticos, municipais e industriais, tem levado a uma maior concentração de cádmio no solo. Mas a principal fonte de contaminação por cádmio em solos agrícolas é o uso de corretivos para acidez, fertilizantes fosfatados (MORTVEDT, 1996; IRETSKAYA, CHIEN, MENON, 1998), fertilizantes com impurezas (SCHICKLER e CASPI, 1999), lodo de esgoto e compostos derivados.

A introdução do cádmio na dieta humana é facilitada pelos produtos agrícolas contaminados. A alimentação é a principal fonte de contaminação, já que 70% das exposições ocorrem via oral (JARUP, ELINDER, SPANG, 1988). A transferência excessiva de metais pesados ao longo da cadeia alimentar é controlada por uma barreira solo-planta, entretanto no caso de alguns metais, incluindo o cádmio, essa barreira não é efetiva. Dessa maneira, alimentos originados de plantas constituem a principal fonte de cádmio para a sociedade atual (KUBOI, NOGUCHI, YAZAKI, 1987).

A exposição ao cádmio pode ser ocupacional ou não. Trabalhadores de indústrias estão sujeitos a inalar o cádmio ou retê-lo em contato com a pele. Exposições não ocupacionais podem decorrer da ingestão de alimentos e de água. O cigarro de nicotina é uma importante fonte de contaminação para o homem (SHIMBO, ZHANG, MOON, 2000).

A importância dos efeitos tóxicos do cádmio foi evidenciada na trágica contaminação da população da cidade de Toyama, Japão, intoxicada pela água contaminada pela mineração, que era utilizada nas culturas de arroz, onde houve grande número de vítimas com problemas neurotóxicos, descalcificação acentuada dos ossos com fraturas múltiplas e osteomalácia em vários níveis de osteoporose, acompanhada de doenças renais severas e proteinúrias (DUDKA e MILLER, 1999). Esta contaminação resultou no desenvolvimento da doença chamada “Itai-Itai”, onde a ingestão diária de cádmio estava em torno de 150-250 µg de cádmio (FRIBERG, NORDBERG, VOUK, 1986).

O cádmio acumula-se naturalmente, em cereais, batatas, vegetais, frutas, carnes e peixes (McGRATH, DUNHAM, ATKIN, 1998). Com o consumo destes alimentos contaminados, o

cádmio acumula-se no corpo e persiste com um período de meia vida de aproximadamente dez anos, tornando-se uma toxina cumulativa, não existindo tratamentos efetivos comprovados contra a intoxicação crônica. Acumula-se primeiramente no fígado e nos rins, concentrando-se também na urina e no sangue (IKEDA et al, 2000). Pode ligar-se a metalotioneínas, proteínas de baixo peso molecular e elevada afinidade por metais pesados como o cádmio, cobre e zinco (WAALKES, 2000).

O cádmio é considerado um provável elemento carcinogênico ou altamente indutor de carcinogênese em humanos (ADAMIS et al., 2003). É tóxico para animais (HINKLE, KINSELLA, OSTERHOUDTH, 1987) e plantas (DAS, SAMANTARAY, ROUT, 1997). Os efeitos adversos à saúde podem aparecer mesmo após a redução ou a cessação à exposição ao cádmio. Em humanos e animais, prolongadas exposições levam a disfunções renais, desmineralização dos ossos (GHOSHROY et al., 1998), enfisemas pulmonares (SALT et al., 1995), gastroenterite, supressão da função testicular, hipersensibilidade a doenças cardíacas (LEE et al., 1976), destruição de eritrócitos, câncer (GHOSHROY et al., 1998), hipertensão, ruptura de sistemas enzimáticos complexos (ADAMIS et al., 2003), além de outras doenças. Administrado por via oral, pode induzir aumentos nas ocorrências de leucemia em ratos e linfoma em certas linhagens de camundongos (WAALKES, 2000).

A dose letal ( $DL_{50}$ ) estimada para camundongos e ratos é de 60 e 5000  $\mu\text{g Cd.Kg}^{-1}$  de peso corporal, respectivamente. Os animais que ingeriram essas quantidades apresentaram sintomas de descamação do epitélio, necrose das mucosas gástricas e intestinais e distrofia do fígado, coração e rins (JARUP et al., 1998). Estudos com administração oral repetitiva podem apresentar efeitos fetotóxicos e embriotóxicos, além da degradação do DNA, diminuição da fidelidade da duplicação e dos reparos do DNA, mutação gênica e anormalidades cromossômicas em células de mamíferos em cultura (JARUP et al., 1998), além da inibição da divisão celular e alterações nos cromossomos (DAS, SAMANTARAY, ROUT, 1997).

Nas plantas o cádmio afeta o crescimento e causa redução na taxa fotossintética e provoca alterações nas atividades enzimáticas e metabólicas (COBBET et al., 2000). A diminuição da atividade enzimática pode ser devida à alta afinidade do cádmio por grupos cisteína de proteínas, os quais se ligam a elas inibindo a atividade das enzimas (LAGRIFFOUL et al., 1998), ou alterando a síntese de aminoácidos.



Dessa forma, existe uma preocupação mundial em relação à contaminação com metais pesados, em especial o cádmio, levando a perdas na produtividade agrícola e apresentando perigosos efeitos para a saúde quando entra na cadeia alimentar (SALT et al., 1995).

### **2.1.3 Biossorção**

A partir do momento que os pesquisadores perceberam que era possível explorar a diversidade microbiana para a obtenção de espécies que apresentassem potencial para a retirada de substâncias que interferem negativamente no ambiente, surgiu a biorremediação por microrganismos. Os microrganismos são biorremediadores bastante eficientes, como exemplo, podemos citar a remoção biológica de chumbo dos efluentes, a qual pode oferecer uma alternativa de remediação desse metal mais eficiente do que os processos físico-químicos convencionais (WAIHUNG et al., 1999). A grande diversidade de microrganismos contribui para o aumento dessa eficiência; estima-se a existência de 1,5 milhão de espécies de fungos, dos quais setenta e quatro mil espécies foram descritas, o que representa apenas 5% do total de espécies existentes. As bactérias possuem quatro mil e setecentas espécies descritas o que representa 12% do total de quarenta mil espécies estimadas (BULL, GOODFELLOW, SLATER, 1992), o que mostra que ainda existe um grande potencial a ser explorado.

A remoção de metais pesados de águas residuais é usualmente realizada por meio de processos físico-químicos, tais como precipitação, coagulação, processos de redução, troca iônica, processos de membrana (assim como ultrafiltração, eletrodialise e osmose reversa) e adsorção (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995). O aumento dos estudos de biossorção pode ser atribuído ao fato desses métodos convencionais de remoção de metais pesados, utilizando processos físico-químicos, apresentarem altos custos, serem extremamente complexos e possuírem baixa eficiência de remoção, trazendo limitações a seu uso na remoção de metais pesados, expandindo o interesse nos estudos de biossorção. Para soluções com concentrações iônicas entre 1 a 100 mg.L<sup>-1</sup>, os tratamentos convencionais, como precipitação e coagulação, são menos efetivos e mais caros. Tais tratamentos apresentam desvantagens, como incompleta recuperação dos metais, alto custo dos reagentes, alto requerimento de energia e podem gerar outros produtos que necessitem de depósito ou tratamento (SEKHAR et al., 1998). Outra

vantagem dos tratamentos biológicos é a remoção do metal do efluente industrial e não sua simples mudança de fase.

A crescente contaminação ambiental por metais pesados tem resultado no desenvolvimento de novas tecnologias de remoção dos mesmos. Para isso existe a necessidade na busca por métodos econômicos e eficientes (KEFALA, ZOUBOULIS, MATIS, 1999).

O que torna os estudos de biossorção ainda mais atrativos é que, quando empregado, torna-se um importante componente no tratamento de efluentes líquidos e no desenvolvimento de bioprocessos flexíveis com a possibilidade de reutilização de biomassa industrial.

De acordo com a Resolução nº 314 de 2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), entende-se por remediador todo o produto, constituído ou não por microrganismos, destinados à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados, tratamento de efluentes e resíduos, desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos atuando como agente do processo físico, químico, biológico ou combinados entre si.

O termo biossorção pode ser definido como um processo onde se utiliza biomassa vegetal ou microrganismos, na retenção, remoção ou recuperação de metais pesados de um ambiente líquido (VOLESKY, 2001). Shumate e Strandberg (1985) definiram biossorção como uma interação físico-química indireta que pode ocorrer entre o metal e o conteúdo celular da espécie biológica.

A biossorção tem por fundamento a característica dos metais se ligarem a vários materiais biológicos, tais como algas, leveduras, fungos e bactérias (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997). Células vivas e mortas são capazes de acumular metais, podendo apresentar diferenças nos mecanismos envolvidos em cada caso, dependendo do metabolismo (GADD e WHITE, 1990).

A biossorção é caracterizada por ser um processo com duas fases, uma independente de energia e atividade metabólica que chamamos de adsorção ou captação passiva (KAPOOR, VIRARAGHAVAN, CULLIMORE, 1999; DÖNMEZ e AKSU, 1999), e outra, dependente de energia e do metabolismo, a absorção (STRANDBERG, SHUMATE, PARROT, 1981). A adsorção apresenta vantagens econômicas, já que dispensa a utilização de meios de cultura. A biossorção pode ainda, dependendo da com a localização do metal após ser removido da solução, em acumulação extracelular ou precipitação; sorção pela superfície celular ou acumulação intracelular (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997).

Na adsorção os microrganismos seqüestram o metal por meio de ligações de superfície, entretanto, no processo de absorção, os metais são concentrados por meio de uma combinação de reações de superfície como precipitações e formação de complexos intra e extracelulares. Porém, existem limitações práticas significativas para sistemas que empregam a absorção, como a inibição do crescimento celular quando a concentração dos íons dos metais torna-se muito elevada, ou a elevada toxicidade dos resíduos hídricos, como valores de pH extremos e altas concentrações de sais. O processo ativo de biorremediação também requer fornecimento de nutrientes adequados, aeração e temperaturas para o crescimento dos microrganismos. Dessa forma, o processo de adsorção mostra-se, de fato, economicamente mais vantajoso. No entanto, se a combinação de absorção e adsorção aumentarem a eficiência do processo de remoção do metal pesado, a relação custo-benefício seria beneficiada e tal processo seria mais vantajoso.

A biossorção de metais pesados segue mecanismos complexos, principalmente troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e o aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e espaços da rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão da parede celular e membranas (VOLESKY e HOLAN, 1995).

A biossorção depende de parâmetros como pH, tipo de metal, concentração do íon, concentração da biomassa, volume, temperatura, ocorrência de pré-tratamento físico ou químico da biomassa e a presença de vários ligantes na solução (KAPOOR e VIRARAGHAVEN, 1995). Os grupos carboxílicos têm sido identificados como um dos principais ligantes de metais (MAJIDI, LAUDE, HOLOCOMBRE, 1990). White e Gadd (1990) afirmaram que a absorção depende exclusivamente de fatores como pH, tempo de residência, concentrações dos íons metálicos e da biomassa, além do estado fisiológico da cultura.

Existem diversos grupos químicos que poderiam atrair e reter metais na biomassa, dentre eles, grupos acetamidas da quitina, polissacarídeos estruturais de parede celular de fungos, grupos aminas e fosfatos em ácidos nucléicos, grupos amidos, sulfidrilas e carboxilas em proteínas e grupos hidroxilas em polissacarídeos (VOLESKY e HOLAN, 1995; SKOWRONSKI, PIRSZEL, SKOWRONSKA, 2001).

Vários estudos vêm sendo realizados com a utilização de biomassa de microrganismos na remoção de metais pesados do ambiente (DEL RIO, 2004, ADAMIS et al., 2003; KAPOOR, VIRARAGHAVAN, CULLIMORE, 1999; VOLESKY e HOLAN, 1995). Breierová et al. (2002), estudaram a biossorção de cádmio por leveduras e atribuíram essa remoção a uma

glicoproteína extracelular. A linhagem CCY 38-1-22 de *Hansenula anomala* foi capaz de absorver 90% da quantidade de cádmio colocada inicialmente, enquanto que a glicoproteína extracelular da linhagem CCY 21-4-100 de *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de bioabsorver apenas 6% do cádmio. O cádmio alterou os padrões de produção dessa glicoproteína quando as linhagens foram expostas ao mesmo. Já para a linhagem de *S. cerevisiae* a remoção do cádmio foi atribuída à parede celular e parte ficou localizada no citosol (BREIEROVÁ et al., 2002).

A maioria dos estudos de bioabsorção utiliza a metodologia de quantificação do metal pesado absorvido ou adsorvido pela biomassa fúngica por meio do espectrofotômetro de absorção atômica (SKOWRONSKI, PIRSZEL, SKOWRONSKA, 2001; ADAMIS et al., 2003; PARK, LEE, JUNG, 2003; LI et al., 2004; LIU et al., 2004), pela diferença entre a quantidade de cádmio contida na solução antes do contato com a biomassa e a quantidade de cádmio depois do contato com a biomassa, ou seja, de forma indireta. O espectrofotômetro de absorção atômica apresenta a vantagem de ser capaz de quantificar íons cádmio em níveis baixos com alta seletividade (GELMI et al., 1994; MAQUIEIRA, ELMAHADI, PUCHADES, 1994), permitindo uma quantificação precisa da quantidade de cádmio bioabsorvida pela biomassa, com confiabilidade e repetibilidade. O limite mínimo de detecção é  $0,0007 \mu\text{g Cd.mL}^{-1}$  de amostra (DEL RIO, 2004).

Para a implementação de uma tecnologia de bioabsorção de metais pesados, diversos requisitos devem ser estabelecidos para que o processo apresente competitividade técnica e econômica. A biomassa deve ter capacidade de acumulação elevada, da ordem de 70 a 100 mg de metal por grama de biomassa; a absorção e a adsorção devem ser rápidas e eficientes; o material biológico deve apresentar baixo custo, ser reutilizável, e ser adaptável a diferentes configurações de reatores e a separação do metal retido deve ser fácil e de baixo custo.

Os estudos de bioabsorção são importantes, podendo promover futuramente o entendimento das bases moleculares da sensibilidade a metais pesados e gerar informações sobre mecanismos de destoxificação, prevenção de doenças e recuperação total de metais do ambiente.

#### **2.1.4 O fungo filamentosso *Aspergillus* sp. e suas características de bioabsorção**

Fungos e leveduras crescem facilmente, produzem elevada quantidade de biomassa e ao mesmo tempo podem ser manipuladas geneticamente e morfológicamente. O *Aspergillus* é um

fungo capaz de crescer numa ampla variedade de substratos, o que facilita os estudos em laboratório.

Entender o comportamento biorremediador de um fungo contribui para o melhor conhecimento da origem da elevada sorção que estes microrganismos possuem e suas possíveis aplicações em sistemas de biorremediação. Da mesma forma, torna-se relevante um conhecimento adequado do fungo para submetê-lo a programas de melhoramento genético, com obtenção de maior eficiência no processo de biorremediação. A baixa tolerância a elevadas concentrações do metal pesado, característica de linhagens selvagens, pode inviabilizar a utilização dessas como bio sorventes em processos de bio sorção, já que as proteínas de defesa da célula serão inativadas nessa condição, havendo a necessidade de utilização de mutantes (RAVEENDER, SCARIA, VERMA, 2002). Foi feita uma comparação da bio sorção de cádmio entre uma linhagem selvagem e duas linhagens mutantes (Met-R1 e Met-R2) da cianobactéria filamentosa *Nostoc calcicola*. Constatou-se que as três linhagens demonstraram padrões diferentes de remoção do metal, sendo que a linhagem selvagem apresentou baixa eficiência de bio sorção, enquanto as mutantes apresentaram elevada eficiência de remoção de cádmio (RAVEENDER, SCARIA, VERMA, 2002). Zhao et al. (2005), estudaram a bioacumulação de mercúrio por *Escherichia coli* JM109 geneticamente modificada com genes para produção da proteína merT-merP (plasmídeo pSUTP) e metalotioneína (plasmídeo pGPMT). A linhagem original era capaz de remover 1 mg/L Hg<sup>2+</sup>, enquanto que a linhagem melhorada removeu 7,4 mg/L Hg<sup>2+</sup>, o que corresponde a 96% de remoção de mercúrio presente no ambiente estudado.

Os fungos são amplamente usados em processos de fermentação industrial, o que reforça a importância de sua utilização em processos de bio sorção, contribuindo com a diminuição de resíduo biológico gerado nesses processos, a biomassa fúngica. Linhagens de *Aspergillus* são usadas na produção de ferricromo, ácido Kojik, ácido gálico, ácido cítrico e enzimas como amilases, glucoses isomerases, pectinases, lipases e glucanases (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995). A biomassa fúngica pode ser produzida de forma fácil e com baixos custos em quantidade substanciais, como um subproduto baseado nos processos industriais em larga escala, para a bio sorção de metais pesados. A conversão de resíduos de biomassa em bio sorvente de metais pode gerar rendimento para as indústrias e ao mesmo tempo reduz o custo da disposição do resíduo de biomassa proveniente dos processos industriais, como por exemplo, os fungos utilizados na produção de ácidos orgânicos (WAIHUNG et al., 1999; KAPOOR,

VIRARAGHAVAN, CULLIMORE, 1999). Alternativamente, a biomassa pode também ser cultivada mediante emprego de técnicas de fermentação não sofisticadas e meios de cultura de baixo custo. Tais procedimentos, tornam o processo de bioissorção economicamente viável, o qual, por sua vez, contribui para um maior crescimento das indústrias. Kapoor e Viraraghavan (1995), afirmaram ainda que o uso da biomassa fúngica como um bioissorvente depende não apenas da capacidade de bioissorção da mesma como também do seu potencial de regeneração e reutilização.

O fungo *Aspergillus* sp. tem capacidade de retirar metais pesados da água, podendo ser usado como biorremediador desses metais, sendo uma ótima alternativa de descontaminação ambiental. São muitos os estudos realizados utilizando este gênero de fungo filamentosos para a bioissorção de metais pesados. Segundo Yakubu e Dudeney (1986), *Aspergillus niger* foi capaz de bioissorver quantidades expressivas de urânio. Kapoor, Viraraghavan, Cullimore (1999) relataram a capacidade do fungo *Aspergillus nidulans* na remoção de metais pesados.

Segundo Kiff e Little (1986), foi observada alta remoção de cádmio em baixas concentrações de biomassa de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma viride*. A remoção inferior em altas concentrações de biomassa pode ser atribuída a interações eletrostáticas de grupos funcionais de células de superfície. Nesses casos, as células em alta concentração na suspensão aderem-se umas as outras reduzindo então, a área de contato das células com a solução. Rostami e Joodaki (2002), relataram uma eficiente adsorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus niger* e *Penicillium austurianum*.

As características mais procuradas num bioissorvente são capacidade de bioissorção, seletividade aos diferentes íons metálicos, fácil recuperação, compatibilidade com o processo a ser realizado e, principalmente, baixo custo (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995; FOUREST e VOLESKY, 1996).

O conhecimento da estrutura química dos bioissorventes é essencial para modelar e prever seus desempenhos em se ligarem a metais em sistemas de purificação de água. A efetividade global de um bioissorvente em remover metais depende também da faixa de concentração, pH da solução, cinética de reação e composição do efluente (VOLESKY, MAY, HOLAN, 1993).

A identificação dos sítios de ligação em bioissorventes eficientes é útil no processo de seleção de novos tipos de biomassa, bem como na tentativa de melhorar suas propriedades complexantes em processos químicos, físicos ou biológicos (FOUREST e VOLESKY, 1996).

As paredes de bactérias, algas, fungos e leveduras são eficientes bioissorventes metálicos, onde as ligações covalentes e iônicas podem estar envolvidas na adsorção, como principais constituintes protéicos e polissacarídeos. Em várias espécies, a adsorção pode ser responsável pela maior proporção de retenção total ou bioissorção. Isto é especialmente verdadeiro para metais pesados como chumbo e alumínio, e radioativos como urânio e tório (GADD e WHITE, 1990).

A parede celular de fungos filamentosos como os do gênero *Aspergillus* é rígida (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1981) e altamente complexa, que representa um sítio adicional de bioissorção, em relação às células desprovidas de parede (BRADY et al., 1994). O seqüestro de íons metálicos pelas paredes celulares é constituído por duas fases, a primeira constitui uma ligação direta nos grupos funcionais e a segunda composta por uma interação físico-química, que é chamada de adsorção (KAPPOR e VIRARAGHAVAN, 1995). A composição das paredes celulares das células microbianas pode ser influenciada pelas condições de cultura, o que resulta em variações consideráveis na capacidade de bioissorção (GADD e WHITE, 1990). Amado Filho et al. (1999) demonstraram que a parede celular da alga *Padina gymnospora* tem um papel fundamental no acúmulo do zinco. A parede celular da alga *P. gymnospora* teve importante papel no acúmulo de cádmio quando a alga foi submetida a altas concentrações de cádmio (ANDRADE, 1998). Além da parede celular, outros constituintes celulares são capazes de remover íons metálicos de soluções. Breierová et al. (2002), observaram que vários constituintes celulares apresentavam teores diferentes de acúmulo de cádmio. Células de *S. cerevisiae* removeram 23% de cádmio, enquanto o citosol e proteínas extracelulares, removeram 35 e 6 % respectivamente. Observaram, também, que a parede celular possui a maior capacidade de remoção, aproximadamente de 36%. A maioria das espécies estudadas apresentaram maior retenção de cádmio na parede celular e no citosol.

A bioissorção de metais pesados pode ser realizada tanto por células vivas, como por células mortas. Este processo, quando realizado por células vivas é um fenômeno que depende de fatores como, tempo de contato, pH da solução metálica, concentração inicial do íon metálico, concentração celular, tipo de microrganismo utilizado e condições de cultura (ITOH, YUASA, KOBAYASHI, 1975; KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995). Por outro lado o emprego da

biomassa morta eliminaria os problemas de toxicidade e aspectos econômicos, como suplementação de nutrientes e manutenção de culturas. No uso de biomassa morta estão envolvidas forças químicas, físicas e iônicas de adsorção independente do metabolismo (SHEKHAR et al., 1998).

Estudos envolvendo sistemas de bioissorção são usualmente baseados em dois tipos de investigação, sendo o primeiro, a bioissorção de metais em quantidades determinadas e o segundo a determinação de bioissorção em sistemas contínuos (VOLESKY e HOLAN, 1995). Com base nesse primeiro tipo de investigação, o objetivo deste trabalho foi determinar a bioissorção de cádmio por biomassa viva ou morta de linhagens de *Aspergillus* sp., estabelecendo parâmetros de bioissorção como tempo de residência, concentração de cádmio e diferentes valores de pH.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Material biológico**

Linhagem MSE, que possui as seguintes marcas genéticas: *wA<sub>3</sub>*, *facA<sub>303</sub>*, *galA<sub>1</sub>*, *yA<sub>1</sub>*, *pyroA<sub>4</sub>*, *sB<sub>3</sub>*, *nicB<sub>6</sub>* e *ribo* (McCULLY e FORBES, 1965), derivada da linhagem original de *A. nidulans*, originária do Departamento de Genética da Universidade de Glasgow, Escócia.

Linhagem CadG1, a qual apresenta grande resistência a metais pesados. A mesma foi isolada no Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais (GUELF, 2001), e deu início aos ensaios de microrganismos e metais pesados, desenvolvidos no Setor de Ecogenética Bioquímica, envolvendo o Laboratório acima citado e o Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, respectivamente coordenados pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Maria G. Molina e pelo Prof<sup>o</sup> Ricardo Antunes de Azevedo, responsáveis pelo referido Setor do Departamento de Genética da ESALQ/USP.



## 2.2.2 Meios de Cultura

### 2.2.2.1 Meio Completo

Preparado de acordo com Pontecorvo et al. (1953) e modificado por Azevedo e Costa (1973).

NaNO <sub>3</sub> .....	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 g
KCl.....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	traços
ZnSO <sub>4</sub> .....	traços
Dextrose.....	10,0 g
Peptona.....	2,0 g
Caseína Hidrolizada.....	1,5 g
Extrato de Malte.....	2,0 g
Extrato de Levedura.....	2,0 g
Solução de Vitaminas.....	1,0mL
Ágar comum.....	1,5 %
Água destilada.....	1000mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N e o meio foi esterilizado em autoclave sob 1,0 atm durante 20 minutos.

### 2.2.2.2 Meio Completo líquido

Preparado como descrito no item 3.2.1, sem adição de ágar.

### 2.2.3 Soluções

#### 2.2.3.1 Solução salina p/v 0,85 %

NaCl.....	8,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Foram distribuídos 9,5mL por frasco e esterilizados em autoclave sob 1,0 atm durante 20 minutos.

#### 2.2.3.2 Solução de Tween 80 v/v 0,1%

Tween-80.....	0,1 mL
Água destilada.....	100 mL

Foram distribuídos 3,5 mL por tubo de ensaio, seguindo-se de esterilização em autoclave sob 1,0 atm durante 20 minutos.

#### 2.2.3.3 Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico.....	100 mg
Ácido p-aminobenzóico.....	10 mg
Biotina.....	0,2 mg
Piridoxina.....	50 mg
Riboflavina.....	100 mg
Tiamina.....	50 mg
Água destilada (qsp).....	100 mL

As vitaminas foram adicionadas à água destilada, previamente esterilizada. A solução foi mantida em banho-maria durante 15 minutos e posteriormente conservada em frasco esterilizado e escuro na geladeira.

#### **2.2.4 Obtenção de esporos**

Das linhagens em estoque foram retiradas pequenas quantidades de esporos com o auxílio de palito roliço e inoculados em placas de Petri contendo Meio Completo sólido. A nova cultura foi incubada em estufa por um período de 4-5 dias à temperatura de 37 °C e os esporos formados foram utilizados como inóculo para os repiques em Meio Completo sólido ou líquido, dependendo do estudo previsto, ou ainda, para manutenção de estoques.

#### **2.2.5 Obtenção da biomassa**

Os experimentos foram realizados com biomassa viva e morta. A morte celular da biomassa foi realizada na autoclave sob 1 atm (111 °C; 0,5 Kgf/cm<sup>2</sup>) durante 15 minutos (ADAMIS et al., 2003). Para a verificação da morte celular foram realizadas inoculações em Meio Completo sólido. A biomassa foi reservada em dessecador de vidro durante o período dos testes.

A concentração de biomassa adotada foi de 1g (VOLESKY, MAY, HOLAN, 1993).

##### **2.2.5.1 Micélio**

A biomassa micelial foi obtida por peneiração do Meio Completo líquido, o qual foi inoculado com uma suspensão de esporos na concentração inicial de 10<sup>7</sup> esporos/mL em 50 mL do meio em frascos *erlenmeyers* de 250mL. Tais recipientes foram dispostos em agitador rotatório a 37 °C e 110 rpm durante um tempo de 24 horas determinado pela curva de crescimento das linhagens.

#### **2.2.6 Solução de sal de cádmio**

O sal utilizado foi o cloreto de cádmio, de fórmula molecular CdCl<sub>2</sub> · 2,5 H<sub>2</sub>O e peso molecular 228,35. Devido a sua higroscopicidade o cloreto de cádmio foi previamente seco em

estufa a 56 °C durante 12 horas e acondicionado em dessecador de vidro durante todos os experimentos.

As soluções de sal de cádmio foram preparadas nas concentrações iniciais ( $C_i$ ) de 100; 80; 60; 40 e 20 mg Cd.L<sup>-1</sup>. A cada repetição foi preparada uma solução estoque de 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>, dissolvendo 0,2031 g CdCl<sub>2</sub> em 1 litro de água miliq.

A partir desta solução estoque foram preparadas as demais soluções, adicionando os volumes de 200; 160; 120; 80 e 40 da solução estoque em balão volumétrico de 200 mL e volume completado com água miliq, para a obtenção das respectivas concentrações iniciais ( $C_i$ ) de 100; 80; 60; 40 e 20 mg Cd.L<sup>-1</sup>.

### **2.2.7 Vidrarias**

Após a lavagem e secagem do material laboratorial reutilizável, estes foram imersos em solução ácida preparada de acordo com Smoley (1992) (ácido nítrico, ácido clorídrico e água deionizada – 1:2:7) por quatro horas e novamente lavados com água deionizada e secos a 50 °C em estufa com circulação forçada. Ao término das análises, os materiais utilizados foram novamente lavados e tratados com a solução ácida.

### **2.2.8 Água**

Para a eliminação de possíveis problemas de contaminação de cádmio por fonte externa, foi utilizada água miliq em todas as etapas.

### **2.2.9 Determinação da bioadsorção**

As unidades experimentais foram frascos tipo *erlenmeyer* de 250 mL, compostas por 1 g de biomassa, adicionados de 50 mL de solução de sal de cádmio (Figura 1). Neste volume a massa de cádmio adicionada ( $M_i$ ) foi equivalente a 5; 4; 3; 2 e 1 mg de Cd.50 mL<sup>-1</sup>, ou simplesmente:

**Massa inicial de Cádmiio (Mi):  $C_i * 0,05 L$**

Onde:  $C_i$ : Concentração inicial ( $mg Cd.L^{-1}$ );

0,05: volume utilizado (50 mL).

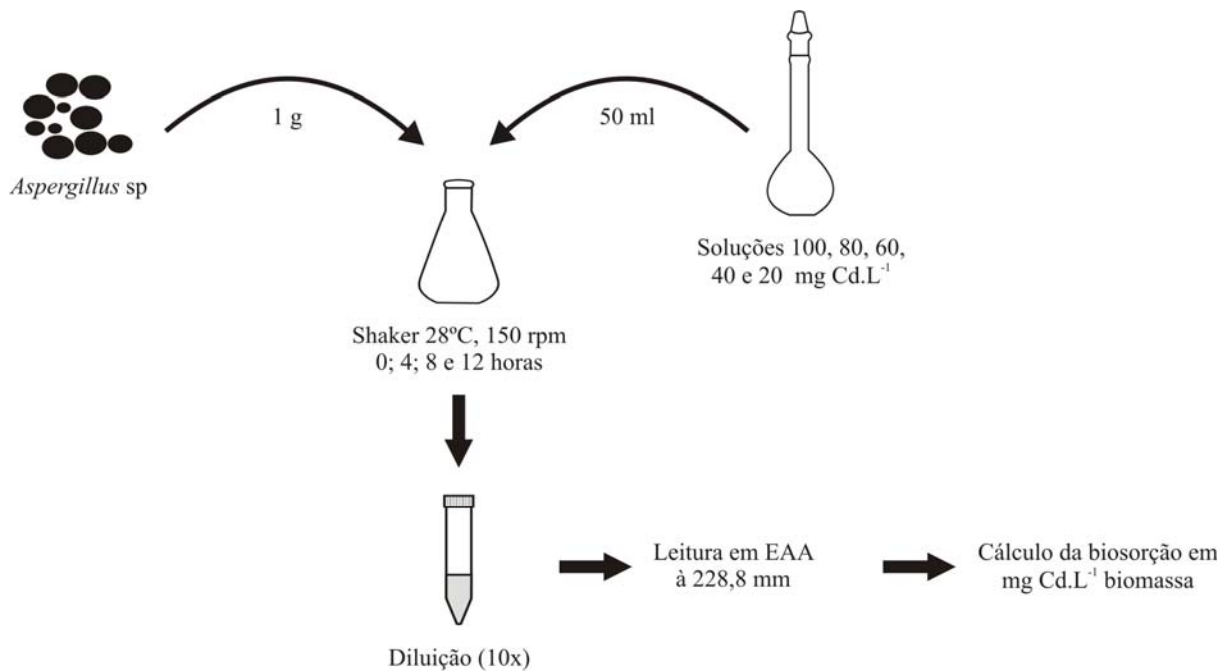


Figura 1 - Procedimentos realizados para montagem dos experimentos de biossorção

A temperatura para os ensaios foi de 28 °C, sob agitação constante de 150 rpm (ADAMIS et al., 2003).

Ao final dos tempos de residência foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada frasco e centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos. Foram retiradas do sobrenadante alíquotas de 4 mL, as quais foram acondicionadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e armazenados sob refrigeração até o momento da leitura, sendo o tempo não superior a 24 horas. Para a leitura em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Varian, modelo AA175) as alíquotas foram diluídas 10 vezes.

Foram utilizados como controle dos ensaios, frascos tipo *erlenmeyer* contendo apenas água e biomassa, com o objetivo de reduzir o efeito de possíveis desvios de leituras causados pela presença de material orgânico liberado pela biomassa, juntamente a outros frascos com somente soluções de sal de cádmio nas diferentes concentrações, analisando o comportamento do sal de

cádmio durante todo o tempo de residência e se ocorreriam ligações do íon cádmio a radicais possivelmente presentes nos frascos.

### 2.2.10 Determinação da massa de cádmio na solução

A concentração final (Cf) de cádmio presente nas amostras obtidas no item 6.8., foi determinada diretamente por uma curva padrão (preparada a cada repetição), por substituição direta dos valores de absorvância, obtidos por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA), em  $\lambda = 228,8$  nm e fenda espectral de 0,5 nm, o gás utilizado foi o acetileno PA.

A massa residual ou final (Mf) de cádmio presente no sobrenadante foi calculada da seguinte maneira:

**Massa residual de cádmio:  $Cf \cdot 10 \cdot 0,05$**

Onde: Cf: Concentração final (mg Cd.L<sup>-1</sup>);

10: Fator de diluição;

0,05: Volume utilizado (50 mL).

### 2.2.11 Determinação da massa de cádmio bioissorvida pela biomassa

A massa de cádmio bioissorvida pela biomassa viva e adsorvida pela biomassa morta foi calculada da mesma maneira descrita no item 2.2.10.

A massa de cádmio bioissorvida (mg), ou retida na biomassa, foi determinada pela diferença entre a massa de cádmio adicionada (Ci) e a massa de cádmio residual (Cf) na solução sobrenadante.

Então:

**Massa de cádmio adicionada:  $Ci$  (mg Cd.L<sup>-1</sup>)\*0,05 L**

**Massa de cádmio restante:  $Cf \cdot 10 \cdot 0,05$  L**

**Massa de cádmio bioissorvida (mg Cd.L<sup>-1</sup>):  $0,05 \cdot (Ci - 10 Cf)$**

### **2.2.12 Determinação da biossorção de cádmio por *Aspergillus* sp. em diferentes tempos de residência**

O tempo de contato entre a biomassa e a solução de sal de cádmio foi estudada a fim de conhecer o tempo de residência necessário para a máxima biossorção do cádmio pelo *Aspergillus* sp. Para isso foram estudados os tempos de 0, 4, 8 e 12 horas.

### **2.2.13 Determinação da biossorção de cádmio por *Aspergillus* sp. em diferentes valores de pH**

Nas melhores condições anteriormente estudadas: concentração de cádmio e tempo de residência, as soluções de sal de cádmio tiveram o pH ajustado para 4,0; 7,0 e 10,0. O ajuste do pH foi realizado com hidróxido de sódio – Na OH (0,75 N) e ácido clorídrico – HCl (0,75 N).

### **2.2.14 Determinação da proteína total**

A dosagem de proteína extracelular, para cálculo da atividade específica nas amostras da solução do sal de cádmio (retiradas após os tempos de residência), foi realizada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada amostra, e transferidas para tubos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL. Estes tubos foram mantidos em gelo durante toda a análise e centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos.

A partir do sobrenadante foram transferidos 20  $\mu$ L da amostra para três poços da placa ELISA (triplicata), em seguida foi adicionado 200  $\mu$ L do reagente Bradford (8 mg de Coomassie Brilliant Blue – G250, 5 mL de Etanol 95%, 10 mL de Ácido Orto Fosfórico ( $H_3PO_4$ ) e completado para 100 mL com água deionizada) diluído 1:1 com água deionizada no momento da aplicação.

A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA marca Bio-Rad, modelo 550, em  $\lambda=595$  nm.

### **2.2.15 Delineamento experimental**

Os experimentos foram realizados com no mínimo três repetições, por tratamento em delineamento inteiramente casualizado para a curva de crescimento de obtenção de biomassa e em blocos ao acaso para os demais experimentos. Os resultados foram comparados através do Teste de Tukey e Regressão polinomial

### **2.2.16 Destino do material contaminado**

Todo o material (biomassa/soluções) contaminado foi colocado em recipiente de vidro com tampa e submetido à secagem em estufa com circulação de ar forçada a 50 °C, até a evaporação do material líquido. O recipiente com o material residual seco foi armazenado em local seguro, para posterior descarte apropriado.

## **2.3 Resultados e discussão**

Foi realizado um experimento preliminar com uma curva de crescimento das linhagens para a determinação do tempo necessário para a obtenção da biomassa fúngica. As duas linhagens estudadas apresentaram o mesmo padrão de crescimento, sendo que a linhagem CadG1 cresce mais rapidamente que a linhagem MSE (Figura 2), o que resultou numa maior quantidade de biomassa total num determinado tempo. No tempo de 12 horas a quantidade de biomassa obtida por *erlenmeyer* foi pequena, sendo necessário um número muito maior desses para se obter a quantidade de biomassa suficiente para os experimentos, o que resultava num maior gasto de meio de cultura e também a necessidade de um espaço físico muito maior. Dessa forma, o tempo adotado para a obtenção da biomassa foi o de 24 horas, já que foi possível obter a quantidade necessária de material, sem que ocorresse a formação de agregações alongadas de micélio (“fitas”) e também a biomassa não ficasse aderida ao vidro do *erlenmeyer*, como ocorreu nos demais tempos superiores ao de 24 horas.



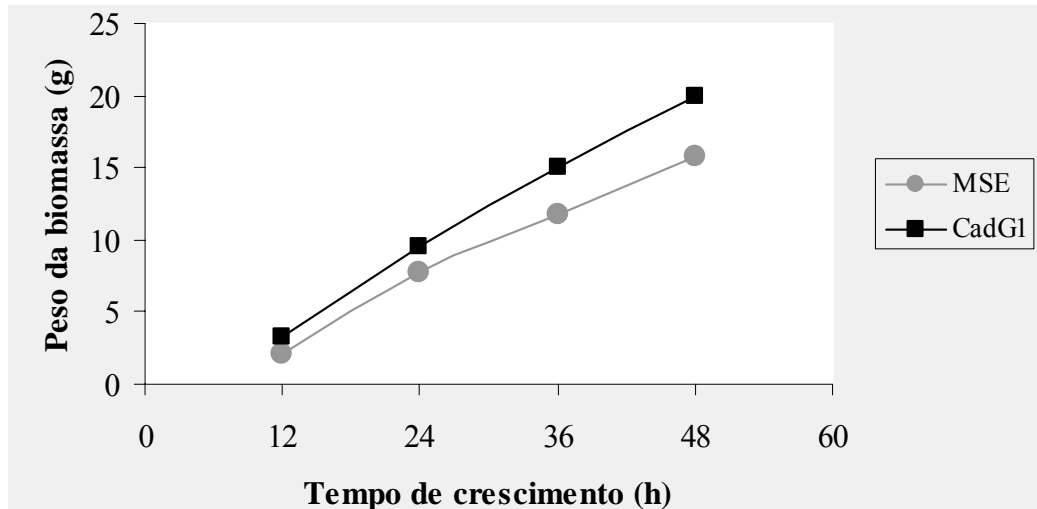


Figura 2 – Curva de crescimento de biomassa das linhagens MSE e CadG1 de *Aspergillus* sp.

A biossorção de metais pesados vem sendo amplamente estudada (ZOUBOULIS et al., 2004; ADAMIS et al., 2003; BREIEROVÁ et al., 2002; KAPOOR, VIRARAGHAVAN, CULLIMORE, 1999 entre outros). No presente trabalho foram avaliados os efeitos dos fatores linhagem (MSE e CadG1), estado fisiológico da biomassa (viva ou morta), tempo de residência (0, 4, 8 e 12 horas) e concentração de cádmio (20, 40, 60, 80 e 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>) e suas interações, sobre a biossorção desse metal.

Observando a análise de variância (Tabela 1) constatou-se efeito altamente significativo das médias de biossorção para as linhagens, ou seja, as linhagens MSE e CadG1 apresentaram comportamento diferenciado quanto à biossorção (Tabela 1; Prob.>F=0,00001) em ao menos um dos tratamentos. O mesmo foi constatado quanto aos fatores tempo e concentração do metal pesado cádmio (Tabela 1; Prob.>F=0,00001 para ambas as causas de variação). Por outro lado, não se constatou efeito do estado da biomassa, se viva ou morta (Tabela 1; Prob.>F=0,065), consideradas médias obtidas no conjunto de todos os tratamentos. Além de praticamente todas as interações duplas e triplas serem significativas, foi altamente significativa a interação quádrupla (entre todos os fatores estudados, Prob.>F=0,00001). Isso evidencia que as linhagens apresentaram desempenhos de biossorção que não apenas as diferenciaram significativamente entre si, mas também foram diferentes os seus desempenhos de biossorção em pelo menos um dos tempos de residência estudados, entre os dois estados fisiológicos da biomassa e em pelo menos uma das concentrações avaliadas.

Tabela 1 - Análise de variância para médias de bioabsorção de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) por linhagens de *Aspergillus* sp.

Fontes de variação	GL	QM	Prob.> F
Linhagem	1	3,517	0,00001
Estado da Biomassa (Ebio)	1	0,017	0,06538
Tempo de residência	3	2,484	0,00001
Concentração de Cádmio (CCd)	4	6,148	0,00001
Linhagem * Ebio	1	0,034	0,00911
Linhagem * Tempo	3	2,111	0,00001
Linhagem * CCd	4	0,093	0,00001
Tempo * Ebio	3	0,139	0,00001
Tempo * CCd	12	0,252	0,00001
Tbio * CCd	4	0,021	0,00362
Linhagem * Ebio * Tempo	3	0,125	0,00001
Linhagem * Ebio * CCd	4	0,007	0,21739
Linhagem * Tempo * CCd	12	0,147	0,00001
Ebio * Tempo * CCd	12	0,019	0,00007
Linhagem * Ebio * Tempo * CCd	12	0,029	0,00001
Resíduo	237	0,005	
Total	319		

Média Geral = 19,84    CV (%) = 7,166

No detalhamento da análise, teste de Tukey, para a interação de todos os fatores (Tabela 2) observou-se que no tratamento de zero hora, com a biomassa viva, nas concentrações de 20, 60 e 80  $\text{mg Cd.L}^{-1}$ , as linhagens não apresentaram diferença estatística significativa, tanto a 1% quanto a 5% de probabilidade; o mesmo resultado foi obtido com a biomassa morta nas concentrações de 20, 40 e 80  $\text{mg Cd.L}^{-1}$ . As linhagens ainda apresentaram comportamentos que não diferem estatisticamente entre si no tempo de 8 horas, biomassa morta e concentração de 20  $\text{mg Cd.L}^{-1}$  e também com a biomassa viva, no tempo de 12 horas nas concentrações de 20 e 60  $\text{mg Cd.L}^{-1}$ . No entanto, na maioria dos tratamentos, houve diferença estatística significativa, e na maior parte deles a linhagem MSE apresentou desempenho superior de bioabsorção de cádmio.

Por outro lado, no tempo de 12 horas para a biomassa viva, nas concentrações de 20, 60, 80 e 100 mg Cd.L<sup>-1</sup> e também no mesmo tempo com a biomassa morta nas concentrações de 40, 60, 80 e 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>, a linhagem CadG1 apresentou níveis de bioissorção significativamente superiores aos da MSE, tanto a 1% como a 5% de probabilidade (Tabela 2 e Figura 3). Guelfi (2001), constatou que a linhagem CadG1 é mais resistente ao cádmio que a MSE. Em face dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se supor que tal resistência esteja associada a algum mecanismo bloqueando a entrada do metal no interior da célula, suplantado após 12 horas de exposição ao cádmio. Estudos com maiores tempos de exposição conduzidos ao longo do presente trabalho, resultaram em grande interferência no volume de matéria orgânica, comprometendo a leitura dos resultados e por esse motivo foram desconsiderados.

Em bactérias, cepas com células de tamanho menor apresentaram melhor desempenho de bioissorção de cádmio e cromo que cepas com células maiores e isso foi associado ao diferencial de superfície de exposição ao metal, maior nas células menores (ZOUBOULIS et al., 2004). De modo análogo, como no presente trabalho sempre se empregou a mesma quantidade de biomassa nos tratamentos (1 g), outro fator associado ao diferencial de bioissorção entre as linhagens, poderia ter sido um diferencial de superfície das estruturas miceliais expostas ao cádmio. De fato, na linhagem MSE, o cultivo em meio líquido resulta em aglomerados esféricos de maior tamanho que os formados pela linhagem CadG1. Nesta última, esses sendo menores resultam em maior superfície de exposição ao metal para essa linhagem. No entanto, constatou-se que a linhagem CadG1 apresentou menor bioissorção em relação à MSE na média de todos os tratamentos. Tal fato novamente poderia ser explicado por algum mecanismo de bloqueio da bioissorção associado à estrutura e/ou composição da parede do micélio ou ao metabolismo no caso da biomassa viva.

Tabela 2 – Teste de Tukey para médias de bioacumulação de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para as linhagens MSE e CadG1 de *Aspergillus* sp., concentração de cádmio, estado da biomassa e tempo de residência

(continua)

Tempo (h)	Estado da biomassa	Concentração ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ )	Linhagem	Médias*	5%	1%
0	Viva	20	MSE	9,16	a	A
			CadG1	7,40	a	A
		40	MSE	16,64	a	A
			CadG1	12,74	b	B
		60	MSE	16,64	a	A
			CadG1	15,60	a	A
		80	CadG1	19,36	a	A
			MSE	19,06	a	A
		100	MSE	24,14	a	A
			CadG1	20,48	b	B
	Morta	20	MSE	8,56	a	A
			CadG1	7,74	a	A
		40	CadG1	13,20	a	A
			MSE	12,82	a	A
60		MSE	20,10	a	A	
		CadG1	16,64	b	B	
80	MSE	20,28	a	A		
	CadG1	19,50	a	A		
100	MSE	25,84	a	A		
	CadG1	22,94	b	B		
4	Viva	20	MSE	11,40	a	A
			CadG1	7,86	b	B
		40	MSE	19,88	a	A
			CadG1	10,86	b	B
		60	MSE	27,30	a	A
			CadG1	14,38	b	B
		80	MSE	32,92	a	A
			CadG1	18,84	b	B
		100	MSE	27,50	a	A
			CadG1	19,96	b	B
	Morta	20	MSE	12,62	a	A
			CadG1	7,76	b	B
		40	MSE	22,10	a	A
			CadG1	12,86	b	B
60		MSE	23,98	a	A	
		CadG1	14,84	b	B	
80	MSE	35,78	a	A		
	CadG1	19,80	b	B		
100	MSE	32,66	a	A		
	CadG1	21,08	b	B		

Tabela 2 – Teste de Tukey para médias de bioacumulação de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para as linhagens MSE e CadG1 de *Aspergillus* sp., concentração de cádmio, estado da biomassa e tempo de residência

Tempo (h)	Estado da biomassa	Concentração ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ )	Linhagem	Médias*	(conclusão)	
					5%	1%
8	Viva	20	MSE	17,26	a	A
			CadG1	11,42	b	B
		40	MSE	19,80	a	A
			CadG1	10,84	b	B
		60	MSE	21,98	a	A
			CadG1	14,20	b	B
		80	MSE	25,50	a	A
			CadG1	14,88	b	B
		100	MSE	25,02	a	A
			CadG1	17,50	b	B
	Morta	20	MSE	12,64	a	A
			CadG1	11,66	a	A
		40	MSE	23,54	a	A
			CadG1	12,54	b	B
60	MSE	25,30	a	A		
	CadG1	14,90	b	B		
80	MSE	26,04	a	A		
	CadG1	14,52	b	B		
12	Viva	20	CadG1	12,86	a	A
			MSE	12,58	a	A
		40	MSE	22,22	a	A
			CadG1	18,76	b	B
		60	CadG1	26,48	a	A
			MSE	26,26	a	A
		80	CadG1	34,22	a	A
			MSE	32,02	b	A
		100	CadG1	38,94	a	A
			MSE	32,44	b	B
	Morta	20	MSE	12,60	a	A
			CadG1	10,32	b	A
		40	CadG1	20,54	a	A
			MSE	17,58	b	B
60	CadG1	27,98	a	A		
	MSE	21,54	b	B		
80	CadG1	34,98	a	A		
	MSE	25,40	b	B		
100	CadG1	40,40	a	A		
	MSE	24,66	b	B		

\* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey. DMS 5% = 0,098 e DMS 1% = 0,129.

Como já comentado acima, o fato de com 12 horas de residência o desempenho de bioissorção da CadG1 tenha superado o da MSE, novamente sugere que tal mecanismo de bloqueio seja suplantado com esse tempo de exposição ao metal. Por outro lado, até o tempo de 12 horas de residência a membrana celular da linhagem CadG1 pode ter permanecido intacta e permeável seletivamente, dificultando a entrada de soluto e dos íons cádmio, como comentado por Adamis et al. (2003) com relação a *Saccharomyces cerevisiae*.

Avaliando a interação entre todos os fatores avaliados (estado da biomassa, concentração de cádmio, tempo de residência e as linhagens) foi possível constatar, em relação ao estado da biomassa, que para a maioria dos tratamentos não há diferenças significativas entre os desempenhos de bioissorção das biomassas viva e morta, tanto a 1% quanto a 5% de probabilidade (Tabela 3), o que comprova o fato de no conjunto de todos os tratamentos não ter sido constatado efeito significativo da estado fisiológico da biomassa sobre a bioissorção de cádmio. Esses resultados indicam que a aplicação de qualquer um dos dois tipos de biomassa em processos de bioissorção de cádmio deve resultar em desempenhos de biorremediação semelhantes. Tais resultados também sugerem que o processo de bioissorção em ambos os casos está mais associado a mecanismos envolvendo a parede celular (adsorção) que a transportes ativos envolvendo a membrana e/ou o metabolismo celular. No entanto, alguns tratamentos apresentaram desempenho melhor de bioissorção do cádmio pela biomassa viva e em outros a maior eficiência de bioissorção foi observado para biomassa morta (Tabela 3).

Em síntese, observou-se que na maioria dos tratamentos em que o fator estado fisiológico apresentou diferença estatística significativa, a biomassa que apresentou maiores índices de bioissorção de cádmio foi a morta. Isso se apresenta como um bom indicativo para aplicações práticas de biorremediação, já que processos utilizando biomassa morta apresentam vantagens econômicas, como a não necessidade de suplementação de nutrientes e manutenção de culturas. Cabe ressaltar que no uso de biomassa morta estão envolvidas forças químicas, físicas e iônicas de adsorção, independentes do metabolismo (ZOUBOULIS et al., 2004; SHEKHAR et al., 1998). Ressalta-se ainda que esse resultado abre a possibilidade de aproveitamento de biomassa fúngica, residual de processos industriais e agroindustriais, de ampla disponibilidade e custos reduzidos.

Tabela 3 – Teste de Tukey para médias de bioabsorção de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para ambos os estados da biomassa, concentração de cádmio, tempo de residência nas linhagens MSE e CadG1 de *Aspergillus* sp.

(continua)

Linhagem	Tempo (h)	Concentração ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ )	Estado da biomassa	Médias*	5%	1%
MSE	0	20	Viva	9,16	a	A
			Morta	8,56	a	A
		40	Viva	16,64	a	A
			Morta	12,82	b	B
		60	Morta	20,10	a	A
			Viva	16,64	b	B
	80	Morta	20,28	a	A	
		Viva	19,50	a	A	
	100	Morta	25,84	a	A	
		Viva	24,14	a	A	
	4	20	Morta	12,62	a	A
			Viva	11,40	a	A
		40	Morta	22,10	a	A
			Viva	19,88	b	A
		60	Morta	29,98	a	A
			Viva	27,38	b	B
	80	Morta	35,78	a	A	
		Viva	32,92	b	B	
	100	Morta	32,66	a	A	
		Viva	27,50	b	B	
	8	20	Viva	17,26	a	A
			Morta	12,64	b	B
		40	Morta	23,54	a	A
			Viva	19,80	b	B
		60	Morta	25,30	a	A
			Viva	21,98	b	B
	80	Morta	26,04	a	A	
		Viva	25,50	a	A	
	100	Morta	27,18	a	A	
		Viva	25,02	b	A	
12	20	Morta	12,60	a	A	
		Viva	12,56	a	A	
	40	Viva	22,22	a	A	
		Morta	17,58	b	B	
	60	Viva	26,26	a	A	
		Morta	21,54	b	B	
80	Viva	32,02	a	A		
	Morta	25,40	b	B		
100	Viva	32,44	a	A		
	Morta	24,66	b	B		

Tabela 3 – Teste de Tukey para médias de bioacumulação de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para ambos os estados da biomassa, concentração de cádmio, tempo de residência nas linhagens MSE e CadG1 de *Aspergillus* sp.

(conclusão)						
Linhagem	Tempo (h)	Concentração ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ )	Estado da biomassa	Médias*	5%	1%
CadG1	0	20	Morta	7,74	a	A
			Viva	7,40	a	A
		40	Morta	13,20	a	A
			Viva	12,74	a	A
		60	Morta	16,64	a	A
			Viva	15,60	a	A
	80	Morta	19,54	a	A	
		Viva	19,34	a	A	
	100	Morta	22,92	a	A	
		Viva	20,48	b	A	
	4	20	Viva	7,86	a	A
			Morta	7,76	a	A
		40	Morta	12,86	a	A
			Viva	10,86	b	A
		60	Morta	14,84	a	A
			Viva	14,38	a	A
		80	Morta	19,80	a	A
			Viva	18,84	a	A
		100	Morta	21,08	a	A
			Viva	19,96	a	A
	8	20	Morta	11,66	a	A
			Viva	11,42	a	A
		40	Morta	12,54	a	A
			Viva	10,84	a	A
		60	Morta	14,90	a	A
			Viva	14,20	a	A
		80	Viva	14,88	a	A
			Morta	14,52	a	A
		100	Morta	17,52	a	A
			Viva	17,50	a	A
12	20	Viva	12,86	a	A	
		Morta	10,32	b	A	
	40	Morta	20,54	a	A	
		Viva	18,76	a	A	
	60	Morta	27,98	a	A	
		Viva	26,48	a	A	
	80	Morta	34,98	a	A	
		Viva	34,22	a	A	
	100	Morta	40,40	a	A	
		Viva	38,94	a	A	

\* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey. DMS 5% = 0,098 e DMS 1% = 0,129



A Figura 3 mostra que a linhagem CadG1 (linhas pontilhadas) apresentou a maior parte dos tratamentos com níveis de bioissorção inferiores ou próximos aos níveis inferiores àqueles apresentados pela linhagem MSE (linhas cheias), com exceção do tempo de 12 horas de exposição. Para a linhagem MSE o tempo de residência que apresentou melhor desempenho de bioissorção de cádmio, para praticamente todos os tratamentos, foi de 4 horas (Tabela 3 e Figura 3). No entanto, como já comentado acima, para a linhagem CadG1 o tempo de 12 horas foi o que apresentou maiores remoções de cádmio (Tabela 3 e Figura 3).

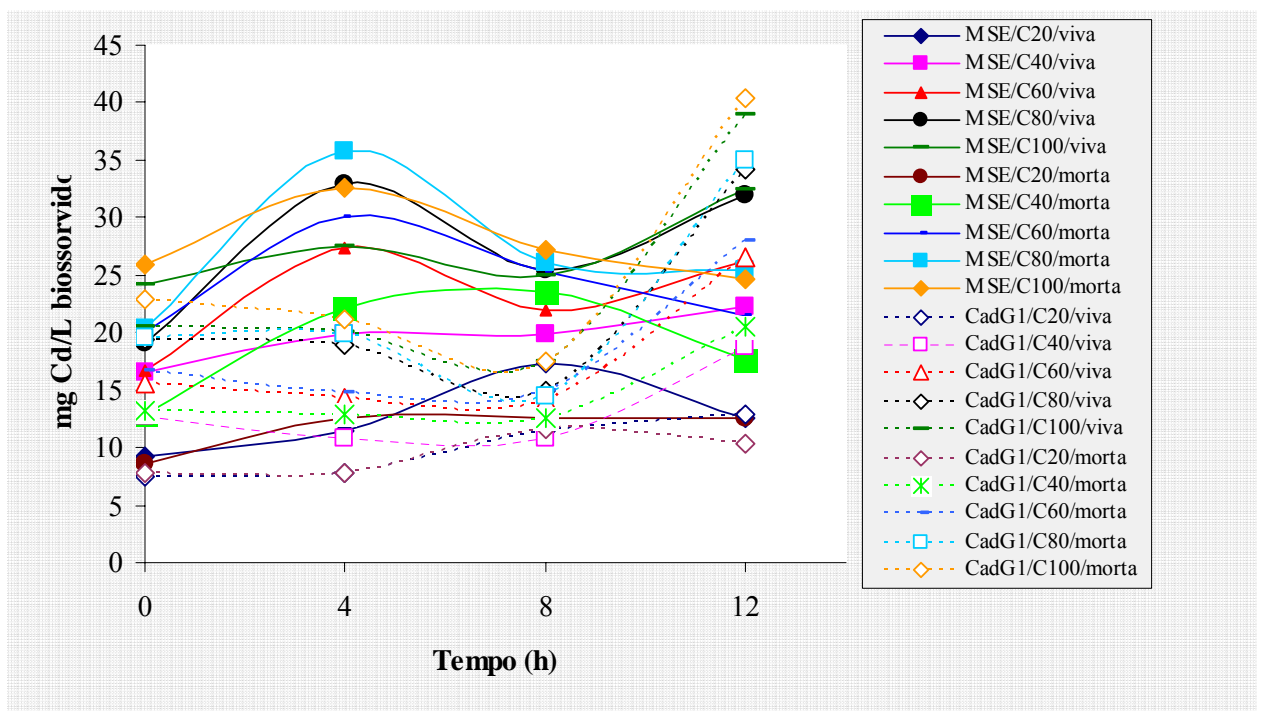


Figura 3 – Padrão de bioissorção de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para a interação entre todos os fatores (linhagem, tempo de residência, estado da biomassa e concentração de cádmio)

A Figura 4 mostra os efeitos da interação entre todos os fatores (linhagem, tempo de residência, estado da biomassa e concentração de cádmio). Quanto ao padrão de bioissorção das linhagens, evidencia-se mais uma vez que a linhagem CadG1 (linhas pontilhadas na Figura 4) apresentou a maior parte dos tratamentos com níveis de bioissorção inferiores ou próximos aos níveis inferiores àqueles apresentados pela linhagem MSE (linhas cheias na Figura 4), exceto com 12 horas de tratamento e na maior concentração ( $100 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ ).

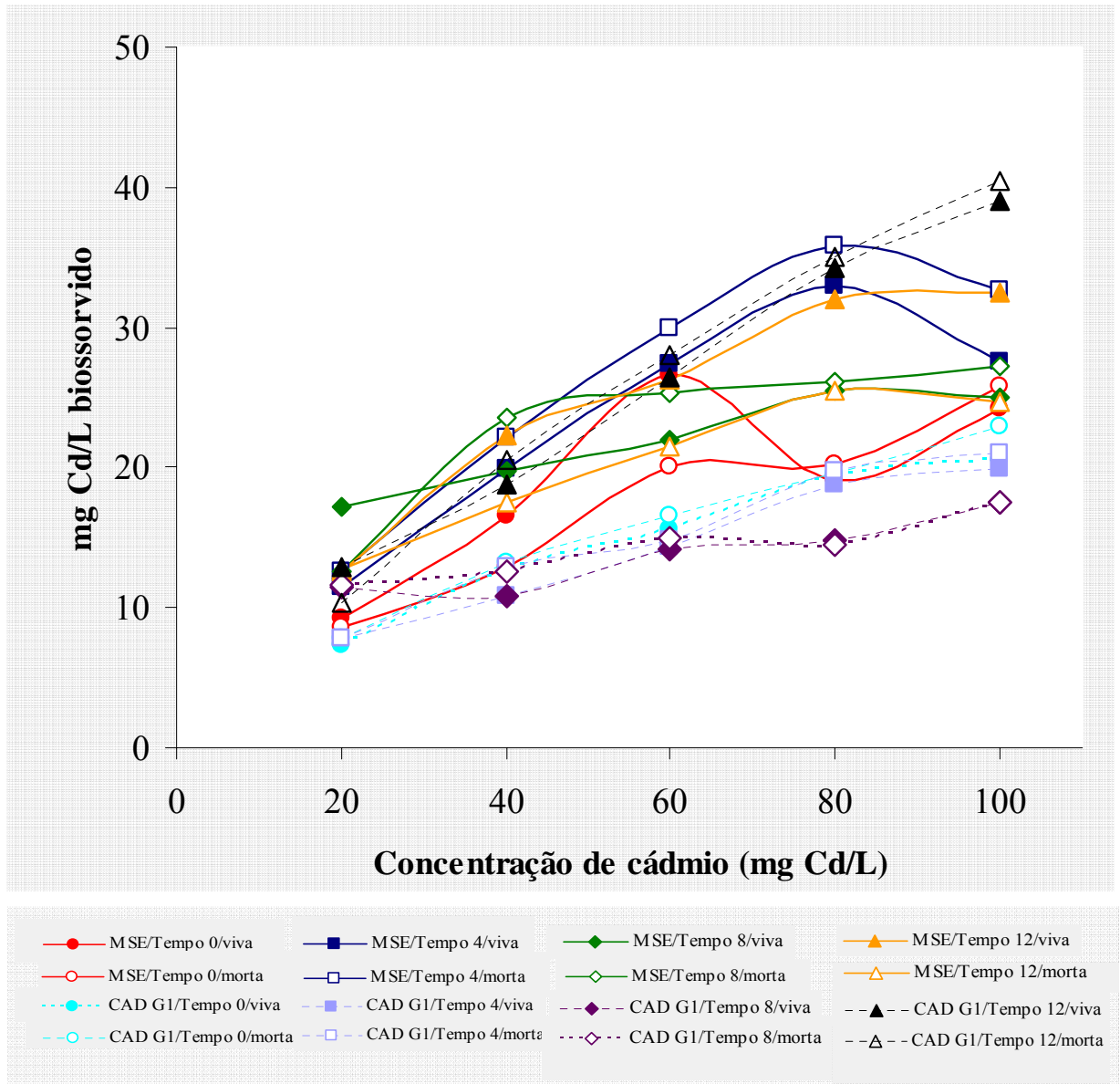


Figura 4 – Padrão de bioacumulação de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para a interação entre todos os fatores (linhagem, tempo de residência, estado da biomassa e concentração de cádmio)

Para a linhagem MSE a análise estatística evidenciou que no tempo 0, a bioacumulação apresentou um ajuste linear altamente significativo tanto para a biomassa viva como morta (em ambos os casos  $\text{Prob.} > F = 0,00001$ ;  $R^2 = 0,90$  e  $R^2 = 0,94$  respectivamente, Tabela 4), indicando que esta linhagem possui maior capacidade de bioacumulação de cádmio do que as avaliadas no presente trabalho. No entanto, a biomassa viva também apresentou ajuste altamente significativo a uma

regressão cúbica (Prob.> F=0,00007;  $R^2=0,99$ , Tabela 4), mostrando variações na intensidade do aumento da biofixação. A biomassa morta apresentou ainda, ajuste significativo a uma regressão de quarto grau (Prob.> F=0,00041;  $R^2=1,00$ , Tabela 4). Para a biomassa, tanto viva como morta, da linhagem MSE, com o tempo de 4 h de residência, foi observado um ajuste linear altamente significativo, (Prob.> F=0,00001;  $R^2= 0,73$  e  $R^2= 0,83$  respectivamente, Tabela 4), o mesmo ocorrendo para o ajuste a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00001;  $R^2= 0,96$  e  $R^2= 0,99$  respectivamente, Tabela 4). Nesse tratamento, tanto a biomassa viva como morta apresentaram ajuste significativo a uma regressão de terceiro grau (Prob.> F=0,00009;  $R^2= 0,99$  e Prob.> F=0,00166;  $R^2= 1,00$  respectivamente, Tabela 4), mais uma vez mostrando que houve variações na intensidade do aumento da biofixação.

Com o tempo de residência de 8 horas, o padrão de biofixação, tanto da biomassa viva como morta, da linhagem MSE, apresentou ajuste linear altamente significativo (Prob.> F=0,00001;  $R^2= 0,92$  e  $R^2= 0,71$  respectivamente, Tabela 4), indicando mais uma vez que esta linhagem tem capacidade de biofixar maiores dosagens do que as testadas. Entretanto, a biomassa morta ainda apresentou ajuste altamente significativo a uma regressão de segundo grau (Prob.> F=0,00001;  $R^2= 0,93$ , Tabela 4), mostrando que é possível os valores de biofixação estarem próximos aos valores máximos e também ajuste significativo a uma regressão cúbica (Prob.> F=0,00014;  $R^2= 0,99$ , Tabela 4), indicando variações na intensidade do aumento da biofixação.

No tempo de 12 horas de residência também houve um ajuste altamente significativo dos dados a uma equação linear (Prob.> F=0,00001;  $R^2= \pm 0,905$ , Tabela 4), tanto na biomassa viva como morta. Entretanto, também se constatou ajuste altamente significativo dos dados da biomassa viva quanto a morta a uma regressão de segundo grau (Prob.> F=0,00001;  $R^2= 0,99$ , Prob.> F=0,00011;  $R^2= 0,98$  respectivamente, Tabela 4), mostrando que, ao menos nas condições estudadas, os valores de biofixação apresentados estão próximos aos valores máximos.

Em síntese, constatou-se ajuste linear em todas as condições de ensaio para a linhagem MSE, indicando que, ao menos no intervalo estudado, quanto maior a dosagem de exposição, maior a biofixação e sugerindo manutenção dessa tendência para valores maiores. Entretanto, na exposição de 4 e 12 horas, tanto a biomassa viva como a morta, mostraram tendência a estabilizar a quantidade de biofixação, mesmo com aumento da dosagem de exposição (houve ajuste dos dados a regressão de segundo grau), o mesmo acontecendo para o tempo de residência de 8 horas

com a biomassa morta. Oscilações na intensidade da bioissorção (ajuste dos dados a regressões de terceiro e quarto graus) ocorreram na exposição apenas instantânea, no tempo de 4 horas para ambas as biomassas e 8 horas apenas com a biomassa morta.

Tabela 4 - Regressão polinomial para o efeito das concentrações de cádmio, linhagem MSE, tempo de residência e estado fisiológico da biomassa sobre a bioissorção de cádmio

Tempo (h)	Estado da biomassa	Regressão (Prob.>F)	Equação	R <sup>2</sup> (%)
0	Viva	0,00001	$y = 0,371 + 0,161x$	0,90
		0,00007	$y = -0,39 + 1,21x - 0,38x^2 + 0,04x^3$	0,99
	Morta	0,00001	$y = 0,2461 + 0,210x$	0,94
		0,00041	$y = 1,99 - 3,29x + 2,23x^2 - 0,55x^3 + 0,05x^4$	1,00
4	Viva	0,00001	$y = 0,512 + 0,226x$	0,73
		0,00001	$y = -0,232 + 0,864x - 0,11x^2$	0,96
		0,00009	$y = 0,46 - 0,11x + 0,27x^2 - 0,04x^3$	1,00
	Morta	0,00001	$y = 0,526 + 0,269$	0,83
		0,00001	$y = -0,156 + 0,853x - 0,097x^2$	0,99
		0,00166	$y = 0,35 + 0,13x + 0,17x^2 - 0,03x^3$	1,00
8	Viva	0,00001	$y = 0,777 + 0,106x$	0,92
		0,00001	$y = 0,673 + 0,158$	0,71
	Morta	0,00001	$y = 0,161 + 0,597x - 0,073x^2$	0,93
		0,00014	$y = -0,51 + 1,53x - 0,43x^2 + 0,04x^3$	0,99
12	Viva	0,00001	$y = 0,512 + 0,248x$	0,91
		0,00001	$y = 0,09 + 0,61x - 0,06x^2$	0,99
	Morta	0,00001	$y = 0,539 + 0,159x$	0,90
		0,00011	$y = 0,250 + 0,407x - 0,04x^2$	0,98

A análise estatística evidenciou que para a linhagem CadG1 no tempo 0, a bioadsorção apresentou um ajuste linear altamente significativo, tanto para a biomassa viva como morta (em ambos os casos a Prob.> F=0,00001;  $R^2=0,95$  e  $R^2=0,98$  respectivamente, Tabela 5). Tal ajuste indica que essa linhagem tem capacidade de bioadsorção de maiores dosagens do que as testadas no presente trabalho. Entretanto, a biomassa viva também apresentou ajuste significativo a uma regressão de segundo grau (Prob.> F=0,005;  $R^2=0,99$ , Tabela 5), sugerindo, que nas condições estudadas, seu limite de bioadsorção esteja próximo aos valores máximos de exposição testados. De acordo com a equação obtida, sua capacidade máxima de bioadsorção seria quando submetida a uma exposição apenas instantânea ao cádmio.

Com o tempo de 4 horas de residência da biomassa da linhagem CadG1 ao cádmio, tanto a viva como a morta, apresentaram um ajuste linear altamente significativo (Prob.> F=0,00001;  $R^2= \pm 0,975$ , Tabela 5). Entretanto, a biomassa viva apresentou variações significativas na intensidade do aumento de bioadsorção, ao ponto dos dados também se ajustarem a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,03;  $R^2= 1,00$ , Tabela 5), mesmo que a um nível de significância menor.

No tempo de residência de 8 horas, o padrão de bioadsorção, tanto da biomassa viva como morta, apresentou somente ajuste linear (Prob.> F=0,00001;  $R^2= \pm 0,895$ , Tabela 5), sugerindo novamente que a linhagem CadG1 poderia bioadsorver quantidades maiores de cádmio que as empregadas nesse trabalho.

No tempo de 12 horas de residência também houve um ajuste altamente significativo dos dados a uma equação linear (Prob.> F=0,00001;  $R^2= 0,99$ , Tabela 5), tanto na biomassa viva como morta. Entretanto, também se constatou ajuste dos dados da biomassa viva a uma regressão cúbica, ainda que a um nível de significância baixo (Prob.> F=0,03;  $R^2= 1,00$ , Tabela 5). Variações na intensidade da bioadsorção em função do aumento da dosagem de exposição, ocorreram no tempo de 4 horas, isso também se deu com a biomassa viva (ver acima) naquele caso, como neste, com 12 horas de exposição. Pode-se atribuir tais variações à atividade das enzimas de defesa do fungo do sistema antioxidante que interferem na sua interação com o metal. O padrão de bioadsorção da CadG1 morta, com 12 horas de residência também apresentou um ajuste a uma regressão de segundo grau (Prob.> F=0,0004;  $R^2= 0,99$ , Tabela 5). Dado que a morte dessa linhagem se deu pelo calor (autoclave sob 1 atm -111°C; 0,5 Kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos), pode-se assumir que nessa biomassa está ocorrendo unicamente o processo de adsorção na retirada do metal da solução de cádmio. Em resumo, constatou-se ajuste linear em todas as

condições de ensaio para a linhagem CadG1, indicando que ao menos no intervalo estudado, quanto maior a dosagem de exposição, maior a bioissorção, sugerindo manutenção dessa tendência para valores maiores. Entretanto, na exposição apenas instantânea e na de 12 horas, a biomassa morta também mostrou tendência a estabilizar a quantidade de bioissorção, mesmo com aumento da dosagem de exposição (houve ajuste dos dados a regressão de segundo grau). Oscilações na intensidade da bioissorção (ajuste dos dados às regressões de terceiro e quarto graus) ocorreram com 4 e 12 horas de exposição, somente na biomassa viva, podendo estas terem ocorrido em função da atividade do sistema de defesa antioxidante dos sistemas vivos (GUELF, 2003; ADAMIS et al., 2003). Del Rio (2004), verificou diferenças no tempo de residência ideal para a bioissorção de cádmio, entre leveduras vivas e mortas, sendo esse de 2 horas para leveduras mortas e de 4 horas para leveduras vivas.

Tabela 5 - Regressão polinomial para o efeito das concentrações de cádmio, linhagem CadG1, tempo de residência e estado fisiológico da biomassa sobre a bioissorção de cádmio

Tempo (h)	Estado da biomassa	Regressão (Prob.>F)	Equação	R <sup>2</sup> (%)
0	Viva	0,00001	$y = 0,264 + 0,164x$	0,95
		0,00500	$y = 0,076 + 0,325x - 0,027x^2$	0,99
	Morta	0,00001	$y = 0,249 + 0,183x$	0,98
4	Viva	0,00001	$y = 0,236 + 0,161x$	0,98
	Morta	0,00001	$y = 0,261 + 0,168x$	0,97
		0,03041	$y = -0,96 + 2,38x - 1,31x^2 + 0,31x^3 - 0,02x^4$	1,00
8	Viva	0,00001	$y = 0,445 + 0,081x$	0,89
		0,05808	$y = 1,68 - 2,09x + 1,24x^2 - 0,28x^3 + 0,02x^4$	1,00
	Morta	0,00001	$y = 0,506 + 0,068x$	0,90
12	Viva	0,00001	$y = 0,298 + 0,338x$	0,99
		0,02979	$y = 0,580 - 0,09x + 0,17x^2 - 0,02x^3$	1,00
	Morta	0,00001	$y = 0,223 + 0,373x$	0,98
		0,00043	$y = -0,028 + 0,588x - 0,03x^2$	0,99

Observando-se as médias de bioissorção em valores percentuais (Tabela 6) podemos observar não apenas que a linhagem MSE sempre retira proporcionalmente mais cádmio da solução do que a CadG1, como também que a medida que aumenta a concentração de cádmio na solução, reduz-se a proporção deste que é bioissorvido. Os dados percentuais estão de acordo com dados obtidos por Rostami e Joodaki (2002), obtidos em um estudo com *Aspergillus niger*, no qual demonstraram que aumentando a concentração inicial de cádmio na solução, a remoção desse metal é proporcionalmente diminuída.

É interessante ressaltar que no presente trabalho, quando ambas as linhagens foram expostas, por exemplo a  $20 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ , as linhagens retiraram da solução em torno de 40% dessa quantidade ou aproximadamente 8 mg de cádmio, isso tanto para a biomassa viva como morta. Mas, ao serem expostas às dosagens maiores, por exemplo,  $100 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ , exposição instantânea, retirou da solução em torno de 23% dessa quantidade ou em média 23,4 mg de cádmio, tanto a biomassa viva como morta. Este padrão manteve-se em todos os tempos de residência. Tal fato pode-se dever ao efeito da concentração dos íons cádmio sobre suas interações com a solução líquida envolvente e as estruturas e componentes da parede do micélio. Respostas metabólicas não podem estar associadas à maior bioissorção em todos os tratamentos dado que o mesmo padrão foi observado na biomassa morta pelo calor.

Cabe comentar ainda que os níveis de cádmio avaliados no presente trabalho (20, 40, 60, 80 e  $100 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ ) são extremamente elevados quando comparados aos níveis de cádmio permitidos para águas utilizadas para a irrigação de hortaliças e pastagens, abastecimento doméstico e aquicultura, que variam entre 0,001 a  $0,01 \text{ mg Cd.L}^{-1}$ ; e também ao valor máximo de  $0,2 \text{ mg Cd.L}^{-1}$  nos efluentes de indústrias ou outras atividades que poderão ser lançadas em corpos de água; o processo de bioissorção de cádmio por ambas as linhagens mostra-se bastante eficiente e com bom potencial para utilizações práticas na remoção de cádmio de ambientes líquidos. Torna-se relevante, em estudos futuros, avaliar a bioissorção dessas linhagens em concentrações semelhantes às de ocorrências mais frequentes em águas residuais e contaminadas.

Tabela 6 – Médias de bioissorção (4 blocos) para as linhagens MSE e CadG1 de *Aspergillus* sp., tempo de residência e concentração de cádmio (valores percentuais - %)

Tempo (h)	Concentração de cádmio (mg Cd.L <sup>-1</sup> )	MSE		CadG1	
		Viva	Morta	Viva	Morta
0	20	43,50	42,75	37,25	38,75
	40	41,60	32,25	31,87	33,00
	60	27,75	33,50	26,25	27,75
	80	23,80	25,31	24,19	24,37
	100	24,00	25,90	20,75	22,95
4	20	57,25	63,25	39,25	38,75
	40	49,75	55,25	27,12	32,12
	60	45,70	49,99	24,00	24,83
	80	41,125	44,81	23,50	24,75
	100	27,25	31,7	20,00	21,10
8	20	61,00	62,75	57,00	58,25
	40	49,50	54,00	27,12	31,50
	60	36,75	42,33	23,75	24,83
	80	31,94	32,56	18,56	18,12
	100	25,25	27,20	17,50	17,45
12	20	62,75	62,75	64,25	52,50
	40	53,37	44,12	46,87	51,37
	60	43,75	35,90	44,00	46,48
	80	39,94	31,75	42,83	43,37
	100	32,25	24,70	38,75	40,40

O pH é um fator que interfere bastante no processo de bioissorção (SEKHAR et al., 1998), dessa forma, seu efeito foi avaliado em três valores 4,0, 7,0 e 10,0. O pH influencia a remoção de íons metálicos, possivelmente pela competição dos prótons e íons pelos ligantes da parede celular (GARNHAM, CODD, GADD, 1993). Como nos ensaios conduzidos no presente trabalho, os dois níveis do estado da biomassa (viva ou morta) não apresentaram efeito significativo, indicando que os dois possuem o mesmo padrão de bioissorção, nos ensaios de pH foi utilizada



apenas a biomassa morta. Os tempos de residência avaliados foram 0, 4 e 12 horas e as concentrações de cádmio foram as de 20 e 100 mg Cd. L<sup>-1</sup>. Observando a análise de variância (Tabela 7 e Figura 4), constatou-se que todos os fatores individualmente, assim como suas interações, apresentaram efeito altamente significativo em relação à bio sorção de cádmio.

Tabela 7 - Análise de variância para médias de bio sorção de cádmio (mg.L<sup>-1</sup>) por *Aspergillus* sp. em diferentes valores de pH

Fontes de variação	GL	QM	Prob. > F
Linhagem	1	1,470	0,00001
Tempo	2	0,708	0,00001
Concentração de Cádmio (CCd)	1	14,301	0,00001
pH	2	2,013	0,00001
Linhagem * Tempo	2	0,391	0,00911
Linhagem * CCd	1	0,159	0,00001
Linhagem * pH	2	0,065	0,00001
Tempo * CCd	2	0,361	0,00001
Tempo * pH	4	0,019	0,00003
CCd * pH	2	0,621	0,00001
Linhagem * Tempo* CCd	2	0,262	0,00001
Linhagem * Tempo * pH	4	0,056	0,00001
Tempo * CCd * pH	4	0,013	0,00046
Linhagem * Tempo * CCd * pH	4	0,133	0,00036
Resíduo	72	0,002	
Total	107		

Média Geral = 14,44

CV (%) = 6,337

No detalhamento da análise por meio de teste de Tukey (Tabela 8 e Figura 4), observou-se que, na maioria dos tratamentos avaliados, a linhagem MSE apresentou melhor desempenho em relação à bio sorção de cádmio. Quando isso não ocorreu, as linhagens apenas apresentaram níveis de bio sorção que se igualam estatisticamente (Tabela 8 e Figura 4).

Tabela 8 – Teste de Tukey para as médias de bio sorção de cádmio (mg Cd.L<sup>-1</sup>) para as linhagens MSE e CadG1, tempos de residência, concentração e valores de pH

Tempo (h)	Concentração (mg Cd.L <sup>-1</sup> )	pH	Linhagem	Médias*	5%	1%
0	20	4	MSE	5,34	a	A
			CadG1	3,22	b	B
		7	MSE	9,68	a	A
			CadG1	6,66	b	B
		10	MSE	8,62	a	A
			CadG1	3,86	b	B
	100	4	MSE	10,96	a	A
			CadG1	9,72	a	A
		7	MSE	24,90	a	A
			CadG1	21,64	b	B
		10	MSE	17,16	a	A
			CadG1	12,76	b	B
4	20	4	MSE	6,30	a	A
			CadG1	3,92	b	B
		7	MSE	12,98	a	A
			CadG1	6,28	b	B
		10	MSE	7,96	a	A
			CadG1	5,26	b	B
	100	4	MSE	23,54	a	A
			CadG1	12,32	b	B
		7	MSE	43,58	a	A
			CadG1	20,78	b	B
		10	MSE	28,54	a	A
			CadG1	17,98	b	B
12	20	4	MSE	7,02	a	A
			CadG1	5,32	b	A
		7	MSE	11,96	a	A
			CadG1	9,18	b	B
		10	MSE	8,66	a	A
			CadG1	6,60	b	B
	100	4	MSE	18,82	a	A
			CadG1	18,00	a	A
		7	MSE	34,66	a	A
			CadG1	32,98	a	A
		10	MSE	21,16	a	A
			CadG1	20,40	a	A

\* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Tukey. DMS 5% = 0,075 e DMS 1% = 0,098

Para a linhagem MSE, no tempo 0, foi observado, para ambas as concentrações estudadas (20 e 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>), um ajuste linear significativo em relação à bio sorção de cádmio (Prob.> F=0,00014; R<sup>2</sup>=0,52 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=0,196 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5) e também a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,0024; R<sup>2</sup>=1,00 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5). No tempo 4 horas foi constatado, para ambas as concentrações estudadas (20 e 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>), um ajuste linear significativo em relação à bio sorção de cádmio (Prob.> F=0,028; R<sup>2</sup>=0,05 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=0,05 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5) e também a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5). No tempo de 12 horas, constatou-se um ajuste linear significativo para ambas as concentrações estudadas (20 e 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>), em relação à bio sorção de cádmio (Prob.> F=0,028; R<sup>2</sup>=0,11 e Prob.> F=0,003; R<sup>2</sup>=0,018 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5) e também a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5). Em síntese, constatou-se, para todos os tratamentos, que existe diferença entre os valores de pH avaliados e que o pH 7,0 é o que apresenta maior bio sorção de cádmio.

Para a linhagem CadG1, no tempo 0, na concentração de 20 mg Cd.L<sup>-1</sup>, foi observado apenas um ajuste linear altamente significativo, em relação à bio sorção de cádmio, a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00006; R<sup>2</sup>=0,03, Tabela 9 e Figura 5). Para a concentração de 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>, houve um ajuste dos dados a uma regressão linear, assim como também houve um ajuste altamente significativo a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00030; R<sup>2</sup>=0,05 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5). No tempo de 4 horas, observou-se na concentração de 20 mg Cd.L<sup>-1</sup>, apenas um ajuste significativo a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,010; R<sup>2</sup>=0,32, Tabela 9 e Figura 5). Para a concentração de 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>, houve um ajuste altamente significativo dos dados a uma regressão linear, assim como também houve um ajuste altamente significativo a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=0,43 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5). Para o tempo de 12 horas, constatou-se um ajuste significativo, na concentração de 20 mg Cd.L<sup>-1</sup>, a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00004; R<sup>2</sup>=1,00, Tabela 9 e Figura 5). Para a concentração de 100 mg Cd.L<sup>-1</sup>, houve um ajuste significativo dos dados a uma regressão linear, assim como também houve um ajuste altamente significativo a uma regressão quadrática (Prob.> F=0,00233; R<sup>2</sup>=0,02 e Prob.> F=0,00001; R<sup>2</sup>=1,00 respectivamente, Tabela 9 e Figura 5). Todos esses resultados das

análises indicam que, também para a linhagem CadG1, como visto acima para a linhagem MSE, existe diferença de efeito entre os valores de pH avaliados e que a maior biossorção de cádmio foi encontrada no pH 7,0.

Tabela 9 - Regressão polinomial para o efeito de pH, linhagens MSE e CadG1, tempo de residência e concentração sobre a biossorção de cádmio

Linhagem	Tempo (h)	Concentração (mg Cd.L <sup>-1</sup> )	Regressão (Prob.>F)	Equação	R <sup>2</sup> (%)
MSE	0	20	0,00014	y= 0,202 +0,027x	0,52
			0,00024	y= -0,442 +0,237x -0,015x <sup>2</sup>	1,00
		100	0,00001	y= 0,522 +0,051x	0,19
			0,00001	y= -2,035 +0,894x - 0,06x <sup>2</sup>	1,00
	4	20	0,02822	y= 0,378 +0,014x	0,05
			0,00001	y= -1,040 +0,469x -0,032x <sup>2</sup>	1,00
		100	0,00001	y= 1,303 +0,041x	0,05
			0,00001	y= -2,888 +1,406x - 0,09x <sup>2</sup>	1,00
	12	20	0,02822	y= 0,364 +0,014x	0,11
			0,00001	y= -0,620 +0,334x -0,023x <sup>2</sup>	1,00
		100	0,00299	y= 1,108 +0,019x	0,02
			0,00001	y= -2,395 +1,160x - 0,08x <sup>2</sup>	1,00
CadG1	0	20	0,00006	y= -0,552 +0,248x -0,017x <sup>2</sup>	1,00
			0,00030	y= 0,559 +0,025x	0,05
		100	0,00001	y= -1,927 +0,834x - 0,06x <sup>2</sup>	1,00
			0,01087	y= -0,223 +0,142x -0,009x <sup>2</sup>	1,00
	4	100	0,00001	y= 0,522 +0,047x	0,42
			0,00001	y= -0,823 +0,485x -0,031x <sup>2</sup>	1,00
	12	20	0,00004	y= -0,489 +0,260x -0,018x <sup>2</sup>	1,00
			0,00233	y= 1,064 +0,020x	0,02
		100	0,00001	y= -2,442 +1,161 -0,081x <sup>2</sup>	1,00

Rostami e Joodaki (2002), demonstraram que o pH ótimo para remoção de cádmio utilizando biomassa viva de *P. austurianum* foi 3,5 e para a biomassa morta o valor de pH ideal foi 4,0. Para *A. niger* o pH ótimo de remoção do cádmio utilizando biomassa viva foi 4,5 e para a biomassa morta o pH foi 5,0. Del Rio (2004), demonstrou que o melhor pH para biossorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* situa-se entre 5,5 e 6,0 para ambos os estados fisiológicos da biomassa. Huang, Huang, Morehart (1991), estudando a remoção de cádmio por biomassa morta de *A. oryzae*, constataram que o pH ótimo para uma máxima remoção desse metal está entre 7,5 e 8,0. Observa-se que os dados desse último trabalho foram os mais próximos aos constatados no presente estudo.

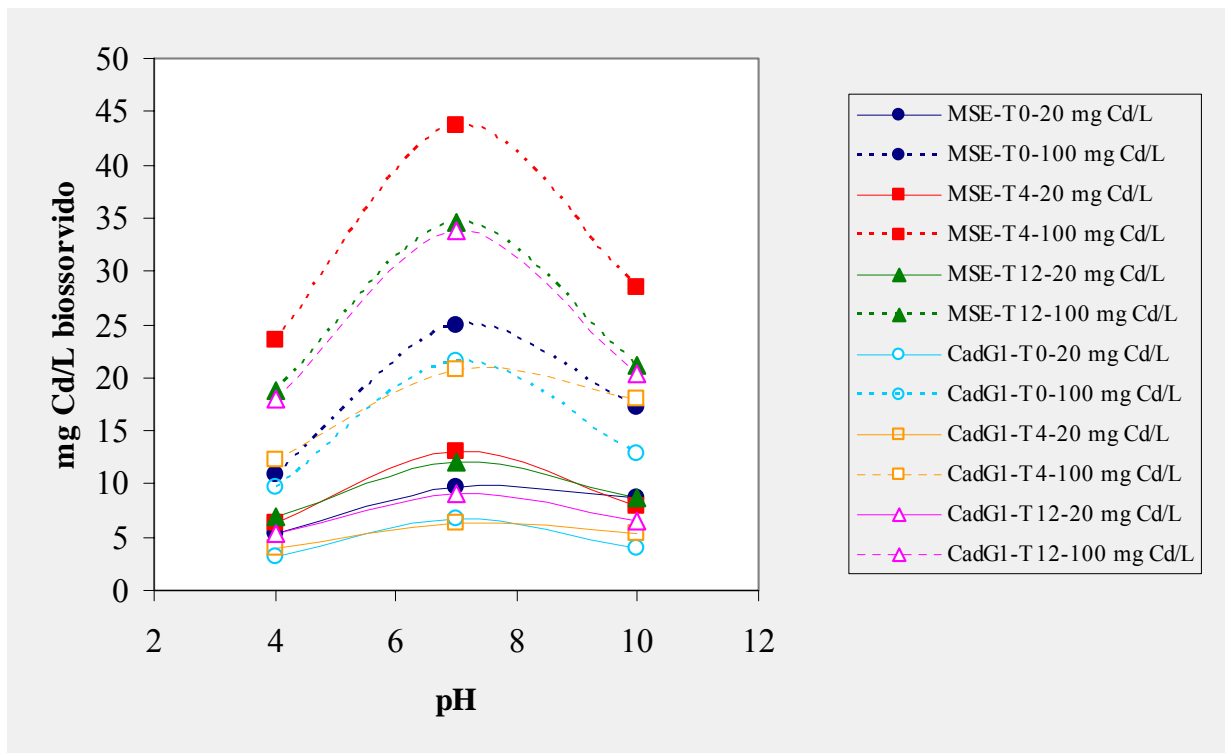


Figura 5 – Padrão de biossorção de cádmio ( $\text{mg Cd.L}^{-1}$ ) para a interação entre todos os fatores (linhagem, tempo de residência, concentração de cádmio e pH)

Em relação à quantidade de proteínas extracelulares nas amostras após o processo de bioadsorção, nos diferentes fatores avaliados (linhagem, concentração de cádmio, tempo de residência e estado da biomassa), observou-se que houve um aumento na concentração das proteínas com o aumento da concentração de cádmio. Para a biomassa viva a concentração de proteínas aumentou com o tempo de residência, enquanto que nos ensaios de bioadsorção utilizando a biomassa morta a concentração de proteínas se manteve constante.

Na Figura 6, observou-se um aumento do total de proteína conforme o tempo de exposição da biomassa viva da linhagem MSE ao cádmio, assim como também houve um aumento de proteínas, bastante evidenciado, com o aumento da concentração desse metal pesado.

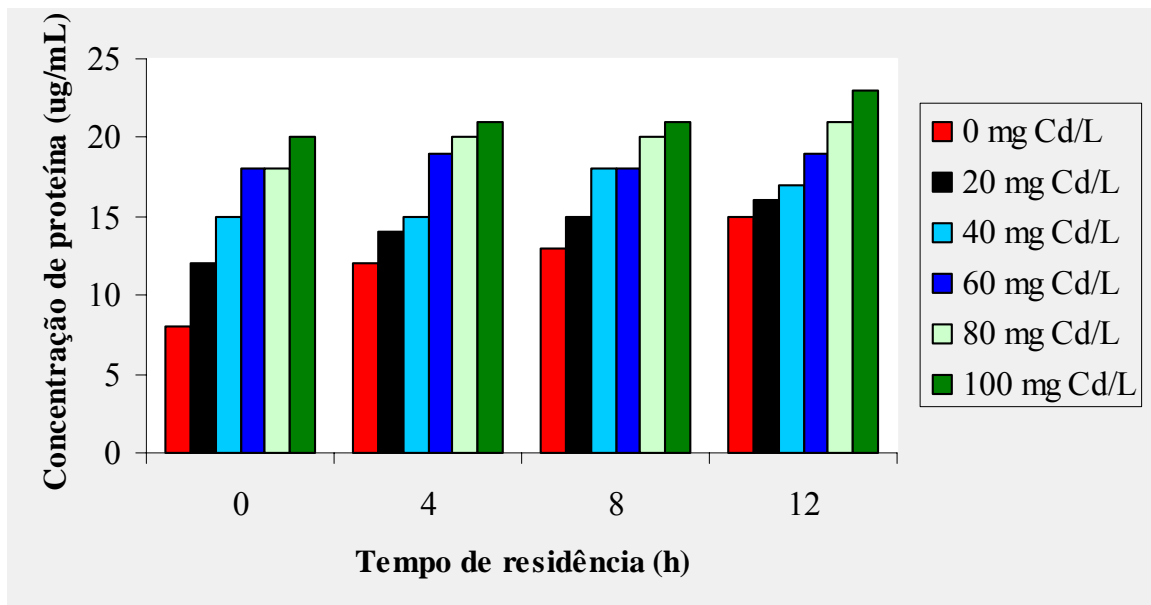


Figura 6 – Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em ensaios utilizando biomassa viva da linhagem MSE nas diferentes concentrações de cádmio

Na Figura 7, ficou evidenciada uma produção de proteínas totais de forma constante entre os tempos de exposição ao metal. Isso se deve ao fato do metabolismo celular não estar em funcionamento.

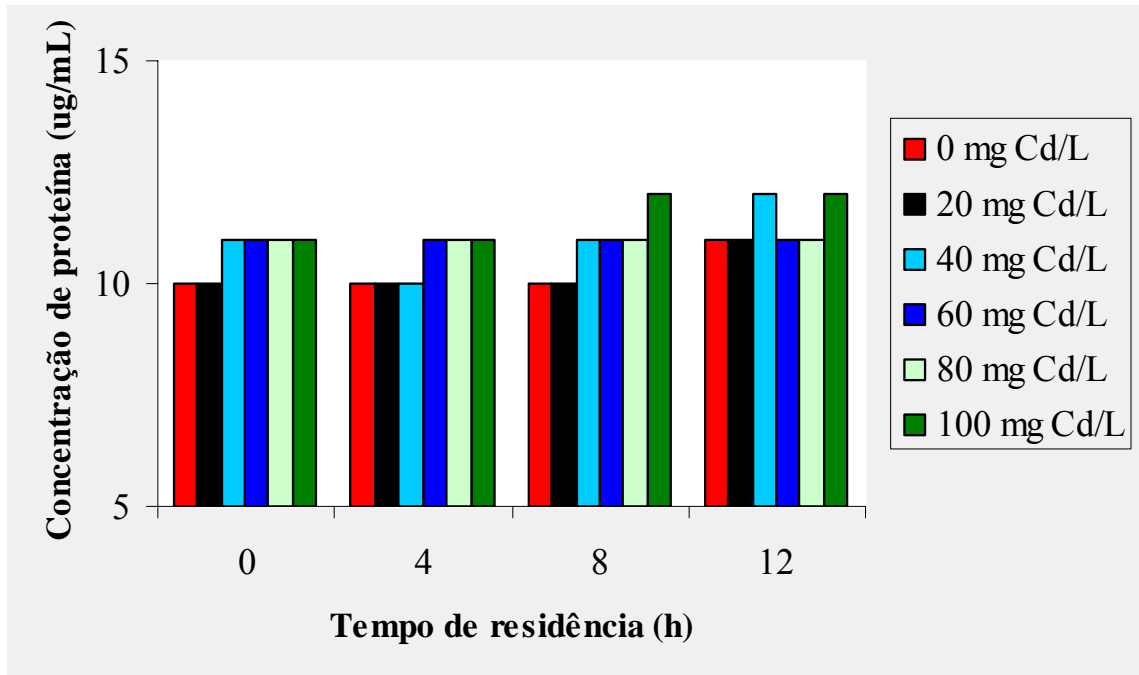


Figura 7 – Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em ensaios utilizando biomassa morta da linhagem MSE nas diferentes concentrações de cádmio

Para a linhagem CadG1, observou-se o mesmo padrão de quantidade de proteínas totais em relação à biomassa viva, a qual apresenta um aumento dessa liberação com o aumento do tempo e também um aumento com o aumento da concentração de cádmio na solução (Figura 8). No entanto, temos que observar que a produção de proteínas totais por esta linhagem é superior à da linhagem MSE, sugerindo uma possível atividade enzimática específica para a resposta de defesa à exposição ao metal pesado.

Na linhagem CadG1 a produção de proteínas totais pela biomassa morta se deu de maneira constante, isso também pelo fato do metabolismo celular não estar ativo. Com uma diferença em comparação a linhagem MSE, já que a linhagem CadG1, no tempo zero, apresentou uma quantidade menor de proteínas totais do que nos demais tempos avaliados (Figura 9).

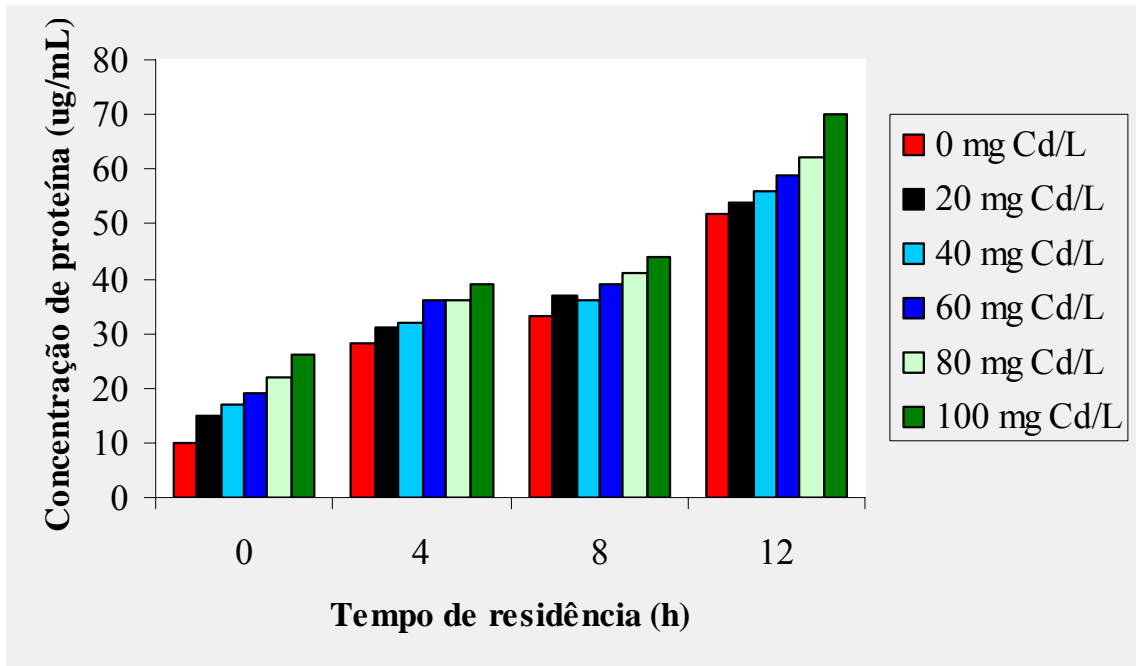


Figura 8 – Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em ensaios utilizando biomassa viva da linhagem CadG1 nas diferentes concentrações de cádmio

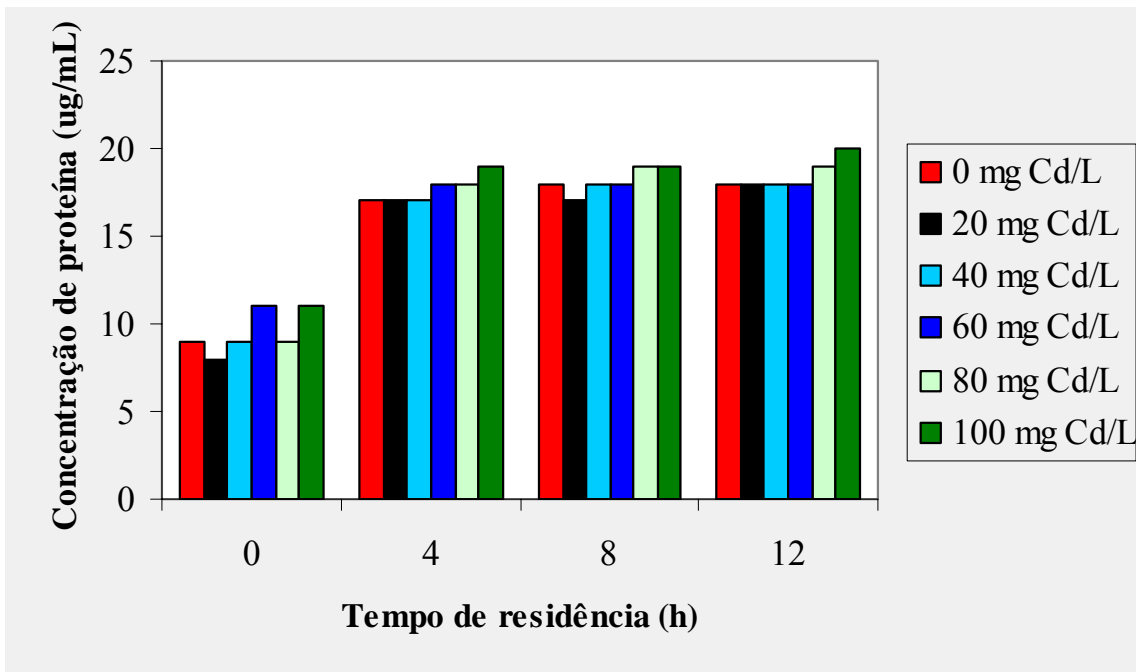


Figura 9 – Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em ensaios utilizando biomassa morta da linhagem CadG1 nas diferentes concentrações de cádmio



A toxidez do cádmio interfere na quantidade de proteínas produzidas após a exposição da biomassa a esse metal. Para a biomassa viva a presença de íons tóxicos tem entre seus efeitos, promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais estimulam a produção de enzimas responsáveis por sua desintoxicação, dentre elas as peroxidases, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), guaiacol peroxidase, metalotioneínas e outras (GUELFİ, 2003; ADAMIS et al., 2003). Segundo Guelfi (2001), a linhagem CadG1 de *Aspergillus* apresentou aumento na quantidade total de proteínas em resposta à exposição ao cádmio. Romandini et al. (1992), também estudando linhagens resistentes à exposição ao cádmio, observou um aumento significativo de proteínas totais, especialmente na linhagem SS1090 de *Saccharomyces cerevisiae*.

O crescente teor de proteína, com o aumento do tempo de residência, pode ser indicado pela ação de processos normais de destoxificação, juntamente com a liberação de proteínas pela biomassa viva e a perda do material citoplasmático em função da ruptura da parede celular em ambos os estados da biomassa devido às altas concentrações do metal nas células.

### 3 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, apresentados e discutidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- O tempo mais eficiente para a obtenção de biomassa, em ambas as linhagens (MSE e CadG1), foi de 24 h.
- A linhagem MSE mostrou-se superior, em relação à CadG1, em termos de capacidade de bioissorção, em todos os tratamentos avaliados, com exceção do tempo de residência de 12 h.
- As biomassas viva e morta não apresentaram diferença estatística significativa entre as médias de bioissorção. No entanto, na interação entre todos os fatores, os estados fisiológicos diferiram estatisticamente, sendo que na maioria dos tratamentos a biomassa morta apresentou maiores índices de bioissorção de cádmio.
- O tempo de residência de 4 horas foi o que apresentou maior eficiência de bioissorção para a linhagem MSE, e para a linhagem CadG1 a maior bioissorção de cádmio foi observada com 12 horas de residência.
- A bioissorção foi maior, em valores absolutos, quanto maior a concentração de cádmio. No entanto, a bioissorção é menor, em valores percentuais, quanto maior a concentração desse metal na solução.
- O pH ótimo para o processo de bioissorção, dentre os estudados, foi 7,0 para ambas as linhagens.
- A concentração de proteínas totais é diferente para os ensaios de bioissorção com biomassa viva e morta (maior quantidade de proteínas totais na biomassa viva) e difere também entre as linhagens (a CadG1 apresentou maior quantidade de proteínas totais).

### 3.1 Considerações finais

O fungo *Aspergillus* sp. apresentou níveis efetivos de bioissorção de cádmio nas condições avaliadas, mostrando-se promissor para uso em processos de remoção desse metal em ambientes líquidos. Em face dos resultados obtidos tornou-se relevante a continuidade dos estudos com este fungo, com avaliação de outras linhagens, localização do metal nas células (por meio de estudos de microscopia eletrônica), estudos de aspectos mais refinados de sua natureza físico-química, efeito da interação com outros metais, monitoramento das enzimas do sistema de defesa antioxidante e proteômica relacionada às mesmas, além de obtenção de mutantes com maior resistência ao metal e maior capacidade de bioissorção. Torna-se relevante, em estudos futuros, avaliar a bioissorção das linhagens em concentrações semelhantes às de ocorrências mais frequentes em águas residuais e contaminadas. Esses estudos permitirão uma caracterização mais profunda dos sistemas metabólicos e genéticos envolvidos no processo de bioissorção de cádmio pelo fungo *Aspergillus* sp e dessa forma, propiciarão o desenvolvimento de sistemas de biorremediação mais eficientes.

## REFERÊNCIAS

ADAMIS, P.D.B.; PANEK, A.D.; LEITE, S.G.F.; ELEUTHERIO, E.C.A. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 55-60, 2003.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cadmium**, Nova York: ATSDR, 2005. 397p.

AMADO FILHO, G.M.; ANDRADE, L.R.; KAREZ, C.S.; FARINA, M. PFEIFFER, W.C. Brown algae species as biomonitors of zinc and cadmium at Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 48, n. 3, p. 213-224, 1999.

ANDRADE, L.R. **Aspectos ultraestruturais da parede celular da alga parda *Padina gymnospora* e sua relação a acumulação de metais pesados**. 2003. 150p. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: Nacional, 1973. 228p.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, Basel, v. 40, n. 2, p. 143-152, 1984.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADY, D.; STOLL, A.D.; STARK, L.; DUNCAN, J.R. Chemical and enzymatic extraction of heavy metal binding polymers from isolated cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 44, n. 3, p. 297-302, 1994.

BREIEROVÁ, E.; VAJCIKAVÁ, I.; SASINKOVÁ, V.; STRATILOVÁ, E. Biosorption of cadmium ions by different yeast species. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 57, n. 7-8, p. 634-639, 2002.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 219-252, 1992.

CARVALHO, C.E.V.; LACERDA, L.D.; GOMES, M.P. Heavy-metal contamination of the marine biota along the Rio de Janeiro coast, Se-Brazil. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 57-58, n. 1, p. 645-653, 1991.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORGBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Cadmium and zinc inductions of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 139-147, 1997.

CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 249-252, 1995.

COOBET, G.P.; SANDS, K.; WATERS, M.; WIXSON, B.G.; DORWARD-KING, E. Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Nova York, v. 19, n. 3, p. 600-607, 2000.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do estado de São Paulo 2000. São Paulo**. São Paulo: 2001a. 73p. (CETESB. Série relatórios).

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Londres, v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997.

DEL RIO, D.T. **Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 1-2, p. 135-142, 1999.

DUDKA, S.; MILLER, W.P. Accumulation os potentially toxic elements in plants and transfer to human food chain. **Journal of Environmental Science and Health – part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, Nova York, v. 34, n. 4, p. 681-708, 1999.

FENG, D.; ALDRICH, C. Adsorption of heavy metals by biomaterials derived from the marine alga *Ecklonia maxina*. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 73, n. 1-2, p. 1-10, 2004.

FOUREST, E.; VOLESKY, B. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metals biosorption by dry biomass of *Sargassum fluitans*. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 30, n. 1, p. 277-282, 1996.

FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. Handbook of the toxicology of metals. **Elsevier**, p. 130-184, 1986.

GADD, G.M.; WHITE, C. Biosorption. **Chemistry and Industry**, Londres, v. 13, n. 2, p.421-426, 1990.

GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 198, n. 1, p. 139-143, 1996.

GARNHAM, G.W.; CODD, G.A.; GADD, G.M. Accumulation of zirconium by microalgae and cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 39, n. 4-5, p. 666-672, 1993.

GELMI, M.; APOSTOLI, P.; CABIBBO, E.; PORRU, S.; ALESSIO, L.; PANEK, A.D. Resistance to cadmium salts and metal absorption by different microbial species. **Current Microbiology**, Nova York, v. 29, n. 6, p. 335-341, 1994.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, Oxford, v. 13, n. 5, p.591-602, 1998.

GIMENO-GARCIA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, Londres, v. 92, n. 1, p. 19-25, 1996.

GOMES, D.S.; FRAGOSO, L.C.; RIGER, C.J.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, E.C.A. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1573, n. 1, p. 21-25, 2002.

GRATÃO, P.L. **Análise da Resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao cádmio**. 2003. 109p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GUELFY, A. **Resposta das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp.** Na presença do metal pesado cádmio. 2001. 60p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GUELFY, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; MOLINA, S.M.G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 63-73, 2003.

GUERINOT, M.L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1465, n. 1-2, p. 190-198, 2000.

HINKLE, P.M.; KINSELLA, P.A.; OSTERHOUDTH, K.C. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 34, p. 16333-16337, 1987.

HUANG, J.P.; HUANG, C.P.; MOREHART, A. Heavy metals in the environmental. **Vernel JP (ed), Elsevier**, Amsterdam, p. 329-349, 1991.

IKEDA, M.; ZHANG, Z.W.; MOON, C.S.; SHIMBO, S.; WATANABLE N.H.; MATSUDA, N.I. Possible effects of environmental cadmium exposure on cadmium function in the Japanese general. Population. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 73, n. 1, p. 15-25, 2000.

IRETSKAYA, S.N.; CHIEN, S.H.; MENON, R.G. Effect of acidulation of high cadmium containing phosphate rocks on cadmium uptake by upland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, n. 2, p. 183-188, 1998.

ITOH, M.; YUASA, M.; KOBAYASHI, T. Adsorption of metal ions on yeast cells at varied cell concentration. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 1167-1169, 1975.

JARUP, L.; BERLUND, M.; ELINDER, C.G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure – a review of literature and a risk estimate. **Scandinavian Journal of Work and Environmental Health**, Helsinki, v. 24, n. 3, p. 1-51, 1998.

JARUP, L.; ELINDER, C.G.; SPANG, G. Cumulative blood-cadmium and tubular proteinuria. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 60, n. 3, p. 223, 1988.



JORDÃO, C.P.; DA SILVA, A.C.; PEREIRA, J.L.; BRUNE, W. Contaminação por crômio de rios provenientes de curtumes em Minas Gerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 47-52, 1999.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption - An Alternative Treatment Option For Heavy Metal Bearing Wastewaters: A Review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 53, n. 3, p. 195-206, 1995.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D.R. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus nidulans*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, n. 1, p. 95-104, 1999.

KEFALA, M.I.; ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A. Biosorption of cadmium ions by Actinomycetes and separation by flotation. **Environmental pollution**, Londres, v. 104, n. 1, p. 283-293, 1999.

KIFF, R.J.; LITTLE, D.R. Biosorption of heavy metals by immobilized fungal biomass. **Immobilization of Ions by Biosorption**, Chichester, UK: H. H. Eccles & S. Hunt. Ellis Horwood, 1986, p. 71-80.

KUBOI, T.; NOGUCHI, A.; YAZAKI, J. Relation ship between tolerance and accumulation characteristics of cadmium in higher plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 104, n. 2, p. 275-280, 1987.

LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 200, n. 2, p. 241-250, 1998.

LEE, K.C.; CUNNINGHAM, B.A.; PAULSEN, G.M.; LIANG, G.H.; MOORE, R.B. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 36, n. 1, p. 4-6, 1976.

LI, Q.; WU, S.; LIU, G.; LIAO, X.; DENG, X.; SUN, D.; HU, Y.; HUANG, Y. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pre-treated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Separation and Purification Technology**, Nova York, v. 34, n. 1-3, p. 135-142, 2004.

LIU, H.L.; CHEN, B.Y.; LAN, Y.W.; CHENG, Y.C. Biosorption of Zn (II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 97, n. 2-3, p. 295-201, 2004.

MAJIDI, V.; LAUDE, D.A.; HOLCOMBRE, J.A. Investigation of the metal algae binding site with  $^{113}\text{Cd}$  nuclear magnetic resonance. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 24, n. 9, p. 1300-1312, 1990.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994. 153p.

MAQUIEIRA, A.; ELMAHADI, H.A.M.; PUCHADES, R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* in flow injection atomic absorption spectrometry for trace metal concentration. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 9, p. 1462-1467, 1994.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. **Comportamento de cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1994. 197p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

McCULLY, K.S.; FORBES, E. Use of p-fluorophenylalanine with master strain of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. **Genetical Research**, Londres, v. 6, n. 3, p. 352-359, 1965.

McGRATH, S.P.; DUNHAM, S.J.; ATKIN, R.K. An extracting science. **Chemistry & Industry**, Londres, v. 22, p. 915-918, 1998.

MORTVEDT, J.J. Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilizers. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 43, n. 1-3, p. 55-61, 1996.

NETO, J.A.B.; SMITH, B.J.; MCALLISTER, J.J. Heavy metal concentrations in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. **Environmental Pollution**, Londres, v. 109, n. 1, p. 1-9, 2000.

PARK, J.K.; LEE, J.W.; JUNG, J.Y. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 33, n. 4, p. 371-378, 2003.

PELCZAR Jr; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.. **PELCZAR Jr, M.; KREID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1996. v.1, cap. 4 , p. 100-143.

PERIN, G.; FABRIS, R.; MANENTE, S.; WAGENER, A.R.; HAMACHER, C.; SCOTTO, S. A five-year study on the heavy-metal pollution of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical. **Water Research**, Nova York, v. 31, n. 12, p. 3017-3028, 1997.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, Nova York, v. 5, p. 141-238, 1953.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; STEWART, C.R. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 4, p. 1597-1605, 1995.

RAVEENDER, V.; SCARIA, S.; VERMA, S.K. Application of Mutant Strains of Cyanobacteria for Cd<sup>2+</sup> Removal. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Nova York, v. 69, n. 3, p. 632-637, 2002.

ROMANDINI, P.; TALLANDINI, L.; BELTRAMINI, M.; SALVATO, B.; MANZANO, M.; DE BERTOLDI, M.; ROCCO, G.P. Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 255-262, 1992.

ROSTAMI, K.; JOODAKI, M.R. Some studies of cadmium adsorption using *Aspergillus niger*, *Penicillium austurianu*, employing an airlift fermenter. **Chemical Environmental Journal**, Boca Raton, v. 89, n. 1-3, p. 239-252, 2002.

SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1427-1433, 1995.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 105, n. 1, p. 39-44, 1999.

SEKHAR, K.C.; SUBRAMANIAN, S.; MODAK, J.M.; NATARAJAN, K.A. Removal of metal ions using on industrial biomass with references to environmental control. **Internacional Journal of Mineral Processing**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 107-120, 1998.

SHIMBO, S.; ZHANG, Z.W.; MOON, C.S. Correlation between urine and blood concentrations, and dietary intake of cadmium and lead among women in the general population of Japan. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 73, n. 3, p. 163-170, 2000.

SHUMATE, S.E.; STRANDBERG, G.W. Accumulation of metals by microbial cells. **Comprehensive Biotechnology**, Nova York, v. 4, p. 235-247, 1985.

SKOWRONSKI, T.; PIRSZEL, J.; SKOWRONSKA, B.P. Heavy metal removal by the waste biomass of *Penicillium chrysogenum*. **Water Quality Research Journal of Canada**, Londres v. 36, n. 4, p. 793-803, 2001.

SMOLEY, C.K. **Metods for determination**. Palo Alto: Boca Raton, 1992. cap. 3, p. 25-32, 1992.

STRANDBERG, G.W., SHUMATE, S.E.; PARROT, J.R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 41, n. 1, p. 237-245, 1981.

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

VIG, K.; MEGHARAJ, M.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganismos and their activeis in soil: a review. **Advances in Environmental Research**, Nova York, v. 8, n. 1, p. 121-135, 2003.

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

VOLESKY, B.; HOLAN, Z.R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, Nova York, v.11, n. 3, p. 235-250, 1995.

VOLESKY, B.; MAY, H.; HOLAN, Z.R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 41, n. 8, p. 826-829, 1993.

YAKUBU, N. A.; DUDENEY, A. W. L. Biosorption of uranium with *Aspevgillus niger*. **Immobilization of Ions by Biosorption**, Chichester, UK: H. H. Eccles & S. Hunt. Ellis Horwood, p. 183-200, 1986.

WAALKES, M.P. Cadmium carcinogenesis in review. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 79, n. 1-4, p. 241-244, 2000.

WAIHUNG, L.; CHUA, H.; LAM, K-H.; BI, S-P. A comparative investigation on the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. **Chemosphere**, Oxford, v. 39, n. 15, p. 2723-2736, 1999.

WHITE, C.; GADD, G.M. Biosorption of radionuclides by fungal biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 331-343, 1990.

ZHAO, X.W.; ZHOU, M.H.; LI, Q.B.; LU, Y.H.; HE, N.; SUN, D.H.; DEMG, X. Simultaneous mercury bioaccumulation and cell propagation by genetically engineered *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 1611-1616, 2005.