



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
FACULDADE DE QUÍMICA

LANNIELE DRIKA CARNEIRO SOUSA

ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ISOLADOS DE UMA
ÁREA DE MINERAÇÃO

Marabá – PA

2022

LANNIELE DRIKA CARNEIRO SOUSA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ISOLADOS DE UMA
ÁREA DE MINERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Licenciatura em Química.

ORIENTADOR: Prof^o. Dr^o. Sebastião da Cruz Silva.

Marabá – PA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Biblioteca Setorial II da UNIFESSPA

S725e Sousa, Lanniele Drika Carneiro
 Estudo do potencial biotecnológico de fungos isolados de
 uma área de mineração / Lanniele Drika Carneiro Sousa. —
 2022.
 64 f.: il. color.

 Orientador (a): Sebastião da Cruz Silva
 Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
 Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas,
 Faculdade de Química, Curso de Licenciatura Plena em Química,
 Marabá, 2022.

 1. Biotecnologia. 2. Tecnologia química. 3. Biorremediação. 4.
 Fungos. I. Silva, Sebastião da Cruz, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 579.55

LANNIELE DRIKA CARNEIRO SOUSA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ISOLADOS DE UMA
ÁREA DE MINERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Faculdade de Química do
Instituto de Ciências Exatas da Universidade
Federal do Sul e Sudeste do Pará, como
requisito para obtenção do grau de
Licenciatura em Química.

Data de aprovação: Marabá (PA), 03 de novembro de 2022.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva (Orientador)

Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA

Prof.ª Dr.ª Simone Yasue Simote Silva (Examinadora)

Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA

Prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino (Examinador)

Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFESSPA

Dedico esse trabalho de conclusão de curso aos meus pais – Oneide Sousa e em especial ao meu pai, Deuzinho (*in memoriam*) por todo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder o dom da vida e permanecer ao meu lado durante toda a minha caminhada, principalmente nos momentos mais difíceis, me dando força e coragem para nunca desistir.

Aos meus pais, Oneide Sousa e Deuzinho Sousa (*in memoriam*) pelo apoio, dedicação, compreensão, amor e força para continuar essa jornada e alcançar todos os nossos objetivos.

Ao meu irmão, Hanniel Yves, o meu estresse diário, entre tapas e beijos, obrigada pelo apoio e por acreditar em mim.

Ao meu namorado e amigo, Michel Monteiro, por ser essa pessoa incrível, sempre me apoiando, dando forças e acreditando no meu potencial com muito carinho e atenção.

Agradeço a minha amiga e parceira, Carlyne Alecrim, apesar de tantos altos e baixos na graduação sempre estivemos juntas, apoiando uma à outra de todas as formas, dentro ou fora do curso, com muito carinho. Uma amizade além dos muros da universidade.

Aos amigos que conquistaram todo meu respeito e admiração, Mattheus, Eivelton, Sandy, Brenda e Airton. Chegamos pessoal ao fim de uma etapa, JUNTOS!

As meninas do laboratório, Hellen, Camylle e Maria Aparecida, por toda parceria, apoio, dedicação ao nosso grupo de trabalho, e as nossas pesquisas.

A Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA), a todo corpo docente e aos técnicos da Faculdade de Química (FAQUIM) e todos os funcionários da instituição, que de uma forma direta ou indireta fazem parte da minha formação. E também, a Universidade Federal do Pará, ao docente Andrey Moacir do Rosário Marinho e sua equipe de pesquisa por todas as contribuições.

Em especial, ao meu orientador, Sebastião da Cruz Silva, que me recebeu de braços abertos, não só com uma grande oportunidade de iniciação científica, mas, também, com uma salvação para minha graduação. Agradeço imensamente ao senhor e a professora Simone Simote, por todos os ensinamentos, apoio, compreensão, dedicação e

carinho. Todo meu carinho, admiração e respeito a vocês, que Deus abençoe a vossa família.

Agradeço a todos que até aqui me ajudaram de alguma forma na construção desta graduação.

E por eu não ter desistido do meu objetivo, do sonho da minha família, especialmente, do sonho do meu pai (*in memoriam*), que estava orgulhoso de sua filha está na universidade. Foi difícil, porém, Deus sempre esteve no comando.

Muito Obrigada!

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.

Josué 1:9

RESUMO

Um das biotecnologias envolvidas na química verde é a biotransformação, que está amplamente ligada às sínteses orgânicas. Logo, o método é alternativo para a produção de compostos bioativos, afirmando – se a redução de reagentes tóxicos. A biotransformação ganhou força na área industrial, principalmente na química e farmacêutica, pelas capacidades de novas rotas metabólicas por um menor custo, utilizando microrganismos. Outra biotecnologia utilizando microrganismo é a biorremediação que buscam meios biotecnológicos para a recuperação da área degradada por contaminantes, ocasionados principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. É uma técnica sustentável que pode ser considerada segura, menos onerosa e agressiva ao meio. Isto posto, o trabalho realizou estudos com as linhagens fúngicas P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁, isoladas da área de mineração. Com intuito de avaliar o crescimento macroscópico no meio de cultura BDA contendo os íons metálicos, Cu²⁺, Pb²⁺ e Cr⁶⁺ nas concentrações 0, 100, 500 e 1000 ppm, após 15 dias. Também foi analisado o potencial de biotransformação da linhagem fúngica P₂Z₂B₁ frente ao substrato S3P. Após todas as análises experimentais, identificou - se que o percentual de inibição de crescimento foi evidente em todos os íons metálicos, principalmente no Cr⁶⁺ com 100% de inibição nas duas linhagens. Em relação aos outros metais pesados, houve a inibição de crescimento em altas concentrações. A análise dos espectros de RMN ¹H observou – se a biotransformação do substrato, estes resultados foram confirmados pela análise de CG-EM, onde foi possível observar no espectro o pico m/z 298, que equivale a massa final do produto, levando-nos a inferir que houve uma reação de redução da ligação dupla. Logo, o trabalho de pesquisa concluiu – se como todos objetivos propostos, nas análises de toxicidade e na biotransformação do substrato sintético S3P.

Palavras-chave: biotecnologias; biorremediação; biotransformação; microrganismo.

ABSTRACT

One of the biotechnologies involved in green chemistry is biotransformation, which is largely linked to organic syntheses. Therefore, the method is an alternative for the production of bioactive compounds, affirming the reduction of toxic reagents. Biotransformation has gained strength in the industrial area, especially in chemistry and pharmaceuticals, by the capabilities of new metabolic routes at a lower cost, using microorganisms. Another biotechnology using microorganisms is the bioremediation that seeks biotechnological means for the recovery of the area degraded by contaminants, caused mainly due to unrestrained population growth and increased industrial activity. It is a sustainable technique that can be considered safe, less expensive, and aggressive to the environment. This being said, this work carried out studies with the fungal strains P₁Z₁M₄ and P₂Z₂B₁, isolated from the mining area. In order to evaluate the macroscopic growth in BDA culture medium containing the metal ions, Cu²⁺, Pb²⁺ and Cr⁶⁺ in concentrations of 0, 100, 500 and 1000 ppm, after 15 days. The biotransformation potential of the fungal strain P₂Z₂B₁ against the substrate S3P was also analyzed. After all the experimental analyses, it was found that the percentage of growth inhibition was evident in all metal ions, especially Cr⁶⁺, with 100% inhibition in both strains. In relation to the other heavy metals, there was growth inhibition at high concentrations. The analysis of the ¹H NMR spectra observed the biotransformation of the substrate, these results were confirmed by the GC-MS analysis, where it was possible to observe in the spectrum the peak m/z 298, which is equivalent to the final mass of the product, leading us to infer that there was a reduction reaction of the double bond. Therefore, the research work was concluded as all the proposed objectives, in the analyses of toxicity and biotransformation of the synthetic substrate S3P.

Keywords: biotechnologies; bioremediation; biotransformation; microorganism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características das hifas dos fungos. (a) As hifas septadas têm paredes cruzadas, ou septos, dividindo a hifa em unidades semelhantes a células. (b) As hifas cenocíticas não têm septos. (c) As hifas crescem pelo alongamento de suas extremidades.....	21
Figura 2 - Esquema geral das etapas para a definição do processo de biorremediação.....	25
Figura 3 - Representação simplificada de uma reação orgânica biocatalítica.....	29
Figura 4 - Setores industriais que mais utilizam processo de biotransformação nos últimos anos.....	30
Figura 5 - Desenvolvimento micelial da linhagem P ₁ Z ₁ M ₄	32
Figura 6 - Desenvolvimento micelial da linhagem P ₂ Z ₂ B ₁	32
Figura 7 - Erlenmeyer contendo o meio de cultura czapek para o experimento de biotransformação.....	37
Figura 8 - Substrato (1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1-(2-metoxi-fenil)-5-(4-metoxi-fenil) -penta-1,4-dien-3-ona (S3P)	38
Figura 9 - Experimento de biotransformação microbiota com o substrato sintético. (a) Primeira etapa: os primeiros três dias em agitação da incubadora shake. (b) Segunda etapa: a adição do substrato SP3, e mais cinco dias na incubadora	39
Figura 10. Crescimento micelial do fungo P ₁ Z ₁ M ₄ com os íons metálicos Pb ⁺² , Cu ⁺² e Cr ⁺⁶ , respectivamente, nas concentrações, 100, 500, 1000 ppm e controle; (a; d; g) 100 ppm; (b; e; h) 500 ppm; (c; f; i) 1000 ppm e (x) controle, após 15dias	41
Figura 11. Crescimento micelial do fungo P ₂ Z ₂ B ₁ com os íons metálicos Pb ⁺² , Cu ⁺² e Cr ⁺⁶ , respectivamente, nas concentrações, 100, 500, 1000 ppm e controle; (a; d; g) 100 ppm; (b; e; h) 500 ppm; (c; f; i) 1000 ppm e (x) controle, após 15dias	43
Figura 12. Média do crescimento micelial da linhagem fúngica P ₁ Z ₁ M ₄ frente aos íons metálicos Pb ⁺² , Cu ⁺² e Cr ⁺⁶ nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm	44

Figura 13 Média do crescimento micelial da linhagem fúngica P ₂ Z ₂ B ₁ frente aos íons metálicos Pb ⁺² , Cu ⁺² e Cr ⁺⁶ nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm	47
Figura 14 - Espectro de RMN ¹ H do substrato (1E, 4E)-1-(2-metoxi fenil)-5-(4-metoxi fenil)-penta-1,4-dien-3-ona (400 MHz, CDCl ₃)	51
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H do produto de biotransformação amostra 26-30 (400 MHz, CDCl ₃)	51
Figura 16 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H do produto de biotransformação amostra 26-30 (400 MHz, CDCl ₃)	52
Figura 17 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹ H do produto de biotransformação amostra 26-30 (400 MHz, CDCl ₃)	52
Figura 18 - Sobreposição dos Espectros de RMN ¹ H do substrato (1E, 4E)-1-(2-metoxi fenil)-5-(4-metoxi fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e do produto de biotransformação 26-30 (400 MHz, CDCl ₃)	53
Figura 19 - Expansão 1 da sobreposição dos espectros de RMN ¹ H do substrato (1E, 4E)-1-(2-metoxi fenil)-5-(4-metoxi fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e do produto de biotransformação 26-30 (400 MHz, CDCl ₃)	53
Figura 20 - Expansão 2 da sobreposição dos espectros de RMN ¹ H do substrato (1E, 4E)-1-(2-metoxi fenil)-5-(4-metoxi fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e do produto de biotransformação 26-30 (400 MHz, CDCl ₃)	54
Figura 21 - Reação realizada pela linhagem fúngica P ₂ Z ₂ B ₁	54
Figura 22 - Espectro de massas do produto de biotransformação	55
Figura 23 - Proposta de fragmentação do produto de biotransformação	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, utilizado para preparar as concentrações 100, 500 e 1000 ppm	34
Tabela 2 - Massa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, utilizado para preparar as concentrações 100, 500 e 1000 ppm	34
Tabela 3 - Massa de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, utilizado para preparar as concentrações 100, 500 e 1000 ppm.....	35
Tabela 4. Efeito das concentrações do íon metálico Cr^{+6} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_1\text{Z}_1\text{M}_4$	45
Tabela 5. Efeito das concentrações do íon metálico Cu^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_1\text{Z}_1\text{M}_4$	46
Tabela 6. Efeito das concentrações do íon metálico Pb^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_1\text{Z}_1\text{M}_4$	46
Tabela 7. Efeito das concentrações do íon metálico Cr^{+6} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$	48
Tabela 8. Efeito das concentrações do íon metálico Cu^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$	49
Tabela 9. Efeito das concentrações do íon metálico Pb^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P ₁ Z ₁ M ₄	Primeiro isolado da profundidade 0-10 cm na concentração de 10 ⁻² crescido no meio Agar-malte
P ₂ Z ₂ B ₁	Primeiro isolado da profundidade 0-10 cm na concentração de 10 ⁻³ crescido no meio BDA
S3P	(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1-(2-metoxi-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
PIC	Inibição do crescimento micelial
CG – EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
CRTE	Crescimento radial da placa controle
p.	Página
<i>d</i>	Dubleto
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Hz	Hetz
δ	Deslocamento químico
<i>dd</i>	Duplo dubleto
UNIFESSPA	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
B.O.D.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
ICM	Índice de crescimento micelial
Eq	Equação

atm	Atmosférico
g	Gramma
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotação por minuto
cm	Centímetro
mL	Milímetro
μL	Microlitro
t	Tripleto
CRT	CRT: Crescimento radial da placa em tratamento
AcOEt	Acetato de Etila
MF	Meio e fungo
MFS	Meio, fungo e substrato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Fungos	20
3.1.1 Biodiversidade e características	20
3.1.2 Aplicação dos fungos na biotecnologia.....	22
3.2 Biorremediação	23
3.2.1 Metais pesados	27
3.3 Biotransformação	29
4. METODOLOGIA	32
4.1 Local de pesquisa	32
4.2 Seleção das linhagens	32
4.3 Avaliação da toxicidade dos metais	33
4.3.1 Preparo do meio de cultivo sólido.....	33
4.3.2 Preparo de meio de cultivo sólido com metais.....	33
4.3.3 Teste de toxicidade.....	35
4.3.4 Análise da inibição do crescimento micelial (PIC)	36
4.4 Biotransformação	36
4.4.1 Síntese dos substratos em estudo	36
4.4.2 Preparação do meio de cultura sólido para o repique do fungo	36
4.4.3 Procedimento para as reações de biotransformações em meio Czapek.....	37
4.4.4 Fracionamento do extrato acetato de etila.....	39
4.4.5 Caracterização dos substratos.....	39
4.4.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	39
4.4.7 Análise Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Análises de toxicidade macroscópica	41
5.2 Análise da inibição do crescimento micelial (PIC)	44
5.3 Biotransformação	50
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as tecnologias que empregam organismos vivos, animais e vegetais, têm salientado como um método renovador, pouco custoso e ecologicamente correto. Deste modo, a biotecnologia ambiental apresenta – se com possibilidades eficientes para reverter os problemas ocasionados pela ação antrópica e os processos produtivos. Além disso, o emprego das técnicas relacionadas com a biotecnologia ambiental é importante para propagar tratamentos alternativos de regeneração ambiental com baixo custo energético (DINIZ; LIMA, 2021).

As ações antrópicas resultam em excessos de contaminantes e toxicidade, que, constantemente, excedem a tolerância do meio ambiente de recuperar - se (DINIZ; PEREIRA; SINÓPOLIS-GIGLIOLLI, 2020). A decorrência dessas atividades pode ser observada tanto nas paisagens naturais, quanto nas agrícolas, onde as mudanças nas condições abióticas expõem negativamente os micróbios, animal e vegetal, e, à saúde humana, a segurança alimentar e a biodiversidade (ZHANG; LI; ZHU, 2018).

A biotecnologia ambiental tem apresentado uma grande visibilidade devido ao seu potencial em auxiliar na prevenção, detecção e remediação da poluição ambiental e a degradação de resíduos, que proporciona a proteção ambiental integralizada e associada ao desenvolvimento sustentável (SINGH, 2017; FLORÊNCIO ET AL., 2019).

Os fungos, são organismos extremamente importantes, pela correlação com a biotecnologia ambiental, pois, são empregados na produção de alimentos, exemplo, produtos fermentados e bebidas alcoólicas, além, da sua contribuição na indústria farmacêutica, nos processos de biodegradação e tratamentos biológicos, desempenhando atividade enzimática e na biotransformação. Os mesmos, ainda são importantes no processo de biorremediação, sendo empregados no equilíbrio de áreas agrícolas e ecológicas, ou seja, degradando substâncias tóxicas (ABREU, ROVIDA & PAMPHILE, 2015).

Os processos de biorremediação ocorrem de forma natural e de baixo custo, e desde o século XX os fungos são empregados nesse papel de biorremediador em áreas contaminadas por metais pesados, esta técnica, evita o uso de ferramentas que ofereçam riscos, proporcionando menor impacto ao meio ambiente (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005; SOARES, et al., 2011).

A aplicação dos microrganismos em processos biotecnológicos é ampla. Outro processo muito utilizado para produções de produtos (compostos) modificados, com a perspectiva de aumentar o leque de substâncias bioativas, são reações de biocatálise ou biotransformação, que são mediadas por enzimas e microrganismos, e representam uma extensão das rotas clássicas de síntese com reduções significativas nos impactos ambientais gerados pelos processos clássicos. Essa biotecnologia é bastante usada de forma eficaz para realizar uma gama de transformações químicas que permitem a preparação de diferentes grupos de compostos orgânicos (SCHAEFER, 2015).

Sendo assim, o estudo com linhagens fúngicas capazes de biorremediar ou biotransformar substâncias químicas, tornou – se uma área muito promissora.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade das linhagens fúngicas, P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁, isoladas da área de mineração, frente a diferentes concentrações de metais pesados e o potencial de biotransformação estrutural do substrato sintético S3P.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar as linhagens fúngicas para o estudo;
- Avaliar o desenvolvimento do crescimento macroscópico das linhagens fúngicas no meio de cultura BDA contendo metais pesados;
- Avaliar o desenvolvimento das linhagens fúngicas em meio de cultura rico em metais pesados;
- Analisar a inibição do crescimento micelial (PIC) das linhagens P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁ frente a metais pesados;
- Avaliar o potencial de biotransformação da linhagem fúngica P₂Z₂B₁ frente ao substrato S3P;
- Analisar por CG – EM e RMN ¹H os possíveis produtos de biotransformação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fungos

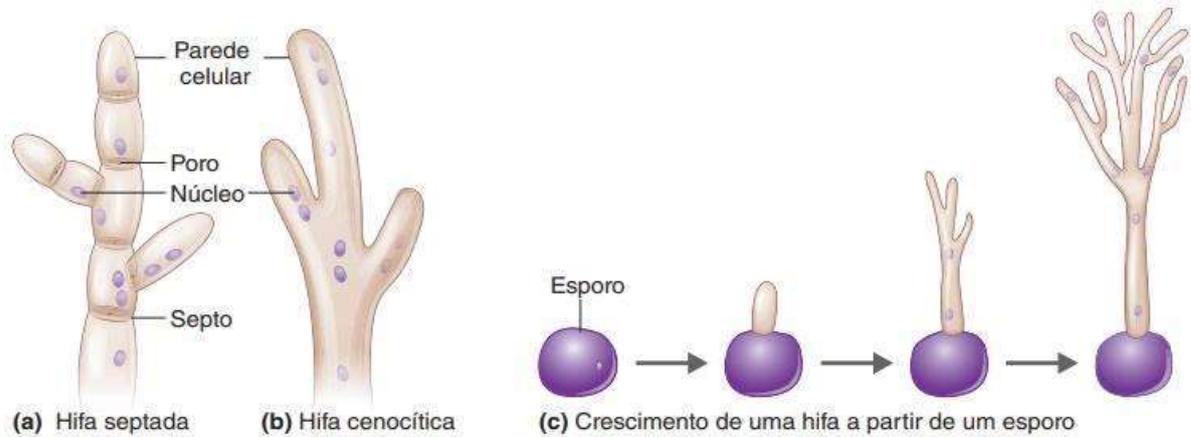
3.1.1 Biodiversidade e características

Os microrganismos, são seres vivos minúsculos que são, em geral, individualmente muito pequenos para serem visualizados a olho nu. O grupo inclui bactérias, fungos (leveduras e bolores), protozoários e algas microscópicas. A tendência é associar esses microrganismos apenas a infecções incômodas, a transtornos comuns, como alimentos deteriorados, ou a outras doenças mais severas. O uso de organismos celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico, e principalmente, os fungos, têm contribuído fundamentalmente com a população nas mais diversas aplicações (SILVA; MALTA, 2017; apud. AZEVEDO, 2011).

Os organismos do Reino Fungi, podem ser unicelulares ou multicelulares, possuindo um núcleo distinto contendo material genético celular (DNA) e são heterotróficos com nutrição absorptiva e reserva energética de glicogênio. Os fungos especialmente, não realizam fotossíntese, e têm paredes celulares compostas principalmente de uma substância denominada quitina (SANTOS, 2015).

Os fungos mais comuns são os bolores ou filamentosos, que consiste na sua morfologia longos filamentos de células conectadas, que são denominadas hifas. As hifas, contêm paredes cruzadas, chamadas septos, que dividem as hifas em unidades semelhantes a células uninucleadas (um núcleo) distintas. Essas hifas são chamadas de hifas septadas (Figura 1a, p.21). Em algumas poucas classes de fungos, as hifas não contêm septos e apresentam como células longas e contínuas com muitos núcleos. São denominadas hifas cenocíticas (Figura 1b, p. 21). Quando um fragmento é quebrado, a hifa é capaz de desenvolver – se novamente (Figura 1c, p. 21) (SANTOS, 2015; TORTORA, FUNKE; CASE, 2017).

Figura 1 - Características das hifas dos fungos. (a) As hifas septadas têm paredes cruzadas, ou septos, dividindo a hifa em unidades semelhantes a células. (b) As hifas cenocíticas não têm septos. (c) As hifas crescem pelo alongamento de suas extremidades.



Fonte: TORTORA, FUNKE; CASE, 2017.

De acordo com Tortora, Funke e Case (2017, p. 322), sobre as hifas aéreas e vegetativas:

A porção de uma hifa que obtém nutrientes é chamada de hifa vegetativa; a porção envolvida com a reprodução é a hifa reprodutiva ou aérea, assim chamada porque se projeta acima da superfície do meio sobre a qual o fungo está crescendo. [...] Quando as condições ambientais, se tornam favoráveis, as hifas crescem e formam uma massa filamentosa, chamada de micélio, visível a olho nu (TORTORA, FUNKE; CASE, 2017, p. 322).

Os fundamentos da classificação taxonômica dos fungos estão relacionados, principalmente, a reprodução sexuada. Contudo, quando a forma de reprodução sexuada não é observada, a classificação é baseada na reprodução assexuada. O processo reprodutivo assexuado pode ocorrer por fragmentação das hifas do micélio ou por esporos assexuais produzidos por mitose nas próprias hifas ou a partir de hifas especializadas (OLIVEIRA, 2014).

Alguns fungos são saprófitos, ou seja, fazem o papel de reciclagem da matéria orgânica, liberando nutrientes para serem absorvidos por seres produtores. Outros fungos são simbiotes, onde estabelecem relações harmônicas com outros seres vivos que podem ser plantas, algas ou cianobactérias. Outros, ainda podem estabelecer relações desarmônicas, parasitas, prejudicando-os, ou provocando doenças (EVERT, et al., 2014).

3.1.2 Aplicação dos fungos na biotecnologia

Os fungos são organismos muito importantes, não somente devido a seu papel vital no ecossistema, mas também por causa da sua influência sobre os seres humanos e em atividades relacionadas. Logo desempenham um papel crucial pela produção de alimentos, nos produtos para saúde e na reciclagem de compostos da biosfera. Alguns fungos são comercializados, enquanto outros são potencialmente valiosos em biotecnologia (ABREU, ROVIDA & PAMPHILE, 2015).

Um dos fatores que têm maior impacto no meio ambiente são as atividades de mineração (LOZANO, 2006). A exploração dessas áreas, degradam a vegetação natural, devido à grande movimentação, ocasionando um grande acréscimo no volume de rejeitos. Em alguns casos, a perturbação da vegetação, eleva o nível de metais pesados no solo, causando distúrbios no local, afetando os microrganismos, vegetação e os processos funcionais do ecossistema (SILVA et al., 2001).

Processo que controla esse distúrbio é a biorremediação que utiliza - se de microrganismos, plantas ou enzimas para tratar ambientes contaminados. Foi demonstrado que os fungos podem degradar poluentes xenobióticos nocivos (ABEDINZADEH et al., 2018). De acordo com Zhang et al. (2018), Além de remediar, os fungos ainda são capazes de aumentar e melhorar a biodegradação dos agroquímicos, e que a combinação de dois ou mais fungos (co-remediação) geralmente aumenta a eficiência do tratamento.

O estudo de microrganismos vem contribuindo com grandes esforços para a reabilitação das áreas degradadas com metais pesados e, assim, possibilitar o retorno da funcionalidade e estabilidade do ecossistema. Os metais pesados e seus compostos podem interagir com os fungos de várias maneiras, dependendo das características do metal, organismo e do ambiente (ANDRADE et al., 2009). Alguns metais pesados podem ser tóxicos quando presentes em altas concentrações e em formas disponíveis, podendo ser acumulados pelos fungos (SANTIAGO, 2006).

A capacidade oxidativa e redutiva dos fungos, já são conhecidas há muito tempo e são utilizadas em reações preparativas. Modelos microbianos têm sido utilizados em estudos de biotransformação enantiosseletiva de muitos fármacos. O uso do microrganismo é vantajoso

uma vez que apresentam um crescimento rápido e de fácil formação do sistema multienzimático (FORTES, 2013).

3.2 Biorremediação

O aparecimento de áreas degradadas no Brasil tem aumentado significativamente ao longo dos anos, causando muitos danos ao meio ambiente. Na maioria dos casos, a degradação está associada às atividades humanas como mineração (acúmulos de minério estéril, e barragens de rejeitos), fundição, indústrias eletrônicas, têxteis e petroquímicas, consumo de combustíveis fósseis (FERNANDES; SILVA, 2021). Um estudo realizado por Zhang et al. (2019), detectou uma relação significativa entre as concentrações totais de Zn, Cu, Cd, As e Ni nos solos agrícolas em 58 minas abandonadas de ferro, cobre e chumbo-zinco na China, mostrando que após a retirada/exploração de minérios, o solo fica extremamente afetado.

Para o tratamento de áreas degradadas, com metais tóxicos, desenvolveu-se uma forma de “limpar” o ambiente natural, chamada de biorremediação (GAYLARDE, BELLINASSO; MANFIO, 2005). A Biorremediação é o processo pelo qual são utilizados microrganismos, como algas, bactérias, fungos e recentemente macrófitas na degradação de contaminantes, que ganhou destaque na década de 90, em detrimento às técnicas tradicionais, em relação a custo benefício. Algumas espécies têm se destacado como potenciais auxiliares na degradação de poluentes nos ambientes solo e/ou água, como exemplo as bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* e *Achromobacter*, que apresentaram capacidade de degradar petróleo e seus derivados (FERREIRA, 2020).

Os solos contaminados com íons metálicos podem ser remediados por técnicas biológicas ou físicas, e agrupadas em duas categorias: *ex-situ*, que requerem a remoção do solo contaminado para tratamento dentro ou fora do local e *in-situ*, que remedia sem a escavação do solo contaminado (KHAN et al. 2000). Nos últimos anos as técnicas *in-situ* é mais recomendada, pois fornecem menores riscos ao meio ambiente e economicamente mais viável (VERÂNE et al., 2020). Assim várias técnicas vêm sendo utilizadas, para remoção de metais pesados do solo, dentre estas, pode-se destacar a utilização microrganismos.

Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos interagem com os metais no solo, destacando-se dois: a mobilização e a imobilização (LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019).

A mobilização dos metais consiste na ação de microrganismos com capacidades de converter um metal de um estado insolúvel inicial, correspondente a uma fase sólida, para um estado solúvel final em fase aquosa (LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019).

Já a imobilização, por sua vez, consiste na ação de microrganismos que irão converter um metal em estado solúvel, em fase aquosa, para um estágio insolúvel, em fase sólida. Apesar desse método não remover totalmente os metais pesados lançados no ambiente, ele é considerado uma das principais formas de proteger lençóis freáticos e cadeias alimentares da ação nociva dos metais pesados. Na imobilização, se destacam dois mecanismos básicos: a bioissorção e a bioacumulação (LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019).

Na bioissorção, os microrganismos interagem com o metal pesado presente no meio ambiente através de componentes da sua parede celular, ou ainda outras estruturas externas da sua membrana, sem, no entanto, gastar energia, podendo assim ocorrer tanto com o uso de organismos vivos ou mortos. Dessa forma, o metal associa-se a estrutura do microrganismo, tendo sua concentração reduzida no meio ambiente (LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019).

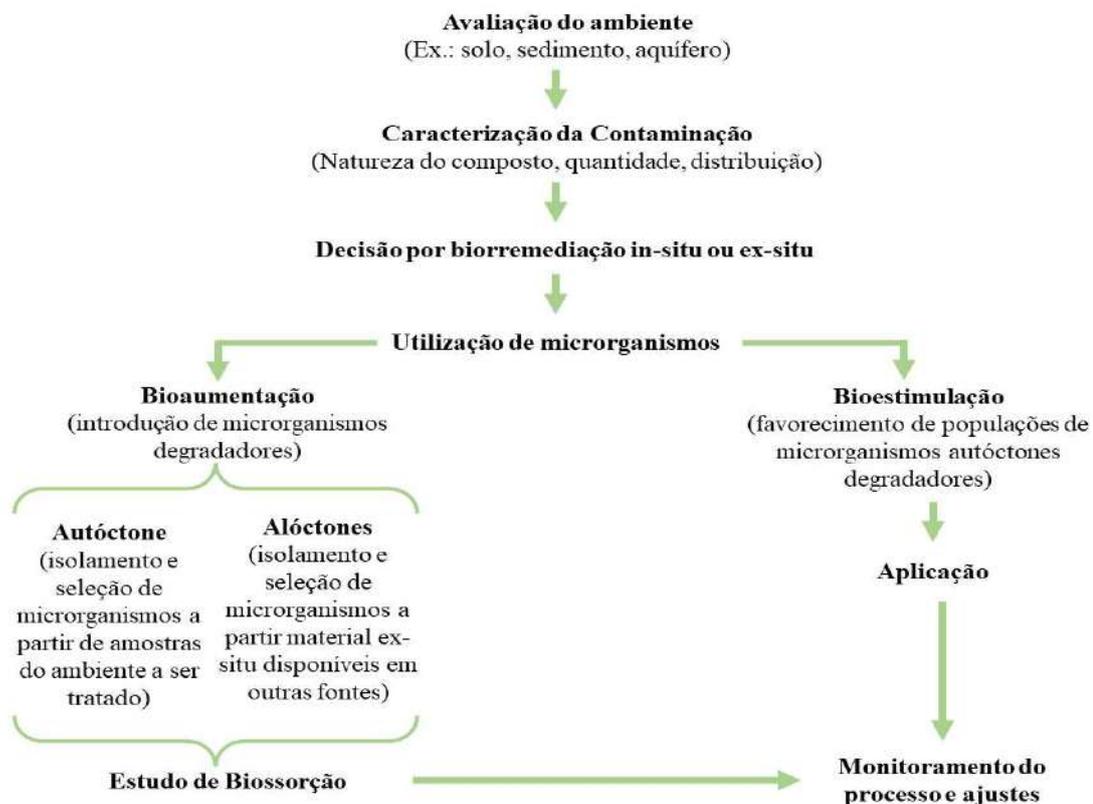
Já na bioacumulação, ocorre um transporte do metal de fora para dentro do microrganismo através da sua membrana celular, sendo necessário um gasto de energia e ocorrendo, desse modo, somente em organismos vivos. Ao final do processo, há uma acumulação do metal dentro do microrganismo, reduzindo, portanto, os impactos ambientais da poluição e contaminação por esses elementos (LACERDA; NAVONI; AMARAL, 2019).

As estratégias para a remoção de metais podem envolver a bioissorção (uso de biomassa viva ou morta, livre ou imobilizada, onde os organismos podem estar absorvendo ou adsorvendo o metal), precipitação (em presença de sulfetos solúveis), complexação (na parede ou em materiais extracelulares) e enzimas (redução ou oxidação do metal para formas menos tóxicas ou atóxicas), entre outras (CAMARGO et al., 2007).

A biorremediação é um ramo em expansão da biotecnologia ambiental (GAAD, 2000) que utiliza agentes biológicos para reduzir o impacto de áreas quimicamente poluídas (Santos et al., 2018). Que emprega técnicas capazes de degradar, mobilizar, mineralizar, transformar ou remover agentes contaminantes do meio ambiente através de organismos vivos (LIM, et al., 2016).

De acordo com Azubuike, Chikere e Okpokwasili (2016), a escolha do melhor método para biorremediação deve estar centralizada na natureza do agente poluente, o tipo de ambiente contaminado, a localização e o nível de contaminação (Figura 2). E os microrganismos utilizados podem ser autóctones ou alóctones. Os autóctones são isolados e selecionados a partir de amostras do próprio ambiente a ser tratado. Por outro lado, os alóctones são adquiridos em meio de cultura e outras fontes. Além disso, é importante o conhecimento dos fatores abióticos (textura do solo, o teor de oxigênio, a temperatura, o teor de nutrientes, pH) para o sucesso da biorremediação em solos diferenciados (AGUILAR, 2018).

Figura 2 - Esquema geral das etapas para a definição do processo de biorremediação.



Fonte: CONICELLI, 2017.

Esta técnica é considerada eficaz por apresentar menor custo e maior eficiência na remoção dos poluentes. E a escolha depende das características do solo e dos contaminantes. Já que levando em consideração que os processos físico-químicos são caros e pouco amigáveis, a biorremediação microbiana é uma técnica econômica e ambientalmente correta para a remediação de solos com metais pesados, além de minimizar o contato com o contaminante (MISHRA et al., 2017; HAIDER, et al., 2021).

Todavia, áreas degradadas por influência de rejeito de mineração, são diferentes por exemplo de área de vinicultura, tanto fisicamente quanto quimicamente, logo, deve considerar – se a área de descontaminação. Áreas de rejeito são áreas com substrato, totalmente desestruturada e imprópria para o desenvolvimento de organismos, pois apresentam baixas concentrações de nutrientes e altas concentrações íons metálicos (ANDREAZZA et al., 2013).

Em relação a eficiência dos microrganismos, o Megharaj et al., (2011), diz – que

Em comparação a outros organismos vivos capazes de degradar poluentes orgânicos, os microrganismos são os agentes preferenciais para desempenhar a função de restauradores da qualidade ambiental, devido a alguns aspectos principais. Dentre eles estão sua natureza ubíqua, sua ampla diversidade genética e catalítica e capacidade de atuação sob condições ambientais extremas (MEGHARAJ et al., 2011).

Algumas linhagens fúngicas são conhecidas por tolerar e desintoxicar metais por vários mecanismos. Existem várias vantagens no uso de fungos em detrimento de outros microrganismos, como, algas e bactérias, na descontaminação do ambiente. Os mesmos são mais versáteis em relação à amplitude de substratos que podem usar (IRAM et al., 2012).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), as rotas metabólicas da degradação dependem de um conjunto de fatores determinados pela estrutura química funcional do composto, da capacidade do microrganismo em promover a degradação e do ambiente, como tipo de solo, local alcançado pelo composto, que pode ser de difícil acesso pelo microrganismo, bem como as condições desse ambiente para o organismo envolvido.

As características morfológicas e de crescimento dos fungos são responsáveis pela rápida colonização de substratos. Também têm a vantagem de serem relativamente fáceis de cultivar, sendo, assim, ideais para a produção em larga escala. Outra vantagem é a facilidade

de separação da biomassa fúngica por filtração, devido à sua estrutura filamentosa. Em comparação com leveduras e bactérias, fungos filamentosos são menos sensíveis a variações de nutrientes, aeração, temperatura e pH (LEITÃO, 2009).

O método de biorremediação biológica visa biodegradar, desintoxicar, ou remover o contaminante nocivo de uma matriz ambiental, através da aplicação de microrganismos com capacidade de metabolizar o metal pesado (MOREIRA, et al., 2016). Em geral, a biorremediação em áreas degradadas com metais pesados usa um conjunto de outras técnicas, como lavagem de solo e fitoextração, para promover a solubilização de metais pesados antes da extração (LIU et al., 2018).

No entanto, não pode se esperar que a ação dos fungos, bactérias, plantas, etc., ou seja, os microrganismos sejam imediatos, uma vez que todos os seres vivos têm suas ações condicionadas às próprias condições do local afetado. Os fungos em si, apresentam grande potencial de adaptação à presença de metais pesados em áreas degradadas, resultando uma atividade notória na recuperação do solo contaminado (GAAD, 2000).

3.2.1 Metais pesados

O solo é visto como um meio complexo responsável por várias funções ambientais, como atividade biológica, manutenção da biodiversidade, sustentabilidade, produtividade, entre outros (CETIM, 2017; SCOPETANI et al., 2022). Nos países de grande aumento populacional relacionado ao seu desenvolvimento, as atividades antrópicas e a industrialização ocorrem rapidamente sem regulamentação vigorosa para controlar a exploração do meio (ABD AL-KHODOR; ALBAYATI, 2020, DANGI, 2019).

Essas atividades antrópicas sucedem na liberação de poluentes orgânicos e inorgânicos, como: metais pesados, fertilizantes químicos e pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos e de petróleo, etc. (XIANG et al., 2022). Um dos elementos nocivos ao solo são os metais pesados, que representa um grande problema global, pois abrange mais 50% dos 10 milhões de áreas degradadas, ou seja, ultrapassam o nível de referência (LIU et al., 2018).

Dessa forma, o aumento dessas áreas se deve à falta de conhecimento e leis mais rígidas e proteção ao meio ambiente. Na mineração todas as etapas causam impactos ambientais, desde a abertura, a averiguação até a mina fechada, após sua exploração, com

danos à vegetação, à paisagem, aos recursos hídricos, à fauna e ao solo (FIGUEIREDO, 2000).

Os elementos químicos presentes na natureza, são fundamentais para o organismo humano por exemplo, ferro (Fe) e zinco (Zn), no entanto sua toxicidade se dá pelo acúmulo destes no ambiente (solo), provenientes da degradação natural das rochas. Devido ao acúmulo destes nos solos, estes são considerados os principais agentes contaminantes do meio ambiente, provenientes dos resíduos agrícolas, área de mineração e indústrias (FERREIRA, 2020).

Os produtos químicos, como os metais pesados, pesticidas, solventes clorados, entre outros, têm sido identificados em diversos recursos naturais, tais como o solo, a água e o ar (MANSOUR; GAD, 2010). Dentre esses poluentes, os metais pesados, é o grande motivo de preocupação para saúde humana, por seu alto nível de toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (LIU et al., 2018; LIM; SCHOENUNG, 2010).

De acordo com Abreu et al., (2001) os principais metais pesados presente no solo e nos produtos de manuseios da agricultura são: Cromo (Cr), cobalto (Co), cádmio (Cd), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb), estanho (Sn) e zinco (Zn). Muitos desses íons metálicos formam complexos estáveis, mesmo em pequenas quantidades, podendo ocasionar prejuízos aos animais e vegetais.

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram realizadas para gerenciar a poluição ambiental causada por materiais perigosos, como elementos tóxicos que podem ser deletérios (YAASHIKAA et al., 2022). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2017), os metais de cádmio, cromo, cobalto, cobre, chumbo, níquel, mercúrio e zinco são considerados preocupantes, mesmo presentes em níveis residuais, são tóxicos e prejudiciais tanto para a flora quanto para a fauna (MAHAJAN; KAUSHAL, 2018).

Alguns dos riscos à saúde humana associados à toxicidade de metais pesados são distúrbios cardiovasculares, efeitos neurológicos, problemas gastrointestinais, insuficiência renal e efeitos carcinogênicos (SHARMA et al., 2016). No entanto, alguns metais como o cromo, o cobre e o zinco, são fundamentais como componentes funcionais e estruturais dos seres vivos (BENITE et al. 2007; BISINOTI et al. 2004).

3.3 Biotransformação

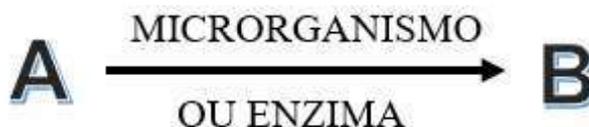
As reações de biotransformação ou biocatálise são ferramentas da biotecnologia da química verde, amplamente utilizadas em síntese orgânica. Este tipo de processo faz uso de enzimas purificadas ou células íntegras, como células microbianas livres ou imobilizadas, e destaca-se como uma tecnologia suplementar útil da indústria química, viabilizando em alguns casos, reações que não são facilmente dirigidas pela química orgânica clássica ou, em outros casos, incrementando reações que podem substituir etapas químicas severas (VASIC-RACKI, 2006; HERNÁIZ et al., 2010; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017).

A biotransformação tem constituído uma área de pesquisa em prospecção ao longo dos anos. Nestes tem sido empregadas enzimas de várias fontes, ou seja, microrganismos, células animais e vegetais, para realizar reações em posições quimicamente inacessíveis de compostos orgânicos (naturais ou sintéticos) (ZAFAR et al., 2012).

O processo de biotransformação compreende a conversão estrutural de determinada substância química, denominada de substrato, catalisadas por microrganismos, que ao final do procedimento dar origem a outra substância ou modifica consideravelmente as atividades biológicas do substrato (SANTOS, 2017). Ainda possuem atributos benéficos, como a versatilidade reacional, especificidade, redução no número de etapas no processo e alto rendimento (PERKIS; SIDDIQUI; DEMAIN, 2015; apud. CORTEZA; CASTRO; ANDRADE, 2017).

O processo de biotransformação é diferente da fermentação comum em que determinada substância é completamente sintetizada por determinado microrganismo através das diversas rotas metabólicas do microrganismo envolvido. De acordo com a Figura 3, ao realizar pequeno número de modificações em substâncias orgânicas, geralmente apenas uma reação química está envolvida (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

Figura 3 - Representação simplificada de uma reação orgânica biocatalítica.

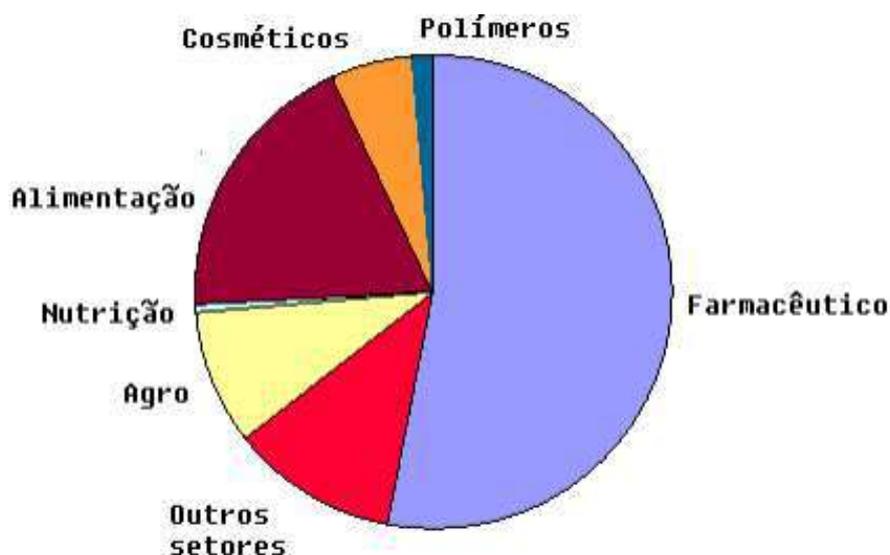


Fonte: OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012.

A biotransformação é um parâmetro alternativo com um ótimo potencial para a produção de novos compostos bioativos, evidenciando o uso reduzido de reagentes tóxicos, como medida que favorece o meio ambiente e ganha cada vez mais destaque (CAO et al., 2015). Recentemente, esse processo tem ganhado reconhecimento no meio industrial, destacando - se a química e a área farmacêutica, devido a possibilidade da criação de novas rotas metabólicas, por um menor custo, além de permitir a realização de reações que improvavelmente seriam obtidas de outra forma (POLLARD; WOODLEY, 2006).

Segundo Straathof et. al. (2002), os processos de biotransformação em nível industrial têm apresentado um grande avanço nos últimos anos, evidenciando um grande aumento de processos utilizados. Na Figura 4, verificar que o setor industrial farmacêutico foi que mais empregou os processos de biotransformação.

Figura 4 - Setores industriais que mais utilizam processo de biotransformações nos últimos anos.



Fonte: STRAATHOF et al., 2002.

À vista disso, estudos nesta área tem acarretado investigação a respeito do uso de microrganismo para ocasionar mudanças em substâncias químicas (FABER, 2011; SULTANA, 2018).

Nos processos de biotransformações, na área da biotecnologia, o uso de microrganismo como os fungos, são bastantes usados, devido sua capacidade de produzirem

uma grande diversidade de substâncias químicas, em virtude ao rápido crescimento e metabolismo, além, de serem utilizados como biocatalizadores (PETERSEN, 2006).

A aplicação da biocatálise, vem por volta de 1858, por Luís Pasteur, realizados pelo estudo do fungo *Penicillium glaucum*, onde foi possível aplicação do microrganismo na biotransformação para obter o L-tártaro de amônio de DL-tártaro de amônio. Os outros fungos filamentosos empregados frequentemente de acordo com a literatura em processos de biotransformação são: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Mucor* e *Beauveria* (CAVALCANTE, 2016).

De acordo com Labes e Wendhausen (2008), as reações dos processos de biotransformação estão correlacionadas a modificações de compostos químicos por meio do metabolismo de seres vivos, de modo que essas reações ocorram com alta especificidade, alta seletividade e que não agridam de forma severa o meio ambiente.

4. METODOLOGIA

4.1 Local de pesquisa

O trabalho foi realizado nos laboratórios de ensino, análises químicas e microbiologia, pertencentes a Faculdade de Química, da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, em Marabá, Pará.

4.2 Seleção das linhagens

Os fungos foram selecionados da micoteca do Laboratório Microbiologia da Faculdade de Química – UNIFESSPA. Para realização do estudo de toxicidade de metais pesados selecionou-se as linhagens fúngicas de código, P₁Z₁M₄ (Primeiro isolado da profundidade 0-10 cm na concentração de 10⁻² crescido no meio agar-malte), Figura 5, e a linhagem P₂Z₂B₁ (Primeiro isolado da profundidade 0-10 cm na concentração de 10⁻³ crescido no meio BDA), Figura 6, isolada do rejeito de mineração.

Figura 5 - Desenvolvimento micelial da linhagem P₁Z₁M₄.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 6 - Desenvolvimento micelial da linhagem P₂Z₂B₁.



Fonte: Autor, 2022.

4.3 Avaliação da toxicidade dos metais

A metodologia empregada para analisar a toxicidade de metais pesados teve como embasamento os trabalhos de conclusão de curso dos autores ALVES (2017), MARQUES (2018) e SILVA (2018). Logo, as linhagens P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁, isoladas em área de mineração, onde existem altas concentrações de metais pesados, assim pode-se avaliar o possível comportamento das cepas em meio de cultivo contendo diferentes concentrações dos sais metálicos.

4.3.1 Preparo do meio de cultivo sólido

Para o cultivo das linhagens fúngicas, utilizou – se o meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), seguindo as seguintes proporções 24 g de batata inglesa, 2,4 g de dextrose e 2,04 g de ágar com 120 mL de água destilada. Em seguida, autoclavou – se por 15 minutos, à temperatura de 120 °C e pressão 1 atm. Após o processo de esterilização, verteu – se o meio BDA nas placas de petri na capela de fluxo laminar (Veco@), previamente esterilizadas. Posteriormente foram colocadas na incubadora B.O.D. (Cientec@) à temperatura 30±2°C durante 24 horas, para descartar possível contaminação das mesmas.

Após o período de incubação, inoculou – se discos de micélios das linhagens fúngicas com auxílio do bisturi estéril, previamente flambado e submergido em álcool 70%, todo o processo foi realizado em triplicata. Logo após as placas de petri serem vedadas com papel filme, foram armazenadas na incubadora B.O.D. (Cientec@) à temperatura 30±2°C, por 7 dias.

4.3.2 Preparo de meio de cultivo sólido com metais

Para o cultivo das linhagens fúngicas em meio de cultura enriquecido com sal metálico, preparou – se a solução inicial com 240 g de batata inglesa, 24 g de dextrose e 20,4 g de ágar com 1200 mL de água destilada em um Erlenmeyer de 2000 mL. Posteriormente, transferiu – se 120 mL da solução inicial para um Erlenmeyer de 250 mL para obtenção da solução controle, e os 1080 mL foi utilizado para o preparo da solução com diferentes concentrações dos metais, para ambas a linhagens.

Em seguida, após determinar a massa do sal necessária para preparar as concentrações dos íons metálicos, Pb²⁺, Cu²⁺ e Cr⁶⁺, realizou – se o preparo das soluções com massa

específica de cada sal metálico, previamente calculado, para um volume de 120 mL, nas concentrações de 100 ppm, 500 ppm e 1000 ppm.

Para a preparação das soluções, a quantidade de sal metálico variou de acordo com a massa molecular, fundamentada na Equação 1, onde a concentração máxima e o volume possuem valores pré-estabelecidos.

$$C = \frac{m \text{ (massa do soluto)}}{V \text{ (volume da solução)}} \quad \text{eq. (1)}$$

Nas tabelas 1, 2 e 3 (p. 35), tem – se a quantidade de sal metálico utilizado nas concentrações 100, 500 e 1000 ppm, dos metais cobre, chumbo e cromo e a respectiva quantidade de metal contida nesta quantidade de sal utilizado.

Tabela 1 - Massa de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, utilizado para preparar as concentrações 100, 500 e 1000 mg/L.

Concentração em ppm (g/mL)	Massa do sal metálico (g)	Massa do metal (g)	Volume (mL)
100	0,00959	0,006	25
500	0,04795	0,03	25
1000	0,09590	0,06	25

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 2 - Massa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, utilizado para preparar as concentrações 100, 500 e 1000 mg/L.

Concentração em ppm (g/mL)	Massa do sal metálico (g)	Massa do metal (g)	Volume (mL)
100	0,01507	0,006	25
500	0,07535	0,03	25
1000	0,15070	0,06	25

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 3 - Massa de $K_2Cr_2O_7$, utilizado para preparar as concentrações 100, 500 e 1000 mg/L.

Concentração em ppm (g/mL)	Massa do sal metálico (g)	Massa do metal (g)	Volume (mL)
100	0,01697	0,006	25
500	0,08486	0,03	25
1000	0,16973	0,06	25

Fonte: Autor, 2022.

Após preparar as soluções, estas foram transferidas para Erlenmeyers de 50 mL, vedados com “bonecas” (algodão envolvido com gaze), e cobertos com papel kraft, evitando – se o contato com o meio externo.

Realizou–se a esterilização do material, autoclavando–os por 15 minutos, à temperatura de 121 °C e pressão 1 atm. Após esse processo, o meio foi vertido em placas de petri, previamente esterilizadas. As mesmas foram incubadas na B.O.D. por 24 horas para verificação de interferentes no meio de cultivo (contaminantes).

4.3.3 Teste de toxicidade

Para o cultivo das linhagens fúngicas em placas de petri contendo metal pesado, foi adicionado disco de micélio da linhagem fúngica no centro das placas de petri contendo meio de cultura BDA enriquecido com o sal metálico, além, das placas controle (o branco). As mesmas foram armazenadas na incubadora B.O.D. (Cientec@) com temperatura controlada de 30 ± 1 °C. Todo o experimento foi realizado em triplicata. O crescimento do fungo nas placas de Petri foi monitorado durante 15 dias, após esse período mediu – se o diâmetro de crescimento micelial a partir do ponto de inoculação ou centro da colônia.

O procedimento de inoculação do fungo nas placas foi realizado em capela de fluxo laminar (Veco@), previamente esterilizada com álcool 70%, seguida de exposição à luz ultravioleta por 30 minutos. Todo este procedimento foi realizado próximo a chama do bico de Bunsen para evitar contaminação nas placas.

4.3.4 Análise da inibição do crescimento micelial (PIC)

A avaliação do desenvolvimento micelial da linhagem fúngica, foi analisada de acordo com a concentração de cada metal através do crescimento radial obtido a partir das medidas do diâmetro do micélio do fungo após 15 dias. A inibição do crescimento micelial (PIC) foi calculada pela Equação 2, descrita por Edgington, Khew e Barron (1971) e modificada por Menten e colaboradores (1976).

$$\%PIC = \frac{CRTE - CRT}{CRTE} \times 100 \quad eq (2)$$

Onde,

PIC: Inibição do crescimento micelial;

CRTE: Crescimento radial da placa controle (cm);

CRT: Crescimento radial da placa em tratamento (cm).

4.4 Biotransformação

4.4.1 Síntese dos substratos em estudo

O substrato utilizado nesse trabalho foi obtido via síntese da pesquisa de Bitencourt et al. (2020) e com embasamento na dissertação de Silva (2019), na Universidade Federal do Pará-Campus Belém.

4.1.2 Preparação do meio de cultura sólido para o repique do fungo

Para realizar o experimento de biotransformação foi utilizado somente a linhagem P₂Z₂B₁, a mesma foi reativada em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar).

Em um frasco de Erlenmeyer de 100 mL, foram utilizados 12 g de batata inglesa, 1,2 de dextrose, 1,02 g de ágar e 60 mL de água destilada para a preparação do caldo para o meio de cultura. Em seguida, o meio foi esterilizado, juntamente com as placas de Petri embaladas em papel kraft, em autoclave (Prismatec) à temperatura de 121°C, à pressão de 1 atm por 15 minutos.

Após a esterilização do meio de cultura e das placas de Petri, foram levadas para a capela de fluxo laminar (Veco@), onde realizou-se o plaqueamento. Com a solidificação do meio, as placas foram armazenadas na incubadora B.O.D. (Cientec@) por 24 horas para descartar contaminação, em seguida inoculou-se disco de micélio do fungo P₂Z₂B₁ nas placas, todo o procedimento foi realizado em triplicata. As placas de Petri, foram armazenadas na incubadora B.O.D. (Cientec@) por um período de 7 dias, para posterior repique em meio Czapek.

4.4.3 Procedimento para as reações de biotransformações em meio Czapek

Para o experimento de biotransformação, preparou-se 1200 mL de meio Czapek, que foram distribuídos em seis Erlenmeyer (500 mL), ou seja, foram adicionados 200 mL em cada frasco (Figura 7). Posteriormente, os frascos foram autoclavados, à temperatura de 121°C, à pressão de 1 atm por 15 minutos.

O caldo Czapek foi preparado utilizando as seguintes proporções:

- 3,0 g/L de nitrato de sódio (NaNO₃);
- 0,5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO₄);
- 0,5 g/L de cloreto de potássio (KCl);
- 0,01 g/L de sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO₄.7H₂O);
- 0,5 g/L de fosfato de potássio (K₂HPO₄);
- 30,0 g/L de sacarose (glicose)
- 20,0 g/L de extrato de levedura.

Figura 7 - Erlenmeyer contendo o meio de cultura czapek para o experimento de biotransformação.

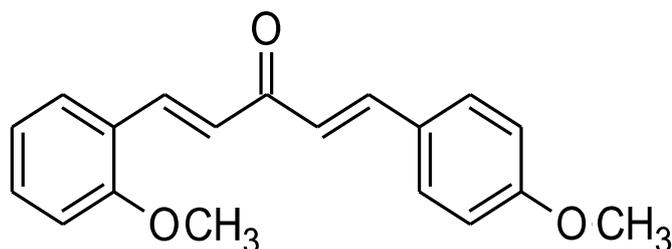


Fonte: Autor, 2022.

Após esterilização, deixou-se os Erlenmeyer com o meio Czapek, atingir a temperatura ambiente, para em seguida serem levados para capela de fluxo laminar (Veco@), previamente esterilizada. Adicionou-se fragmentos de micélios do fungo P₂Z₂B₁ em 4 frascos de Erlenmeyer. Os frascos foram codificados como: Meio (M), Meio + Fungo (MF), Meio + Fungo + Substrato (MFS) e Meio + Substrato (MS).

Com a adição do micélio, os seis Erlenmeyer foram levados à incubadora Shake (SOLAB) à temperatura de 32°C e 150 rpm. Após três dias, solubilizou-se 30 mg do substrato S3P (Figura 8) em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionou-se nos frascos de Erlenmeyer MFS e MS (controle). A reação ficou no Shake por mais 05 dias (Figura 9, p.39). Após os oito dias de experimento, realizou-se a filtração à vácuo, obtendo-se dois materiais: o micélio e o filtrado (fase aquosa). O micélio foi descartado e a fase aquosa foi utilizada na obtenção dos extratos.

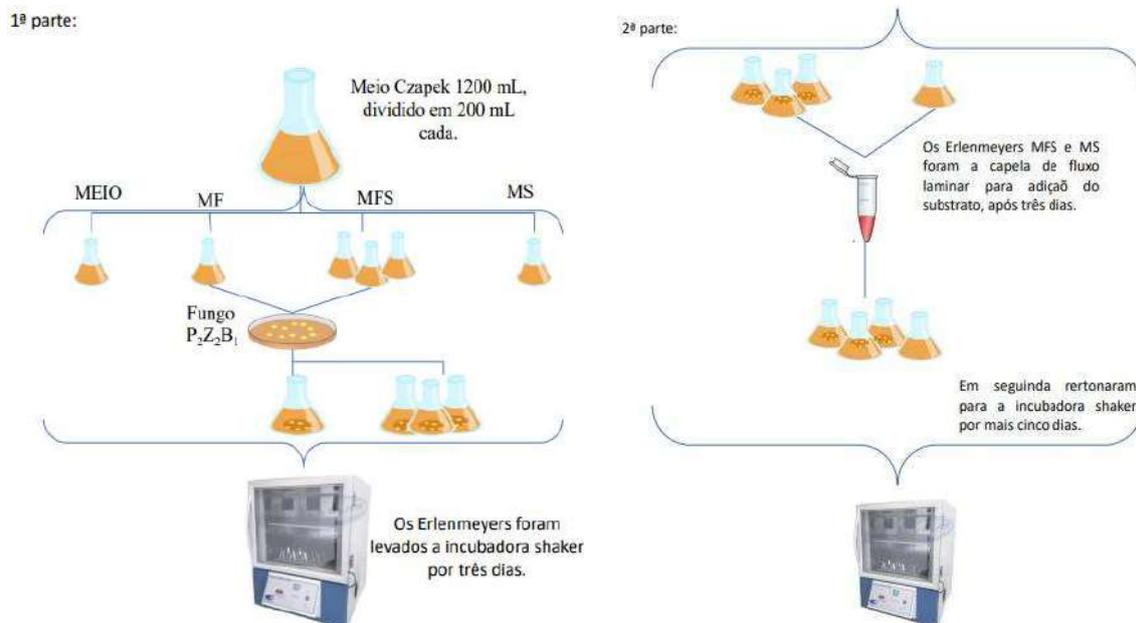
Figura 8 - Substrato (1*E*,4*E*)-1-(2-metoxi-fenil)-5-(4-metoxi-fenil)-penta-1,4-dien-3-ona (S3P).



Fonte: SILVA, 2019.

Para obtenção dos extratos realizou-se uma partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt) (3 x 100 mL) com as soluções aquosas. Posteriormente, as fases aquosas foram descartadas e as fases acetato de etila foram concentradas em evaporador rotativo (QUIMIS®) para obtenção de nove extratos brutos na fase AcOEt.

Figura 9 - O processo de biotransformação microbiota com o substrato SP3. (a) Primeira etapa: os primeiros três dias em agitação da incubadora Shake. (b) Após os três dias, a adição do substrato SP3, e mais cinco dias na incubadora.



Fonte: Autor, 2022.

4.4.4 Fracionamento do extrato acetato de etila

Após obtenção dos extratos secos, o extrato MFS foi fracionado em coluna cromatografia, tendo como fase estacionária sephadex LH-20 e como fase móvel metanol, tendo-se ao final 10 frações, estas frações foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada, utilizado como padrão o S3P com a finalidade de avaliar em quais destas frações teríamos os possíveis produto de biotransformação.

4.4.5 Caracterização dos substratos

Os extratos foram caracterizados com análises no CG-EM (Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

4.4.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise por cromatografia gasosa do produto de biotransformação foi realizada no Laboratório de Análise Químicas da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – Unifesspa. O equipamento utilizado foi um CG-EM Shimadzu, operando

no modo de impacto eletrônico (70 eV) e com coluna capilar Rtx5ms (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme da fase estacionária). O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 8.2371 psi e velocidade de 36.623 cm/s. O forno interno do equipamento foi programado para iniciar em 70 °C, objetivando toda a evaporação do solvente durante 5 minutos, a temperatura foi aumentada à taxa de 7 °C/min até atingir 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. O tempo total da corrida foi de 31 minutos. As temperaturas do injetor e da interface do detector foram de 200°C e 280°C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1,0 µL com razão de split 10:1, fluxo de 1,0 mL/min. A faixa de massas selecionada foi de m/z 45-450.

4.4.7 Análise Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As frações analisadas na CCD que possivelmente, tinham o produto de biotransformação, foram submetidos à análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. As análises foram realizadas em aparelho de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Ascend 400 operando a 400 MHz da Universidade Federal do Pará.

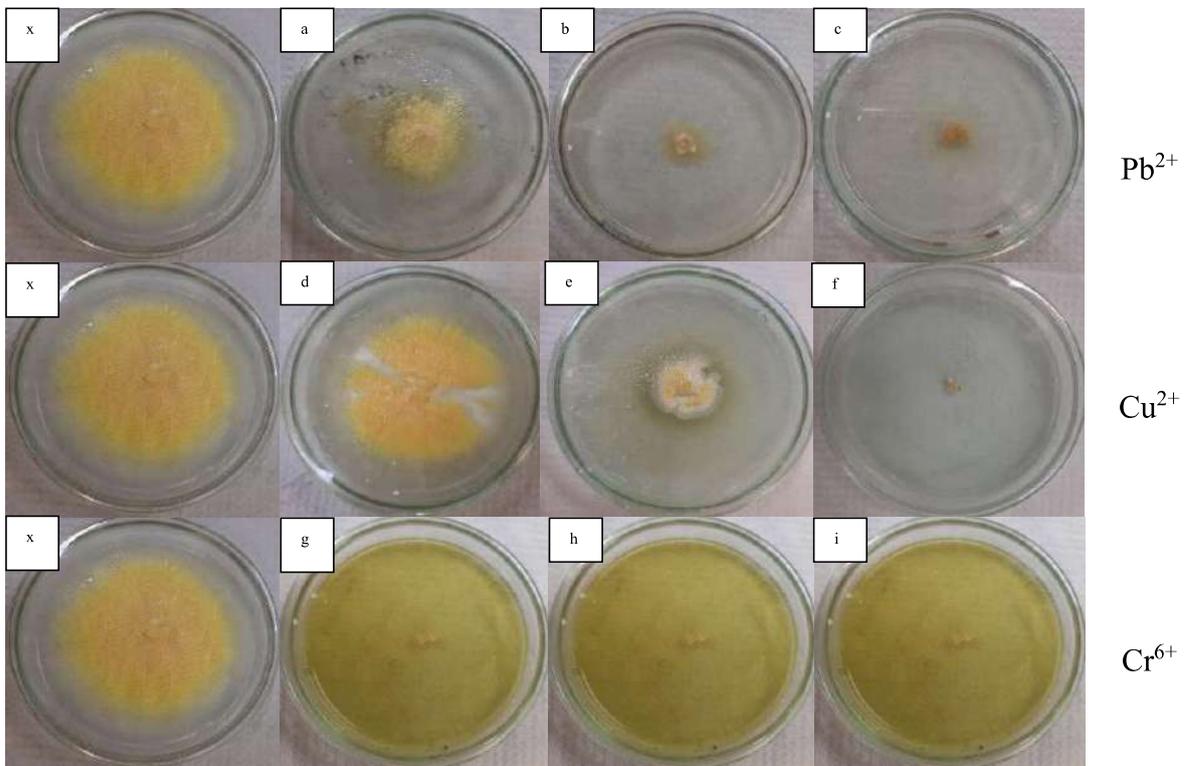
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises de toxicidade macroscópica

Nas análises de toxicidade das linhagens fúngicas P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁, foi observado que as mesmas responderam de maneira diferenciada quando expostas aos meios de cultura contendo diferentes concentrações de íons metálicos.

Na Figura 10, trata – se do crescimento micelial macroscópico do P₁Z₁M₄ cultivada placas de petri, contendo meio BDA enriquecidas com os íons metálicos Pb⁺², Cu⁺² e Cr⁺⁶ respectivamente. A placa com a linhagem fúngica P₁Z₁M₄ sem adição dos íons metálicos, é ilustrada na Figura 10, portanto, nas Figuras 10 (a, b, c, d, e, f, g, h, i) são as placas com inóculos enriquecidas com os metais pesados, nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm, respectivamente, após 15 dias de incubação.

Figura 10 - Crescimento micelial do fungo P₁Z₁M₄ tratada com os íons metálicos Pb⁺², Cu⁺² e Cr⁺⁶, respectivamente, nas concentrações controle, 100, 500 e 1000 ppm. (x) controle; (a; d; g) 100 ppm; (b; e; h) 500 ppm (c; f; i) 1000 ppm após 15 dias.



Fonte: Autor, 2022.

Pode - se observar que diante ao metal Pb⁺² (Figura 10a) na concentração de 100 ppm, houve uma inibição de crescimento após os 15 dias de incubação, e nas concentrações de 500

(Figura 10b, p. 41) e 1000 ppm (Figura 10c, p. 41), além da inibição de crescimento notório comparada com a placa de controle (Figura 10x, p. 41), apresentou um escurecimento da pigmentação do micélio. De acordo com Vale e colaboradores (2011), são comuns mudanças em espécies fúngicas quando submetidas à presença de metais.

Na Figura 10 (d; e; f, p. 41), o meio foi enriquecido com íon de Cu^{+2} , onde alterou consideravelmente o crescimento da linhagem nas concentrações de 500 (Figura 10e, p. 41) e 1000 ppm (Figura 10f, p. 41), pois observa-se a inibição em 500 ppm e, também, não foi constatada nenhuma hifa em desenvolvimento na concentração de 1000 ppm após os 15 dias de experimento. Os resultados obtidos por Martins (2009) com a espécie *Penicilium*, mostra que a espécie só desenvolveu – se em baixas concentrações, resultados similares a esse encontrado.

Diferenciando dos demais metais, os íons de Cr^{+6} , inibiu o crescimento micelial do fungo em todas as concentrações comparado com a placa de controle. Correlacionando o crescimento radial da placa em tratamento com o trabalho de Leal (2018) com o fungo $\text{R}_2\text{1B}_1$ onde observou-se que a espécie apresentou um bom crescimento nos meios que continham o íon metálico cromo, um crescimento maior do que na placa de controle (meio de cultura sem metal), ou seja, o metal favoreceu o crescimento do fungo $\text{R}_2\text{1B}_1$.

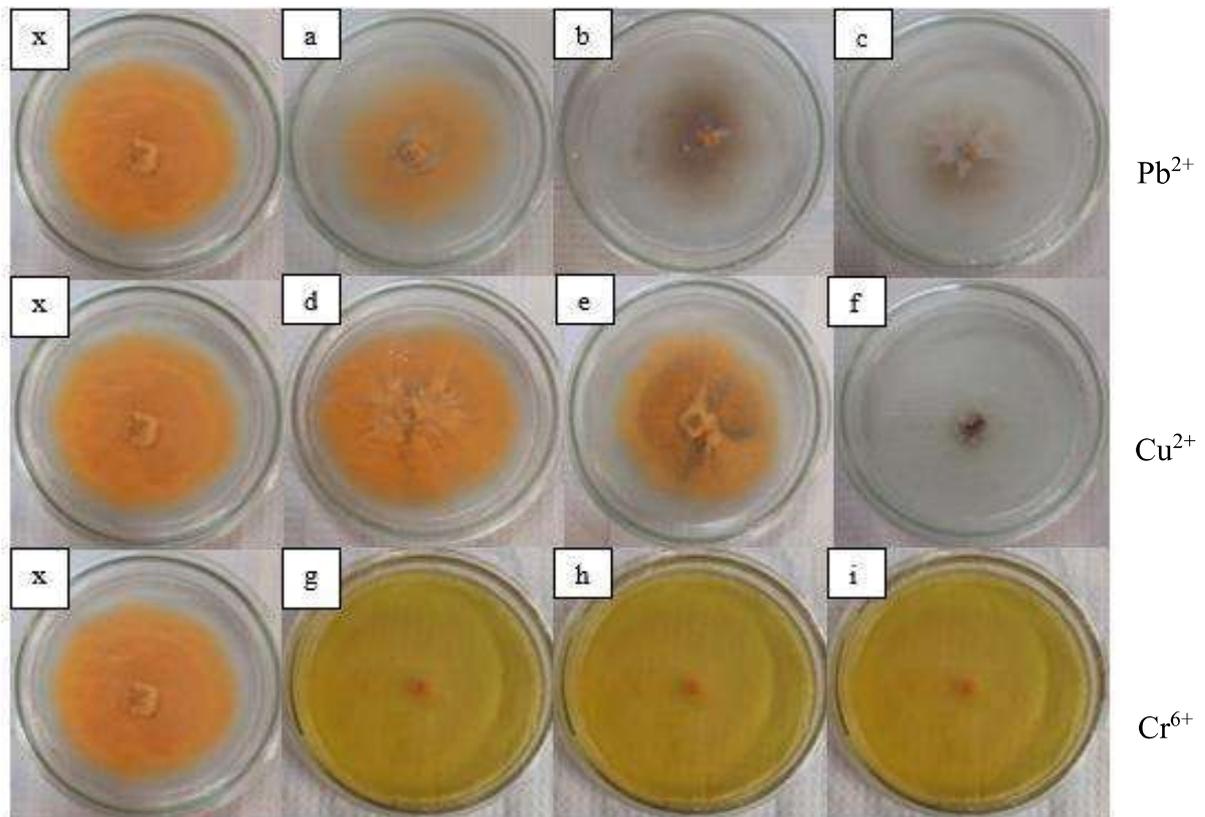
Na Figura 11 (p. 43) são ilustradas as placas com meio de cultura BDA com inóculo da linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$, após 15 dias de incubação. A placa sem adição dos íons metálicos, é ilustrada na Figura 11x, conseqüentemente, nas Figuras 11 (a, b, c, d, e, f, g, h e i, p. 43) são as placas com inóculos enriquecidas com os íons metálicos, nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm, respectivamente.

Para as concentrações de 500 e 1000 ppm do Pb^{+2} (Figura 11a; b; c, p. 43) observa – se um escurecimento na pigmentação das hifas aéreas e vegetativas. Apesar, que na placa de petri com concentração de 100 ppm apresentou, aparentemente, a mesma morfologia fúngica da placa controle, a partir desta concentração observa-se a inibição micelial. Vale e colaboradores (2011), ainda afirma que o fungo pode apresentar adaptação à concentração do metal.

Já as placas de petri contendo o íon metálico cobre (Figura 11d; e; f, p. 43), o crescimento radial da placa de petri foi significativo nas concentrações de 100 (Figura 11d, p.

43) e 500 ppm (Figura 11e). Logo, as concentrações não foram tóxicas para a linhagem fúngica. No entanto, para a concentração de 1000 ppm foi tóxica. Afere-se que o cobre é um elemento essencial para o crescimento de fungos, podendo atuar como um cofator enzimático, onde é essencial para a respiração e desintoxicação de radicais livres (ANTSOTEGI-USKOLA et al., 2020). Entretanto, em altas concentrações resultará em toxicidade.

Figura 11 - Crescimento micelial do fungo $P_2Z_2B_1$ tratada com os íons metálicos Pb^{+2} , Cu^{+2} e Cr^{+6} , respectivamente, nas concentrações controle, 100, 500 e 1000 ppm. (x) controle; (a; d; g) 100 ppm; (b; e; h) 500 ppm (c; f; i) 1000 ppm após 15 dias.



Fonte: Autor, 2022.

Na figura 11 (g; h; i) o crescimento radial nas placas de petri enriquecido com o íon Cr^{+6} inibiram totalmente o desenvolvimento micelial em todas as concentrações da linhagem fúngica $P_2Z_2B_1$. De acordo com o estudo de Ferreira (2020) os microrganismos apresentam capacidade de adaptação aos ambientes diversos, que toleram concentrações superiores a 10.000 mg/L de Cr (VI), no entanto, o fungo em estudo, $P_2Z_2B_1$, não se desenvolveu frente ao metal cromo em concentrações bem abaixo da de Ferreira (2020).

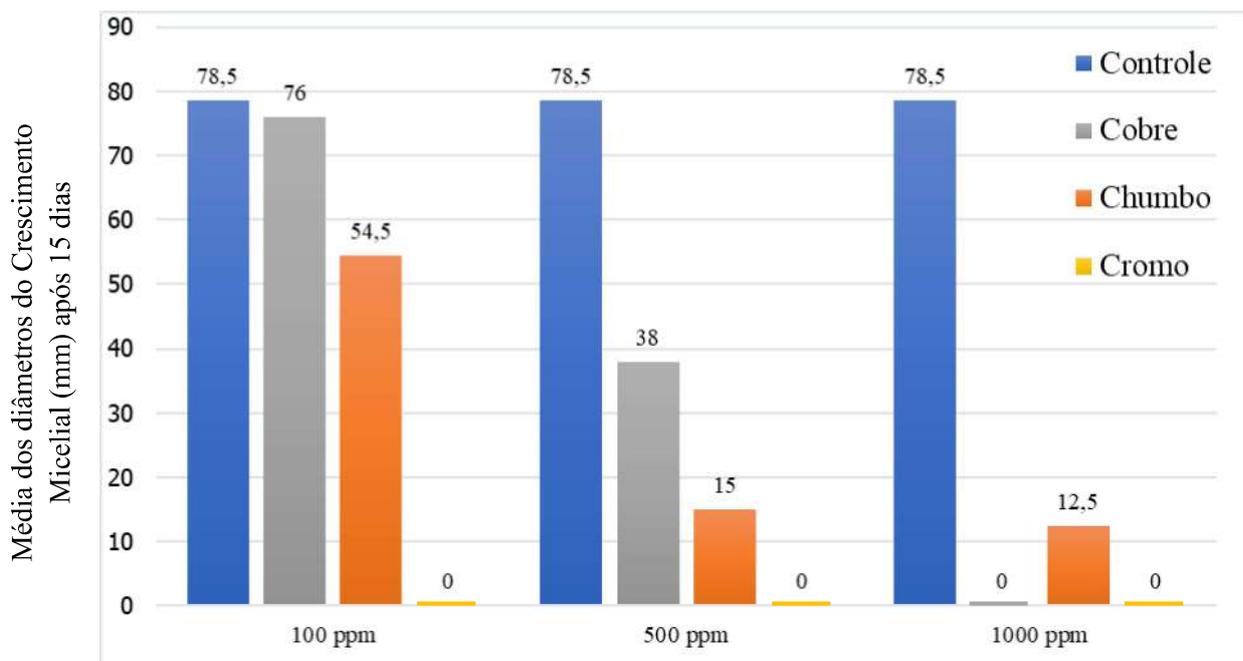
Ezzouhri e colaboradores (2009) afirmam que as diferentes capacidades de resistir à toxicidade por metais diversos deve ser devido à presença de diferentes processos de tolerância ou mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos.

Os trabalhos realizados por Bruins et al. (2000), relata que o desenvolvimento dos microrganismos, morfologia, metabolismo, formação ou destruição da membrana celular são influenciados pelos metais pesados. Isso justifica o fato dos fungos na presença de grandes concentrações de metais pesados, apresentarem formas diferentes comparados com a placa controle, já que existem algumas alterações em seu meio.

5.2 Análise da inibição do crescimento micelial (PIC)

Quando avaliado o efeito “fungitóxico” frente aos metais pesados, de acordo com o aumento das concentrações, verifica-se uma redução do ICM (índice de crescimento micelial). Na Figura 12, tem-se a média dos diâmetros do crescimento micelial em milímetro após os 15 dias de incubação. Destaca – se que na linhagem fúngica P₁Z₁M₄, o cobre em 100 ppm possui a capacidade de adaptar – se ao meio, porém em altas concentrações, é visível a redução no ICM.

Figura 12 - Crescimento miceliais da linhagem fúngica P₁Z₁M₄ tratada com os íons metálicos Pb⁺², Cu⁺² e Cr⁺⁶ nas concentrações controle, 100, 500 e 1000 ppm.



Fonte: Autor, 2022.

O íon metálico Pb^{+2} , sofre uma redução no ICM de acordo com o aumento da concentração do metal na placa de petri, além do que já foi discutido, a sua morfologia é afetada à altas concentração. O índice de crescimento micelial da placa de petri contendo Cr^{+6} , é notório que ocorreu totalmente a inibição radial do desenvolvimento, apresentando sequer hifas em seu inóculo. Isto pode ser devido o cromo ter um alto índice de toxicidade (LEHNINGER, 2006).

A Tabela 4, mostra os índices de crescimento micelial do íon Cr^{+6} e a porcentagem de inibição do crescimento. Vale destacar que em todas as concentrações o cromo tem 100% de inibição de crescimento (PIC), por seu alto nível de toxicidade ao fungo $P_1Z_1M_4$.

Tabela 4 - Efeito das concentrações do íon metálico Cr^{+6} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $P_1Z_1M_4$.

Concentração em ppm (g/mL)	IMC (mm)	PIC (%)
0	78,5	-
100	0	100
500	0	100
1000	0	100

Fonte: Autor, 2022.

Na Tabela 5 (p.46), o IMC do crescimento radial da placa controle é de 78,5 mm. Nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm a porcentagem de inibição de crescimento comparada com o controle é de 3,18%, 47,19% e 100%, respectivamente. Logo, quanto maior a inibição, a intolerância do fungo a adaptar ao meio em tratamento, maior sua porcentagem de inibição micelial (PIC).

Na tabela 6 (p. 46), a comparação entres as placas de CRT e CRTE do íon metálico Pb^{+2} , mostra que em todas as concentrações houve o desenvolvimento micelial, diferente do Cu^{+2} e Cr^{+6} . A maior PIC é na concentração de 1000 ppm, de 84,07%, evidenciando maior inibição micelial macroscopicamente. Na Figura 11a (p. 43), na concentração de 100 ppm,

comprova que a inibição foi menor em relação as outras concentrações, evidenciando o PIC de 30,57%. O chumbo é considerado um elemento não essencial para o metabolismo dos microrganismos, pois possui grande toxicidade (POGGIO et al., 2009).

Tabela 5 - Efeito das concentrações do íon metálico Cu^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica P₁Z₁M₄.

Concentração em ppm (g/mL)	IMC (mm)	PIC (%)
0	78,5	-
100	76,0	3,18
500	38,0	47,19
1000	0	100

Fonte: Autor, 2022.

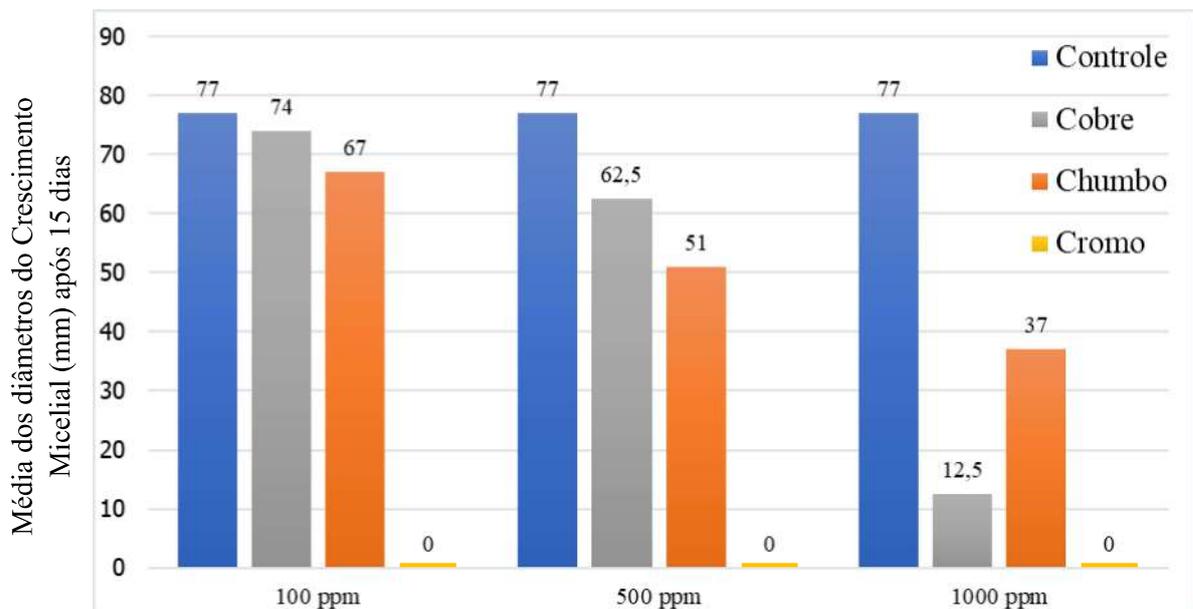
Tabela 6 - Efeito das concentrações do íon metálico Pb^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica P₁Z₁M₄.

Concentração em ppm (g/mL)	IMC (mm)	PIC (%)
0	78,5	-
100	54,5	30,57
500	15,0	80,89
1000	12,5	84,07

Fonte: Autor, 2022.

Na figura 13, o gráfico de barras onde pode-se observar que as placas de tratamento enriquecida com íon de Cu^{+2} evidenciou-se um bom desenvolvimento micelial nas concentrações 100 e 500 ppm, de 74 mm e 62,5 mm, respectivamente. De acordo com Silva e colaboradores (2007), os fungos tolerantes ao cobre, quando adicionados em meio de cultura, apresentam bom desenvolvimento, estas características tem sido usada para atividades de desenvolvimento micelial. No entanto, em altas concentrações do metal, já torna – se tóxico.

Figura 13 - Crescimento miceliais da linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$ tratada com os íons metálicos Pb^{+2} , Cu^{+2} e Cr^{+6} nas concentrações controle, 100, 500 e 1000 ppm.



Fonte: Autor, 2022.

O desenvolvimento micelial nas placas enriquecidas com chumbo (Figura 13), apresentaram crescimento radial nas concentrações 100, 500 e 1000 ppm, respectivamente, 67 mm, 51 mm e 37 mm. O desenvolvimento micelial mostram um decaimento de acordo com o aumento das concentrações, evidenciando a alta toxicidade do metal.

A linhagem $\text{P}_1\text{Z}_1\text{M}_4$ apresentou total inibição de crescimento (Figura 12, p. 44), como também o fungo $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$ em todas as concentrações nas placas de tratamento no íon metálico de cromo (Figura 13) De acordo com Moreira e Siqueira (2006) a presença de metais pesados no solo interfere no pH, aumentando a acidez e levando à inibição da atividade de algumas espécies de microrganismos.

Na Tabela 7, tem-se o percentual de inibição de crescimento micelial do fungo P₂Z₂B₁ em frente ao íon Cr⁺⁶, que apresenta 100% em todas as concentrações, 100, 500 e 1000 ppm, pois não desenvolveu – se nenhuma hifa.

Tabela 7 - Efeito das concentrações do íon metálico Cr⁺⁶ na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica P₂Z₂B₁.

Concentração em ppm (g/mL)	IMC (mm)	PIC (%)
0	77,0	-
100	0	100
500	0	100
1000	0	100

Fonte: Autor, 2022.

Na tabela 8 (p.49), tem os valores da inibição de crescimento do íon metálico cobre, evidenciando um bom PIC na concentração de 100 e 500 ppm, com 3,89% e 18,83, respectivamente. Com o IMC de 12,5 mm, na placa de petri contendo a concentração de 1000 ppm, resultando um percentual alto, com índice de inibição de 83,76%.

Com a inibição de crescimento radial de 12,98%, o fungo P₂Z₂B₁, em 100 ppm, apresentou um IMC mais próximo da concentração de 0 ppm (Tabela 9, p. 49). Em comparação as concentrações de 500 e 1000 ppm, com a de 0 ppm, a inibição foi razoavelmente significativa, expressando 33,76 % e 51,94%, respectivamente.

O estudo de Zafar, Aquil e Ahmad (2007), corrobora indicando que a tolerância dos fungos aos metais depende do tipo de concentração do metal e da sua habilidade de adaptação. Ou seja, a diferença nos níveis de tolerância pode ser a variação no mecanismo de resistência (IRAM, et. Al, 2012).

Tabela 8 - Efeito das concentrações do íon metálico Cu^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$.

Concentração em ppm (g/mL)	IMC (mm)	PIC (%)
0	77,0	-
100	74,0	3,89
500	62,5	18,83
1000	12,5	83,76

Fonte: Autor, 2022.

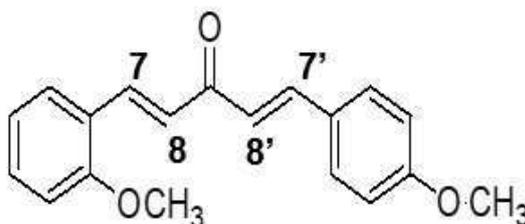
Tabela 9 - Efeito das concentrações do íon metálico Pb^{+2} na redução do ICM (índice de crescimento micelial) e PIC (porcentagem de inibição do crescimento micelial) na linhagem fúngica $\text{P}_2\text{Z}_2\text{B}_1$.

Concentração em ppm (g/mL)	IMC (mm)	PIC (%)
0	74	-
100	67	12,98
500	51	33,76
1000	37	51,94

Fonte: Autor, 2022.

5.3 Biotransformação

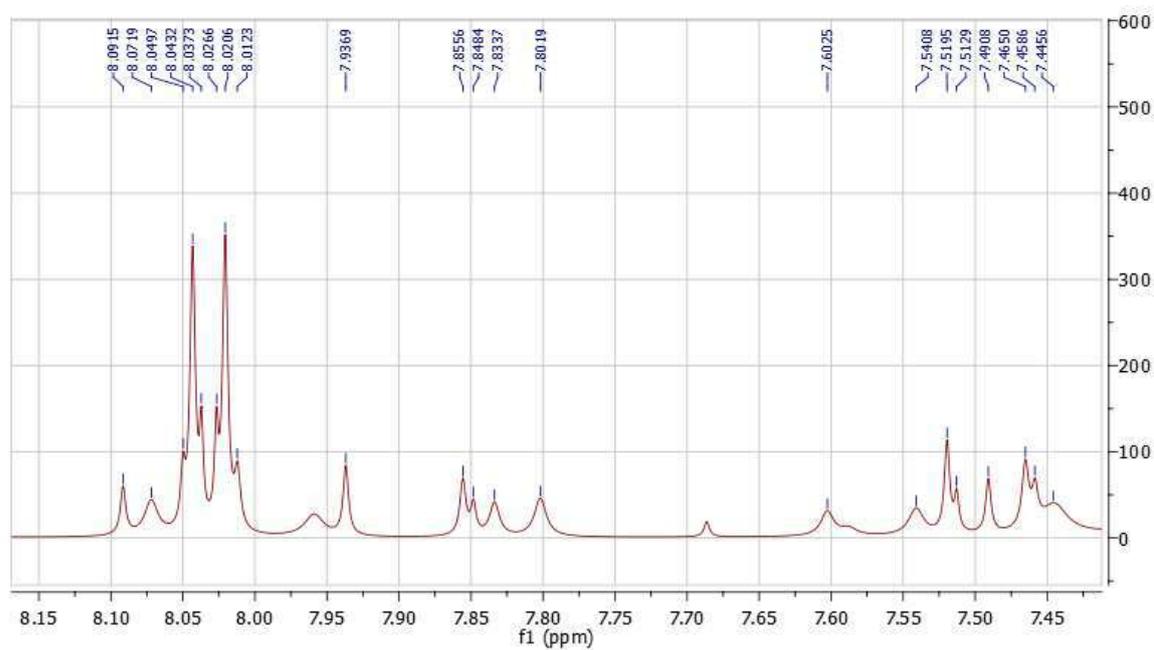
O espectro de RMN ^1H (Figura 14, p. 51) do substrato (1E, 4E)-1-(2-metoxi fenil)-5-(4-metoxi fenil)-penta-1,4-dien-3-ona (Figura 8, p. 38) observamos a presença do sinal dos dois grupos metoxilas em δ_{H} 3.84 e δ_{H} 3.91, observa-se também sinais relativos aos hidrogênios olefinícos em δ_{H} 8,05 (d, $J = 16,2$ Hz), δ_{H} 7,12 (d, $J = 16,2$ Hz), δ_{H} 7,70 (d, $J = 15,8$ Hz) e δ_{H} 7,00 (d, $J = 15,8$ Hz) referentes aos hidrogênios H7, H8, H7' e H8' respectivamente.



Além dos sinais dos hidrogênios metílicos e olefinícos, tem-se a presença de 6 sinais relativos aos hidrogênios aromáticos H6 em δ_{H} 7,61 (dd, $J = 7,7$ Hz e 1,2 Hz) integrando para um hidrogênio, H2'/H6' em δ_{H} 7,56 (d, $J = 8,74$ Hz) integrando para dois hidrogênios, H4 em δ_{H} 7,35 (dt, $J = 8,36$ Hz e 1,2 Hz) integrando para 1 hidrogênio, H5 em δ_{H} 6,99 (t, $J = 8,3$ Hz) integrando para um hidrogênio, os sinais dos hidrogênios H3 e H3'/H5' ovelaparam em δ_{H} 6,92, sinal este integrando para três hidrogênios. Esses dados estão de acordo com os relatados na literatura para análogos de curcumina monocarbonilados (BITENCOURT et al, 2020).

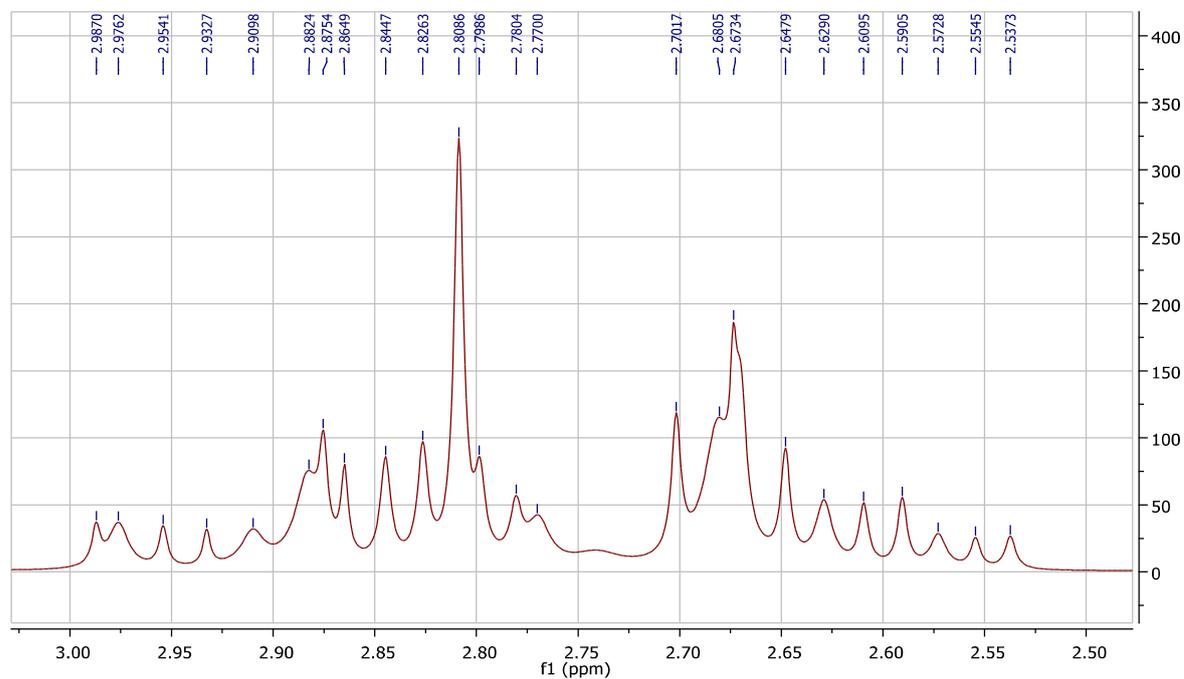
Ao analisar o espectro de RMN ^1H do produto de biotransformação (Figura 15, p. 51, Figura 16 e p. 52, Figura 17, p. 52) e também da sobreposição dos espectros do substrato sintético e do produto da reação, observa-se que pode ter ocorrido a reação de biotransformação (Figura 18, p. 53, Figura 19, p. 53 e Figura 20, p. 54). É observado no espectro a ausência dos sinais referente aos hidrogênios das ligações duplas *trans* relacionados em δ_{H} 8.04, 7.70, 7.12 e 7.00, sugerindo que houve hidrogenação das ligações duplas. Ainda se observa no espectro de RMN ^1H do produto de biotransformação a presença de sinais multipletos próximo a δ_{H} 1.70; 2.80 e 3.65 ppm, que nos permite supor que o produto principal da reação é a redução das ligações duplas, ou seja, uma reação de hidrogenação (Figura 21, p. 54). No entanto para se confirmar que houve esta reação será

Figura 12 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H do produto de biotransformação amostra 26-30 (400 MHz, CDCl_3).



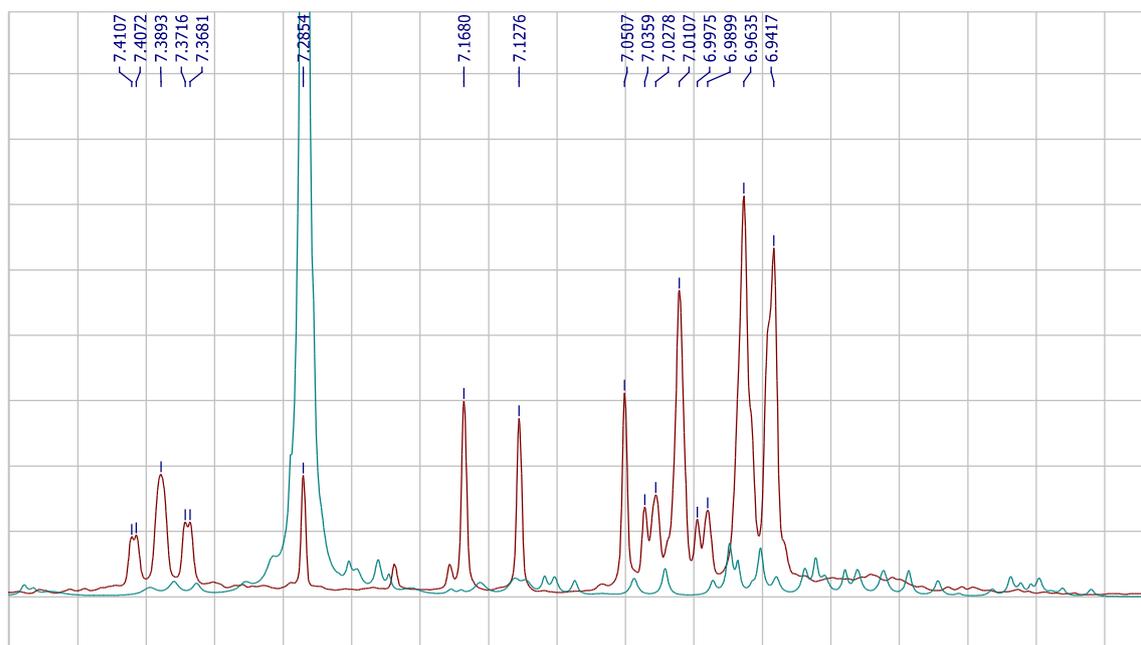
Fonte: Autor, 2022.

Figura 13 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H do produto de biotransformação amostra 26-30 (400 MHz, CDCl_3).



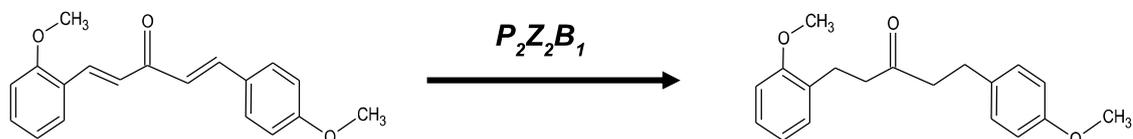
Fonte: Autor, 2022.

Figura 20 - Expansão 2 da sobreposição dos espectros de RMN ^1H do substrato (1E, 4E)-1-(2-metoxi fenil)-5-(4-metoxi fenil)-penta-1,4-dien-3-ona e do produto de biotransformação 26-30 (400 MHz, CDCl_3).



Fonte: Autor, 2022.

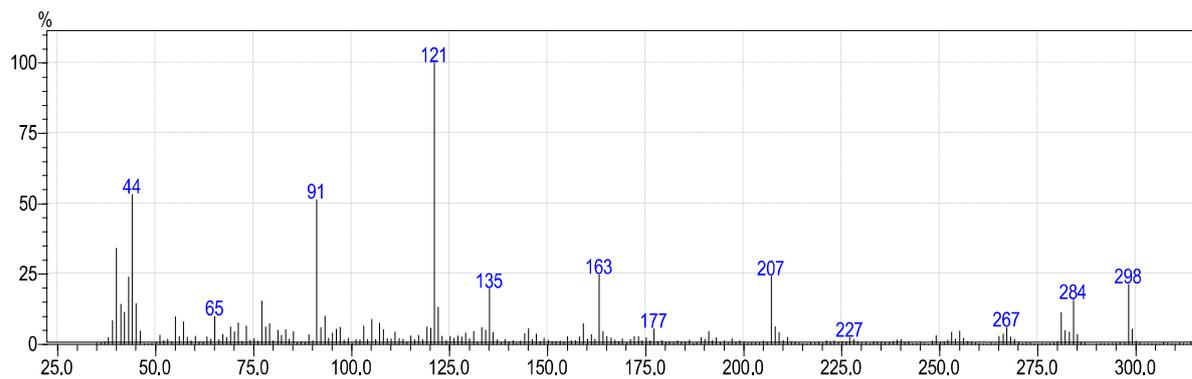
Figura 21 - Reação realizada pela linhagem fúngica $P_2Z_2B_1$.



Fonte: Autor, 2022.

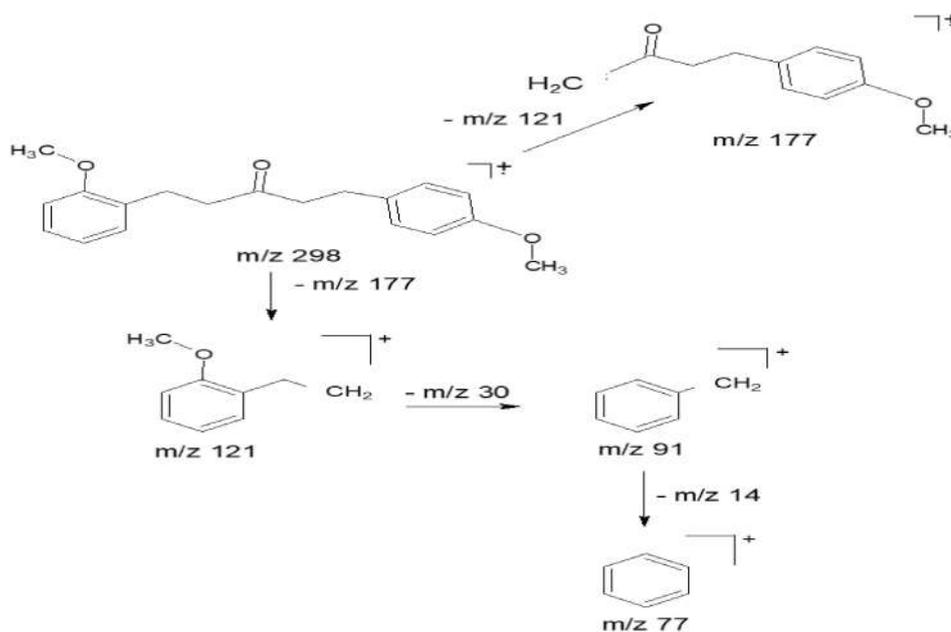
Além da análise de RMN ^1H , o produto de biotransformação foi também analisado por CG-EM, no espectro da amostra foi observado que a amostra não estava totalmente pura, mas ainda assim foi possível observar o pico de m/z 298 no espectro de massas (Figura 22, p. 55), que seria a massa molecular do produto com a redução da ligação dupla. Na figura 23 (p. 55), tem-se a proposta de fragmentação do produto de biotransformação.

Figura 22 - Espectro de massas do produto de biotransformação.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 23 - Proposta de fragmentação do produto de biotransformação.



Fonte: Autor, 2022.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, conclui – se que as linhagens fúngicas são importantes, não apenas pelo seu papel essencial no ecossistema, mas também são imprescindíveis contra as atividades antrópicas do meio ambiente. Logo, os fungos são potencialmente valiosos para a biotecnologia.

As duas linhagens fúngicas P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁, isoladas do rejeito contaminado por metais pesados da Mina do Sossego, em Canaã dos Carajás, foram mais resistentes ao íon metálico Cu²⁺, principalmente o fungo P₂Z₂B₁, que apresentou um bom desenvolvimento micelial em 100 e 500 ppm, sendo assim um possível descontaminante de áreas degradadas por contaminantes de cobre. Porém em altas concentrações o íon metálico é tóxico para os microrganismos, mesmo sendo essencial ao seu metabolismo.

O metal chumbo apresentou inibição de crescimento desde a concentração de 100 ppm nas duas linhagens, no entanto, no P₂Z₂B₁, sua morfologia foi alterada apresentando um escurecimento das hifas áreas e vegetativas nas concentrações de 500 e 100 ppm, com PIC de 33,76 % e 51,94%, respectivamente. No íon de Cr⁶⁺, houve a inibição completa dos fungos em todas as concentrações, com PIC de 100%, apesar que a maioria dos microrganismos serem adaptáveis ao metal, as linhagens P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁ não se desenvolveram.

Na análise por RMN ¹H, no espectro do produto de biotransformação, foi observado a ausência dos picos de hidrogênio referente a duplas trans, inferindo que, possivelmente, ocorreu uma reação de hidrogenação. Os resultados das análises por CG-EM corroboraram com os resultados, pois foi possível observar o pico m/z 298 do produto tendo as ligações duplas hidrogenadas.

Para estudos posteriores, são necessárias análises para identificar se os fungos P₁Z₁M₄ e P₂Z₂B₁ são capazes de absorção ou adsorção os íons metálicos na biorremediação. Já na biotransformação, ainda seria necessário purificar o produto e realizar outros experimentos, tais como, RMN ¹³C e RMN 2D.

REFERÊNCIAS

- _____. Organização Mundial da Saúde (OMS). **Diretrizes para a Qualidade da Água Potável: Quarta Edição Incorporando o Primeiro Adendo**. 4^a ed., 2017.
- ABD AL-KHODOR, Y. A.; ALBAVATI, T. M. **Employing sodium hydroxide in desulfurization of the actual heavy crude oil: Theoretical optimization and experimental evaluation**. Process Safety and Environmental Protection. V. 136, 334–342, 2020.
- ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. **Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture**. Biotechnology Reports (20), 2018.
- ABREU, C. A.; ABREU, M. F.; ANDRADE, C. **Determinação de cobre, ferro manganês, cádmio, zinco usando solução, e chumbo em solos DTPA em pH 7,3, zinco**. In: van Raij, B.; Andrade, JC; Cantarella, H.; Quaggio, JA (ed.). Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: IAC, p.240-250, 2001.
- ABREU, J. A. S. D.; ROVIDA, A. F. D. S.; PAMPHILE, J. A. **FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**. Revista UNINGÁ Review. Vol.21, n.1, p. 55-59 (Jan – Mar 2015).
- AGUILAR, N. C. **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ARSÊNIO COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO**. Dissertação da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, 2018.
- ALVES, M. A. P. M. D. S. **Efeito da toxicidade de metais pesados no crescimento do fungo *Aspergillus* sp, isolado do rejeito da mineração da mina do Sossego em Canaã dos Carajás**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará, 2017.
- ANDRADE, M. G; MELO, V. F; GABARDO, J; SOUZA, L. C. P; REISSMANN, C. B. **Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo. I -Fitoextração**. Seção IX - poluição do solo e qualidade ambiental. Revista Brasileira de Ciência do solo. vol. 33 n.6 Viçosa Nov./Dec. 2009.
- ANDREAZZA, R. CARMAGO, F. A. D. O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. **Biorremediação de áreas contaminadas com cobre**. Revista de Ciências Agrárias, 36 (2): 127-136, 2013.
- ANTSOTEGI-USKOLA, M., MARKINA-IÑARRAIRAEGUI, A., UGALDE, U. **New insights into homeostase do cobre em fungos filamentosos**. Int. Microbiol. 23, 65-73, 2020.
- ARBIX, G. **Biotechnologia sem fronteiras**. Revista Novos Estudos, n° 78. Julho 2007.
- AZEVEDO, J. L. **Fungos – Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia**. Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 2011.

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

BENITE A. M. C. MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. **Uma visão da química bioinorgânica medicinal.** Quim. Nova, Vol. 30, No. 8, 2062-2067, 2007.

BISINOTI, M.C.; YABE, M.J.S.; GIMENEZ, S.M.N. **Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina-PR.** Revista Analytica, v.8, p.22-17, 2004.

BITENCOURT, H. R. **Síntese de Análogo da Curcumina: (1E,4E) -1,5-Bis-(2-metóxi-fenil) -penta-1,4- dien-f^o 3-ona.** Braz. Ap. Sci. Rev, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 2021-2029 mai./jun. 2020.

BRUINS, M.; KAPIL, S.; OEHME, F. **Microbial resistance to metal in the environment.** Ecotoxicology and Environmental Safety. v. 45, p. 198-207, 2000.

CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M.; JACCQUES, R. J. S.; ROESCH, L. F. W.; FRANKENBERGER, W. T. **Uso de microrganismos para a remediação de metais.** Tópicos Especiais em Ciência do Solo, 5: 467-496, 2007.

CAO, H.; CHEN, X.; JASSBI, A. R.; XIAO, J. **Microbial biotransformation of bioactive flavonoids.** Biotechnology Advances, v. 33, p. 214- 223, 2015.

CAVALCANTE, F. O. D. R. **Estudo químico e atividade biológica de Nephrolepis brownii e da biomassa produzida pelo fungo endofítico NB-1 associado a espécie.** Tese (Doutor em Química). Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

CETIN, M. **Uma mudança na quantidade de CO₂ no centro das salas de exame: estudo de caso da Turquia.** Viga. Ethno-Med., 10, pp. 146 – 155, 2017.

CONICELLI, B. P. **BISSORÇÃO DE CHUMBO E MERCÚRIO PELAS LINHAGENS SELVAGEM E RECOMBINANTE DE C. metallidurans EM MEIO AQUOSO.** Dissertação, São Paulo, 2017.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. **Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação.** Quim. Nova, Vol. 40, No. 1, 85-96, 2017.

CORTEZA, D. V.; CASTRO, H. F. D.; ANDRADE, G. S. S. **POTENCIAL CATALÍTICO DE LIPASES LIGADAS AO MICÉLIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.** Quim. Nova, Vol. 40, No. 1, 85-96, 2017.

DANGI, A. K.; SHARMA, B.; HILL, R.; SHUKLA, P. **Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach.** Critical Reviews in Biotechnology. V. 39, 79-98, 2019.

DINIZ, T. O.; PEREIRA, N. C.; SINÓPOLIS-GIGLIOLLI, A. A. **Abelhas como bioindicadores ambientais**. In: OLIVEIRA-JÚNIOR, J. M. B., CALVÃO, L. B. (Org.). *A Interface do Conhecimento sobre Abelhas 2*. 1ed. Ponta Grossa: Atena, 2020.

DINIZ, T. D. O.; LIMA, M. X. D. **Biotecnologia ambiental como ferramenta de gestão ambiental – Breve revisão**. Scientific Electronic Archives. Vol. 14 (9) September 2021.

EDGINTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. **Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds**, *Phytopathology*. V. 61, p. 42-44, 1971.

EVERT, R. F.; HEICHHORN, S. E. RAVEN. **Avaliação biológica de fenilhidrazonas e derivadas de análogos da curcumina**. Dissertação (Mestre em Química). Biologia vegetal. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

EZZOUHRI, L.; CASTRO, E.; MOYA, M. ESPINOLA, F.; LAIRINI, K. **Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Marocco**. African journal of microbiology research, v. 3, n. 2, p. 35-49, 2009.

FABER, Kurt. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6th Edition. Graz: Springer, International Publishing, 2011.

FERNANDES, J. A. F.; SILVA, L. D. N. A. **TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO MICROBIANA DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS**. XII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Salvador/BA, 2021.

FERREIRA, S. B. S. **BIORREMEDIAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE TRATAMENTO EM AMBIENTES CONTAMINADOS**. REVISTA FIMCA, V. 7, N. 3, 2020.

FIGUEIREDO, B. R. **Minérios e ambiente**. Campinas: Editora Unicamp, 2000.

FLORÊNCIO, M. N. S.; ABUD, A. K. S.; COSTA, B. M. G.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. M. **Um panorama da produção tecnológica sobre biotecnologia ambiental no Brasil**. Anais do X Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica, 10(1), 846-853, 2019.

FORTES, S. S. **Avaliação de fungos na biotransformação estereosseletiva da Hidroxizina e obtenção do metabólito quirál e ativo Cetirizina**. Dissertação (Mestrado em Química, na Universidade de São Paulo, 2013.

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

GAYLARDE, C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P.; **Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos**. 2005.

HAIDER, F. U.; EJAZ, M.; CHEEMA, S. A.; KHAN, M. I.; ZHAO, B.; LIQUN, C.; SALIM, M. A.; NAVEED, M.; KHAN, N.; NUÑEZ-DELGADO, A.; MUSTAFA, A. **Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies**. Environmental Research, 197, 2021.

HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; GARCÍA, J. I.; SINISTERRA, J. V. **Applied biotransformations in green solvents**. Chemistry –A European Journal, 16(31), 2010.

IRAM, S.; ZAMAN, A.; IQBAL, Z.; SHABLIR, R. **Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater**. Paquistão, v. 22, n. 691-697, 2012.

KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T. M.; KHOO, C. S.; HAYES, W. J. **Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation**. Quimiosfera. Volume 41, edições 1–2, julho de 2000.

LABES, J. R; WENDHAUSEN R. **Seleção de microorganismos com ação de compostos com ação sobre compostos carbonilados gerando álcoois quirais**. *Dynamis*, v.1, n.14, p.73-79, 2008.

LACERDA, F.; NAVONI, J. A.; AMARAL, V. S. D. **BIORREMEDIAÇÃO: EDUCAÇÃO EM SAÚDE E ALTERNATIVAS À POLUIÇÃO AMBIENTAL**. Ed. IFRN, Natal, 2019.

LEAL, L. V. P. **Adsorção de Cobre, Chumbo e Cromo em fungo isolado do Rejeito da área de mineração da Companhia VALE**. Trabalho de Conclusão de Curso: Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, 2018.

LEHNINGER, A. L. NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Bioquímica: princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, p. 1202, 2006.

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

LIM, M. W.; LAU, E. V.; POH, P. E. **A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions**. Marine Pollution Bulletin, 109(1), 14–45, 2016.

LIM, S.R.; SCHOENUNG, J.M. **Human health and ecological toxicity potentials due to heavy metal content in waste electronic devices with flat panel displays**. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, v.177, p.251–259, 2010.

LIU, L.; LI, W.; GUO, M. **Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability**. Science of The Total Environment, 633, 206-219, 2018.

LOZANO, F. A. E. **SELEÇÃO DE LOCAIS PARA BARRAGENS DE REJEITOS USANDO O MÉTODO DE ANÁLISE HIERÁRQUICA**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAHAJAN, P.; KAUSHAL, J. **Role of phytoremediation in reducing cadmium toxicity in soil and water**. J. Toxicol, p. 1-16, 2018.

MARQUES, H. P. D. C. **ESTUDO DA TOLERÂNCIA DE METAIS PESADOS E ENSAIO ENZIMÁTICO COM A LINHAGEM FÚNGICA P1R4Bx**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará, 2018.

- MARTINS, L. R. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. **Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective**. Environment International, USA, v. 37, p. 1362–1375, 2011.
- MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. **Efeitos de alguns fungicidas no crescimento micelial de Macro-phomina faseolina (TASS)**. GOID. “In vitro”, Fitopatologia Brasileira, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- MISHRA, J.; SINGH, R.; ARORA, N.K. **Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms**. Frontiers Microbiology, 2017.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Xenobióticos do solo**. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Cap. 6. p.263-311, 2006.
- MOREIRA, I.; OLIVEIRA, O.; TRIGUINS, J.; SANTOS, A.; QUEIROZ, A.; FERREIRA, S.; MARTINS, C.; SILVA, A. **Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistente total petroleum hydrocarbons (TPH's) using Avicennia schaueriana**. Marine Pollution Bullentin, (67), 2016.
- OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Micologia Médica**. 4ª Ed. Rio de Janeiro; 2014.
- OLIVEIRA, K. B. D.; OLIVEIRA, B. H. D. **OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS ATRAVÉS DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**. Revista Eletrônica de Farmácia Vol. IX (1) 89 –99, 2012.
- PERKINS, C.; SIDDIQUI, S.; PURI, M.; DEMAIN, A. L. **CRIT. REV. BIOTECHNOL.** V. 18, 2015.
- PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- POGGIO, L.; VRSCAJ, B.; SCHULIN, R.; HEPPELLE, E. E.; MARSAN, F. A. **Metal pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy)**. Environmental Pollution, 157, 680-689, 2009.
- POLLARD, D.J.; WOODLEY, J. M. **Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now**. TRENDS in Biotechnology, v. 25, 2006.
- SALEH, H. E. D. M.; AGLAN, R. **Heavy Metals**. Edited by Hosam El-Din M. Saleh and Refaat F. Aglan, 2018.
- SANTIAGO, A. L. C. M. A; Motta Cristina, M. S. **Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase**. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas. Acta Botânica Brasilica vol.20 n. 3 São Paulo July/Sept. 2006.

SANTOS, E. R. D. D. **Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos**. Florianópolis, 2015. Acesso: 13 de setembro de 2022.

SANTOS, G. F. **BIOTRANSFORMAÇÃO DE TERPENOS NATURAIS POR FUNGOS DE SOLOS E APROXIMAÇÃO À BIOSÍNTESE DE SESQUITERPENOS ISOLADOS DO FUNGO FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea***. Tese (Doutorado em Ciências – Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

SCHAEFER, C. A. **BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS COM MICRORGANISMOS EM SISTEMA AQUOSO E/OU BIFÁSICO**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SCOPETANI, C.; CHELAZZI, D.; CINCINELLI, A.; MARTELLINI, T.; LEINIO, V.; PELLINEN, J. **Contaminantes perigosos em plásticos contidos em composto e solo agrícola**. *Chemosphere*, 293, 2022.

SHARMA, A.; KATNORIA, J. K.; NAGPAL, A. K. **Metais pesados em vegetais: triagem de riscos à saúde envolvidos no cultivo ao longo de drenagem de águas residuais e irrigar com águas residuais**. *Regenerative Medicine for Peripheral Artery Disease*, 2016.

SILVA, C. J. A. D.; MALTA, D. J. D. N. A IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NA BIOTECNOLOGIA. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - PERNAMBUCO**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 49, 2017. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/facipesaude/article/view/3210>. Acesso em: 12 set. 2022.

SILVA, G. A. D.; MAIA, L. C.; SILVA, F. S. B.; LIMA, P. C. F. **Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares oriundos de área de caatinga nativa e degradada por mineração, no Estado da Bahia, Brasil**. *Brazilian Journal of Botany. Revta brasil. Bot.*, São Paulo, V.24, n.2, p.135-143, jun. 2001.

SILVA, M. C. D. **Biotransformações de compostos carbonílicos α , β -insaturados por *Lasiodiplodia pseudotheobromae* fungo endofítico de *Morinda citrifolia* (RUBIACEAE)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas, Programa de Pós- Graduação em Química, Marabá, 2019.

SILVA, R. F. **Tolerancy arboreal forestry species and ectomycorrhizal fungi of the copper**. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

SINGH, R. L. **Introduction to Environmental Biotechnology**. Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future. Singapore: Springer, 2017.

SOARES, I.A.; FLORES, A.C.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.P.; BARONI, S. **Fungos na biorremediação de áreas degradadas**. *Arq. Inst. Bio.*, São Paulo, v.78, n.2, p. 341-350, abr./jun., 2011.

STRAATHOF, A.J.J.; PANKE, S.; SCHIMID, A. **The production of fine chemical by biotransformation**. *Current opinion in biotechnology*. Vol.13. p.548-556. 2002.

SULTANA, N. **Microbial biotransformation of bioactive and clinically useful steroids and some salient features of steroids and biotransformation**, *Steroids*. Elsevier, v. 136, p. 76- 92, 2018.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12^a Ed. – Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA, 2017.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12^a Ed. – Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA, 2017, p. 322.

VALE, M. S.; ABREU, K. V.; GOUVEIA, S. T.; LEITÃO, R. C.; SANTAELLA, S. T. **Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso Aspergillus Niger isolado de efluente industrial**. Eng. Sanitária ambiental. V. 16, N. 3, p. 237-244, 2011.

VASIC-RACKI, D. (2006). **History of Industrial Biotransformations –Dreams and Realities**. In: **Industrial Biotransformations**. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (Org). Wiley-VCH: Weinheim. p.1-36. Zanatta, P. (2017). **Gestão Ambiental e o Desenvolvimento Sustentável**. Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental, 6(3), 296-312. Zhang, H., Li, Y., & Zhu, J. K. (2018). **Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture**. *Nature Plants*, 4(12), 989-996.

VERÂME, J.; SANTOS, N.; SILVA, V.; ALMEIDA, M.; OLIVEIRA, O.; MOREIRA, I. **Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments using Rhizophora mangle**. *Marine Pollution Bulletin*, (160), 2020.

XIANG, Y.; JIANG, L.; ZHOU, Y.; LUO, Z.; ZHI, D.; YANG, J.; LAM, S. S. **Microplastics and environmental pollutants: key interaction and toxicology in aquatic and soil environments**. *Journal of Hazardous Materials*. V. 422, 2022.

YAASHIKAA, P. R.; SENTHIKUMAR, P.; JEEVANANTHAM, S.; SARAVANAN, R. **A review on bioremediation approach for heavy metal detoxification and accumulation in plants**. V. 130, 2022.

ZAFAR, S.; AQUIL, F.; AHMAD, I. **Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil**. *Bioresour. Technol.* 98: 2557–2561, 2007.

ZAFAR, S.; YOUSUF, S.; KAYANI, H.A.; SAIFULLAH, S.; KHAN, S.; AL-MAJID, A.M.; CHOUDHARY, M.I. **Biotransformation of oral contraceptive ethynodiol diacetate with microbial and plant cell cultures**. *Chem. Cent. J.*, v.6, p.109, 2012.

ZHANG, C.; TAO, Y.; LI, T. S. J.; KE, T.; WEI, S.; WANG, P.; CHEN, L. **Simultaneous degradation of trichlorfon and removal of Cd (II) by Aspergillus sydowii strain PA F-2**. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26, 26844–26854, 2019.

ZHANG, H.; LI, Y.; ZHU, J. K. **Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture**. *Nature Plants*, 4(12), 989-996, 2018.

SILVA, C. D. O. C. ENSAIO ENZIMÁTICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE METAIS PESADOS FRENTE AO FUNGO *Aspergillus*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Marabá, Pará, 2018.