



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Ana Claudia Claudina do Nascimento

**MECANISMO CELULARES E ESTRESSE OXIDATIVO COMO
MARCADORES DE TOLERÂNCIA PARA CÁDMIO EM *Aspergillus
nidulans* (UCP 1580)**

Recife

2011

Ana Claudia Claudina do Nascimento

**MECANISMO CELULARES E ESTRESSE OXIDATIVO COMO
MARCADORES DE TOLERÂNCIA PARA CÁDMIO EM *Aspergillus
nidulans* UCP 1580**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Elesbão do Nascimento

**Recife
2011**

N244m

Nascimento, Ana Claudia Claudina do

Mecanismo celulares e estresse oxidativo como marcadores de tolerância para cádmio em *Aspergillus nidulans* (UCP 1580) / Ana Claudia Claudina do Nascimento ; orientador Aline Elesbão do Nascimento, 2011.

xv, 160 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2011.

1. Cádmio. 2. Biorremediação. 3. *Aspergillus nidulans*. 4. Estresse oxidativo. 5. Polifosfato. 6. Ultraestrutura. I. Título.

CDU 574.6

MECANISMO CELULARES E ESTRESSE OXIDATIVO COMO MARCADORES DE TOLERÂNCIA PARA CÁDMIO EM *Aspergillus nidulans* UCP 1580

Ana Claudia Claudina do Nascimento

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Aline Elesbão do Nascimento (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof. Dr^o. Marcos Antonio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Suplentes:

Prof^a. Dr^a. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico

Á Deus por ter concedido a concretização deste trabalho, a minha mãe avó Carmelita do Nascimento por ter contribuído com a minha formação com todos os esforços e dignidade e ao meu esposo Marcos Mergulhão pelo apoio dado ao longo do mesmo.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

"Não fiz o melhor, mas fiz tudo para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes."

Martin Luther King

Àquele que esteve presente em todos os momentos, permitindo durante toda minha caminhada, coragem, força, determinação e luzes para seguir neste caminho: Deus;
Ao meu esposo Marcos Mergulhão pelo apoio e incentivo para realização de mais um sonho, dando-me credibilidade, amor e carinho, sendo os quais de fundamental importância para o fortalecimento do nosso amor;

À todos os meus familiares, em especial a minha mãe avó Carmelita do Nascimento pelo companheirismo, dedicação e ensinamentos, fortalecendo-me com seu amor incondicional, pois foram os que contribuíram para minha formação inicial, a minha querida tia Cleide de Souza (*in memoriam*) pela passagem em minha vida cuja ausência deixou lembranças que jamais foram esquecidas;

À Profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento pela participação ativa e direta neste passo gigantesco a caminho do meu engrandecimento profissional, ensinando-me a conciliar os momentos de austeridade e ternura, fatores primordiais na realização de um trabalho científico, meu eterno agradecimento.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), pelo espaço físico proporcionado para o desenvolvimento da pesquisa e pelo seu corpo docente do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais sou muito grata;

À coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) a Prof^a. Dr^a. Galba Takaki pela atenção e exemplo de dedicação.

À coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais a Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro pela simpatia e cordialidade.

Aos meus colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais Amanda Alencar, Alex Bezerra, Carlos Vilar, Carolina Arruda, Gustavo Macedo, João Feliciano, Ladiel Tavares, Maria das Graças, Marcelo Andrade, Mirthys Amorim, Romualdo Maciera, pelas trocas de experiência e convívio em especial a Jaceline Lima pela amizade construída desde a graduação.

À todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pelo apoio e atenção;

Aos Professores da UNICAMP, em especial Flávio Vasconcelos pelo apoio dado durante a minha permanência na mesma;

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

Aos funcionários Sônia Maria de Souza, Severino Humberto de Almeida, André Felipe e Charles Silva pelo apoio e presteza sempre que foram solicitados;

À Fundação de Ampara à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio de grande parte dos recursos para a realização deste mestrado.

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para realização do intercâmbio com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP);

À todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1	16
1.1 Introdução	17
1.2 Objetivos	20
1.2.1 Objetivo Geral	20
1.2.2 Objetivos Específicos	20
1.3 Revisão da Literatura	21
1.3.1 Poluição Ambiental por Metais Pesados	21
1.3.2 Metais Pesados e a Saúde Humana	23
1.3.3 CÁDMIO (Cd)	24
1.3.3.1 Considerações Gerais	24
1.3.3.2 Aspectos ambientais e toxicológicos	26
1.3.4 Interação dos Microrganismos com Metais Pesados	31
1.3.5. Estresse Oxidativo e Mecanismos Antioxidantes	39
1.3.5.1. O Sistema Antioxidante Enzimático	41
1.3.6. Polifosfato	43
1.3.7. Ultraestrutura e Morfologia	47
1.3.8. Biossorventes para Metais Pesados	49
1.3.9. Fungos	52
1.39.1. Generalidades	52
1.3.9.2. <i>Aspergillus</i>	53
1.3.9.3. Aplicação dos <i>Aspergillus</i> na Biotecnologia	54
1.3.9.4. <i>Aspergillus nidulans</i>	58
1.4 Referências Bibliográficas	62
CAPÍTULO 2	78

Influência do Cádmio sobre Mecanismos Celulares e Resposta Antioxidante em <i>Aspergillus nidulans</i> (UCP 1580)	79
RESUMO	80
ABSTRACT	81
2.1 Introdução	82
2.2 Materiais e Métodos	84
2.2.1 Microrganismo e condições de cultivo	84
2.3. Solução Metálica	85
2.4 Determinações Bioquímicas	85
2.4.1 Determinação do pH	85
2.4.2 Determinação do Consumo de Glicose	85
2.4.3 Determinação de Proteínas Totais	85
2.4.4 Extração e Dosagem do Polifosfato Total	86
2.5. Atividade Enzimática Extracelular	86
2.5.1 Atividade Lipolítica	87
2.5.2 Atividade Proteolítica	87
2.5.3 Atividade Amilolítica	87
2.5.4 Atividade das Fenoloxidasas	87
2.5.5 Atividade da celulase	88
2.5.6. Atividade da Xilanase	88
2.5.7. Atividade da Pectinase	88
2.6. Análise Morfológica e Ultraestrutural	88
2.6.1. Análise dos Efeitos do Cádmio sobre a Morfologia Celular	88
2.6.2. Análise do Comportamento Ultraestrutural em Presença de Cádmio.	89
2.7. Determinação Atividade Antioxidante Enzimática	89
2.7.1. Glutathione S-Transferase	89
2.7.2. Catalase	90
2.7.3. Peroxidase	90
3. Resultados	90
3.1. Efeitos do Cádmio sobre o Comportamento Bioquímico de <i>Aspergillus nidulans</i>	90

3.2. Efeitos do Cádmio sobre o Polifosfato	94
3.3. Efeitos do Cádmio sobre a Morfologia e Ultraestrutura de <i>Aspergillus nidulans</i>	95
3.4. Ação do Cádmio sobre a Expressão de Enzimas Extracelulares	97
3.5. Efeitos do Cádmio sobre o Sistema Antioxidante Enzimático de <i>Aspergillus nidulans</i>	101
4. Discussão	105
5. Conclusões	114
6. Agradecimentos	115
7. Referências	116
CAPÍTULO 3	122
Remoção de Cádmio por Biomassa de <i>Aspergillus nidulans</i> Isolado de Manguezal: Durante Cultivo e Efeitos do Pré-Tratamento	123
RESUMO	124
ABSTRACT	125
3.1 Introdução	126
3.2 Materiais e Métodos	128
3.2.1 Microrganismo e Condições de Cultivo	128
3.2.2 Produção e Tratamento da Biomassa para Cinética de Remoção em Solução Aquosa	128
3.2.3 Avaliação do Efeito do pH sobre a Remoção de Cádmio em Solução Aquosa	129
3.2.4 Análise ultraestrutural	129
4. RESULTADOS DISCUSSÃO	129
5. CONCLUSÕES	143
6. AGRADECIMENTOS	143
7. REFERÊNCIAS	144
8. ANEXOS	150

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - Esquema resumido dos mecanismos de interação entre metais e microrganismos 35
- Figura 2** - Mecanismos de interação entre metais e células microbianas 37
- Figura 3** - Principais espécies reativas de oxigênio; RH- molécula orgânica 40
- Figura 4**- Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* 59

Capítulo 2

- Figura 1** - Curvas de crescimento, consumo de glicose e pH do isolado de *Aspergillus nidulans* em meio Sabouraud líquido. (A) Culturas Controle; (B) Culturas cultivadas em presença de 1mM de cádmio; (C) Culturas cultivadas em presença de 2mM de cádmio; (D) Culturas cultivadas em presença de 3mM de cádmio. 92
- Figura 2** - Conteúdo de proteínas totais de *Aspergillus nidulans*. (A) Culturas Controle; (B) Culturas cultivadas em presença de 1mM de cádmio; (C) Culturas cultivadas em presença de 2mM de cádmio; (D) Culturas cultivadas em presença de 3mM de cádmio. 93
- Figura 3** - Curva de polifosfato relacionada ao crescimento de *Aspergillus nidulans*. 94
- Figura 4** - Comportamento morfológico de *A. nidulans*. (A) Culturas Controle; (B) Culturas cultivadas em presença de 1mM de cádmio; (C) Culturas cultivadas em presença de 2mM de cádmio; (D) Culturas cultivadas em presença de 3mM de cádmio. 95
- Figura 5** - Eletronmicrografias of *Aspergillus nidulans*. (A) Amostra controle 3 dias; (B) Amostra controle 15 dias; (C) Amostra cultivada em 1mM de cádmio 3 dias; (D) Amostra cultivada em 1mM de cádmio 15 dias; (E) Amostra cultivada em 2mM de cádmio 3 dias; 96
- Figura 6** - Análise de variância dos diâmetros dos halos das enzimas em relação às quatro concentrações de cádmio, 0,0, 1mM, 2mM e 3mM. 100
- Figura 7** - Atividade antioxidante de *Aspergillus nidulans*, (A) Glutation Transferase, (B) Catalase e (C) Peroxidase. 102
- Figura 8** Análise de variância dos diâmetros médios dos halos das enzimas

(GS-transferase, catalase e peroxidase) em relação a concentrações de cádmio de 3mM. 105

Capítulo 3

Figura 1- Determinação do cádmio residual ao longo do tempo de cultivo em função da concentração do íon metálico. 130

Figura 2- Eficiência da remoção de cádmio pelo micélio de *Aspergillus nidulans*. 130

Figura 3- Efeito do pré-tratamento e do pH sobre a remoção de cádmio, 1mM, por *Aspergillus nidulans*. BV- biomassa viva lavada com água destilada; Bauto- biomassa autoclavada e Bform – biomassa tratada com formaldeído. 136

Figura 4- Efeito do pré-tratamento e do pH sobre a remoção de cádmio, 2mM, por *Aspergillus nidulans*. BV- biomassa viva lavada com água destilada; Bauto- biomassa autoclavada e Bform – biomassa tratada com formaldeído. 137

Figura 5- Efeito do pré-tratamento e do pH sobre a remoção de cádmio, 3mM, por *Aspergillus nidulans*. BV- biomassa viva lavada com água destilada; Bauto- biomassa autoclavada e Bform – biomassa tratada com formaldeído. 137

Figura 6- Biomassa de *Aspergillus nidulans* controle, (A) e (B), micélio cultivado e coletada para pré-tratamento. 142

Figura 7- Eletronmicrografias de Biomassa lavadas de *Aspergillus nidulans* submetidas á pré-tratamento. A-B-C – biomassas vivas submetidas à cinética de remoção em 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente; D-E-F - biomassas tratadas com formaldeído e submetidas a cinética de remoção em 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente; G-H-I - biomassas autoclavadas e submetidas a cinética de remoção em 1mM, 2mM e 3mM, respectivamente. 142

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1-** Diâmetro dos halos (cm) das enzimas protease, amilase, fenoxidase, xilanase, lipase, pectinase e celulase em função da concentração de cádmio (0,0 ; 1,0mM; 2,0mM; e 3,0mM). 97
- Tabela 2-** Análise de Variância do diâmetro do halo segundo o tipo de enzima (protease, amilase, fenoxidase, xilanase, lipase, pectinase ou celulase) e sua concentração (0,0; 1,0; 2,0 ou 3,0mM). 98
- Tabela 3 -** Halos médios das enzimas protease, amilase, fenoxidase, xilanase, lipase, pectinase e celulase para concentração de cádmio de 3mM, medidos com 15 dias. 99
- Tabela 4 –** Teste de Tukey: comparação das médias dos halos das enzimas. 99
- Tabela 5 -** Análise de Variância do diâmetro do halo segundo o tipo de enzima (GS-transferase, catalase e peroxidase) e concentração de cádmio (0,0; 1,0; 2,0 ou 3,0mM). 103
- Tabela 6 -** Halos médios das enzimas Glutation-S-transferase, catalase e peroxidase para concentração de cádmio de 3mM, medidos com 15 dias. 104

RESUMO

O aumento da poluição/degradação ambiental tem sido observado com uma crescente preocupação pelas comunidades globais, considerando como sua principal resultante os problemas de saúde e perdas significativas dos sistemas naturais. Dentre os contaminantes, os metais pesados vêm obtendo destaque por sua toxicidade e acumulação nas cadeias tróficas. Dentre os métodos de remoção/minimização de metais, a biorremediação vem ganhando espaço como alternativa viável para o tratamento de ambientes poluídos. O cádmio é um metal de altíssima toxicidade, e induz alterações celulares, que atingem a morfologia, bem como a atividade de polímeros e sistemas enzimáticos dos sistemas vivos. Contudo, alguns sistemas exibem tolerância á presença do cádmio e o estudo dessas modificações poderá fornecer dados importantes para contribuir com a biorremediação de metais pesados. Dessa forma, a presente proposta visa avaliar o comportamento de enzimas oxidativas, bem como proteínas totais, polifosfatos e estrutura celular e sorção do íon metálico em *Aspergillus nidulans* como resposta ao crescimento em presença de 1mM, 2mM e 3mM de cádmio. Os resultados servirão como elementos de base para o entendimento dos mecanismos metabólicos associados á sobrevivência e manutenção e viabilidade celular, que podem ser aplicados em protocolos de biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados. Com isso, a fim de uma melhor compreensão do potencial tóxico de um componente ambiental e seus efeitos sobre a biota local, é necessária uma visão ampla que envolva conhecimentos relacionados à genética, proteômica, metabolismo celular e de níveis de organização biológica mais elevada, a fim de tornar este tipo de estudo com biomarcadores uma ferramenta fundamental para o manejo e conservação do meio ambiente.

Palavras-Chave: Cádmio, *Aspergillus nidulans*, Polifosfato, Estresse Oxidativo, Ultraestrutura.

ABSTRACT

The environmental degradation/pollution, without doubt, has been observed as an increasing concern of the global community, taking as its main resulting health problems and significant loss of natural systems. Among the contaminants, heavy metals are gaining prominence for its toxicity and accumulation in trophic chains. Among the methods of removal / minimization of metals, bioremediation has gained the space as a viable alternative for the treatment of polluted environments. Cadmium is a metal of high toxicity, and induces cellular changes that affect the morphology and the activity of enzyme systems, and biomolecules in living systems. However, some biological systems exhibit tolerance in the presence of cadmium, and studies related to that processes of tolerance could provide important data to contribute to the bioremediation of heavy metals. Thus, this proposal aims to assess the behavior of oxidative enzymes, total and total protein, polyphosphates and cellular structure and sorption of metal ion in *Aspergillus nidulans* in response to growth in the presence of 1mM, 2mM and 3mM of cadmium. The results serve as basic data for understanding the metabolic mechanisms associated with survival, maintenance and cell viability, which can be used in protocols for bioremediation of environments contaminated with heavy metals. Thus, in order to better understand the toxic potential of an environmental component and its effects on local biota, it is necessary a vision that involves the knowledge related to genetics, proteomics, cellular metabolism and the highest levels of biological organization, in order to make this type of study related to biomarkers a fundamental tool for management and conservation of the environment.

keywords: Cadmium, *Aspergillus nidulans*, polyphosphate, Oxidative Stress, Ultrastructure.

Capítulo I

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A indústria é responsável pela produção de diferentes substâncias poluentes encontradas na natureza, produzindo um imenso número de compostos tóxicos. Dentre os principais poluentes, os metais pesados e seus derivados exercem papel preponderante, os quais são diretamente prejudiciais á saúde humana, cujas substâncias orgânicas comprometem a manutenção dos processos vitais. Na tentativa de reduzir os severos problemas causados por elevados níveis de concentração de metais no ambiente, vários estudos têm sido desenvolvidos para estabelecer parâmetros para a diminuição da concentração destes elementos em efluentes industriais (CHEY & BUCHANAN, 2008; GADD, 2009).

Apesar da contaminação por metais pesados ser um fato desencadeante de processos tóxicos para peixe, crustáceos, plantas aquáticas, mamíferos e microrganismos, tais elementos ocorrem naturalmente e muitos deles são componentes essenciais do ecossistema global. Esses metais podem ser facilmente transportados quando em solução e, muitas vezes, podem alcançar altas concentrações em áreas fechadas por sua própria disposição ou por amplificação biológica. Em geral, o tratamento de ambientes contaminados por metais envolve processos físico-químicos de precipitação, floculação, eletrólise, cristalização ou adsorção; entretanto, estes processos podem ser onerosos e/ou contribuir para a formação de novos contaminantes ambientais. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias mais econômicas e práticas para a remoção dos metais (ADRIANO et al., 2004; GADD, 2008; GADD, 2009).

Os metais são contaminantes de extrema letalidade de tal forma que os estudos da toxicidade de metais pesados em plantas e microrganismos vêm atraindo a atenção de muitos cientistas do ambiente. Dentre os metais pesados, o cádmio é um dos mais tóxicos para os seres humanos, animais e plantas, e não exibe função biológica conhecida. Também, dentre esses elementos é o que apresenta a mais alta taxa de emissão para o ambiente nas últimas décadas (JARUP, 2002; 2003; 2009; CHEY & BUCHANAN, 2008; DONAT & DRIDEN, 2009; RENSING & ROSEN, 2009).

A biotecnologia aplicada ao meio ambiente, embora ainda considerada uma área de pesquisa emergente, mostra-se potencialmente capaz de responder com soluções

para Cádmiio...

efetivas para uma grande variedade de problema de poluição ambiental. Neste sentido, não apenas proporciona métodos para o tratamento de rejeitos industrial, mas também pode contribuir para a biorremediação de ambientes já contaminados (GADD, 2009; GADD, 2010).

Os microrganismos desenvolveram, ao longo da evolução, um grande número de mecanismos de tolerância que permitem seu pleno desenvolvimento, mesmo na presença de grandes quantidades de metais pesados: exclusão; excreção; seqüestro e transformação. Tais mecanismos são primeiramente ativos quando o sistema é exposto á presença de metais pesados. Por outro lado, os microrganismos exibem mecanismo de tolerância, ditos passivos, uma vez que não são induzidos na presença do metal, mas que sem duvida aumentam a resistência celular (GADD, 2008; GADD 2009; GADD, 2010).

A literatura tem sugerido que ocorre um possível mecanismo de quelação intracelular através de um polímero aniônico de cadeia longa, o polifosfato. Assim, nos últimos anos, vários laboratórios têm investigado a relação entre o nível de polifosfato e a resistência aos metais pesados. Desta forma, é possível gerar conhecimentos para melhorar e propor alternativas para remoção dos metais, utilizando microrganismos (KULAEV, 2000; KEASLING, et al., 2000; VAN LOOSDRECHT et al., 1997).

Além disso, em organismos expostos a metais pesados ocorre o aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio, radical superóxido, e radical hidroxila. Os radicais livres produzidos pela presença de compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucléicos e resultam em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas. A detoxificação das espécies reativas de oxigênio tornou-se um pré-requisito para a vida aeróbia, o que proporcionou o desenvolvimento de muitas defesas orgânicas a partir da evolução a fim de prevenir, interceptar e reparar os danos no organismo. Adicionalmente, os sistemas de detoxificação podem ser de natureza enzimática e não enzimática (LEHNING et al., 1995; CHANDRAN et al., 2005; ATLI & CANLI, 2007; AVERY et al., 2007; MONSERRAT et al., 2008; AVILEZ et al., 2008; ATSDR, 2008), o que pode elevar a atividade das enzimas do estresse oxidativo, como a catalase, peroxidase e glutathion-s-transferase, que utilizam esses compostos como substratos específicos (ATLI & CANLI, 2007). Essas enzimas são constantemente citadas na literatura como biomarcadoras de contaminação em diversos organismos e podem ser utilizadas também como sistemas de contaminação ambiental.

Enzimas e polímeros de origem microbiana têm sido usados em indústrias de tecnologia enzimática por décadas. Muitas das enzimas microbianas são exploradas comercialmente e utilizadas com sucesso em escala industrial para catalisar vários processos químicos, tendo eficiência e custos, tanto ambientais quanto financeiros em relação ao uso de produtos químicos. Recentemente, tais moléculas enzimáticas também têm sido exploradas em biorremediação de resíduos de substâncias complexas (CURTIS & SLOAN 2005; WHITELEY & LEE, 2006; TRIPATTI et al., 2007; OSTEGAARD & OLSEN, 2010).

Os fungos estão ecologicamente envolvidos na degradação de uma variedade de materiais complexos, uma propriedade que é atribuída a enzimas e biopolímeros produzidas por estes microrganismos. Dentre os fungos, o gênero *Aspergillus* é um grupo muito diversificado de fungos, de ocorrência cosmopolita. Membros do gênero são conhecidos pelo seu potencial para degradar biomassa vegetal e aplicações industriais desde o tempo antigo (ADENIRAN & ABIOSE, 2009; TRIPATTI et al., 2007; OSTEGAARD & OLSEN, 2010).

Considerando a necessidade de conhecimentos associados aos mecanismos celulares, bioquímicos, fisiológicos e estruturais relacionados ao desenvolvimento de tolerância e resistência a metais pesados, o presente estudo foi realizado com *Aspergillus nidulans* na metabolização de compostos xenobióticos, visando à ampliação dos conhecimentos bioquímicos e ultraestruturais do processo de remoção de cádmio.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos celulares e oxidativos de *Aspergillus nidulans* em resposta a presença de cádmio no meio de cultivo, bem como avaliar o potencial de remoção de cádmio pela biomassa viva e tratada.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *Aspergillus nidulans* em presença de diferentes concentrações de cádmio;
- Analisar a influência do crescimento em presença de diferentes concentrações de cádmio na integridade morfológica e ultraestrutural do organismo;
- Caracterizar as possíveis alterações induzidas pelas diferentes concentrações de cádmio na expressão das enzimas oxidativas;
- Caracterizar os efeitos de diferentes concentrações de cádmio na expressão das enzimas protease, amilase, fenoloxidase, xilanase, lípase, pectinase e celulase do organismo;
- Analisar o comportamento do polifosfato em resposta ao cultivo na presença de diferentes concentrações de cádmio;
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de cádmio sobre o conteúdo de proteínas totais do fungo;
- Identificar o potencial de remoção do íon cádmio pela biomassa;
- Avaliar a cinética de remoção do metal cádmio por *Aspergillus nidulans*.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Poluição Ambiental por Metais Pesados

Atividades antrópicas geram uma quantidade significativa de poluentes que são lançados ao meio ambiente, muitas vezes ocasionando distúrbios ecológicos e alterações biológicas em vários níveis, seja, molecular, celular, tecidual, organismo, populações e comunidades (GADD, 2009; ATSDR, 2008).

A poluição pode ser definida como sendo toda alteração das propriedades naturais do ambiente que seja prejudicial à saúde, à segurança ou ao bem estar da população sujeita aos seus efeitos, causada por agentes de qualquer espécie. A partir daí a contaminação do meio ambiente por quantidades crescentes de materiais de destruição espontânea muito lenta passou a causar preocupação.

Atualmente existe uma grande preocupação com relação aos efeitos a curto e longo prazo que muitos poluentes químicos possam ter sobre a saúde pública e o meio ambiente, pois a crescente urbanização das últimas décadas tem expostos animais e vegetais a muitos elementos químicos potencialmente tóxicos (CHEY & BUCHANAN, 2008; GADD, 2009). Os metais pesados são elementos químicos que apresentam número atômico superior a 22, com massa específica superior a 5 g.cm^{-3} , também são conhecidos pelo fato de serem precipitados por sulfuretos. Entretanto, a definição mais difundida é aquela relacionada com a saúde pública: metais pesados são aqueles que apresentam efeitos adversos para a saúde humana (Carvalho, 2006). Os metais pesados geralmente são classificados nas seguintes categorias: metais tóxicos (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn, etc); metais preciosos (Pd, Pt, Ag, Au, Ru, etc.); e radionuclídeos (U, Th, Ra, Am, etc.), cujos pesos específicos são normalmente superiores a $5,0 \text{ g.cm}^{-3}$, apresentando as seguintes características: 1- Toxicidade permanece por longos períodos na natureza e ocorre mesmo em baixas concentrações ($1.0\text{-}10 \text{ mg.L}^{-1}$); 2- Metais tóxicos, de baixo interesse, podem transformar-se em metais ainda mais tóxicos num determinado meio ambiente; 3- São acumuláveis; e 4- Não são degradados por qualquer método (ADRIANO et al., 2004; FULLER, 2004; IBRAHIM et al., 2006; HOGAN, 2010).

Alguns íons metálicos tóxicos tais como o mercúrio e o cádmio são muito tóxicos mesmo em baixas concentrações $0.001-1 \text{ mgL}^{-1}$ (NEUSTADT & PIECZENI, 2007; JARUP, 2009). Um dos fatores para o aumento de águas residuais contaminadas por metais pesados é a industrialização, nisto a comunidade científica é unânime. Este aumento coloca sérios problemas ambientais e de saúde pública, associados aos seus efeitos tóxicos e a sua acumulação ao longo da cadeia alimentar (CALLENDER, 2007; ATSDR, 2008; CHEY & BUCHANAN, 2008; DONAT & DRIDEN, 2009; GADD, 2009).

As águas residuais de atividades metalúrgicas e mineiras, de indústrias de eletrônica, de acabamentos de superfícies, de indústrias têxteis, curtumes, produção de plásticos, fertilizantes, tintas e pigmentos contêm metais pesados (ALHUWALIA E GOYAL, 2007; JARUP, 2009; ATSDR, 2008). Contudo, a ausência de tratamento adequado para os cursos de água superficiais tem como consequência a acumulação de metais nos recursos hídricos e sedimentos (ATSDR, 2008). Desta forma, a busca por metais pesados tem resultado na exploração de novas jazidas, enquanto que algumas espécies metálicas são extraídas, outras espécies de menor importância econômica não são recuperadas e são libertadas no meio ambiente.

Assim, as atividades antropogênicas exercem um efeito considerável na concentração e mobilidade dos metais pesados no meio ambiente. Um exemplo, o processo de mineração que envolve as operações de: extração da mina, processamento do minério de interesse, evacuação de resíduos e transporte dos semiprocessados, todas estas operações podem produzir uma poluição localizada de metais. Os metais associados a áreas de desenvolvimento industrial incluem: cromo, ferro, ouro, chumbo e mercúrio. Aproximadamente 10% dos resíduos produzidos pelos países desenvolvidos são formados por metais pesados (ATSDR, 2008).

Por estas razões a presença de tais elementos em ecossistemas naturais constitui um dos problemas ambientais de uma importância relevante, uma vez que a sua acumulação ao longo da cadeia alimentar causa sérios riscos para os animais e ao homem. Sendo assim torna-se difícil de seguir os metais pesados ao entrarem nos ecossistemas, uma vez que devido a sua acumulação passam de um nível trófico para outro superior, acabando por atingir o homem no seu topo.

1.3.2 Metais Pesados e a Saúde Humana

Ao longo da história a toxicidade dos metais é associada a grandes acidentes com graves consequências na saúde, como o caso da população Japonesa que vivia na baía de Minamata, que se alimentava de peixes e mariscos contaminados por metil-mercúrio, apresentando doenças neurológicas. Outro acidente ocorreu às margens do rio Jinstsu, devido o cultivo de arroz, o qual era irrigado por águas contaminadas com cádmio, chumbo e níquel. Assim, a periculosidade destes metais está associada a danos ao sistema nervoso, fígado, ossos e também ao bloqueio de grupos funcionais de enzimas vitais (IBRAHIM et al., 2006; BERTIN, 2006; NEUSTADT & PIECZENIK, 2007; ANDY 2009; SIMEONOV et al., 2011).

Sob o ponto de vista fisiológico, os metais pesados são classificados em três categorias: i) essenciais não tóxicos (Ca e Mg); ii) essenciais, mas nocivos acima de determinadas concentrações (Fe, Cu, Mn, Zn) e iii) tóxicos, quando causa problemas ao metabolismo ou o crescimento (Hg, Pb, e Cd). (IBRAHIM et al., 2006; NEUSTADT & PIECZENIK, 2007; ATSDR, 2008; JARUP 2009; SIMEONOV et al., 2011). A disponibilidade destes metais no ambiente é geralmente baixa, mas as células têm mecanismos de transporte ativo para a sua acumulação. A concentração destes metais torna-se problemática para o organismo não só quando excede os níveis fisiológicos, mas também quando é deficitária (IBRAHIM et al., 2006; NEUSTADT & PIECZENIK, 2007; ATSDR, 2008; JARUP 2009; SIMEONOV et al., 2011).

Os problemas de saúde relacionados com os metais pesados podem revelar-se de uma forma crônica ou aguda, refletindo-se no bem-estar individual e na sociedade.

Os efeitos tóxicos dos metais pesados manifestam-se geralmente como resultado da sua capacidade de coordenação, o que pode resultar no bloqueio de grupos funcionais e a substituição de metais essenciais em biomoléculas com funções importantes, modificações conformacionais, desnaturação e inativação de enzimas e a alteração da integridade celular, o que se reflete no crescimento, aumento da fase de latência e perturbações na morfologia e fisiologia (IBRAHIM et al., 2006; NEUSTADT & PIECZENIK, 2007; ATSDR, 2008; JARUP 2009; SIMEONOV et al., 2011).

Os metais mais perigosos de um ponto de vista toxicológico para o ser humano são: o mercúrio, o chumbo, o cádmio e o crômio. São metais não essenciais, sem qualquer função biológica. Destes o cádmio é o mais utilizado em baterias de níquel-cadmio, em pigmentos, revestimentos, ligas e componentes eletrônicos, fertilizantes e fungicidas. Uma exposição a elevados níveis de cádmio provoca disfunções renais, degeneração dos ossos, danos no fígado e no sangue, sendo considerado um composto cancerígeno para o homem (JARUP, 2009; IBRAHIM, 2006; NEUSTADT & PIECZENIK, 2007; SIMEONOV et al., 2011).

Para ilustrar a importância da poluição por metais no ambiente, pode-se citar que dentre as 20 substâncias com maior risco de causar danos aos seres humanos, em locais contaminados, conforme levantamento realizado em 2001 pela ATSDR (2008) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) e EPA (Environmental Protection Agency) do governo dos E.U.A., 5 são metais, incluindo os 3 primeiros colocados. Teores fitotóxicos de metais não são encontrados em solo sob condições naturais, mas podem ser originados frequentemente de zona industrial e atividades agrícolas; metais como Zn, Cu e Cd são amplamente difundidos e podem aparecer em altos níveis no solo.

No âmbito da Convenção sobre a poluição atmosférica, em 1998, foi assinado um protocolo relativo aos metais pesados dirigidos ao controle de emissões para a atmosfera, tendo prioridade metais como chumbo, cádmio e mercúrio. Dessa forma, o problema ambiental relativo à poluição por metais pesados é uma das prioridades para organizações internacionais e programas.

1.3.3. CÁDMIO (Cd)

1.3.3.1. Considerações Gerais

O cádmio foi descoberto na Alemanha em 1817 por Friedrich Strohmeyer, professor de metalurgia, observando que algumas amostras de calamina com impurezas mudavam de cor quando aquecidos, dando origem a um material cuja cor era amarela em vez de branca. Contudo, não ocorria com a calamina pura. Após um

estudo mais pormenorizado, concluiu-se que o responsável pela alteração da cor era o óxido metálico, o qual foi isolado por precipitação com ácido sulfídrico (COSANO, 2003).

O cádmio (do latim, *cadmia*, e do grego *kadmeia*, que significa "calamina", nome dado antigamente ao carbonato de zinco, $ZnCO_3$) é um metal macio com brilho muito semelhante ao da prata, branco azulado, dúctil e maleável, relativamente pouco abundante, sendo um dos metais mais tóxicos. Pertence ao grupo IIB da Tabela Periódica, possui elevada pressão de vapor; Ponto de Fusão igual a $320,9^{\circ}C$; Ponto de Ebulição de $765^{\circ}C$. Oxida-se rapidamente no ar em forma de vapor produzindo Cd. Dissolve-se em soluções ácidas e no NH_4NO_3 . Pode-se cortá-lo facilmente com uma faca. Em alguns aspectos é similar ao zinco. Seu estado de oxidação mais comum na natureza é o +2. Pode apresentar o estado de oxidação +1, mas que é muito instável. À temperatura ambiente e a seco o cádmio é um produto estável. Oxida-se lentamente no ar com a umidade. Aquecido a temperaturas elevadas encandeia-se emitindo vapores amarelo-avermelhados de óxido de cádmio. Este metal é muito atacado pelos ácidos, mesmo pelos mais fracos, como por exemplo, os ácidos orgânicos dos alimentos. Os sais daí resultantes são tóxicos. Os compostos do cádmio, nomeadamente o clorato e o bromato podem causar explosões sob aquecimento, por choque ou por contato com materiais redutores. Quando queimado ou aquecido, produz o óxido de cádmio, pó branco e amorfo ou na forma de cristais de cor vermelha ou marrom. Sulfetos, carbonatos e óxidos são quase insolúveis na água, ao passo que os nitratos, halogenatos e sulfatos são hidrossolúveis (COSANO, 2003; DECKERT, 2005; ATSDR, 2008; EPA, 2009; HOGAN, 2010).

O cádmio é um elemento escasso na crosta terrestre. As reservas são difíceis de serem encontradas e existem em pequenas quantidades. Dificilmente é encontrado na forma elementar, sempre é encontrado ligado a outros elementos, tais como oxigênio, cloro ou enxofre, formando compostos. Todos estes compostos são sólidos estáveis que não se evaporam. Somente o óxido de cádmio é encontrado na atmosfera na forma de pequenas partículas junto com o zinco, em proporções que variam de 1:100 a 1:1000, na maioria dos minérios e solos (HOGAN, 2010).

O Cd utilizado na indústria tem sido produzido nos últimos 20 anos, daí na atualidade seus compostos apresentarem numerosas aplicações na mesma como, por exemplo, (HOGAN, 2010):

- ✓ Aproximadamente três da quarta parte de cádmio produzido é empregado na fabricação de eletrodos das baterias "recarregáveis (Ni-Cd, níquel-cádmio)" usadas em calculadoras e aparelhos similares, especialmente nas baterias e principalmente na fabricação de pilhas;
- ✓ Uma parte importante é empregada em galvanoplastia (processo eletrolítico que consiste em recobrir um metal com outro), como revestimento, brilho e resistência á corrosão a objetos. É um dos processos industriais que mais utiliza o cádmio (entre 45 a 60% da quantidade produzida por ano);
- ✓ Alguns sais são utilizados como pigmentos na forma iônica. Por exemplo, o sulfato de cádmio é empregado como pigmento amarelo;
- ✓ É usado em algumas ligas metálicas de baixo ponto de fusão;
- ✓ Devido ao seu baixo coeficiente de fricção é muito resistente a fadiga, sendo utilizado em ligas para almofadas;
- ✓ Revestimento eletrolítico dos metais;
- ✓ Esmaltes e tinturas têxteis;
- ✓ Cigarros;
- ✓ Muitos tipos de solda contém este metal;
- ✓ Em barras de controle em fissão nuclear;
- ✓ Alguns compostos fosforescentes de cádmio são empregados em televisores;
- ✓ É empregado em alguns semicondutores;
- ✓ Alguns compostos de cádmio são empregados como estabilizantes de plásticos como, por exemplo, no PVC;
- ✓ Fotografia, litografia e pirotecnia;
- ✓ Varetas para soldagens, em células fotoelétricas.

1.3.3.2. Aspectos ambientais e toxicológicos

A fonte mais importante de descarga de cádmio para o meio ambiente é através da queima de combustíveis fósseis (como carvão e petróleo) e pela incineração de lixo

doméstico. O cádmio também contamina o ar quando se fundem rochas para extrair zinco, cobre ou chumbo. Trabalhar ou viver na proximidade de uma destas fontes contaminantes pode resultar numa exposição significativa ao cádmio (ATSDR, 2008; JARUP, 2009; SATARUG et al., 2010; GARRET et al., 2011).

A emissão de Cd para o meio ambiente, também ocorre mediante a incineração de plásticos e outros materiais que os utilizem como pigmento ou estabilizante. Sendo os plásticos como principais fontes de Cd (67-77%) e as pilhas e baterias contribuindo com 45% para a contaminação de cádmio nos lixos. Cada bateria contém cerca de 5 gramas de cádmio, sendo a maior parte volatilizada e emitida para o ambiente quando as baterias gastas são incineradas como um componente do lixo. Também ocorre emissão para a atmosfera quando o aço laminado com cádmio é reciclado (PINOT et al., 2002; ATSDR, 2008; JARUP, 2009; SATARUG et al., 2010; GARRET et al., 2011).

O solo possui uma grande capacidade de retenção de metais pesados, porém, se essa capacidade for ultrapassada, os metais em disponibilidade no meio penetram na cadeia alimentar dos organismos vivos ou são lixiviados, colocando em risco a qualidade do sistema de água subterrânea.

A retenção desses metais no solo pode se dar de diferentes formas, já que os argilominerais possuem sítios negativos onde os metais são adsorvidos por forças eletrostáticas. A contaminação dos solos por Cádmio se dá principalmente por mineração, poluição atmosférica de indústrias metalúrgicas, queima de combustíveis fósseis entre outros (ATSDR, 2008; JARUP, 2009; HOGAN, 2010; SATARUG et al., 2010; GARRETT et al., 2011).

O cádmio, existente na atmosfera é precipitado e depositado no solo agrícola com uma relação aproximada de 3 g/hectares/ano. Rejeitos não ferrosos e artigos que contêm cádmio contribuem significativamente para a poluição ambiental. Outras formas de contaminação do solo são através dos resíduos da fabricação de cimento, da queima de combustíveis fósseis e lixo urbano e de sedimentos de esgotos (ATSDR, 2008; SATARUG et al., 2010; GARRET et al., 2011).

As baterias recarregáveis níquel-cádmio contabilizam 400 toneladas do metal pesado altamente tóxico, tanto para o ser humano como para o meio ambiente e são

descarregadas no meio ambiente anualmente. A causa mais significativa é que os atuais sistemas de coleta de baterias usadas são aparentemente inadequados. Apenas 30 por cento das baterias de cádmio, tais como as usadas em ferramentas á bateria são retornadas pela população. Uma pesquisa realizada concluiu, portanto, que proibir o uso de baterias de níquel-cádmio em ferramentas seria o único caminho certo para evitar a poluição do ambiente a partir desta fonte. As baterias retornadas são classificadas e recicladas ou dispostas (HOGAN, 2010).

A água é outra fonte de contaminação e deve ser considerada não somente pelo seu consumo como água potável, mas também pelo seu uso na fabricação de bebidas e no preparo de alimentos. Sabe-se que a água potável possui baixos teores de cádmio (cerca de 1 mg/L), o que é representativo para cada localidade (ATSDR, 2008; MARIA et al., 2008; SATARUG et al., 2010; GARRET et al., 2011).

Na agricultura, uma fonte direta de contaminação pelo cádmio é a utilização de fertilizantes fosfatados. Sabe-se que a captação de cádmio pelas plantas é maior quanto menor o pH do solo. Nesse aspecto, as chuvas ácidas representam um fator determinante no aumento da concentração do metal nos produtos agrícolas. Com isso ás plantas absorvem este elemento principalmente do solo e da água (ATSDR, 2008; MARIA et al., 2008; SATARUG et al., 2010; GARRET et al., 2011).

Assim, as plantas constituem-se o principal ponto de entrada do Cd na cadeia alimentar. Em contraste com outros metais pesados tóxicos, o Cd no solo é mais facilmente absorvido pelas raízes das plantas, sendo este fenômeno mais pronunciado em solos ácidos. Acredita-se que, similarmente a outros metais pesados, o Cd entra nas células vegetais através de transportadores de cátions com ampla especificidade de substrato. No citosol, o Cd é ligado a quelantes, tais como fitoquelatinas e ácido cítrico e, posteriormente, sequestrado em vacúolo. Nas plantas um efeito claro da toxidez pelo Cd pode ser observado na germinação, comprometendo a respiração e induzindo diminuição de crescimento (ASTDR, 2008; JARUP, 2009).

Além disso, a presença do metal causa efeitos variados na atividade enzimática. O alvo potencial da ação de metais como o Cd, são enzimas e proteínas, que contém grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto, levando a oxidação destes grupos que, reagindo com o enxofre, destrói as ligações dissulfeto, desnaturando a proteína, resultando na redução da atividade enzimática. Vários exemplos deste efeito foram descritas para enzimas do Ciclo de Krebs na mitocôndria (MARTELLI et al., 2006; IVANINA et al., 2008; SATARUG et al., 2010; GARRET et al., 2011).

Dessa forma, o metal é prejudicial á saúde humana, uma vez que induz a inibição de algum sistema de absorção de nutrientes, inorgânicos e orgânicos pelo organismo humano. O cádmio e seus compostos são extremamente tóxicos em baixas concentrações.

É essencial que se tomem cuidados especiais em processos de soldagem e quando há emissão de vapores e fumaças. Suas propriedades químicas são similares às do zinco, mas apresenta maior tendência á formação de complexos.

Assim que o cádmio é liberado na atmosfera, ele permanece lá para sempre, uma vez que não é degradável e é acumulado no meio ambiente (ATSDR, 2008; CELIA et al 2009; JARUP, 2009; CANDEAS et al., 2010).

O cádmio é um elemento de vida biológica longa (10 a 30 anos) e de lenta excreção pelo organismo humano. O órgão alvo primário, nas exposições ao cádmio á longo prazo, é o rim. Os efeitos tóxicos provocados por ele compreendem principalmente distúrbios gastrointestinais, após a ingestão do agente químico. A inalação de doses elevadas produz intoxicação aguda, caracterizada por pneumonite e edema pulmonar. O efeito tóxico do cádmio em seres humanos tem sido cuidadosamente pesquisado e classificado como substância carcinogênica (SCHEWERDTLE et al., 2010; GARRET et al., 2011).

A exposição ao cádmio nos humanos ocorre geralmente através de duas fontes principais (JARUP, 2009):

- Via oral (por água e ingestão de alimentos contaminados),
- Inalação (aerossóis, poeiras e fumos, absorção estimada em 0,1 a 50%; influenciada pelo tamanho e propriedades químicas), sendo esta a principal via de absorção.

O cádmio entra na corrente sanguínea por absorção no estômago ou nos intestinos logo após a ingestão do alimento ou da água, ou por absorção nos pulmões após a inalação. Muito pouco cádmio entra no corpo através da pele. Uma vez absorvido, o cádmio é transportado pela corrente sanguínea até o fígado, onde se une a uma proteína de baixo peso molecular. Pequenas quantidades desse complexo proteína-cádmio passam continuamente do fígado para a corrente sanguínea, para ser transportado até os rins e filtrado através dos glomérulos, para posteriormente ser reabsorvido e armazenado nas células tubulares dos rins. Usualmente só é absorvido

pelo sangue aproximadamente 1 a 5% do cádmio ingerido por via oral, entretanto é absorvido de 30 a 50% quando inalado. Este último órgão excreta de 1 a 2% do cádmio obtido diretamente das fontes ambientais.

A concentração do metal nos rins é aproximadamente 10 mil vezes mais altas que a da corrente sanguínea. A excreção fecal do metal representa uma mínima quantidade do cádmio não absorvido no sistema gastrointestinal. Por outro lado, se estima que a vida biológica do cádmio nos humanos varia de 13 a 40 anos (EPA, 1999; ATSDR, 2008; KOBAYASHI et al., 2008; HSU et al., 2009; JARUP, 2009).

Os sinais clínicos da intoxicação por cádmio podem ser classificados em função dos tipos de transtornos observados. Assim, transtornos gastrintestinais, traqueobronquite, pneumonia e edema pulmonar (óbito por doença pulmonar > 20%) caracterizam a intoxicação aguda pelo metal. Na intoxicação crônica: transtornos gastrintestinais, anemia, eosinofilia, descoloração dos dentes, enfisema pulmonar, hipertensão arterial, danos ao miocárdio, doença renal. A intoxicação crônica é precedida de um período de impregnação em que se consta frequentemente o aparecimento de um "anel amarelo cádmio dentário". Esta pigmentação do esmalte começa na base do dente e pode chegar a cobrir metade do mesmo (EPA, 1999; ATSDR, 2008; ETSUKO et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2008; HSU et al., 2009; JARUP, 2009; SCHWERDTLE et al., 2010).

As manifestações patológicas agrupam-se em síndromes mais ou menos complexas. As mais características são de ordem respiratória e renal, perturbações respiratórias com ulcerações nasais, laringite, bronquite e enfisema, perturbações hepato-digestivas com náuseas, vômitos e prisão de ventre e diarreia em alternância; perturbações renais com albuminúria; podem ainda ocorrer perturbações sanguíneas, nervosas e ósseas (EPA, 1999; ATSDR, 2008; ETSUKO et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2008; HSU et al., 2009; JARUP, 2009; SCHWERDTLE et al., 2010).

A Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer tem classificado o Cd como uma substância carcinogênica, causando a proliferação celular e induzindo a apoptose (SHLOMO & ZIANG, 2008; ATSDR, 2008).

1.3.4 Interação dos Microrganismos com Metais Pesados

Metais são componentes naturais da rocha e leito de rocha. Por esse motivo, solos têm naturais concentrações de fundo dos diferentes metais pesados como resultado de intemperismo da rocha. Estas concentrações irão variar com a localização. Assim, existem naturalmente na crosta da terra em concentrações traços, suficientes para subsidiar os sistemas de vida com nutrientes essenciais, mas em níveis insuficientes para provocar toxicidade (ADRIANO et al., 2001; 2004; 2005; DONAT & DRIDEN, 2009).

Metais e Metalóides passam por uma matriz de processos biogeoquímicos dinâmicos, na qual interações complexas envolvendo rocha, solo, água, ar e microrganismos regulam o habitat natural e determinam a sua disponibilidade para sustentação dos recursos naturais. Processos biogeoquímicos afetam a especiação do metal, que por sua vez controla sua solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade. Os íons metálicos são levados a fazer parte da fase líquida aquosa do solo e seus solutos, que resultam em íons livres ou complexados com ligantes orgânicos e/ou inorgânicos. Tais formas podem: (1) ser absorvidas pelas plantas; (2) retidas em superfícies minerais, matéria orgânica natural, e por microrganismos; (3) transportados através do solo para as águas subterrâneas através de lixiviação ou por transporte facilitado por colóide; transporte facilitado, (4) precipitado e (5) difundido em meios porosos. Durante o processo, exsudatos de raízes e microrganismos afetam o transporte e a solubilidade de metais (SPARKS, 2005; GADD, 2007, 2008. 2009; ADRIANO et al., 2009).

Microrganismos desempenham um papel geotivo chave na biosfera, particularmente nas áreas de biotransformação e ciclo biogeoquímico de elementos metálicos, bem como nas transformações e decomposição de minerais, e formação dos solos e sedimentos. Transformam metais através de oxidação–redução e metilação (o processo de substituição de um átomo, geralmente um átomo H, com um grupo metila) e reações de demetilação.

Juntos, esses processos afetam metal toxicidade e mobilidade (ADRIANO 2001; SPARKS 2002; ADRIANO et al., 2005; ADRIANO et al., 2009; RENSING & ROSEN, 2009).

Todos os tipos de microrganismos, incluindo procariotas e eucariotas e respectivas associações simbióticas podem contribuir ativamente para os fenômenos geológicos. Exibem uma variedade de propriedades que podem efetuar mudanças na especiação, toxicidade e mobilidade, de metais, bem como formação, dissolução ou deterioração de espécies metálicas. Assim, microrganismos interagem com metais e minerais em ambientes sintéticos e/ou naturais, alterando seus estados físicos e químicos, sendo metais e minerais também elementos chave no crescimento, atividades e sobrevivência celular (GADD & RAVEN, 2010).

Metais e seus derivados interagem com microrganismos de várias formas dependendo da espécie metálica, organismos e ambiente, enquanto que os componentes estruturais e atividades metabólicas também influenciam a especiação de metais e dessa forma, sua solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade (GADD 2007, 2008, 2009, 2010).

Metais estão diretamente e/ou indiretamente envolvidos em todos os aspectos do crescimento, metabolismo e diferenciação dos fungos. Enquanto muitos metais são essenciais para os organismos, por exemplo, K, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Co e Ni, muitos outros não parecem exibir funções essenciais, por exemplo, Rb, Cs, Al, Cd, Ag, Au, Hg e Pb. Contudo, esses elementos podem interagir com as células fúngicas, sendo acumulados através de mecanismos físico-químicos e sistemas de transporte de especificidade variável (GADD 2007, 2008, 2009, 2010).

A maioria dos metais, essenciais e não essenciais, exibem toxicidade acima de certas concentrações, as quais irão depender do organismo em questão, das propriedades físico-químicas do metal e fatores ambientais. Tudo isso explicita mecanismos de detoxificação se o organismo sobrevive.

Embora, as conotações de toxicidade e bioacumulação estejam muitas vezes ligadas com os metais não essenciais, a toxicidade potencial de muitos metais essenciais também é descrita (GADD 2007, 2008, 2009, 2010).

Os metais tóxicos exercem efeitos lesivos de muitas formas, mas principalmente com resultado de sua forte habilidade de coordenação. Os efeitos tóxicos incluem bloqueio de moléculas biologicamente importantes – enzimas e sistemas de transporte para nutrientes essenciais e íons; remoção e ou substituição de íons metálicos

essenciais (competição) de biomoléculas e unidades celulares funcionais, modificação de conformação, desnaturação e inativação de proteínas e enzimas e lesão de membranas citoplasmática e de organelas. Assim, afirma-se que a toxicidade observada para os metais pesados se deve á presença excessiva de metais pesados e a um conjunto de interações ao nível celular (HALL, 2002; GADD 2007, 2008, 2009, 2010).

Dessa forma, os sinais de toxicidade podem variar amplamente entre os fungos e íons metálicos. Mas, pode-se afirmar que um pré-requisito para as interações de toxicidade é o contato entre o metal ativo e os componentes celulares.

No entanto, os mecanismos de indução de toxicidade ainda não estão completamente compreendidos. Atualmente começa-se a verificar uma interdependência entre a extensão da poluição por metais e a tolerância/resistência de microrganismos isolados de ambientes contaminados por esses elementos. A seleção de microrganismos resistentes e a sua utilização como bioindicadores de ambientes poluídos tem demonstrado ser uma ferramenta sensível e de confiança para a detecção de metais abaixo do limiar da sua toxicidade.

Assim, a utilização de sistemas biológicos apresenta uma adesão crescente para a avaliação de ecotoxicidade integrada, permitindo uma maior compreensão dos potenciais perigos associados aos metais pesados no ambiente, bem como para o desenvolvimento de estratégias de remediação ambiental (GRAVILESKA, 2004; AKSU 2005; ALLURI et al., 2007; CHOJNACKA, 2010; GADD, 2010).

A despeito da aparente toxicidade muitos microrganismos crescem e mesmo se desenvolvem em abundância em locais contaminados com metais pesados, e uma variedade de mecanismos, ativos e incidentais, contribui para a sua resistência. A resistência a metais tóxicos é ampla, com frequências que vão de baixos percentuais a aproximadamente 100% em ambientes fortemente poluídos (ECCLES, 1995; BROSS et al., 2005; GADD, 2010).

Parece que a maior parte dos mecanismos de sobrevivência depende de algum tipo de mudança na especiação do metal que conduz a diminuição ou aumento na sua mobilidade. Tais mudanças incluem transformação redox, produção de peptídeos e proteínas que ligam metais (metalotioneínas e fitoquelatinas), precipitação orgânica ou

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

inorgânica, transporte ativo, efluxo e compartimentalização intracelular, enquanto paredes celulares e outros componentes estruturais também exibem significativa habilidade ligadora de metais (BRUINS, 2000; CHOJNACKA, 2010; GADD, 2010).

Outras propriedades microbianas também conduzem à solubilização de metais, de fontes orgânicas e inorgânicas (Gadd, 2010). A membrana citoplasmática é obviamente o sítio inicial da ação de uma espécie metálica tóxica, o que resultará na perda de solutos, por exemplo, potássio, e aumento da permeabilidade celular para materiais externos (GADD 2007; 2008; 2009; 2010).

Freqüentemente, os termos resistência e tolerância são usados como sinônimos. Gadd (1992) definiu resistência como à habilidade de sobreviver a metais tóxicos por mecanismos de detoxificação produzidos em resposta direta ao metal. A tolerância, por outro lado, seria a habilidade de sobreviver à toxicidade de metais por meio de propriedades intrínsecas do organismo.

Comumente a tolerância/resistência dos microrganismos a metais pesados está diretamente relacionada à capacidade de acumulação.

Os processos de acumulação de metais por microrganismos podem ou não depender do metabolismo. Microrganismos possuem dois mecanismos distintos de acumulação de metais.

O primeiro envolve a adsorção físico-química à superfície celular, constituindo um processo independente do metabolismo que é denominado de "biossorção". O segundo é exclusivamente dependente do metabolismo celular e envolve transporte ativo dos metais para o interior da célula, sendo conhecido como "bioacumulação" (GADD 2007, 2008, 2009, 2010).

Dessa maneira, a detoxificação de metais via bioacumulação é baseada em sistemas de transporte. Em bactérias, o cádmio é internalizado pelo sistema de transporte do magnésio, enquanto que em plantas o cádmio entra pelo sistema de transporte do cálcio. Em *Sacharomyces cerevisiae*, cádmio é ligado pela glutathione, resultando no complexo cádmio-bis-glutathionato, o qual é transportado para o interior de vacúolos (NIES, 1999; WANG & CHEN 2006).

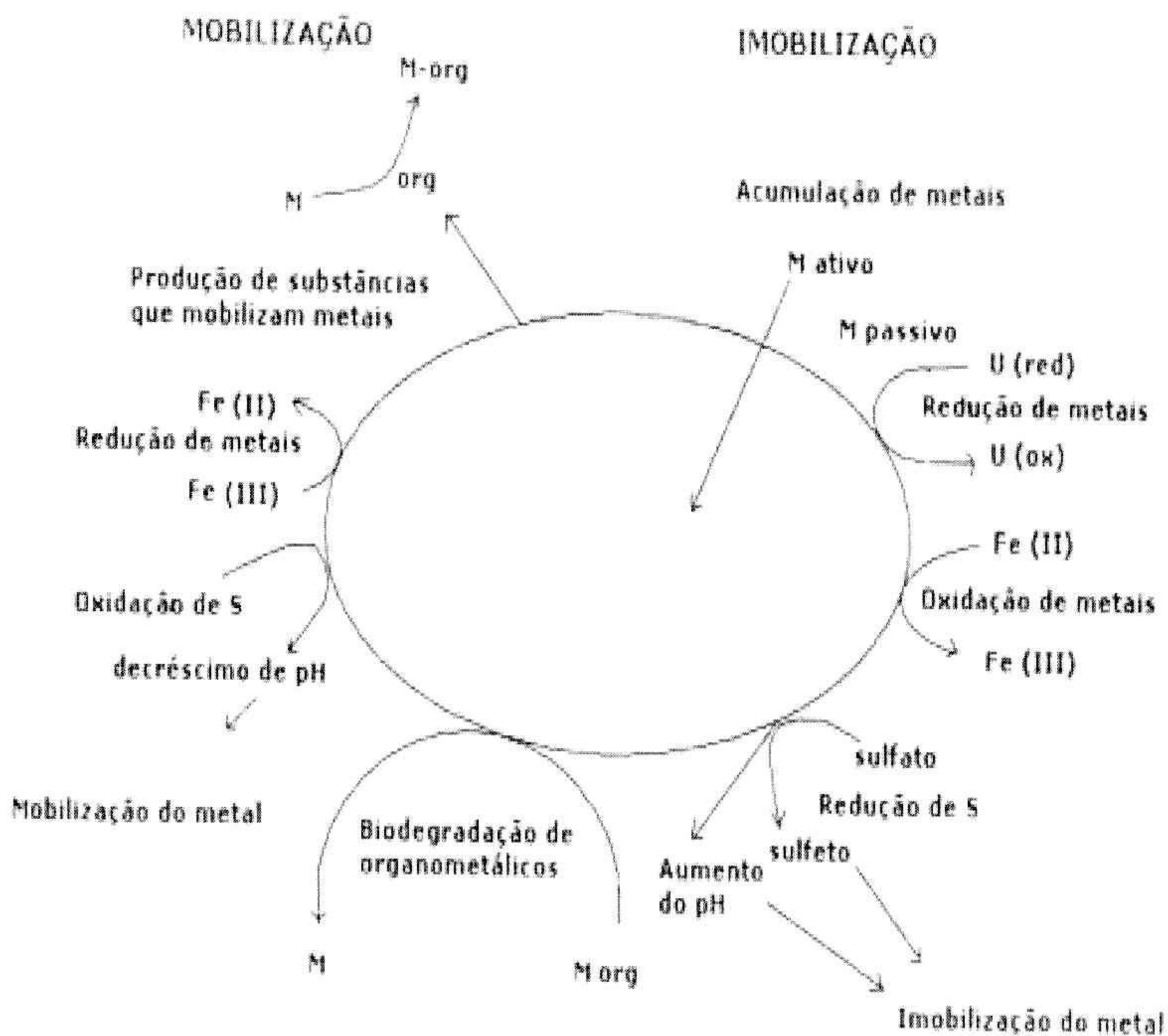


Figura 1. Esquema resumido dos mecanismos de interação entre metais e microrganismos. Fonte: LEDIN, 2000

O fenômeno de biossorção está intimamente relacionado à superfície celular e varia significativamente entre grupos, gêneros e espécies de microrganismos. A predominância de grupos carregados negativamente em vários biopolímeros que formam a parede celular confere um caráter aniônico à superfície celular, resultando na atração passiva dos íons de metais a mesma. Sendo assim, a ligação dos íons metálicos ocorre por interações eletrostáticas com estes grupos funcionais (OH⁻, HPO₄⁻², RCOO⁻, -SH-, NH₂-) presentes em carboidratos, lipídios e proteínas da superfície celular.

A independência do metabolismo ocorre pelo fato de não ser necessário um gasto energético por parte da célula microbiana, para que haja captação dos íons metálicos. A remoção neste caso pode ocorrer usando tanto células vivas quanto

células mortas (GADD, 1992). Atualmente, a bioissorção é o processo mais usado na biorremediação de metais pesados, sendo muito eficiente no tratamento de efluentes, porém seu potencial em solo é menos avançado (GADD 2007; 2008; 2009; ZIMMERMANN & WOLF, 2010).

A bioacumulação é um processo mais lento do que a bioissorção e pode ser inibida pela ausência de nutrientes tais como glicose, nitrogênio e fósforo, e pela ação de inibidores metabólicos e fatores ambientais (GADD, 2010). Este processo de acumulação de metais envolve tanto mecanismo passivo quanto ativo, pois os íons metálicos precisam ligar-se a parede celular para depois serem internalizados (GADD, 2010).

Enquanto a bioissorção é um fenômeno que ocorre em microrganismos vivos e mortos, a bioacumulação é apenas mediada por microrganismos vivos. Sendo assim, a bioacumulação é um processo dependente do crescimento, em contraste com a bioissorção que é crescimento independente (GADD, 2010). Em adição, células vivas podem interagir de diversas formas com metais, tanto por mecanismos passivos, utilizados por células mortas, quanto por mecanismos que requerem atividade metabólica (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010).

Na bioacumulação o transporte dos cátions de metais pesados através da membrana celular e sua acumulação intracelular são dependentes do metabolismo, ou seja, ocorrem somente em células vivas, capazes de gerar energia.

A remoção de íons metálicos por este tipo de mecanismo é usualmente mais lento que o mecanismo de adsorção físico-químico. Em contrapartida maiores quantidades de metal podem ser acumuladas (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010).

Os processos de bioacumulação apresentam algumas vantagens em relação à bioissorção no tocante a sua utilização em biorremediação de metais pesados, como a capacidade de remoção contínua de metais e potencial de otimização, através do desenvolvimento de espécies mais resistentes (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010).

A necessidade de fontes de energia, a presença de inibidores metabólicos, a temperatura e a luminosidade são os principais fatores que afetam este tipo de acumulação (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010). Os mecanismos de transporte envolvidos na acumulação de metais pesados são pouco conhecidos. Uma

das possibilidades relacionadas ao acúmulo de metais seria a de que os metais pesados podem ser captados pelos sistemas de transporte intracelular que são essenciais para o desenvolvimento microbiano (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010).

Uma vez dentro da célula, os íons metálicos podem se localizar em organelas, ou podem estar ligados a proteínas, deslocando os íons adequados ao funcionamento celular de suas posições originais, prejudicando, assim, as funções metabólicas (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010). A Figura 2 mostra um esquema sobre os mecanismos de interação entre metais e células bacterianas.

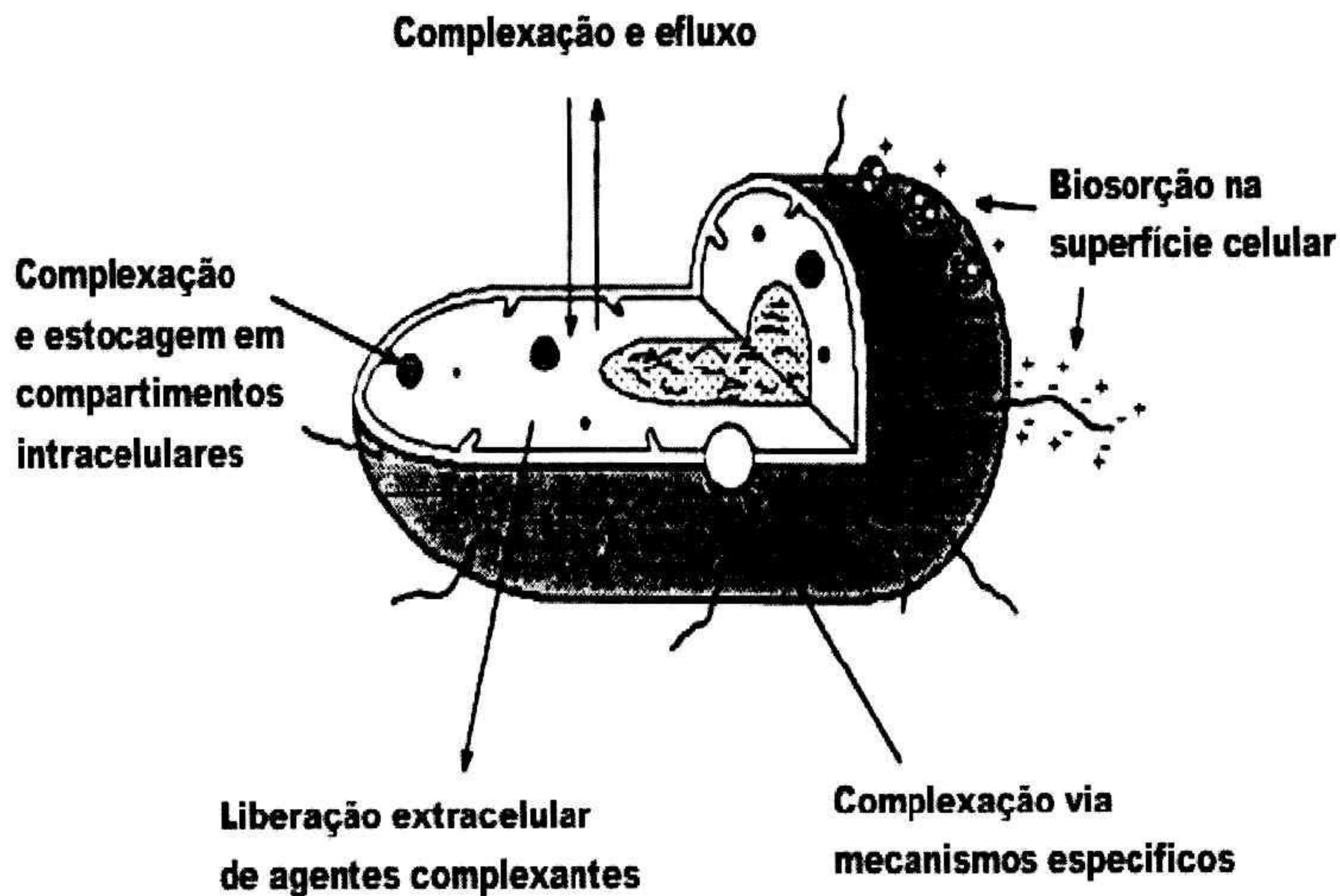


Figura 2. Mecanismos de interação entre metais e células bacterianas. Fonte: Birch e Bachofen, 1990.

Existem autores que sugerem como tecnologia alternativa, o emprego de biosurfactantes produzidos pelas bactérias, leveduras e fungos filamentosos, os quais poderiam ser usados para a remediação ambiental de metais pesados de solos, superfícies e águas subterrâneas (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010). Na

remediação biológica, processos diferentes podem ser utilizados de acordo com o tipo de contaminação, a área contaminada e o microrganismo.

Muitos trabalhos já obtiveram sucesso usando algas, bactérias e fungos, já que suas células possuem propriedades que os habilitam a utilizar mecanismos de interação com os metais.

Igualmente, o mecanismo bioquímico microbiano para lidar com metais pesados, não consiste na degradação do átomo contaminante, mas na mudança do estado de oxidação do metal, permitindo a sua detoxificação. Independentemente das reações que ocorrem, provavelmente, o metal ainda permanecerá no local, pois se sabe que os fungos possuem capacidade para concentrar ou remover os mesmos, seja em forma de precipitados ou de substâncias voláteis, transformando as espécies em compostos menos tóxicos e mais facilmente disponíveis. Em outras palavras, os microrganismos podem apenas alterar a especiação dos contaminantes e convertê-los em formas não tóxicas (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010).

A troca no estado de oxidação permite que várias estratégias de biorremediação sejam seguidas: a) metal se torna menos solúvel e precipita o que permite que esteja menos disponível para os organismos do ambiente; b) Torna-se mais solúvel, o que facilita sua remoção pela permeação através da sua membrana celular; c) Permite que possa haver uma volatilização do elemento e/ou do composto e d) Converte-se em um produto menos tóxico para os organismos do meio (GADD, 2010; ZIMERMANN & WOLF, 2010).

A remediação de um solo contaminado com cátions metálicos tóxicos tem empregado, convencionalmente, técnicas que incluem a escavação e o depósito em aterros sanitários ou, ainda, o recobrimento do sítio contaminado. Essas tecnologias tradicionais, além de não serem capazes de remediar realmente os solos, são muito caras (KATSOU et al., 2010a, 2010b, 2011). Recentemente, a busca por tecnologias inovadoras tem sido direcionada para a aplicação da biorremediação. Por esse motivo, as tecnologias que utilizam microrganismos e biossorbentes, de um modo geral, para remover metais pesados a partir de esgotos têm sido largamente estudadas (GADD, 2010, ZIMERMANN & WOLF, 2010).

1.3.5. Estresse Oxidativo e Mecanismos Antioxidantes

Todos os sistemas vivos, durante o seu ciclo de vida, estão expostos a diversas situações desfavoráveis, que se traduzem por desequilíbrios ou estresses, ao nível do seu desenvolvimento e crescimento, que afetam o seu comportamento biológico. Neste contexto, um estresse representa uma alteração significativa das condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento normal de um organismo, o que origina uma resposta, em diferentes níveis, que passam por alterações fisiológicas, bioquímicas, moleculares e ainda na expressão de genes (HALIWELL & GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

O estresse oxidativo é um fator chave no estresse abiótico e biótico que ocorre quando, ao nível da célula, ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species, ROS) e a defesa antioxidante que originará alterações drásticas na fisiologia da célula (JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

O oxigênio molecular é relativamente não reativo, mas as suas espécies derivadas são elementos chaves em reações químicas. Assim, as espécies reativas de oxigênio são formas de oxigênio atmosférico (O_2) parcialmente reduzidas que resultam do metabolismo aeróbio. São subprodutos que resultam da inversão do *spin* de um elétron do O_2 para formar oxigênio singleto (1O_2) ou da transferência de um, dois ou três elétrons do O_2 para formar, respectivamente, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila ($HO\bullet$) (JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

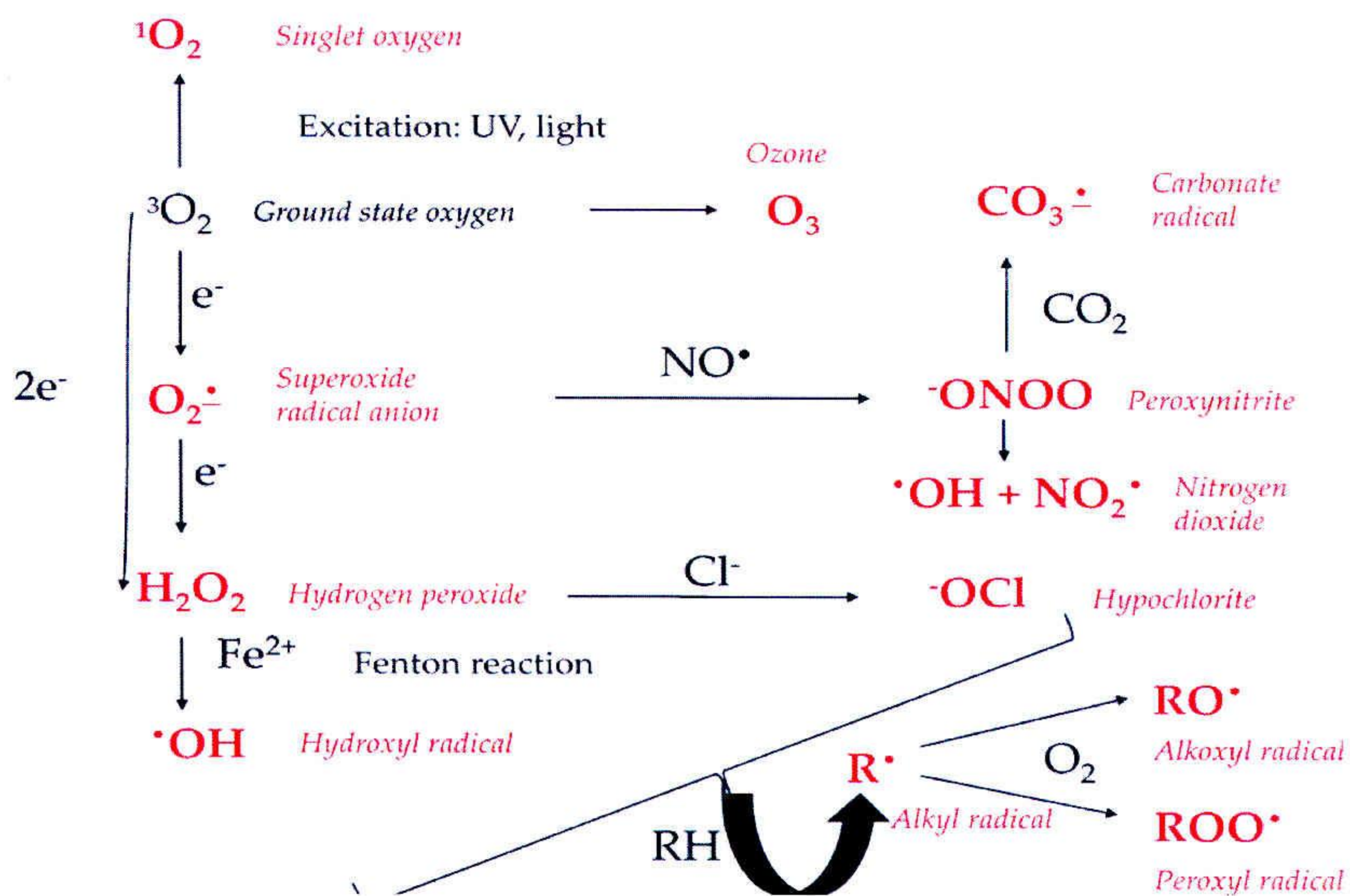


Figura 3. Principais espécies reativas de oxigênio; RH – molécula orgânica. Fonte: BARTOSZ (2009).

Estudos recentes indicam que os metais funcionam como catalisadores nas reações oxidativas de macromoléculas biológicas, portanto toxicidades associadas a estes metais podem ser devido ao dano oxidativo. Metais Redox-ativo, como o ferro, cobre e cromo, bem como metais redox-inativos, tais como chumbo, cádmio, mercúrio e outros metais podem causar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Eros), como radical hidroxila (HO^\bullet), radical superóxido (O_2^\bullet) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que leva a destruição celular. Metais pesados, especialmente o cobre, o mercúrio e o cádmio quando presentes em quantidades excessivas provocam estresse oxidativo, que se deve á ocorrência na célula de reações redox descontrolada que resultam na formação de ROS (AUGUSTYNIAK et al., 2010).

Na presença de íons metálicos, o peróxido de hidrogênio pode ser reduzido, por íons superóxido, dando origem a radicais hidroxilo (HO^\bullet). Estes possuem uma reatividade muito superior aos radicais que lhe deram origem.

Para a célula, o risco principal é colocado quando se formam radicais hidroxilo, pois não existem mecanismos de eliminação destes radicais. Assim, a única forma de eliminar ou reduzir os danos, potenciais, deste radical é através do controle das espécies que estão na sua origem (AUGUSTYNIAK et al., 2010).

A regulação entre a produção e degradação de ROS é efetuada através de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, conforme a estrutura/função química do agente (JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010). Qualquer desequilíbrio entre a produção de ROS e moléculas antioxidantes devidos quer ao excesso de ROS ou á falha do sistema antioxidante, provoca o fenômeno de estresse oxidativo (JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

Ainda conforme a ação sobre os radicais livres, o antioxidante pode ser denominado de “*scavenger*”, quando ele age transformando um radical livre em outro menos reativo, ou “*quencher*”, quando consegue neutralizar completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação. Dessa forma, o mecanismo de ação dos antioxidantes é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura dos radicais livres, sequestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres aumentos da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo. O estudo da atividade enzimática serve como critério de avaliação da toxicidade de metais pesados. Determinada a via preferencial de eliminação do poder tóxico por estes metais, podem ser traçadas estratégias de estudo que possam condicionar tanto a sensibilidade como a tolerância a metais.

1.3.5.1. O Sistema Antioxidante Enzimático

Os mecanismos enzimáticos incluem sistemas enzimáticos capazes de remover, neutralizar e/ou eliminar radicais livres (BARTOSZ, 2009).

Os parâmetros que determinam a contribuição das diferentes enzimas na eliminação do efeito nocivo, provocado pelas ROS são: a afinidade para o substrato, taxa de reação e concentração da enzima, nos diferentes compartimentos celulares. Entre os principais mecanismos antioxidantes enzimáticos, destaca-se a importância da catalase (CAT), Superóxido-dismutase (SOD) e ascorbato-peroxidase (APX) oxidativo (JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

Assim, de modo a minimizar os danos infligidos pelas ROS, as células desenvolveram sistemas antioxidantes enzimáticos. O balanço ou equilíbrio entre as atividades das enzimas é fundamental, pois determina os teores de ROS (superóxido, peróxido de hidrogênio), entre outros na célula. A resposta ao estresse oxidativo, que protege os organismos de efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio (Eros), vem sendo amplamente estudada em procariotas e eucariotas (BARTOSZ, 2009; JOMOVA et al., 2010; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

A catalase é uma enzima que se encontra, sobretudo nos peroxissomas, onde promove a decomposição do peróxido de hidrogênio - H_2O_2 a uma taxa extremamente elevada. Por possuir uma constante de Michaelis bastante elevada não é facilmente saturada pelo H_2O_2 , o que permite manter um controle da concentração intracelular de H_2O_2 (AUGUSTYNIAK et al., 2010).

Segundo os autores, dependendo da concentração de H_2O_2 , a enzima pode exercer uma dupla função: em reduzidas concentrações de H_2O_2 ($<1 \mu M$) atua como "peroxidase", ou seja, pode utilizar doadores de hidrogênio diferentes do H_2O_2 (por ex.: etanol e ácido ascórbico) que são oxidados da seguinte forma: $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2 H_2O$. Em elevadas concentrações de substrato, a enzima decompõe o H_2O_2 a uma taxa muito elevada, utilizando uma reação catalítica na qual o H_2O_2 atua como aceitador e doador de moléculas de hidrogênio, de acordo com o esquema reacional: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$.

Entre as enzimas que degradam o H_2O_2 , a catalase é a única que consegue catalisar este substrato sem consumir equivalentes redutores constituindo, assim, um mecanismo eficiente de remoção de H_2O_2 (AUGUSTYNIAK et al., 2010). Para além dos peroxissomas, localiza-se ainda nos glioxissomas e organelas onde existam enzimas produtoras de H_2O_2 , como a glicolato oxidase.

Atualmente conhecem-se três isoformas desta enzima (BARTOSZ, 2009; AUGUSTYNIAK et al., 2010). Apesar de a catalase ser responsável pela eliminação de elevadas quantidades de H_2O_2 , a sua localização é quase restringida aos peroxissomas o que limita a sua capacidade para manter os teores de H_2O_2 baixos o suficiente para prevenir danos e outros compartimentos celulares, como nos cloroplastos (BARTOSZ, 2009; AUGUSTYNIAK et al., 2010).

Após a conversão dos íons superóxido a H_2O_2 , este radical deve ser convertido em água pelas peroxidases. Estas enzimas encontram-se presentes no citosol, mitocôndria, peroxissoma e membrana plasmática (BARTOSZ, 2009; AUGUSTYNIAK et al., 2010; JOMOVA et al., 2010).

Por outro lado, dentro do sistema antioxidante enzimático, as glutathion S-transferases são três famílias de enzimas (citosólica, mitocondrial e microsomal), que estão envolvidas na detoxificação de muitos xenobióticos e ainda tem um importante papel na proteção dos tecidos que se encontra em estresse oxidativo (BARTOSZ, 2009; AUGUSTYNIAK et al., 2010; JOMOVA et al., 2010).

1.3.6 Polifosfatos

Os ecossistemas ao longo do tempo sofreram modificações, não apenas em suas características geográficas, mas também em suas características e propriedades físicas, químicas e biológicas. Dessa forma, como consequência os sistemas microbianos, que existem nesses ambientes, têm evoluído e exibe habilidades bioquímicas, fisiológicas e morfológicas que os permitem tolerarem amplas variações físicas e químicas, como temperaturas diárias, salinidade, pH, níveis de radiação, disponibilidade de nutrientes, e concentrações de metais (CALDWELL et al., 2007; SEUFFERRHEAL et al., 2008).

Polifosfatos (PoliP) são polímeros lineares de dezenas ou centenas de resíduos de ortofosfato (PI) unidos por ligações fosfoanidídricas de alta energia. De grande interesse teórico é a antiguidade do PoliP na evolução prebiótica, o que o torna um precursor plausível para o RNA, o DNA e as proteínas, tendo, portanto origem via processos abióticos (HASAN, 2007). PoliP tem sido associado com a capacidade dos microrganismos para resistir a variações físicas e químicas dos ambientes naturais (HASAN, 2007). As características estruturais e físico-químicas do PoliP parecem ter sido critérios para a seleção destas moléculas como componentes de processos celulares durante a evolução (KULAEV, 2000a, 2000b; KEASLING, 2000).

Os primeiros organismos vivos podem ter usado o polímero como fonte de energia e fósforo inorgânico (PI). Isso também pode ter permitido que os

microrganismos sobrevivessem no ambiente primitivo da terra, que se assemelhava a alguns ambientes atuais extremos da terra. Grânulos de PoliP (grânulos de Volutina, que cora em vermelho na presença do azul de toluidina) são amplamente distribuídos entre espécies microbianas. Em eucariotas, pode ser encontrada em organelas subcelulares e vacúolos, em níveis tão elevados como 20% do peso seco da célula (CALDWELL et al., 2007; SEUFFERRHEAL et al., 2008).

Tais grânulos de PoliP são homólogos aos acidocalcissomas, organelas envolvidas especificamente no armazenamento e metabolismo de PoliP celular. A associação de acidocalcissomas com o metabolismo do fósforo possivelmente vincula a capacidade de bactérias na superação de estresse ambiental e é de crescente interesse científico (URECH, 1978; KEASLING et al., 1999; DO CAMPO et al., 2005).

Microrganismos desenvolveram diversos mecanismos de resistência que lhes permitam colonizar e prosperar em ambientes extremos. Dentro destes habitats, as comunidades microbianas devem suportar estados estacionários, e flutuações extremas dos fatores ambientais (SHI et al., 2004). Avanços na biotecnologia forneceram as ferramentas necessárias para gerar um conjunto de fatores microbianos normalmente associados à resistência ao estresse. No entanto, os mecanismos de regulação microbiana e coordenação em resposta ao estresse continuam mal compreendidos.

Assim, polifosfato celular tem sido relacionado experimentalmente a uma grande variedade de processos bioquímicos e fisiológicos, incluindo motilidade, desenvolvimento de biofilme, quorum sensoriamiento e virulência. Paralelamente, atua como reservatório de fosfatos e como agente quelante de íons metálicos e em inúmeros mecanismos de regulação gênica (SUREKA, 2007).

O envolvimento de polifosfatos na resistência microbiana ao stress está embasado em experimentos com mutantes com deficiências fenotípicas, nos quais os níveis do polímero são significativamente reduzidos. Tais mutantes não são capazes de sobreviverem à fase estacionária, sendo suscetíveis ao estresse oxidativo, intolerantes ao choque térmico e ácido, mostrando virulência e potencial de esporulação reduzida (RAO et al., 1998; RASHID & KORNBER, 2000, 2000a, 2000b). Além disso, a ausência do polímero resulta em redução de expressão de proteínas fundamentais para a

sobrevivência dos organismos na fase estacionária de crescimento, prejudicando seu sistema de reparo molecular (VAGABOV et al., 2000).

Em mutantes bacterianos para a superóxido dismutase, o acúmulo temporário do polímero está correlacionado com maior resistência á H_2O_2 . Proteção contra danos oxidativos ao ADN, que parece ser correlacionados com a indução de catalase e outras enzimas de reparo do DNA, é regulada por indução do fator sigma RpoS (EL-MAGHREBI & BENOVA, 2001; KIM et al., 2007).

Polifosfatos foram relatados a indução transcricional da proteína RecA, essencial para a reparação e manutenção do DNA e que tem homologia estrutural e funcional em muitas espécies associado á produção de danos no DNA. Recentemente, foi demonstrado que a acumulação de PoliP modula o sistema de reparo do DNA, regulando a atividade e a fidelidade das DNA polimerases. Polifosfatos também influencia a atividade de enzimas como DNA ligase, endonucleases de restrição, Taq polimerase e a proteínas LON (STIMPF et al., 2007; RODRIGUEZ-GARCIA, 2007; KIM et al., 2007; DEANA et al., 2008).

Fisiologicamente, o polifosfato está associado à proteção contra o estresse oxidativo. Sob o estresse oxidativo, as proteínas estão sujeitas a alterações conformacionais, que conduzem a estados de desdobramentos e agregação molecular. Entre as proteínas responsáveis por esse mecanismo estão ás denominadas Chaperones, que são os principais impulsionadores do enrolamento e estabilização molecular, promovendo adequadas dobraduras e impedem sua auto-associação.

O polifosfato pode regenerar ATP, que pode ser usado para sintetizar chaperones ou para ativar ATPases de efluxo para eliminar metais tóxicos. Além disso, tem sido sugerido que o PoliP também pode atuar como um "chaperone químico" que promove a estabilização da proteína e a proteólise de proteínas desnaturadas e seus agregados. A atividade de chaperone do PoliP é útil na liberação de aminoácidos, evitando a toxicidade (NOMURA et al., 2006).

Alguns estudos demonstram que microrganismos sob estresse oxidativo aumentam a atividade da catalase (YUAN et al., 2005). Nestes casos as células são capazes de usar fontes internas de polifosfatos para regenerar ATP. O mesmo estudo sugeriu que nestas circunstâncias, tanto o crescimento celular como a carga de energia

são baixas. O ATP gerado pode ser usado para ativar vias metabólicas que aprimoram a utilização de carbono e a absorção de fosfato.

Uma importante função do polifosfato é a desintoxicação de cátions de metais pesados. A captura de metais pesados utilizando PoliP em bactérias está bem documentado (ING et al., 1984; AKIYAMA et al., 1993; 1992; KURODA & KORNBERG, 2000; ALVAREZ & JEREZ, 2007). A hidrólise do polímero sob o estresse induzido por metais pesados tem sido observada entre eucariotos e procariotes. Por exemplo, em mamíferos a hidrólise do polímero está associada à funcionalidade das plaquetas sob estresse oxidativo (RUIZ et al., 2004; AHN & KORNBERG, 1990; BARAK & RIJN, 2000). A versatilidade do PoliP manifesta-se também por suas propriedades de troca iônica, que podem ser usadas para regular a homeostasia de metais pesados. Esse mecanismo pode ser associado à desintoxicação de metais pesados e a excreção de complexos de metal-fosfato de células (MORIARTY et al., 2006).

A multifuncionalidade do polifosfato coloca essas moléculas em uma encruzilhada entre a vida e o mundo inorgânico. Enquanto os polifosfato mantiveram continuidade química ao longo da evolução, seus papéis funcionais têm divergido e tornaram-se mais especializados.

Microrganismos são muito dependentes das condições dos seus habitats, especialmente em ambientes adversos em que é importante conservar energia. Bioenergéticamente, o PoliP é uma molécula flexível que pode servir como uma fonte de energia em curto prazo, liberada durante sua hidrólise. Dessa forma, o polímero pode mimetizar complexos com RNA e DNA, influenciando a expressão gênica em condições de estresse, o que resulta na regulação da atividade de enzimas específicas durante condições estressantes. Por conseguinte, o polímero apenas modula mecanismos adaptativos que protegem os organismos contra o estresse ambiental, mas também pode estar envolvido na evolução adaptativa de microrganismos em ambientes submetidos a estresse (VAN GROENESFIJN, 1988; VANVEEN, 1994; VAN LOOSDRECHT 1997; ALVAREZ & JEREZ, 2007).

As fosfatases ácida e alcalina compõem o grupo de enzimas fosfomonoesterases, não específicas, que hidrolisam uma variedade de ésteres orgânicos, com a liberação de íons de fosfato, estando desta forma envolvida no metabolismo do fosfato. Estas duas fosfatases diferem tanto do pH ótimo de atividade,

como na localização celular e suas atividades podem ser intensificadas pela ausência/presença de fosfato no meio de cultura (JOH et al., 1996; KEASLING, 1993; SHARFSTEIN & KEASLING, 1994; KULAEV & KULAKOVSKAYA, 2000).

Assim, as enzimas fosfatases e polifosfatos são moléculas de essencial importância em inúmeros eventos e fenômenos celulares. Dessa forma, estudos direcionados para a identificação, localização e mapeamentos dessas moléculas permitirão um maior entendimento sobre inúmeros eventos biológicos, não apenas ao nível ultraestrutural bem como, ao nível bioquímico e fisiológico. Adicionalmente, são moléculas cujo comportamento celular é fortemente influenciado pelas condições ambientais aos quais os sistemas vivos são expostos.

1.3.7. Ultraestrutura e Morfologia

Sem sombra de dúvida a microscopia, tanto fotônica quanto eletrônica, bem como o desenvolvimento de protocolos específicos, adicionaram uma nova dimensão ao estudo dos fungos. Estudos que lidam com a morfologia/ultraestrutura dos fungos têm sido elementos chave para o entendimento de inúmeros fenômenos como desenvolvimento e germinação de esporos, interações parasito-hospedeiro, comportamento nuclear, caracterização, distribuição e organização de organelas e ligação entre estrutura e função (HOHMARMM-MARIOT et al., 2006; HIBBET et al., 2007; KOHLI et al., 2008; MAHO-UCHIDA et al., 2008).

Fungos são organismos extremamente plásticos e versáteis no que diz respeito a seus hábitos e habitats. Dessa versatilidade surge a sua enorme capacidade de adaptação a inúmeros ambientes, a qual é o resultado de suas atividades bioquímicas, fisiológicas e genéticas. Como resposta a interação com seu ambiente, um fungo é capaz de alterar seu metabolismo para sua sobrevivência, e conseqüentemente mudanças em seus padrões bioquímicos, fisiológicos e morfológicos - ultraestruturais são observadas (ALEXOPOULOS et al., 1996; CANTRELL et al., 2006; GAO et al., 2007).

Por exemplo, fungos podem alterar a natureza e o conteúdo de macromoléculas como lipídeos, proteínas e carboidratos em resposta a condições físicas e químicas de seu ambiente. Essas alterações também podem surgir em função da fase de

crescimento vegetativo, reprodução, germinação e desenvolvimento celular. Diversos trabalhos demonstram que essas mudanças ambientais resultam em alterações morfológicas e ultraestruturais, as quais são demonstradas através de técnicas de rotina para microscopia fotônica e eletrônica (FISHER-PARTON et al., 2000; CANTRELL et al., 2006; GAO et al., 2007; PARFITT et al., 2007).

Considerando que os tipos de crescimento e morfogênese no reino dos fungos filamentosos baseiam-se no crescimento apical, mudanças nos padrões de expansão das hifas podem ser observadas como processos que resultam de estímulos induzidos por condições ambientais, que por sua vez, induzem mudanças nos comportamentos bioquímicos e fisiológicos para que o organismo se adapte às novas condições (MIMS et al., 1987; ROBERSON & LUTTRELL, 1987; LANDVIK et al., 2003; CANTRELL et al., 2006; GAO et al., 2007).

Ressalte-se que os fungos estiveram entre os primeiros organismos estudados com o microscópio eletrônico. Inúmeros trabalhos demonstraram a estrutura fina celular básica, bem como peculiaridades das várias espécies estudadas. O desenvolvimento de novos protocolos para o processamento das amostras permitiu a produção de espécimes com seus detalhes morfológicos não observados anteriormente em função das limitações das preparações obtidas (KLOMPARENS, 1990; MIMS, & ROBERSON, 1981; ROBERSON 1992; ROBERSON, 1993; ROBERSON & FULLER 1990; ROBERSON et al., 1989; MIMS et al., 1988; FULLER, 1990; FULLER et al., 1990).

Assim, o estudo relacionado à estrutura celular, bem como os aspectos da ultraestrutura são ferramentas, atualmente, muito importantes para elucidar diversos comportamentos celulares frente a variações ambientais.

Com isso, tanto a microscopia óptica, quanto a microscopia eletrônica têm se tornado técnicas valiosas nos ensaios que associam o metabolismo celular com a morfologia e os componentes subcelulares (KLOMPARENS, 1990; DE SOUZA, 2000).

Adicionalmente, a caracterização anatômica constitui-se uma ferramenta que, associada com parâmetros morfofisiológicos, pode auxiliar a seleção de espécies para remediação de ambientes contaminados por metais pesados, pois permite identificar mecanismos de tolerância por meio de alterações histológicas.

1.3.8. Biossorventes para Metais Pesados

Atualmente, o tratamento de ambientes contaminados é um dos mais importantes objetivos para as indústrias principalmente, aquelas cujos efluentes contêm metais pesados, podendo constituir um grande problema para o meio ambiente. Devido aos efeitos tóxicos destes metais sob o ecossistema, é de vital importância a eliminação/minimização, de forma eficaz, destes elementos.

A remoção de metais pesados do solo é realizada por meio de várias técnicas, na maioria das vezes utilizadas em conjunto. Algumas dessas técnicas já são conhecidas e utilizadas mundialmente para a descontaminação de efluentes líquidos. Um dos fatores que influem na escolha da técnica a ser utilizada é o custo da mesma em relação a sua eficiência na remoção de despejos. As tecnologias utilizadas atualmente para a limpeza de solos contaminados com metais custam em média U\$1.000.000 por acre e, somente os EUA, possuem um custo estimado para a desintoxicação de metais de U\$ 300 bilhões com tecnologias convencionais. (CHEN et al., 2008).

O estudo de novas tecnologias se torna indispensável já que as técnicas convencionais, na maioria das vezes, possuem um custo relativamente elevado e agridem o ambiente. Atualmente, a preocupação de se remediar o meio contaminado sem causar maiores prejuízos ao solo, abre espaço para novas formas de remediação a curto e longo prazo. A eficiência na utilização das técnicas de remediação pode variar bastante, dependendo do contaminante (CHEN et al., 2008; SMITH, 2009). O método ou técnica escolhida tem de apresentar baixo custo, e que consiga tratar grandes volumes de efluentes.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas, com o objetivo de remover metais pesados dos diferentes tipos de ambientes contaminados e de águas residuais. Técnicas envolvendo mudanças de pH para provocar precipitação, entre as quais a precipitação química, permuta iônica, osmose inversa e adsorção (LLANOS et al., 2008; BOBERLY & NAGY, 2009; WANG, 2009; NAYA et al., 2009; IJAGBENI et al., 2009; KATSOU et al., 2010 a, b, c).

A utilização de microrganismos para remediação de ambientes contaminados com metais pesados representa uma excelente alternativa em relação aos processos

convencionais. A capacidade de remoção, bem como os mecanismos de acumulação, depende amplamente do tipo de biomassa utilizada nas diferenças da composição da parede celular, bem como do metal em análise.

Contudo existem fatores externos, como o pH, a temperatura, a luminosidade e a natureza do adsorbato, que influenciam o mecanismo de atuação e consequentemente, a eficiência e seletividade da acumulação (GOMES et al., 1988; GUPTA et al., 2000; LLOYD, 2002; AHMWALIA & GOYAL, 2007; BUMBAC et al., 2010).

O grau de afinidade do adsorvente para o adsorbato determina a sua distribuição entre as fases. A remoção de metais não é baseada num único mecanismo. Ela consiste em vários mecanismos que quantitativamente e qualitativamente diferem de acordo com as espécies usadas, a origem da biomassa e o seu processamento. A remoção segue mecanismos complexos, principalmente a troca iônica, adsorção por forças físicas e o aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e espaços da rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular de membranas (KATSOU et al., 2010 a, b, c; ZVINOWANDA et al., 2009).

A extensão máxima de adsorção que se pode obter é determinada pelo equilíbrio atingido entre a solução e o adsorvente. Em casos onde todas as variáveis, exceto a concentração de metal são essencialmente constantes, podem estabelecer-se correlações com os dados de concentração de metal adsorvido usando expressões empíricas. No entanto este procedimento apresenta limitações, as expressões empíricas não prevêm as variações de pH, força iônica e tipos de eletrólitos, nem o efeito de forças eletrostáticas no decorrer da adsorção (KATSOU et al., 2010 a, b, c).

O entendimento dos mecanismos pelos quais microrganismos acumulam metais é importante para o desenvolvimento de processos de concentração, remoção e recuperação de metais de soluções aquosas.

Por exemplo, o conhecimento das reações químicas ou fisiológicas durante a remoção metálica poderia possibilitar a especificação e controle dos parâmetros do processo para aumentar a velocidade, a quantidade e a especificidade da acumulação metálica. Uma grande variedade de microrganismos pode ligar metais. Entretanto, há

grandes diferenças nas respostas das espécies microbianas quando expostas as soluções metálicas. Atualmente é considerada uma das mais promissoras tecnologias que pode ser utilizadas para a recuperação de metais e para a remoção de substâncias tóxicas (GADD, 2008; 2009; 2010).

As principais vantagens da remoção biológica em relação a outros métodos de tratamentos convencionais encontram-se descritas em seguida (GADD, 2008; 2009; 2010). Utilização de materiais biológicos abundantes e de baixo custo; Permite o tratamento de grandes volumes; Eficiência elevada; Volume reduzido de resíduos perigosos gerados; Necessidades reduzidas de nutrientes adicionais; Opera numa larga gama de condições físico-químicas; Baixos custos de investimento e de operação; Geralmente rápida e reversível; Requer uma energia de ativação mínima, em torno de 21 KJ/mol.

O primeiro desafio que se coloca, portanto, é a seleção do tipo de biomassa entre uma vasta oferta de produtos com elevada disponibilidade e de baixo custo. Seguiu-se uma linha de orientação que era utilizar biomassa já existente em grande quantidade e não utilizar biomassa com características particulares (AHLUWALIA & GOYAL, 2007; ÓCONNELL et al., 2008; MALAMIS et al., 2009; 2010). Este desafio tem centrado a atenção em microrganismos, bactérias leveduras, fungos filamentosos, algas, e em materiais de natureza celulósica.

O custo total do material biossorvente tem um papel determinante para a escolha do tipo de biomassa. Existem vários requisitos para conferir competitividade técnica e econômica para os diferentes tipos de biomassa, tais como (AHLUWALIA & GOYAL, 2007; ÓCONNELL et al., 2008; MALAMIS et al., 2009; 2010): Apresentar uma capacidade de acumulação elevada; Naturalmente abundante e de baixo custo; Deve ser reutilizável com elevada capacidade de biossorção; Facilmente adaptável; O metal retido pela biomassa deve ser de fácil recuperação e a custo reduzido.

Uma vez que o custo de produção de biomassa pode se tornar um processo economicamente inviável á escala industrial, a matéria-prima que constituiu os biossorbentes deve ser preferencialmente um material residual ou um subproduto.

Dentre esses materiais são citados: Partes ou tecidos específicos de vegetais como cascas, bagaço ou sementes; Microrganismos: bactérias, microalgas e fungos e

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

Vegetais macroscópicos: algas, plantas aquáticas (GADD, 2007; 2008; 2009; 2010; ABDEL-GHANI et al., 2007; ARRUDA et al., 2007; DANG et al., 2009; DUBEY & KRISHNA, 2007; LESMANA et al., 2009; MALAKOOTIA et al., 2009).

Nos últimos anos os fungos são os sistemas biológicos de maior interesse na área de biorremediação/sorção de metais pesados (LAMA e GRAY, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; GADD, 2010).

1.3.9 Fungos

1.3.9.1. Generalidades

Os fungos constituem um grupo de organismo heterotrófico, eucariótico e desprovidos de clorofila, desta forma não realizam fotossíntese. Existem quatro principais classes de fungos terrestres: Zigomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes e Deuteromycetes. São químiotróficos, necessitando de componentes orgânicos para energia e fonte de carbono. Apresentam estruturas como o talo (corpo de um fungo filamentosos), que consiste de hifas cenocíticas que podem ser apresentadas como células longas e contínuas, com muitos núcleos ou apresentarem paredes cruzadas por septos os quais dividem as hifas em células uninucleadas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os fungos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (GADD, 2009). Contudo, apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos.

É importante ressaltar que grande parte dos avanços relacionados com a biotecnologia moderna e agricultura são derivadas das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de fungos (ALEXOPOULOS et al., 1996; GADD, 2009, 2010).

A nutrição dos fungos se dá pela absorção dos nutrientes, através da liberação de enzimas digestivas no ambiente externo que quebram moléculas grandes e praticamente insolúveis, tais com carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis que podem ser absorvidas. Os fungos apresentam a capacidade de utilizar praticamente qualquer fonte de carbono como alimento, porém, cada espécie apresenta uma necessidade nutricional diferente (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Nos últimos anos, os fungos têm sido utilizados pelo homem em diferentes processos e de diferentes maneiras. Muitas substâncias de considerável valor econômico são produtos do metabolismo microbiano, desde a produção industrial de materiais importantes incluindo, químicos finos (farmacêuticos) e aqueles produzidos em grandes quantidades, que serão utilizados como matéria-prima. Desta forma, fungos filamentosos apresentam um grande potencial na remediação de solos contaminados por metais pesados (GADD, 2007, 2008, 2009, 2010).

Assim, os fungos estão ecologicamente envolvidos na degradação de uma variedade de materiais complexos, uma propriedade que é atribuída a uma bateria de enzimas produzidas por estes microrganismos. Enzimas fúngicas têm sido usadas em indústrias de tecnologia enzimática por décadas muitas das enzimas microbianas são (exploradas comercialmente e utilizadas com sucesso em escala industriais para catalisar vários processos químicos). Tais enzimas são comprovadamente mais eficientes, de operacionalização menos onerosa e ambiente amigável em relação ao uso de produtos químicos. Recentemente, enzimas também têm sido exploradas em biorremediação de resíduos de substâncias complexas. Portanto, a produção de enzimas tornou-se uma possibilidade econômica que envolve bilhões de dólares (GADD, 2007, 2010).

1.3.9.2. *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* insere-se na classe Ascomycete, que corresponde a fungos filamentosos que atuam como decompositores de matéria orgânica, reciclando elementos vitais através do uso de enzimas extracelulares, como celulasas, pectinases,

xilanases, proteases, lipases, amilases e invertases (BENNET, 2010; CHAKRABORTY et al., 2010). Sendo, portanto *Aspergillus* um gênero muito diversificado de fungos que ocorrem naturalmente, cujas espécies têm um grande repertório químico.

Assim, membros do gênero *Aspergillus* são economicamente importantes e utilizados em numerosas fermentações industriais, incluindo a produção de ácido cítrico e de ácido glucônico. Crescem mesmo na presença de altas concentrações de açúcar e de sal, indicando que podem extrair água de substância relativamente seca (BENNET, 2010; CHAKRABORTY et al., 2010).

Os espécimens desenvolvem-se numa ampla variedade de substrato, muitos dos quais induzem a geração, em níveis elevados, de espécies reativas de oxigênio. Dentre esses indutores podem-se ressaltar os ácidos graxos, etanol, glicerol e ácido úrico. Os microrganismos por serem facilmente cultiváveis e serem acessíveis a inúmeros métodos são modelos ideais para estudos bioquímicos e fisiológicos associados ao fenômeno. Os estudos associados ao estresse metabólico se constituem ferramentas cruciais para a área da microbiologia industrial e ambiental, trazendo obviamente informações sobre o metabolismo básico celular (CARLILE et al., 2001; BENNET, 2010; CHAKRABORTY et al., 2010).

Por outro lado, uma vez que o estresse pode afetar os organismos, resultando em perdas econômicas em plantas industriais, tais estudos também geram dados relevantes sobre como manter a viabilidade metabólica, bem como sobre a vitalidade e manutenção de linhagens utilizadas nas indústrias, em função de seu grande potencial de síntese (BENNET, 2010; CHAKRABORTY et al., 2010).

1.3.9.3. Aplicação dos *Aspergillus* na Biotecnologia

Produtos como os ácidos: cítrico, glucônico, itaconico e kojico são obtidos a partir do cultivo de espécies do gênero, cujas produções são reconhecidas e remontam a 1917. Membros do gênero são conhecidos pelo seu potencial para degradar biomassa vegetal e aplicações industriais desde o tempo antigo (SHWABA & KELLER, 2008). Exibem uma grande dispersão no ambiente e consiste de aproximadamente 200 espécies (BENNET, 2010; CHAKRABORTY et al., 2010).

Algumas espécies de *Aspergillus* são de importância médica, uma vez que são patógenos oportunistas para seres humanos (BENNET, 2010; TRACKS, 2009).

As espécies são extremamente versáteis e capazes de transformar, com grande velocidade, um amplo espectro de compostos aromáticos relacionados à lignina. Produzem altos níveis de enzimas hemicelulolíticas com ampla aplicação biotecnológica usado na indústria de papel e celulose. É, pois um grupo fascinante de fungos com imensa diversidade ecológica e metabólica. Esta inclui notórios patógenos como *Aspergillus flavus*, que produz a aflatoxina, um dos mais potentes, de ocorrência natural, compostos conhecidos pelo homem. Por outro lado, também estão incluídos outros fungos, tais como *A. oryzae*, envolvidos na produção industrial de molho de soja e saquê ou *A. niger* utilizados para a produção de ácido cítrico e enzimas como a glucose oxidase e lisozima (BENNET, 2010).

O interesse neste grupo é tão grande que as sequências genômicas de quinze diferentes *Aspergillus* já foram determinadas fornecendo aos cientistas um recurso interessante para melhorar a compreensão da genômica molecular, ferramenta fundamental na busca por novos metabólitos e genes de importância industrial ou médica. Assim, a recente disponibilidade das sequências de *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* tornou o gênero um tesouro para estudos de genômica comparativa.

As abordagens genômicas têm fornecido detalhes sobre a estrutura do genoma e evolução, fluxo gênico em populações naturais e a natureza da patogenicidade, que levou á descoberta de enzimas potencialmente benéficas e metabólitos secundários (JONES, 2007; SANSON & VARGA, 2008; SCAZZOCCHIO, 2009; BENNET, 2010).

Além disso, espécies de *Aspergillus* também são usadas como hospedeiros para os processos de transformação, biorremediação e bioconversões. Após o seqüenciamento do genoma completo de várias espécies de *Aspergillus*, os campos da genômica comparativa, transcriptômica, proteômica e metabolômica estão abertos para a exploração (ARCHER & TURNER, 2006; BAKER, 2006; GEISER et al., 2008; BENNET, 2010).

Inúmeros genes foram descritos incluindo aqueles responsáveis pela expressão de enzimas envolvidas na degradação de polímeros complexos tais como carboidratos e proteínas. A existência de uma matriz de genes com grande atividade metabólica confirma imensa contribuição histórica de *Aspergillus* nas áreas da fermentação, produção de alimentos e indústrias de enzimas (ABE & GOMI, 2008; BAKER, 2008; BENNET, 2010).

O mercado mundial de biocatalisadores, atualmente avaliado em US\$ 1,5 bilhões, tem previsões de crescimento continuado em resposta às demandas por processos industriais com menor impacto ambiental, menor consumo energético e também por produtos de melhor qualidade (OSTERGAARD & OLSEN, 2010).

As enzimas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores (carboidratos em açúcares, por exemplo), de catalisar alterações estruturais dentro de uma molécula, assim como podem ajudar a construir moléculas específicas de material celular, por exemplo. Em muitos processos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas (BENNET, 2010; OSTERGAARD & OLSEN, 2010).

As enzimas extraídas de fungos podem ter sua produção aumentada pela transferência das informações genéticas para um microrganismo hospedeiro conhecido por meio de técnicas de DNA recombinante. Esses microrganismos geneticamente modificados podem então ser cultivados sob as melhores condições. Caracterizam-se pela alta especificidade e eficiência e se fazem necessárias em apenas pequenas quantidades. Muitas vezes contribuem para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados e o consumo de energia (BENNET, 2010; OSTERGAARD & OLSEN, 2010).

Assim, a biotecnologia moderna possibilita a produção industrial de enzimas específicas para diversos fins, através do cultivo de microrganismos com habilidade de excreção. Os fungos são extremamente importantes nesse aspecto. Assim, a procura por cepas fúngicas é maior pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um

substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular. E também, pela estabilidade e atividade em pH e temperatura extrema.

Além disso, a biotecnologia de processos fermentativos permite a utilização de subprodutos e dejetos de indústrias e agroindústrias como fontes nutricionais para microrganismos, visando obtenção de insumos. Os processos que empregam enzimas, portanto, produzem menos subprodutos residuais, propiciando a obtenção de produtos de melhor qualidade e diminuindo a probabilidade de poluição (BENNET, 2010).

O gênero *Aspergillus* é amplamente explorado no mercado promissor de enzimas extracelulares. Entre os fungos mesófilos, espécies do gênero são importantes na produção de xilanases, juntamente com glucanase, pectinase, celulase, protease, amilase, fitase, galactosidase e lipase. A ação conjunta com as glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitases, galactosidases e lipases melhoram a digestibilidade da mistura alimentar (POLIZELI et al., 2005 MUSSATTO et al., 2007).

Dessa forma, as enzimas apresentam grande aplicação em muitos segmentos industriais, como o de alimentos e bebidas, de detergentes, têxtil, couro, celulose e papel, química fina, medicamentos e cosméticos e, ainda, em metodologia analítica e em biologia molecular. Amilases, glicose oxidase, pectinases, invertase, renina, naraginase, lipases, proteases, celulases e peroxidases são os biocatalisadores mais utilizados (OSTERGAARD & OLSEN, 2010).

Paralelamente, a indústria de produtos de limpeza utiliza enzimas, como a protease, a amilase, a lipase e a celulase, para remover manchas e conferir mais brilho aos tecidos. As proteases que removem impurezas protéicas constituem-se hoje componentes essenciais de detergentes, nos quais podem ser empregadas em concentrações muito baixas (0,1 – 1,0%). Não se obtém resultado similar com nenhuma outra substância, nem efetuando a lavagem em temperatura mais elevada.

Fenoloxidasas representam o maior grupo de enzimas envolvidas na atividade metabólica secundária, a maioria associada à produção de melaninas e outros pigmentos. As fenoloxidasas e peroxidases são oxidoredutases, enzimas caracterizadas pela catálise de reações de transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de um composto para outro. As reações de polimerização catalisadas por essas enzimas estão relacionadas a mudanças nas propriedades das paredes

celulares (aumento de permeabilidade e força hidrostática), interações intracelulares (agregação de hifas) e remoção/detoxificação de metabólitos secundários ou outras substâncias (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os compostos fenólicos enquadram-se nos resíduos resultantes da biodegradação de resíduos naturais e da atividade antrópica; são encontrados no solo e na água, mas apesar de amplamente distribuídos na natureza fazem parte dos principais poluentes tóxicos residuais descartados por uma grande variedade de indústrias, como têxteis, refino de petróleo, polpa e papel, farmacêutica, revestimentos de metais, preservação de madeira, corantes, resinas e plásticos, conversão de carvão, além de serem componentes de muitos biocidas (GADD, 2010).

O interesse na pesquisa de enzimas do grupo das fenoloxidasas fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e/ou rejeitos urbanos e também no tratamento de solos e efluentes diversos (DURÁN & ESPOSITO, 2000). Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, porque nestas enzimas falta especificidade pelo substrato e, com isso, são capazes de degradar uma ampla faixa de xenobióticos, incluindo efluentes corados (GADD, 2010).

Espécies de *Aspergillus* apresentam um grande potencial na remediação de solos contaminados por metais pesados, devido principalmente à sua característica miceliar, além do fato de suportarem a toxidez causada por esses compostos. Podem acumular metais pesados e de translocá-los por meio do micélio (GADD, 2010; OSTERGAARD & OLSEN, 2010).

1.3.9.4. *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans é um dos sistemas microbianos de grande interesse na área da genética e biologia celular, uma vez que em função de sua correlação com as outras espécies, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, e *A. fumigatus*, e por não exibir potencial oportunístico é utilizado como modelo para sua biologia, uma vez que diferente dessas espécies, que são assexuadas, exibe ciclo sexuado bem caracterizado (BENNET, 2010).

Na Figura 4 está representado o ciclo de vida de *Aspegillus nidulans*. Nos ascomicetos ocorre á presença de uma estrutura reprodutiva característica, o asco, no qual são formados os ascósporos, geralmente em número de oito em cada asco. A produção de esporos sexuais passa por três processos: 1. Um núcleo haplóide de uma célula doadora (+) penetra no citoplasma da célula receptora (-); 2. Os núcleos (+) e (-) se fundem formando o núcleo zigoto diplóide; e 3. Por meiose o núcleo diplóide origina um núcleo haplóide que é o esporo sexual.

Em cultura cresce rapidamente em meios sólidos e líquidos sob uma grande variedade de substratos e condições nutricionais. É uma espécie homotática, o que significa que duas cepas podem ser acasaladas diretamente. É geralmente haplóide, mas pode ser induzida para crescer como heterocarion ou como diplóide vegetativo. Produz esporos sexuais (conídeos) e assexuais (ascósporos) (BENNET, 2010).

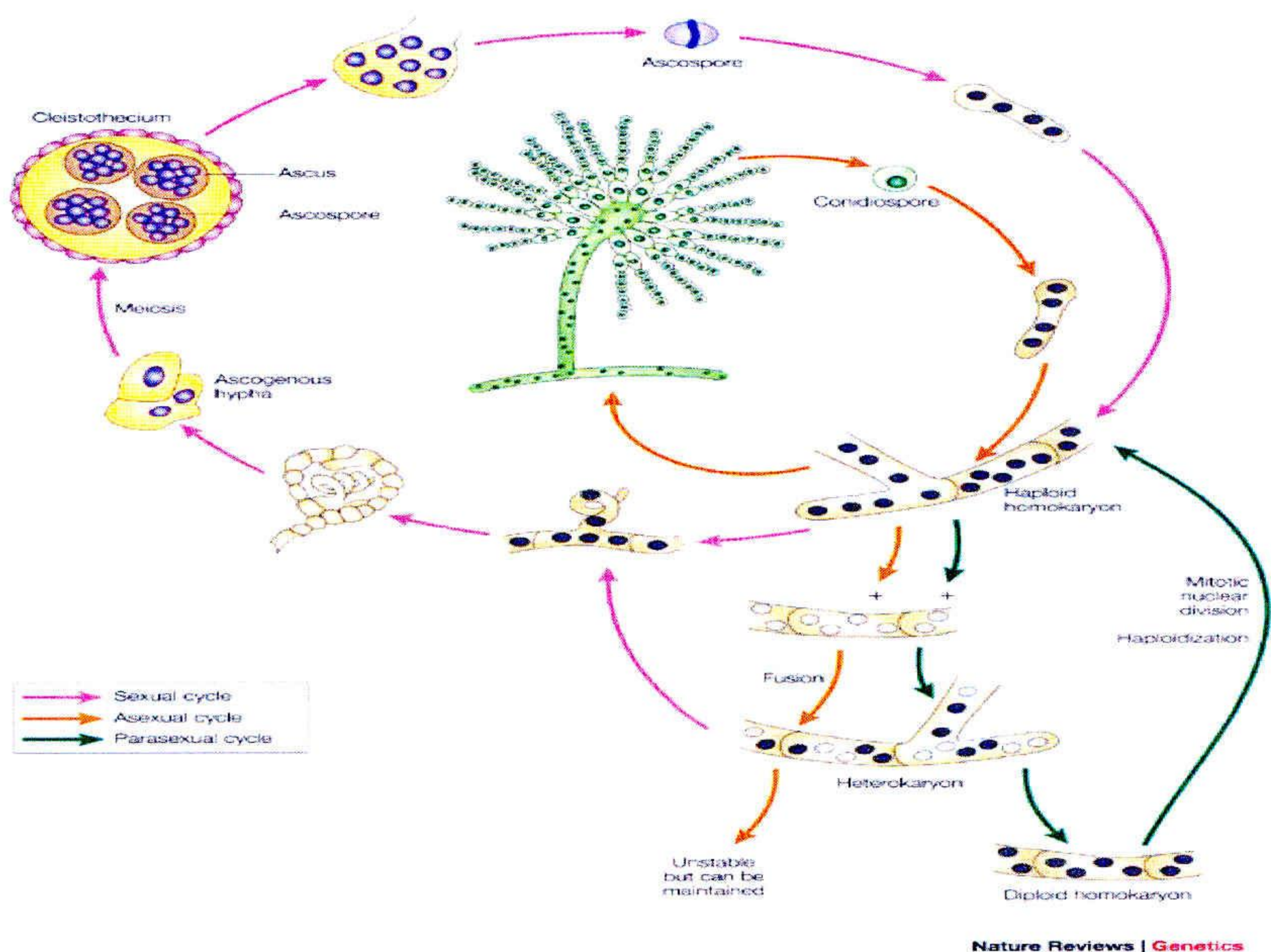


Figura 4 - Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* com as fases sexual (←), assexual (←) e parassexual (←). Modificado de CASSELTON & ZOLAN, 2002.

Exibe genoma com aproximadamente 31 Mb. Apresenta 8 cromossomas, contendo um número estimado de 11.000 a 12.000 genes. Dentre esses, aproximadamente 900 genes já foram identificados; onde 432 já estão mapeados e 254 clonados e seqüenciados pela Monsanto. Dessa seqüência, 29% dos genes têm função conhecida, 23% têm função putativa e 48% ainda permanecem desconhecidos. Em adição, 61% das Open Read Frames (ORFs) de *S. cerevisiae* exibem homologia em *A. nidulans*. Atualmente, 40 laboratórios mundiais focam a genética e a biologia molecular da espécie. Nove desses grupos – representando a Austrália, Inglaterra, França, Alemanha e Estados Unidos da América uniram-se formando um grupo especialista na genômica de *A. nidulans* (BENNET, 2010).

Além disso, genes de outras espécies e de mamíferos são expressos em *A. nidulans*, que atua como ferramenta para estudo da regulação de genes. Por exemplo, os estudos iniciais sobre a genética da tubulina e microtúbulos foram realizados em *A. nidulans*. Adicionalmente, *A. nidulans* contribui para o entendimento da mitose e funções intracelulares dos motores mitóticos associados à cinesina e a dineína citoplasmática. As regulações do metabolismo do carbono e do nitrogênio também estão bem caracterizadas nesse modelo, cuja consequência de grande importância foi a caracterização e desenvolvimento do promotor regulável *alcA* do álcool desidrogenase, que é induzido pelo álcool e reprimido pela presença de glicose, como ferramenta molecular de grande importância para controlar a expressão de genes (BENNET, 2010).

Dessa forma, espécies do *Aspergillus* são hábeis na expressão de inúmeros metabólitos, primários e secundários. Tais habilidades vêm sendo amplamente exploradas, nas últimas décadas em função de seus potenciais na biodegradação, biotransformação e na remoção de metais pesados e corantes. Além disso, as espécies exibem mecanismos de resistência em condições ambientais adversas.

Com isso, a utilização desses fungos no tratamento dos mais diversos tipos de efluentes tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares.

Assim, os mecanismos através dos quais as células se protegem contra altas concentrações de metais pesados são muito complexos e ainda pouco esclarecidos, apesar da relevância do assunto para problemas de saúde. O crescimento, o comportamento do polifosfato, a morfologia/ultraestrutura, atividades de enzimas e os

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

parâmetros de estresse oxidativo são importantes ferramentas complementares em trabalhos de monitoramento ambiental, junto a outros biomarcadores já estabelecidos, auxiliando a compreensão dos efeitos da contaminação sobre os organismos e fornecendo importantes informações a respeito das modulações das defesas celulares.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; GOMI, K. Food products fermented by *Aspergillus*. In: *The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology and research methods*, Goldman, G. H., e Smanim S. A., eds., Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, p.p. 429- 439, 2008.

ABDEL - GHANI, N. T.; HEFNY., M.; EL-CHAGBABY, G. A. F. Removal of lead from aqueous solution using low cost abundantly available adsorbents. **Int. J. Environ. Sci. Tech.**, 4 (1), 67-73, 2007.

ADRIANO D. C.; BOLAN N. S.; VANGRONSVELD J.; WENZEL, W. W. Heavy metals. In: D Hillel (ed.) **Encyclopedia of Soils in the Environment**, Elsevier, Amsterdam, p.p. 175-182, 2005.

ADRIANO D. C.; BOLAN N. S.; VANGRONSVEL, D; WENZEL, W. W. Heavy metals. **Enc. Soils Environ.** 175-182, 2004.

ADRIANO, D. C. Trace Elements in the Terrestrial Environment. 2^a edition. **Springer-Verlag**, New York, 2001.

ADENIRAN, A.H.; ABIOSE, S. H. Amylolytic potentiality of fungi isolated from some Nigerian agricultural wastes. **African J. Biotechnol.** 8 (4); 667-672. 2009.

AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresour Technol**; 98:2243–2257, 2007.

AHN, K.; KORNBERG, A. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. **J. Biol Chem.** 265 (20): 11734–11739, Jul., 1990.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry** 40, 997–1026, 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York, **John Wiley & Sons publishers**, 1996.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

ALLURI, H. K.; RONDA, S. R.; SETTALLURI, V. S.; SINGH, J. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *Afr. J. Biotechnol*; 25: 2924–31, 2007.

AL- MAGHREBI, M. A.; BENOVA, L. T. Polyphosphate accumulation and oxidative DNA damage in superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 1352-1359, 2001.

ALVAREZ, S.; JEREZ, C. A. Copper Ions Stimulate Polyphosphate Degradation and Phosphate Efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (9): 5177-5182, 2004.

ARCHER, D. B.; TURNER, G., Genomics of protein secretion and hyphal growth in *Aspergillus*. In: *The mycota XIII*, Brown, A.P.J., ed. Berlin Spring Verlag, p.p. 75-96, 2006.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C. 145: 282-287, 2007.

ATSDR, Draft Toxicological Profile for Cadmium. Atlanta, G. A.: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 450 p.p. September, 2008.

AUGUSTYNIAK, A.; BARTOSZ, G.; CIPAK, A.; DUBURS, G.; HORÁKOVÁ, L.; LUCZAJ, W.; MAJEKOVA, M.; ODYSSEOS, A.D.; RACKOVA, L.; SKRZYDLEWSKA, E.; STEFEK, M.; STROSOVÁ, M.; TIRZITIS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VISKUPICOVA, J.; VRAKA, P.S.; ZARKOVIĆ N. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic. Res.* Oct; 44 (10):1216-62, 2010.

BACKER, S. C. *Aspergillus* genomics: past, present and into the future. *Med. Mycology Suppl.* 44, 517-521, 2006.

BARAK, Y.; RIJN, J. V. Relationship between Nitrite Reduction and Active Phosphate Uptake in the Phosphate-Accumulation Denitrifier *Pseudomonas sp.* Strain JR 12. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.66. Nº 12, p.5236-5240, December, 2000.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

BARTOSZ, G.; Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology**. Volume 77, Issue 8, 15 April. Pages 1303 - 1315, 2009.

BENNETT, J. W. Masayuki Machida, Katsuya Gomi. Overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus*. **Molecular Biology and Genomics**. Eds. Cap. 1. p. 1-17, 2010.

BERTIN, G. & AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie** 88: 1549 - 1559, 2006.

BORBELY, G.; NAGY, E. Removal of zinc and nickel ions by complexation – membrane filtration process from industrial wastewater. **Desalination** - 240 pp. 218 – 226. 2009.

BOK, J. W.; KELLER, N. P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* sp. *Eukaryot. Cell* 3, p.p. 527–535, 2004.

BUMBAC, C.; PENA LEONTE, E.; DUMITRESCU, C.; GHITA, I.; STEFANESCU, M. Heavy metals removal using residual fungal biomass. **J. Environ Protection Ecol**; Volume 11, Issue 3, Pages 822-829, 2010.

BROOS, K.; MERTENS, J.; SMOLDERS, E. Toxicity of heavy metals in soil assessed with various soils microbial and plant growth assays: a comparative study. **Environ. Toxicol Chem**; 24: 634–640, 2005.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S. & OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol Environ Saf**, 45, 198–207, 2000.

CALDWELL, M. M.; J. F. BORNMAN, C. L. BALLARE, S. D.; FLINT and G. KULANDAIVELU. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. **Photochem. Photobiol. Sci.** 6: 252-266, 2007.

CALLENDER E. Heavy Metals in the Environment. Historical Trends Treatise on Geochemistry, Chapter 9.03, Pages 67-105, 2007.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

CANDÉIAS, S., PONS, B., VIAU, M., CAILLAT, S., SAUVAIGO, S. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: Analysis on dedicated biochips. **Mutation Research** 694: 53–59, 2010.

CANTRELL, S. A.; CASILLAS-MARTINEZ, L.; MOLINA, M. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. **Mycol. Res.** Vol. 110, Issue 8, August, Pages 962-970, 2006.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. The fungi. London / San Diego: **Academic Press**, 2001.

CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: Filamentous fungi. **Nature Rev Gen.** 3 (9): pp. 683 - 697, 2002.

CELIA, B.; SHAILAJA, D. D.; GEOFFREY, B. S. Cadmium-a metal lohormone Toxicol. **Appl. Pharmacol**, 238 (3), 266 - 271, 2009.

CHAKRABORTY, S.; GHOSH, U.; CHAKRABORTY, S. Fungi: Its importance in biotechnology - A review on its past, present and future prospects. **Journal of Pharmacy Research**, Vol.3, No 12; 3059 - 3060, 2010.

CHANDRAN R.; SIVAKUMAR A. A.; MOHANDASS, S. & ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Compar Biochem Physiol. Part C.**, 140: 422 - 426, 2005.

CHEN, G. Q.; ZENG, G. M.; TANG, L.; DU, C. Y.; JIANG, X. Y.; HUANG, G. H.; LIU, H. L.; SHEN, G. L. Cadmium removal from simulated wastewater to biomass by product of *Lentinus edodes*. **Biores Technol**, 99 (15): 7034-7040, 2008.

CHEY H.; BUCHANAN, S. Toxins in every life. *Prim Care Clin Office Pract*; 25: 707-727, 2008.

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. **Environ Intern.** 36: 299 – 307, 2010.

COSANO, G. Z.; M. A. AMARO LÓPEZ. Cadmium: Properties and Determination. **Enc. Food Scie Nutrition**, pp. 733 - 739, 2003.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. "Exploring microbial diversity - A vast below". **Science**, Vol. 309, pp. 1331 - 1333, 2005.

DANG, V. B. H.; DOAN, H. D.; DANG - VU, T.; LOHI, A. Equilibrium and kinetics of biosorption of cadmium (II) and copper (II) ions by wheat straw. **Bioresource Tech.** 100 (1), 211 - 219, 2009.

DE SOUZA, W. **Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica**. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 21 - 47; p.134, Rio de Janeiro, 2000.

DEANA, A. H.; CELESNI, K.; BELASCO, J. G. The bacterial enzyme Rpp H. triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. **Nature**. 451:355, 2008.

DOCAMPO, R. W.; DE SOUZA, K.; MIRANDA, P.; ROHLOFF, S.; MORENO, N. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. **Nat. Rev. Microbiol.** 3: 251 - 261, 2005.

DONAT J.; DRYDEN C. Transitions metals and heavy metal speciation. **Enc. Ocean Sci**, 100 - 108, 2009.

DUBEY, S. P.; KRISHNA, G. Adsorption of chromium (VI) on low cost adsorbents derived from agricultural waste material. **J. Hazard. Mater.** 145 (3), 465 - 470, 2007.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Potencial applications of oxidative enzyme and fenoloxidase - like compounds in wastewater and soil treatment: a review, applied catalysis **B. Environmental**, V. 28, p. 83 - 99, 2000.

ECCLES, H. Removal of heavy metals from effluent streams - Why select a biological process. **Intern. Biodeter. Biodegrad**, Inglaterra, v. 44, n. 5, pp. 5 - 16, 1995.

E.P.A. Toxicological review, Cadmium and Com - pounds. (**CAS** No.7, 439 - 440), 1999.

ETSUKO, K.; YASUSHI, S.; RYUMON, H. Serial changes in urinary cadmium concentrations and degree of renal tubular injury after soil replacement in cadmium-polluted rice paddies. **Toxicology Letters**, 176, 124 - 130, 2008.

FULLER, M. S.; ROBERSON, R. W.; GISI, U. Effects of the sterol biosynthesis inhibitor cyproconazole on hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii* III A cytochemical study. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 115 - 126, 1990.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. Volume 84, Issue 1, pages 13 – 28, January, 2009.

GADD, G. M. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radiounuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycol. Res.**; 111, 3 - 49, 2007.

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**. 46, 834 - 40, 1990.

GADD, G. M. Heavy Metal Pollutants: Environmental and Biotechnological Aspects. **Encyclopedia of Microbiology**, Pages 321 - 334, 2009.

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

GAO, L.; SUN, M. H.; LIU, X. Z.; CHE, Y. S. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycol Res**. Vol. 111, Issue 1: 87 - 92, 2007.

GARRETT, S. H.; SOMJI, S.; SENS, M. A.; ZHANG, K.; SENS, D. A. Microarray analysis of gene expression patterns in human proximal tubule cells over a short and long time course of cadmium exposure. **J. Toxicol Environ Health A**. Jan.; 74 (1): 24-42, 2011.

GAVRILESCA, M. Removal of heavy metals from the environmental by biosorption. **Eng. Life Sci.**, 4, 219 – 32, 2004.

GEISER, D. M.; SAMSON, R. A.; VARGA, J.; ROKAS, A.; WITIYAK, S. M. A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus*, and prospects for a robust genus - wide phylogeny. In: *Aspergillus in the Genomic Era* Varga, J., and Samson, R. A., eds. (Netherlands: Wageningen Academic Pubs), pp. 17–32, 2008.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

GOMES, N. C. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SAVVAIDIS, I. Metal Bioremediation by microorganisms. **Rev. Microbiol.** São Paulo, V. 29, n. 2º, pp. 85 - 92, 1998.

GUPTA, R.; AHUJA, P.; KHAN, S.; SAXENA, R. K.; MOHAPATRA, H. Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. **Curr. Sci.** 78 (8): 967 - 973, 2000.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance **J. Exp. Bot.** 53: 1-11, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. Nova York: **Oxford University Press**, v.1, p.851, 2007.

HASAN, H. A. H. Role of rock phosphate in alleviation of heavy metals stress on *Fusarium oxysporum*. **Plant Soil Environ**, 53 (1), 1 – 6, 2007.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN. A higher - level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Volume 111, Issue 5, Pages 509 - 547, May, 2007.

HOGAN, C. M. Heavy metal. **Encyclopedia of Earth**. National Council for Science and the Environment. Eds. E. Monosson & C. Cleveland. Washington D.C. 2010.

HOHMANN - MARRIOTT, M. F.; UCHIDA, M.; VAN DE MEENE, A. M. L.; GARRET, M.; HJELM, B. E.; KOKOORI, S.; ROBERSON, R. W. Electron tomography and its application to revealing fungal ultrastructure: Tansley Review. **New Phytologist**. 172: 208 - 220, 2006.

HSU C. W.; LIN J. L.; LIN-TAN D. T.; YEN T. H.; HUANG W. H.; HO T. C.; HUANG Y. L.; YE H. L. M.; HUANG L. M. Association of environmental cadmium exposure with inflammation and malnutrition in maintenance haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**. Apr. 24 (4): 12 - 82. 2009.

IBRAHIM, D.; FROBERG, B.; WOLF, A.; RUSYNIAK, D. E. Heavy metal poisoning: clinical presentations and pathophysiology. **Clin Lab Med**. 26: 67 - 97, 2006.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

IJAGBEMI, C. O.; BAEK, M. H.; KIM, D. S. Montmorillonite surface properties and sorption characteristics for heavy metal removal from aqueous solutions, **J. Hazard. Mater.** 166, pp. 538 – 546, 2009.

IVANINA, A. V.; HABINCK, E. & SOKOLOVA I. M. Differential sensitivity to cadmium of key mitochondrial enzymes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C.** 148: 72-79, 2008.

JARUP, L.; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicol Appl. Pharmacol.** Aug 1; 238 (3): 201 - 8, 2009.

JOH, T.; MALICK D. H.; YAZAKI J.; HAYAKAWA T. 1996. Purification and characterization of secreted acid phosphatase under phosphate-deficient condition in *Pholiota nameko*. **Mycoscience**; 37: 65 - 70, 1996.

JOMOVA K.; VONDRAKOVA D.; LAWSON M.; VALKO M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Mol. Cell Biochem**; 345: 91 - 104, 2010.

KATSOU, E.; MALAMIS, S.; HARALAMBOUS, K. J.; LOIZIDOU, M. Use of ultrafiltration membranes and aluminosilicate minerals for nickel removal from industrial wastewater, **J. Membr. Sci.** 360, pp. 234 – 249, 2010.

KATSOU, E.; MALAMIS, S.; HARALAMBOUS, K. J. Examination of zinc uptake in a combined system using sludge, minerals and ultrafiltration membranes, **J. Hazard. Mater.** 182, pp. 27 – 38, 2010.

KATSOU, E.; MALAMIS, S.; HARALAMBOUS, K. J. Industrial wastewater pre-treatment for heavy metal reduction by employing a sorbent-assisted ultrafiltration system. **Chemosphere** 82, 557 – 564, 2011.

KEASLING J. D., et al. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. **Proc. Natl Acad Sci USA.** Aug. 1; 90 (15): 7029 – 7033, 1993.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

KEASLING, L. D. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**, Moscow, Mar; vol.65 (63), p. 324 - 331, 2000.

KIM, H. J. K. Y.; YANG, B. H.; CHO, K. Y.; KIM, M. C.; LEE, Y. H.; KIM, A. J.; ANDERSON, and Y. C. KIM. Transcript accumulation from the *rpoS* gene encoding a stationary-phase sigma factor in *Pseudomonas chlororaphis* strain O6 is regulated by the polyphosphate kinase gene. **Curr. Microbiol.** 54: 219 - 223, 2007.

KOBAYASHI, E.; SUWAZONO, Y.; DOCHI, M. Estimation of benchmark doses as threshold levels of urinary cadmium, based on excretion of beta2-micro-globulin in cadmium-polluted and non-polluted regions in Japan. **Toxicol Lett.** 179 (2), 108 - 12, 2008.

KÖHLI, M.; GALATI, V.; BOUDIER, V.; ROBERSON, R. W.; PHILIPPSEN, P. Growth-speed correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. **Journal of Cell Science.** 121: 3803 - 3814, 2008.

KULAEV, I. S. Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. **Biochemistry**. Moscou. 65 (3), 269 – 270, 2000.

KULAEV, I. end T. KULAKOVSKAYA. Polyphosphate and phosphate pump. Annu. **Rev. Microbiol.** 54: 709 - 734, 2005.

KURODA, A. and H. OHTAKE. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. **Biochemistry** (Moscow) 65: 304 - 308, 2000.

LAMA, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin.** 46(2): 182 - 186, 2003.

LANDVIK, S.; SCHUMACHER, T. K.; ERIKSSON, O. E.; MOSS, S. T. Morphology and ultrastructure of *Neolecta* species. **Mycological Research.** Volume 107, Issue 9, Pages 1021 - 1031, September, 2003.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. **Earth-Science Reviews**, v.51, p.1 - 31, 2000.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

LEHNINGER A. L.; NELSON D.L. & COX M. M. Princípios de Bioquímica. 2ª ed. São Paulo: Savier, 1995.

LESMANA, S. O.; FEBRIANA, N.; SOETAREDJO, F. E.; SUNARSO, J.; ISMADJI, S. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater, **Biochem. Eng. J.** 44, pp. 19–41, 2009.

LLANOS, J.; PEREZ, A.; CANIZARES, P. Copper recovery by polymer enhanced ultrafiltration (PEUF) and electrochemical regeneration, **J. Membr. Sci.** 323, pp. 28 –36, 2008.

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

MAHO UCHIDA, R. R.; MOURIÑO-PÉREZ; MICHAEL FREITAG; SALOMON BARTNICKI-GARCÍA; ROBERSON, R. W. Microtubule dynamics and the role of molecular motors in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**. 45: 683 - 692, 2008.

MALAKOOTIAN, M.; NOURI, J.; HOSSAINI, H. Removal of heavy metals from paint industries wastewater using Leca as an available adsorbent. **Int. J. Environ. Sci. Tech.**, 6 (2), 183 - 190, 2009.

MALAMIS, S.; KATSOU, E.; CHAZILIAS, D.; LOIZIDOU, M. Investigation of Cr (III) removal from wastewater with the use of MBR combined with low-cost additives, **J. Membr. Sci.** 333, pp. 12 – 19, 2009.

MALAMIS, S.; KATSOU, E.; STYLIANOU, M.; HARALAMBOUS, K. J.; LOIZIDOU, M. Copper removal from sludge permeate with ultrafiltration membranes using zeolite, bentonite and vermiculite as adsorbents, **Water Sci. Technol.** 61 (3), pp. 581 – 589, 2010.

MARIA, T. P.; ANA, N. A.; CIPRIAN, M. C. Cadmium Exposure and Hypertension in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **Environ. Health Perspect**, 116(1), 51 - 56, 2008.

MARTINELLI, S. D. Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. **J Gen Microbiol**, 114 (2): 277 - 87, 1979.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; ROBERSON, R. W. Ultrastructure of basidium and basidiospore development in three species of the fungus *Exobasidium*. **Canadian Journal of Botany** 65: 1236 - 1244, 1987.

MIMS, C.W.; ROBERSON, R. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of freeze-substituted and chemically fixed basidiospores of *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. **Mycologia** 80: 356 - 364, 1988.

MONSERRAT, J. M.; LIMA, J. V.; FERREIRA, J.L.R.; ACOSTA, D.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P. B.; MORAES, T.B.; SANTOS, L. C. & AMADO, L. L. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. 148: 287-292, 2008.

MORIARTY, T. F.; A. MULLAN.; J. W. MCGRATH; J. P. QUINN; J. S. ELBORN and M. M. TUNNEY. Effect of reduced pH on inorganic polyphosphate accumulation by *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Lett. Appl. Microbiol.** 42: 617 - 623, 2006.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, 41; 28 - 33, 2007

NEUSTADT, J.; PIECZENIK, S. Heavy Metal Toxicity With Emphasis on Mercury, **Integr. Med.** 6, 2007.

NIES, D. H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. **Plasmid**, 27, 17 - 28, 1992.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotech.** 51, 730 - 750, 1999.

NOMURA, K. J.; KATO, N.; TAKIGUCHI, H.; OHTAKE and A. KURODA. Inorganic polyphosphate stimulates Lon-mediated proteolysis of nucleoid proteins in *Escherichia coli*. **Cell. Mol. Biol.** 52: 22 - 29, 2006.

O'CONNELL, D. W.; BIRKINSHAW, C.; O'DWYER, T. F. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. **Bioresour. Tech.** 99 (15), 6709 - 6724, 2008.

OSTERGAARD, L. H.; OLSEN, H. S. Industrial Applications of Fungal Enzymes. **The Mycota**, Volume 10, Part. 2, 269 - 290, 2010.

PARFITT, D.; MARTYN AINSWORTH, A.; SIMPSON, D.; ROGERS, H. J.; BODDY, L. Molecular and morphological discrimination of stipitate hydroids in the genera *Hydnellum* and *Phellodon*. **Mycol Res**, Vol 111; 761 - 777, 2007.

POLIZELLI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. AMORIM, D. Xylans and xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** (Mini-Review), V. 67, nº.5, p. 577 - 591, 2005.

RAO, N. N.; S. J. LIU, and A. KORNBERG. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. **J. Bacteriol.** 180: 2186 - 2193, 1998.

RASHID, M. H. and A. KORNBERG. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 4885 - 4890, 2000.

RASHID, M. H.; K. RUMBAUGH, L.; PASSADOR, D. G.; DAVIES, A. N.; HAMOOD, B. H.; IGLEWSKI and A. KORNBERG. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 9636 - 9641, 2000.

RENSING C.; ROSEN B. P. Heavy metals cycle. **Enc. Microbiol.** 205 - 219, 2009.

ROBERSON, R. W.; FULLER, M. S. Ultrastructural aspects of the hyphal tip of *Sclerotium rolfsii* preserved by freeze substitution. **Protoplasma** 146: 143 - 149, 1988.

ROBERSON, R. W.; FULLER, M. S. Effects of the sterol biosynthesis inhibitor cyproconazole on hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. II An electron microscopic study. **Experimental Mycology** 14: 124 - 135, 1990.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

ROBERSON, R. W.; FULLER, M. S.; GREBSKI, C. Effects of the sterol biosynthesis inhibitor cyproconazole on hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii*. A light microscopic study. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 34: 130 - 142, 1989.

ROBERSON, R. W.; LUTTRELL, E. S. Ultrastructure of teliospore ontogeny in *Tilletia indica*. **Mycologia**. 79: 753 - 763, 1987.

ROBERSON, R. W. The actin cytoskeleton in hyphal cells of *Sclerotium rolfsii* **Mycologia**. 84, 41 - 51, 1992.

ROBERSON, R. W. Cryofixation and freeze substitution of teliospores of *Gymnosporangium clavipes*: an ultrastructural investigation. **Mycological Research** 97: 195 - 204, 1993.

RODRÍGUEZ-GARCIA, A.; C. BARREIRO.; F. SANTOS-BENEIT.; A. SOLA-LANDA and J. F. MARTIN. Genome - wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M.145 and in a *phoP* mutant. **Proteomics** 7: 2410-2429, 2007.

RUIZ, F. A.; C. R. LEA; E. OLDFIELD and R. DOCAMPO. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. **J. Biol. Chem.** 279: 44250 - 44257, 2004.

SAMSON, R. A.; VARGA, J.; WITIASK, M. S.; GEISER, D. M. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. In: *Aspergillus Systematics in the Genomic Era*, Samson, R. A., and Varga, J., eds. (**Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre**), pp. 71 – 73, 2008.

SCAZZOCCHIO, C. *Aspergillus*: a multifaceted genus. **Encyclopedia of Microbiology** (Amsterdam: Elsevier), in press, 2009.

SATARUG, S.; GARRETT, S.H.; SENS, M.A.; SENS, D.A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environ Health Perspect.** Feb; 118 (2): 182 - 90. Review. 2010.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

SEUFFERHELD, M. J.; ALVAREZ, H. M.; FARIAS, M. E. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. **Appl. Environ Microbiol.** Oct; 74 (19): 5867 - 5874, 2008.

SCHWERDTLE, T.; EBERT, F.; THUY, C.; RICHTER, C.; MULLENDERS, L. H.; HARTWIG, A. Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. **Chem Res Toxicol.** 23: 432 - 442, 2010.

SHARFSTEIN S. T.; KEASLING J. D. Polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. **Ann N Y Acad Sci.** 745: 77 – 91. 30 Nov. 1994.

SHI, X. B.; N. N. RAO and A. KORNBERG. Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101: 17061 - 17065, 2004.

SHLOMO, B.; XIANG, Z. S. T. Transcriptome Analyses in Normal Prostate Epithelial Cells Exposed to Low - Dose Cadmium: Oncogenic and Immunomodulations Involving the Action of Tumor Necrosis Factor. **Environ. Health Perspect,** 116 (6), 769 - 776, 2008.

SIMEONOV, LUBOMIR I.; KOCHUBOVSKI; MIHAIL V.; SIMEONOVA; BIANA G. (Eds.). Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development.

Risk Assessment and Prevention Strategies. Series: NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. 1st Edition, XX, 361 p. **Hardcover.** ISBN: 978 – 94 – 007 - 0252 - 3, 2011.

SMITH R. S. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. **Environ Int.;** 35: 142 - 156, 2009.

SPARKS, D. L. Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces. **Elements.** 1: 193 – 197, 2005.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmio...

STUMPF, J. D.; A. R. POTEETE and P. L. FOSTER. Amplification of *lac* cannot account for adaptive mutation to Lac⁺ in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 189: 2291 -2299, 2007.

SUREKA, K. S.; DEY, P.; DATTA, A. K.; SINGH, A.; DASGUPTA, S.; RODRIGUE, J.; BASU, and M. KUNDU. Polyphosphate kinase is involved in stress-induced *mprAB-sigE-rel* signalling in mycobacteria. **Mol. Microbiol.** 65: 261 - 276, 2007.

TRIPATHI, A. K.; HARSH, N. S. K.; GUPTA, N. Fungal treatment of industrial effluents: a mini- review, **Life Science Journal**, Vol. 4, 78 - 81. Nº 2, 2007.

URECH K., et al. Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol.** 116(3): 275 – 278, Mar.; 1978.

VAGABOV, V. M.; TRILISENKO, L. V; KULAEV, I. S. Dependence of Inorganic Polyphosphate Chain Length on the Orthophosphate Content in the Culture Medium of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, Moscow, Mar.; Vol. 65 (3), p. 349 - 354, 2000.

VAN GROENESTI J. N.; JOHAN W. et al. Role of Cations in Accumulation and Release of Phosphate by *Acinetobacter* Strain 210 A. **Appl. Environ Microbiol.** 54 (12): 2894 – 2901, Dez.; 1988.

VAN LOOSDRECHT, M. C.; SMOLDERS, G.J.; KUBA, T.; HEIJNEN, J.J. Metabolism of Microorganisms Responsible for Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71 (1-2), 109 - 116, 1997.

VAN VEEN, H.W., et al. Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210 A. **J Biol Chem.** 269 (47): 29509–29514, 25 Nov, 1994.

WANG J.; CHEN C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnol Adv.**; 24: 427–51, 2006.

WANG, J.; ZHANG, D.; LAWSON, T. R.; BARTSCH, R. A. Sorption of heavy metal ions by silica gel-immobilised, proton-ionisable calyxarenes. **Talanta**, 78 (2), 477 - 483, 2009.

Nascimento, A.C.C. Mecanismos Celulares e Estresse Oxidativo como Marcadores de Tolerância para Cádmiio...

YUAN, Z. C.; R. ZAHEER and T. M. FINAN. Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. **Mol. Microbiol.** 58: 877 - 894, 2005.

YUN, Y.; e VOLESKY, B. Modeling of lithium interference in cadmium biosorption, **Environmental Science & Technology**, 16, 3601 - 3608, 2003.

ZIMMERMANN M, WOLF K. Biosorption of metals. *The Mycota*; 10: 379 - 392, 2010.

ZVINOWANDA, C. M.; OKONKWO, J. O.; SHABALALA, P. N.; AGYEI, M. A novel adsorbent for heavy metal remediation in aqueous environments. **Int. J. Environ. Sci. Tech.** 6 (3), 425 - 434, 2009.