



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
AMBIENTAIS**

**Marcos Antônio Cavalcanti Luna**

**EFEITOS DO COBRE EM *Aspergillus niger* UCP/  
WFCC 1261: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,  
ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS**

Recife  
2013

**Marcos Antônio Cavalcanti Luna**

**EFEITOS DO COBRE EM *Aspergillus niger* UCP/  
WFCC 1261: ASPECTOS MORFOLÓGICOS,  
ULTRAESTRUTURAIS E BIOQUÍMICOS**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>Aline Elesbão do Nascimento

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kaoru Okada

Recife

2013

Luna, Marcos Antônio Cavalcanti

Efeitos do cobre em *Aspergillus niger* ucp/ wfcc 1261: aspectos morfológicos, ultraestruturais e bioquímicos, Recife, 2013. p.132

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. *Aspergillus niger* 2. Cobre 3. Estresse oxidativo 4. Enzimas

**EFEITOS DO COBRE EM *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261:  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIS E  
BIOQUÍMICOS**

**Marcos Antônio Cavalcanti Luna**

Examinadores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Aline Elesbão do Nascimento  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof. Dr Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Defendida em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Coordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.. Alexandra Amorim Salgueiro

Dedico aos meus pais Douglas e Lindinalva  
pelo dom da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Elesbão do Nascimento pela amizade construída e ajuda indispensável na orientação deste trabalho;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki pela sua atuante promoção e incentivo a geração do conhecimento científico;

A coordenadora do curso Dr<sup>a</sup> Alexandra Amorim Salqueiro, pelo respeito e sincera acolhida;

A todos os professores do mestrado que com carinho e amizade promovem a aprendizagem;

Aos técnicos do Laboratório Severino Humberto de Almeida e Andre Felipe Santos Lima pela atuação exemplar e disponibilidade;

As Pós Doutorandas Marta Cristina Freitas e Patrícia Mendes de Souza pela simplicidade e atenção com que exercem suas atividades de monitoramento no Laboratório;

A Doutoranda Maria Helena Menezes Estevam Alves e aos mestrandos José Henrrique Edmilson Sousa Freitas e Layla Carvalho Mahnke pela ajuda nos experimentos e a disponibilidade de troca de informações;

Aos amigos e colegas, pela força e pela vibração em relação a esta jornada.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo dentro do Projeto – Rede SISBIOTA, a Universidade Católica de Pernambuco e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela concessão do espaço para desenvolvimento do Trabalho de pesquisa;

A CNPq e FECEPE, pelo fomento ao desenvolvimento científico.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
SUMÁRIO.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO I.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivo Específicos.....	15
1.3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.3.1 Metais Pesados e Poluição Ambiental.....	16
1.3.1.1 Cobre.....	19
1.3.1.2. Métodos de tratamento de efluentes metálicos.....	22
1.3.1.3 Biorremediação.....	26
1.3.1.4 Mecanismos de Toxicidade dos Metais Pesados e Estresse Oxidativo.....	27
1.3.1.5 Polifosfatos.....	36
1.3.1.6 Fungos: <i>Aspergillus niger</i> .....	39
1.3.1.7 Bioma Caatinga.....	44
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	49
CAPÍTULO II.....	66
INFLUÊNCIA DO COBRE SOBRE O CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE <i>Aspergillus niger</i> UCP/ WFCC 1261.....	67
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	68
2.1 INTRODUÇÃO.....	69

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	70
2.3 RESULTADOS .....	72
2.4 DISCUSSÃO.....	78
2.5 CONCLUSÕES.....	83
2.6 REFERÊNCIAS .....	84
CAPÍTULO III.....	87
TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO COBRE EM <i>Aspergillus niger</i> UCP/WFCC 1261 .....	88
RESUMO.....	89
ABSTRACT .....	90
3.1 INTRODUÇÃO.....	91
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	93
3.3 RESULTADOS .....	98
3.4 DISCUSSÃO.....	112
3.6 CONCLUSÕES.....	116
3.6 REFERÊNCIAS .....	118
CAPÍTULO IV .....	125
Anexo I .....	125



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Relação entre biodisponibilidade e toxicidade de xenobiontes.....	19
Figura 1.2 Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio.....	29
Figura 1.3 Mecanismo de ataque de EROs e os sistemas de defesa antioxidante. O símbolo □ refere-se aos mecanismos de produção de EROs e o símbolo △, às principais enzimas de defesas antioxidante.....	30
Figura 1.4 Classificação dos antioxidantes .....	31
Figura 1.5 Lipoperoxidação ou peroxidação de lipídeos – LPO. ....	34
Figura 1.6 Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo .....	36
Figura 1.7 Aspecto da morfologia de <i>Aspergillus</i> . O conidióforo formando uma vesícula com células adjacente, metulas e fiáldes com os conídios.....	40
Figura 1.8 <i>Aspergillus niger</i> . ....	41
Figura 1.9 Aspecto da morfologia de <i>Aspergillus niger</i> O conidióforo formando uma vesícula com células adjacente, metulas e fiáldes com os conídeos.....	42
Figura 2. 1 Crescimento de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, em meio Sabouraud. cultura controle(A). cultura exposta ao cobre a 0,5 mM (B); 1,0 mM (C); 2,0 mM (D); 3,0 mM (E); 4,0 mM (F) e 5,0 mM (G) .....	74
Figura 2. 2 Micrografias de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, ampliação de 1000: cultura controle(A). cultura exposta ao cobre a 0,5 mM (B); 1,0 mM (C); 2,0 mM (D); 3,0 mM (E); 4,0 mM (F) e 5,0 mM (G) vezes. ....	75
Figura 2. 3 Expressão da atividade enzimática de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, cultivado durante 96h a 28° C – atividade da protease(A); atividade da amilase (B); Atividade da celulase (C) e atividade da tanase (D). ....	76
Figura 3.1 Consumo de glicose e peso da biomassa na ausência e presença de cobre em cultivo líquido no período de 15 dias.....	99
Figura 3.2 pH das amostras cultivo líquido com e sem concentração de cobre nos intervalos de tempo de 3 a 15 dias em condição de agitação 150 rpm a 28°C.....	100
Figura 3.3 Perfil do conteúdo de proteínas totais de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, cultivado na ausência e na presença de cobre. ....	100
Figura 3.4 Atividade da enzima catalase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo .....	101

Figura 3.5 Atividade da enzima glutathion S transferase em resposta a presença e ausência de cobre em relação ao tempo de cultivo.....	102
Figura 3.6 Atividade da enzima glutathion peroxidase) em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo .....	103
Figura 3.7 Atividade da enzima peroxidase UI/mg ), em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo. ....	104
Figura 3.8 Peroxidação de lipídeos em <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, induzido pela exposição ao sulfato de cobre. Os dados representam a concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	105
Figura 3.9 Perfil do polifosfato celular de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, cultivado na ausência e na presença de cobre .....	106
Figura 3.10 Comportamento da atividade das enzimas fosfatase no sobrenadante de culturas por <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, cultivado na presença e ausência de cobre no período de 15 dias. (A) fosfatase ácida. (B) fosfatase alcalina. ....	107
Figura 3.11 Comportamento da atividade das enzimas fosfatase na biomassa por <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, cultivado na presença e ausência de cobre. A. fosfatase ácida. B. fosfatase alcalina .....	108
Figura 3.12 Eletromicrografias de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, A- B amostras controle, com 3 e 15 dias; C-H – amostras expostas a sulfato de cobre; C-D - 0,5 mM, com 3 e 15 dias; E- F - a 1,0 mM,, com 3 e 15 dias e G-H - 2,0 mM , com 3 e 15 dias .....	110
Figura 3.13 Remoção de íons de cobre por <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261 .....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela.1.1 Redução do oxigênio a espécies reativas .....	28
Tabela 2.1 Média dos resultados obtidos para as medidas do diâmetro (mm) em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) na ausência e presença de cobre .....	73
Tabela 2.2 Equação de regressão linear, coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e velocidade de crescimento radial ( $V_{cr}$ mm $h^{-1}$ ) de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126 no meio de cultivo na ausência e presença de cobre, em 144h. ....	73
Tabela 2.3 Atividade celulase do isolado <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, <i>niger</i> em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C .....	77
Tabela 2.4 Atividade amilase do isolado <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C .....	77
Tabela 2.5. Atividade protease do isolado <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C .....	77
Tabela 2.6. Atividade tanase do isolado <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 126, em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C .....	78
Tabela 3.1 Análise de variância da produção de biomassa, na ausência e presença de cobre no meio de cultura em relação ao tempo de cultivo .....	99
Tabela 3.2 Análise de variância da atividade da catalase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias) .....	102
Tabela 3.3 Análise de variância da atividade glutathione S transferase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo(dias) .....	103
Tabela 3.4 Análise de variância da atividade da glutathione peroxidase , em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias).....	104
Tabela 3.5 Análise de variância dos resultados provenientes da atividade peroxidase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias). ....	105
Tabela 3.6 Análise de variância da peroxidação de lipídeos em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias) .....	106
Tabela 3.7 Análise de variância – conteúdo de polifosfato na ausência e presença de cobre no meio de cultura nos intervalos de tempo(dias) .....	107
Tabela 3.8 Análise de variância fosfatase ácida no extrato micelial de <i>A. niger</i> UCP/ WFCC 1261, nos intervalos de tempo (dias) .....	109

Tabela 3.9 Análise de variância fosfatase alcalina no extrato micéial de <i>A. niger</i> UCP/WFCC 1261, nos intervalos de tempo (dias).....	109
Tabela 3.10 Análise de variância no percentual de remoção de cobre por <i>Aspergillus niger</i> no intervalos de tempo (dias).....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	catalase
Cu/Zn SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DNA	Ácido desoxiribonucléico
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$HO^\bullet$	Hidroxila
LPx	Lipoperoxidação
Mn SOD	Superóxido dimutase dependente de manganês
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
$O_2$	Dioxigênio; oxigênio molecular
$O_2^{\bullet-}$	Superóxido
$^1O_2$	Oxigênio Singlet
poli P	Polifosfato Inorgânico
$RO^\bullet$	Radical alcóxil
$ROO^\bullet$	Radical Peroxil
ROOH	Hidroperóxido Orgânico
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SOD	Superóxido dismutase

## RESUMO

O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos tornaram-se um dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vem crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial. A utilização de micro-organismos é tida como uma potencial alternativa para a biotecnologia ambiental e industrial. A presente proposta visa gerar informações acerca dos mecanismos fisiológicos, através da avaliação dos aspectos relativos ao crescimento, proteínas totais, acumulação de polifosfato, atividade das enzimas extracelulares, sistemas antioxidante enzimático e remoção do metal, por *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261, isolado da caatinga, em função da indução de estresse oxidativo por cobre no meio de cultivo. O isolado foi cultivado em meio Sabouraud, contendo cobre, nas concentrações de 0,5 mM; 1mM e 2 mM durante 15 dias, sob a temperatura de 28 °C. A variação do polifosfato, proteínas totais e atividades das enzimas antioxidantes, foram avaliadas em função do cultivo nos diferentes meios, na presença e ausência do metal. Para as determinações das atividades das enzimas extracelulares foram utilizadas metodologias específicas, durante o crescimento na ausência e em presença do íon metálico. Os aspectos morfo-ultraestruturais foram analisados sob microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos fornecem informações essenciais para o entendimento da diversidade microbiana, bem como dados acerca do comportamento do micro-organismo frente ao cobre com sua potencial aplicação nos processos biotecnológicos associados à remediação de ambientes poluídos com cobre.

**Palavras-Chave:** *Aspergillus niger*, tolerância, estresse oxidativo, enzimas, cobre.

## ABSTRACT

The knowledge about the biodiversity and the bioprospection of new microorganisms are the main focus of the biotechnological age, since the use of these organisms in the areas of food, health, environment and industry is increasing in the current world-wide scene. The use of microorganisms is one alternative potential for ambient and industrial biotechnology. Present proposal aims at to provide informations about the physiological mechanisms by using the evaluation of growth, accumulation of polyphosphate, total proteins, extracellular enzyme activity, antioxidant enzyme systems and metal renoção by *Aspergillus niger* UCP / WFCC 1261, isolated from caatinga, depending on the induction of oxidative stress by copper in the culture medium. The isolate was grown on Sabouraud medium containing copper at concentrations of 0.5 mM, 1 mM and 2 mM for 15 days under a temperature of 28 ° C. The variation of polyphosphate, total protein and antioxidant enzyme activities were measured as a function of cultivation in different media in the presence and absence of metal. For the determination of enzyme activities, extracellular specific methodologies were used during growth in the absence and presence of the metal ion. Morphological and ultrastructural aspects were analyzed by light microscopy and scanning electron microscopy. The results could be used to generate essential knowledge related to the behavior understanding face the copper presence and its potential application in the biotechnological processes related to environment remediation polluted with the heavy metal.

**key words:** *Aspergillus niger*, tolerance, oxidative stress, enzymes, copper.

## **CAPÍTULO I**



## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os agentes de estresse ambiental, os metais pesados têm lugar de destaque, e correspondem a elementos químicos metálicos que em concentrações elevadas são muito tóxicos à vida. Os metais pesados diferem de outros agentes tóxicos porque não podem ser metabolizados, sendo acumulados nos sistemas vivos e nas cadeias tróficas. A presença de metais muitas vezes está associada a regiões agrícolas como resultado do uso indiscriminado de agro-químicos. Nos sistemas vivos, os efeitos deletérios dos metais pesados variam com tipo, modo, quantidade e grau de exposição (ATSDR, 2008; JARUP 2009).

Como todo metal pesado, o cobre é biogeoquimicamente ciclado desde a formação do planeta e, por isso, de ocorrência natural. O cobre corresponde a um metal pesado essencial, fundamental para o metabolismo celular por ser cofator para muitas enzimas. Contudo, a partir de determinadas concentrações induz intoxicação celular e sistêmica. O mecanismo de toxicidade do cobre reside na interação com proteínas, ácidos nucleicos, enzimas e outros metabólitos. Os efeitos tóxicos do cobre sobre populações de micro-organismos é apenas um dos aspectos dos ecossistemas contaminados/poluídos pelo cobre (ATSDR, 2008).

Os fungos e bactérias são indicados na área da biotecnologia como principais micro-organismos eficientes na degradação de poluentes, possuindo alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (GADD, 2009; GADD, 2010). Assim, a biorremediação é um processo de tratamento que utiliza micro-organismos que degradam e transformam compostos orgânicos existentes nos solos contaminados, aquíferos, lodos e resíduos, em substâncias menos complexas e mais facilmente degradáveis. Os processos de biorremediação ou biodegradação vem sendo cada vez mais utilizados na área de tecnologia ambiental, sendo uma opção de tratamento viável, de baixo custo e que pode ser implementado em campo ou em sistemas fechados, sendo considerados mais eficientes que os processos físicos e químicos. Um dos maiores desafios para a biotecnologia é o isolamento e a seleção de linhagens/isolados com características de maior eficiência, produtividade e adaptação a variações ambientais com vistas a um planejamento futuro de conservação e aproveitamento sustentável dos recursos naturais (SINHA, 2009; GADD, 2010; KARTHIKA et al., 2010; KUMAR ET AL., 2011).

Além desse papel fundamental, é importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são derivadas das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de micro-organismos (TORTORA, 2011). A diversidade genética e metabólica dos fungos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, tais como a produção de antibióticos (estreptomicina,

penicilina), de alimentos (cogumelos), processamento de alimentos (queijo, iogurte, vinagre, etc.), bebidas alcoólicas (vinho, cerveja), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), alcoóis (etanol), alimentos fermentados (molho de soja), tratamento e/ou remediação de resíduos (esgotos domésticos, lixo), e, na agricultura, na fertilização de solos (fixação biológica de nitrogênio) e controle biológico de pragas e doenças (ALEXOPOULOS et al., 1996; MANFIO et al., 1998; ADRIO et al., 2003; BAKER et al., 2009; GHORAI et al., 2009).

A sobrevivência em ambientes expostos a agentes poluidores exibe a existência de mecanismos para sobrepor os efeitos tóxicos, que além de causarem distúrbios ecológicos como perda de biodiversidade, destruição do hábitat, declínio populacional, acabam tendo conseqüências e podem induzir a morte celular. Assim, a elucidação dos mecanismos moleculares e/ou celulares de resposta rápida na presença de contaminantes pode garantir uma compreensão mais rápida sobre a situação do meio ambiente, a tempo de evitar danos maiores a níveis macroecológicos (FENT, 2004; PUGLISI, et. al.2011).

Enzimas, intra e extracelulares, polifosfatos e os 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, resultando na compreensão do papel dos micro-organismos nos ecossistemas terrestres (KAPPOR E VIRARAGHAVAN, 1995; KULAEV et al., 2000; DRODGE, 2002; CANOVAS et al., 2004; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; GADD, 2009).

*Aspergillus niger* é um fungo filamentoso haplóide, cosmopolita, sendo encontrado em solos, plantas e ar. Exibe ampla potencialidade de sobrevivência, sendo xerófilo e termotolerante. Além disso, é considerado um organismo seguro (GRAS - generally recognized as safe) pela FDA (United States Food and Drug Administration GRAS). Esta espécie produz vários metabólitos secundários de interesse industrial, tais como, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glicônico, amilases, lipases, celulasas, xilanases e proteases. Uma das características mais interessantes da espécie é a realização do "Bioleaching", que corresponde a um processo de extração de metais dos minérios. Dessa forma, espécies do gênero *Aspergillus* spp. apresentam extrema importância econômica e tecnológica. Adicionalmente, alguns estudos apresentam o fungo como eficiente ferramenta na remoção de metais pesados em função de sua elevada resistência e tolerância a diferentes íons metálicos (AUNG & TING, 2005; SANTHIYA & TING, 2005; 2006; CANOVAS et al., 2004; GOU et al., 2010; FRISVAD et al., 2011; WUCHERPFENNIG et al., 2012).

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, o que significa que grande parte do seu patrimônio biológico não é encontrado em nenhum outro lugar do planeta. O bioma Caatinga abrange cerca de 800.000 km<sup>2</sup> (10 % do território brasileiro), dos quais

200.000 km<sup>2</sup> foram reconhecidos em 2001 como Reserva da Biosfera. Ressalte-se que na Caatinga, clima semi-árido, as características do solo e sua distribuição são fundamentais no que diz respeito à dinâmica da água e, condicionam, em grande parte, a introdução de inovações tecnológicas ou alterações nos sistemas de produção mais equilibrados com vistas ao desenvolvimento sustentável local (BRASIL, 2007).

A degradação ambiental da Caatinga é resultado de mais de três séculos de uso extrativista da terra. Dentre os diversos impactos ocasionados pela agricultura convencional extrativista na área do bioma, destacam-se: degradação do solo com as alterações de caráter físico (compactação e erosão), e alterações de caráter químico (salinização, diminuição da matéria orgânica e da capacidade de retenção de água, contaminação dos aquíferos e a eutrofização, deposição de resíduos e metais pesados – que estão contidos em alguns tipos de fertilizantes); e o desmatamento que ocasiona mudanças no relevo altera o escoamento natural das águas, impermeabiliza o solo e aumenta a erosão. Tornando-se, portanto, um grande desafio ampliar o conhecimento sobre a sua biodiversidade (BRASIL, 2007; ALVES et al., 2009).

A diversidade biológica possui, além de seu valor intrínseco, valor ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e estético. Assim, diversos esforços são feitos para estimar o valor global atribuível à biodiversidade e aos serviços ambientais. A biodiversidade é a base das atividades agrícolas, pecuárias, pesqueiras e florestais e, também, a base estratégica da indústria da biotecnologia (BARBOSA, 2005; GARIGLIO et al., 2010).

Neste sentido, a manutenção e a produtividade no ecossistema associam-se diretamente aos micro-organismos do solo, que desempenham funções únicas e cruciais como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Estudos que se baseiam no isolamento e identificação, bem como na compreensão das relações entre micro-organismos e suas interações com o ambiente, ou de processos por eles desencadeados, são fundamentais para o entendimento das respostas associadas à produtividade e a manutenção da integridade ambiental relacionadas à ciclagem de matéria e energia cujas interações resultam no funcionamento do ecossistema (ABOIN et al., 2004; SAMPAIO et al., 2009).

As características particulares do solo da caatinga, como salinidade, umidade, matéria orgânica e pH, vegetação e altas temperatura, favorecem um habitat peculiar para exploração de micro-organismos adaptados às condições adversas do deste bioma. O conhecimento de micro-organismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos podem possibilitar mecanismos estratégicos para esta região consolidando processos sustentáveis do uso de recursos e de um manejo social responsável.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

A presente proposta objetiva avaliar o comportamento fisiológico, bioquímico e metabólico de um isolado de *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261, obtido do solo da Caatinga, frente à exposição ao cobre, visando identificar os mecanismos celulares e antioxidantes do fungo, gerando perspectivas de aplicação em processos de produção de metabólitos e biorremediação.

### 1.2.2 Objetivo Específicos

- ✓ Avaliar o crescimento de *Aspergillus niger* em presença de diferentes concentrações de cobre;
- ✓ Analisar a influência do crescimento em presença de diferentes concentrações de cobre na integridade morfológica e ultraestrutural do organismo;
- ✓ Caracterizar as possíveis alterações induzidas pelas diferentes concentrações de cobre na expressão das enzimas oxidativas;
- ✓ Caracterizar as possíveis alterações induzidas pelas diferentes concentrações de cobre na peroxidação de lipídeos;
- ✓ Caracterizar os efeitos de diferentes concentrações de cobre na expressão das enzimas, protease, tanase, celulase e amilase do organismo;
- ✓ Analisar o comportamento do polifosfato em resposta ao cultivo na presença de diferentes concentrações de cobre;
- ✓ Determinar os efeitos de diferentes concentrações de cobre sobre o conteúdo de proteínas totais do organismo;
- ✓ Identificar o comportamento anti estresse oxidativo do isolado;
- ✓ Determinar os mecanismos utilizados pelo isolado para determinação da tolerância;
- ✓ Caracterizar o isolado como uma possível ferramenta na produção de metabólitos de interesse biotecnológico e industrial, bem como na sua utilização na remoção de cobre;

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 Metais Pesados e Poluição Ambiental

Nas últimas décadas, com acentuada utilização de recursos minerais pelas indústrias e seu conseqüente extrativismo, o impacto potencial dos metais pesados ao meio ambiente, saúde pública e economia tornou-se sério problema a ser resolvido. Quimicamente, os metais pesados são definidos como um grupo de elementos que possuem densidade superior a  $4,0 \text{ g/cm}^3$  estando classificados na tabela periódica entre o cobre e o chumbo e pelo menos 20 metais são classificados como tóxicos sendo que a metade destes são emitidos para o meio ambiente em quantidades que representam riscos para os sistemas vivos, incluindo os humanos (JARUP, 2009; GADD, 2009; ATSDR, 2008)

Tradicionalmente, o íon metálico é considerado um receptor de pares de elétrons, ou ácido de Lewis (qualquer espécie química que emprega um orbital eletrônico vazio no início da reação de complexação), ao passo que o ligante é tido como doador de pares eletrônicos, ou base de Lewis (qualquer espécie química que emprega um orbital duplamente ocupado no início da reação de complexação). Todos os cátions metálicos de interesse ambiental são classificados como ácidos de Lewis. As ligações covalentes são, portanto, controladas pelos chamados orbitais de fronteira, representados pelos orbitais preenchidos de energia mais alta (no doador) e pelos orbitais vazios de menor energia (no receptor) (ATKINS, 2001).

Para metais de transição com orbital d não saturado ( $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ), as ligações coordenadas dativas são dominantes na formação dos complexos, e quanto maior o estado de oxidação, maior a estabilidade do complexo com o ligante (FILEP, 1999).

A especiação de um metal ou de um ligante depende da concentração total de todos os componentes. A variação da concentração total de um componente influencia as concentrações dos outros componentes. A concentração dos íons metálicos livres aumenta proporcionalmente com a concentração total do metal e diminui com o aumento da concentração de um ligante (ALLOWAY, 1990; VOLESKY, 1990; GADD, 2009).

Os principais metais pesados que têm recebido atenção devido a sua acumulação nos solos, plantas, rios e nas águas subterrâneas são chumbo (Pb), cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni), cromo (Cr) e mercúrio (Hg). Os metais podem estar presentes como íons-livres ou complexos organo-minerais solúveis ou adsorvidos às partículas sólidas (ADRIANO et al., 2004; HOGAN, 2010).

Em geral o nível da concentração dos metais no meio ambiente está associada à localização geográfica, sendo verificado o aumento do nível toxicidade, em locais próximos

as atividades industriais e de mineração. Nestes locais, plantas e animais das proximidades podem absorvê-los e acumular em seu organismo (bioacumulação), provocando graves intoxicações ao longo da cadeia alimentar (CALLENDER, 2007; ATSDR, 2008; JARUP 2009; SIMEONOV et al., 2011).

Diante do caráter tóxico por parte de alguns metais, fez-se necessário o estabelecimento de normas para o descarte de efluentes. No Brasil, segundo a Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005), o lançamento de despejos de efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderá ser feito, direta ou indiretamente, nos corpos de água de classe 1 a 8, desde que atendam às condições dispostas na resolução, e não venha a fazer com que os limites estabelecidos para as respectivas classes sejam ultrapassados.

VOLESKY (2001) afirma que o controle das emissões dos metais pesados deve ser feito diretamente na fonte poluidora, antes destes entrarem no ecossistema, movendo-se e acumulando-se nos tecidos vivos ao longo da cadeia trófica.

Diversos efluentes industriais contendo metais pesados tóxicos têm sido descartados no meio ambiente. Uma vez lançados no ambiente, os cátions de alguns metais pesados podem ser acumulados através da cadeia alimentar, mesmo que presentes em baixas concentrações nos efluentes, tornando-se fatores de concentração perigosos em peixes e animais que, posteriormente, são consumidos pelo homem ( ATSDR, 2008).

Os metais pesados tais como cobre, zinco, níquel e cádmio estão comumente presentes em águas residuais não tratadas provenientes das atividades de mineração, fundição, galvanoplastia, metalurgia e da indústria de metal-acabamento (JARUP, 2009; GADD, 2009; SIMEONOV et al., 2011)

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais dependendo da dose e da forma química. Em baixas concentrações alguns são indispensáveis (Fe, Cu, Zn) na dieta alimentar, entretanto, altas concentrações podem provocar distúrbios ao organismo. Diversos estudos têm evidenciado os efeitos prejudiciais dos metais pesados à saúde humana. Existem indícios que sutis mudanças psicológicas podem estar associadas aos metais pesados, sendo quase sempre ignorada a sua origem ou sendo atribuindo a outras causas (ATSDR, 2008; JARUP, 2009; GADD, 2009; SIMEONOV et al., 2011).

Elevadas concentrações de metais, em locais poluídas com zinco, cádmio, chumbo, cobre e outros podem ter efeitos adversos sobre a microbiota do solo podendo reduzir o número e a atividade dos microorganismos. (KAVAMURA; ESPOSITO, 2010).

Os metais pesados, quando presentes no ambiente, podem inibir a atividade metabólica dos microrganismos de modo a limitar a taxa de degradação da matéria. A consequência ambiental deste fato é a acumulação ainda maior de compostos poluentes ao meio ambiente. Entretanto, concentrações adequadas de metais que têm ação de cofatores

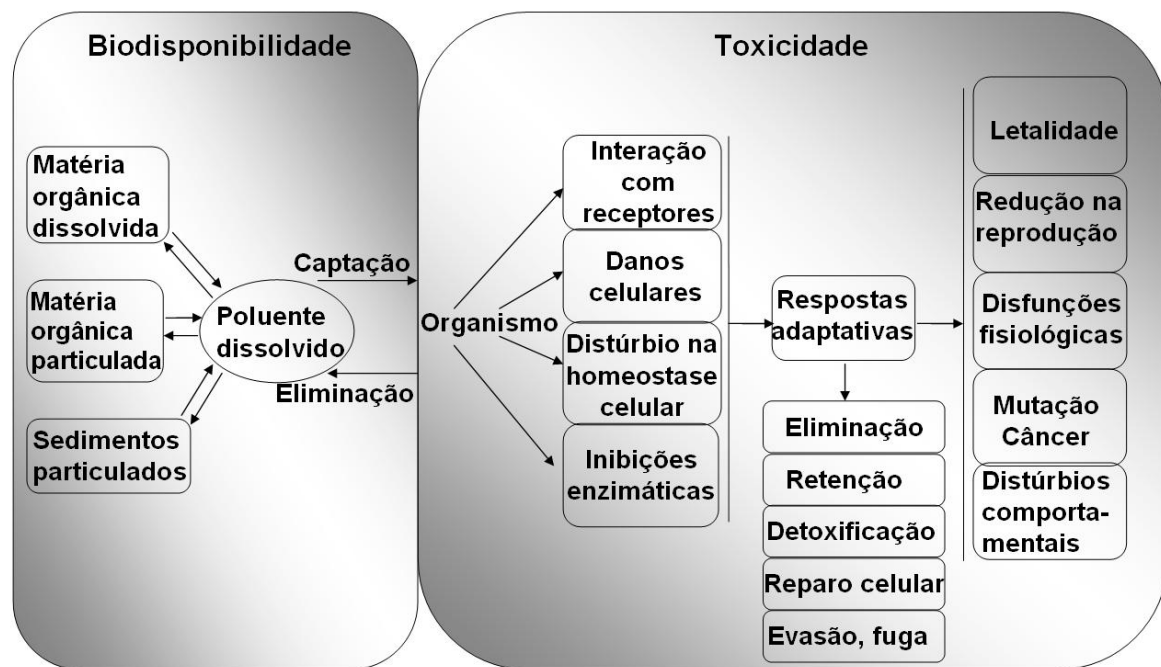
enzimáticos podem melhorar a capacidade degradativa do meio (BAKER, 1974; BABICH; SKOTZKY, 1980; ATLAS, 1984; BAATH et al., 1998; ATSDR, 2008; JARUP, 2009)

Diversas pesquisas têm demonstrado que microrganismos residentes em ambientes contaminados por extração de minérios podem ter a toxicidade diminuída ou eliminada pela ação de microrganismos adaptados. Variações significativas foram observadas sobre o níveis inibitórios dos metais pesados, provavelmente devido a diferenças encontradas em condições experimentais utilizados em vários ensaios (por exemplo, a composição do meio, os valores de pH, temperatura, concentração de metal etc.), podem influenciar especiação do destes e sua biodisponibilidade.(HERRERA et. al, 2011; KAVAMURA; ESPOSITO 2010)

De maneira geral a forma mais tóxica de um metal não é a livre, mas quando se encontra como cátion ou ligado a cadeias carbônicas. A formação de complexos com os grupos funcionais das enzimas, prejudicam o perfeito funcionamento do organismo, decorrente pela sua afinidade ao enxofre. Assim, quando presentes em suas formas catiônicas, os metais reagem com o radical sulfidríla (-SH) presente na estrutura protéica das enzimas, alterando suas propriedades, o que pode resultar em conseqüências danosas ao metabolismo dos seres vivos. Também podem se combinar com as membranas celulares, perturbando ou em alguns casos mais drásticos, impedindo completamente o transporte de substâncias essenciais, tais como os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e de substâncias orgânicas. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Sprague (1990), vários fatores interferem diretamente na toxicidade dos agentes poluentes, entre os quais destacam-se: 1) o pH, principalmente para substâncias que se ionizam; 2) a dureza da água, que determina mudanças no efeito poluente dos metais; 3) o material orgânico dissolvido na água, que pode se ligar aos elementos-traço e diminuir o efeito tóxico dos mesmos e 4) estágios nutricionais, que podem ser responsáveis por inexplicáveis variações na suscetibilidade a poluentes. Ainda, a temperatura também é um fator abiótico que pode interferir na toxicidade de determinada substância, porém tais interferências só se fazem notar diante de variações muito drásticas.

A biologia da espécie em questão também é um fator importante na avaliação da toxicidade. Outro fator a ser levado em conta quando avaliamos a toxicidade de metais é a biodisponibilidade: o metal pode estar presente no ambiente, porém não está disponível para contaminar os organismos (Figura 1). A biodisponibilidade dos poluentes está relacionada tanto à sua associação com outras partículas presentes no meio aquático como à taxa de captação e eliminação do mesmo pelo organismo. Já a sua toxicidade é o resultado entre os efeitos diretos, a níveis celulares e moleculares, e a capacidade adaptativa do organismo frente a este poluente (SHARMA e AGRAWAL, 2005; FLOREA e BUSSELBERG, 2006; FENT, 2004; ATSDR, 2008).

**Figura 1.1** Relação entre biodisponibilidade e toxicidade de xenobiontes

Fonte: FENT, (2004).

Embora tais parâmetros sejam observados, verifica-se que a influência de metais pesados sobre alterações da atividade fisiológica e viabilidade dos microrganismos no meio ambiente ainda é entendida insuficientemente e permanece como um problema a ser estudado isto devido a complexidade dos fatores ambientais que estão relacionados aos processos de desintoxicação e sobrevivência celular.

### 1.3.1.1 Cobre

O cobre apresenta quatro estados de oxidação: metálico ( $\text{Cu}^0$ ), íon cuproso ( $\text{Cu}^+$ ), íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e íon trivalente ( $\text{Cu}^{3+}$ ). Pode ser encontrado na natureza tanto na forma elementar como na forma metálica. Por estar presente na crosta terrestre, a principal fonte natural do cobre são as poeiras. Outras fontes naturais, em ordem de importância são os vulcões, os processos biogênicos, os incêndios florestais e as névoas aquáticas (FLEMMING; TREVORS, 1989; SILVEIRA, 2006; SHRIVASTAVA, 2009).

As propriedades de alta condutividade térmica e elétrica, maleabilidade e ductibilidade com facilidade de transformação e fios, tornou o cobre um dos metais mais utilizados pela indústria depois do ferro. As indústrias elétricas, de galvanoplastia, de fertilizantes, são as que mais a utilizam. Sendo estas também as principais fontes de poluição ambiental juntamente com atividades extrativistas de minério de cobre (ATSDR, 2008; SHRIVASTAVA, 2009).



As fontes antrópicas de cobre incluem a emissão pelas atividades de mineração e fundição, pela queima de carvão como fonte de energia, pelos incineradores municipais, descargas industriais, agente antiaderente em pinturas, na agricultura (fertilizante, algicida, fungicida e suplemento alimentar). O sulfato de cobre é mundialmente utilizado para inibir o crescimento de algas em reservatórios. Porém, somente 7% do total de cobre produzido são empregados no tratamento de água, 65% são utilizados na agricultura e 28% na indústria (ATSDR, 2008; SHRIVASTAVA, 2009).

O aumento da concentração de cobre no ambiente pode ser atribuído tanto a fontes naturais quanto a antropogênicas, entretanto, as fontes antropogênicas têm sido as maiores responsáveis por elevar os níveis desse elemento em vários ecossistemas (FLEMMING; TREVORS, 1989; SILVEIRA, 2006; SHRIVASTAVA, 2009).

A forma físico-química do cobre determina seu comportamento no meio ambiente e sua disponibilidade a biota. Por exemplo, o cobre incorporado a estrutura da rede mineral é inerte e de pouco significado ecológico. A maioria dos métodos analíticos não distingue a forma de cobre presente, sabe-se somente o total de metal contido na matriz. Na água, a literatura mostra que a biodisponibilidade é geralmente pequena para as concentrações de metais totais. A biodisponibilidade do cobre é influenciada no sistema aquático pela complexação a ligantes orgânicos e inorgânicos, adsorção a óxidos metálicos, argila e material particulado em suspensão, bioacumulação e trocas entre a interface água e sedimento (ATSDR, 2008). As formas tóxicas de cobre incluem  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$ ,  $\text{CuOH}^+$ , porém a  $\text{Cu}^{+2}$  é considerada a forma mais tóxica (SHRIVASTAVA, 2009).

O cobre é um elemento essencial para toda biota, estudos mostram que este micronutriente é necessário para o crescimento de animais e plantas. Nos animais, o cobre, atua participando de processos fisiológicos, como, por exemplo: 1) na cadeia respiratória, fazendo parte do complexo citocromo oxidase; 2) para síntese de hemoglobina, o cobre é um constituinte de eritrocupreína no eritrócito; 3) no aproveitamento adequado do ferro; 4) na síntese do colágeno e da elastina; e 4) está presente no centro ativo da lisil oxidase, enzima que produz interligações entre as cadeias polipeptídicas (Lenhinger, 1990). Contudo, quando em altas concentrações e por períodos prolongados de exposição, esse elemento-traço apresenta efeito tóxico, podendo causar a morte.

Para satisfazer sua demanda metabólica interna todas as espécies de um habitat estão adaptadas às concentrações dos elementos essenciais naturalmente presentes. Desse modo, o cobre pode ser tóxico em elevadas concentrações, entretanto, em concentrações muito baixas pode ser limitante ou causar sinais de deficiência (ATSDR, 2008).

Como mencionado anteriormente o cobre é um micronutriente essencial, e está incorporado a um grande número de enzimas e proteínas estruturais. Assim, como outros metais, o cobre desempenha papel importante na regulação da expressão gênica. Vários estudos demonstram a existência de fatores de transcrição regulados pelo cobre. O mecanismo de regulação transcricional se deve a ligação do cobre a promotores de metalotioneína, mais precisamente a elementos que respondem a metais (MRE). A necessidade de cobre nos vários órgãos ou nos sistemas do organismo é regulada por mecanismos de controle homeostáticos. A toxicidade do cobre ocorre quando tais mecanismos de controle dentro de um determinado compartimento são sobrecarregados e/ou quando os mecanismos de reparo celular são destruídos (HALIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO, 2005; JOMOVA; VALKO, 2011).

O excesso de cobre é sequestrado por moléculas de metalotioneínas ricas em cisteína, fitoquelatinas e sulfetos. O radical sulfidrila da cisteína nos peptídeos e proteínas funciona como ligante nos íons metálicos. As cisteínas das metalotioneínas correspondem a 20-30% dos aminoácidos e estão arranjadas em seqüências repetitivas. A glutatona também apresenta cisteína em sua seqüência (HALIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VALKO, 2005; JOMOVA; VALKO, 2011).

Para os humanos, embora, o cobre seja considerado metal altamente tóxico, baixas doses é um elemento essencial participando das função enzimáticas como cofatores, e permitindo o funcionamento normal de algumas rotas metabólicas, auxiliando com isto diversas funções orgânicas, como: a mobilização do ferro para a síntese da hemoglobina, a síntese do hormônio da adrenalina e a formação dos tecidos conjuntivos. Sobre a saúde humana, o efeito, mas nocivo e comum registrado pelo excesso de cobre é a doença de Wilson, caracterizada pela falta de coordenação motora e deterioração mental progressiva (GAETKE e CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA e VALKO, 2011).

Assim, quando em excesso, o cobre promove as seguintes reações: deslocamento do metal de seus sítios de ligação resultando em alterações nas membranas como despolarização e dano dos receptores ou moléculas transportadoras; ligação do cobre a macromoléculas como DNA ou enzimas contendo grupamento sulfidrilas, carboxilas ou imidazólicos, resultando em dano proteico, alterações oxidativas do DNA, com consequentes alterações funcionais decorrentes do grande número de enzimas dependentes do cobre; dano celular devido a produção de oxiradicaís pela reação de Fenton. A produção excessiva de tais radicaís iniciará uma cascata de oxiredução (estresse oxidativo) levando a perda da integridade celular. Este dano inclui aumento nos níveis de cálcio citosólico, depleção de ATP, oxidação do tiol, lipoperoxidação, dano no DNA e em organelas críticas como mitocôndrias e lisossomos (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Ressalte-se que nas concentrações normalmente encontradas em efluentes industriais o metal é considerado tóxico a uma grande variedade de seres vivos, principalmente populações microbianas, incluindo bactérias desnitrificantes e nitrificante, algas e diversos fungos. Nos peixes exposições baixas podem afetar a respiração. Existe grande diferença de tolerância ao cobre entre as espécies, como algas, bactérias e diversos fungos. Algumas espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella* e *Mucor* têm demonstrado uma resistência maior a concentrações de cobre e outros metais. As alterações morfológicas e fisiológicas provocadas na presença de metais pesados revelam a possibilidade para a aplicação destes fungos como uma indicação de poluição de cobre. (STARKEY; WAKSMAN, 1943; LEVINSKAITÉ, 2001, TSEKOVA; DENTCHEV 2001; SOUZA, et. al. 2005; HERRERA 2011).

### 1.3.1.2. Métodos de tratamento de efluentes metálicos

Segundo a Resolução do CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), a qual dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, o limite máximo permitido de cobre presente em um efluente industrial para descarte é de 1,0 mgL-1.

Assim, vários são os processos disponíveis para o tratamento de efluentes que contêm metais pesados, entre eles, cita-se, a precipitação química, a evaporação, a troca iônica (colunas ou resinas), as tecnologias de membrana (osmose inversa e eletrodialise) e os processos de sorção (adsorção em carvão ativado, biossorção) (VALENZUELA et al., 2006; CRINI, 2006; CRINI; BARDOT, 2007; SHRIVASTAVA, 2009).

Dentre os processos mencionados, alguns como as colunas trocadoras de íons ou resinas de troca iônica, evaporadores a vácuo, ultrafiltração e osmose inversa, permitem a reciclagem do efluente tratado ao processo industrial, bem como a conseqüente recuperação dos insumos. Entretanto, a aplicação destes tratamentos por questões de condições de processo, de operação ou dos materiais utilizados pode se tornar pouco atraente (VOLESKY, 2004; DAVYDOVA, 2005; CRINI, 2006; CRINI e BARDOT, 2007; VALENZUELA et al., 2006; SHRIVASTAVA, 2009)..

O processo de troca iônica consiste no uso de resinas trocadoras de íons empregadas para remover todos os metais e íons dissolvidos nos efluentes. Em geral, estas resinas são polímeros sintéticos, insolúveis, possuidoras de sítios ativos, capazes de reagir com os íons positivos (cátions) ou negativos (ânions) presentes nas soluções. A vantagem do emprego das resinas é que, depois de saturadas, estas podem ser regeneradas por meio da recuperação de sua capacidade de retenção de íons. Resinas catiônicas e aniônicas são regeneradas, respectivamente, pela passagem de uma solução concentrada de ácido forte e

base forte (DABROWSKI et al., 2004; KALIN et al., 2006; VALENZUELA et al., 2006; SHRIVASTAVA, 2009).

O uso de evaporadores a vácuo consiste em concentrar as águas por meio de destilação, promovendo a redução do volume de líquido a ser tratado ou recuperado. O processo de ebulição a vácuo utiliza exclusivamente energia elétrica que, mediante ciclo frigorífico, permite uma destilação a custo moderado. Esses processos, geralmente são econômicos para águas de lavagem concentradas e lavagem de múltiplos estágios em contracorrente. As vantagens apresentadas por este processo são: o retorno e o reaproveitamento da água destilada nos processos (VOLESKY., 2006; VALENZUELA et al., 2006; SHRIVASTAVA, 2009).

Processos com membranas permitem concentrar os poluentes, dentro destes processos destacam-se como sendo os mais importantes a osmose inversa e a eletrodialise.

A osmose inversa é uma técnica que se baseia na aplicação de pressões elevadas a uma solução concentrada, obrigando o solvente a passar por uma membrana semipermeável para uma região de solução diluída. A solução concentrada fica mais concentrada ainda, podendo ser reutilizada. A utilização deste processo permite obter níveis de concentração de metais pesados muito baixos apresentando, no entanto, custos elevados de operação e investimento. Na eletrodialise os componentes iônicos de uma solução são separados através do uso de uma membrana semipermeável de seletividade iônica. O processo de eletrodialise pode ser operado tanto em batelada quanto de forma contínua. Neste processo existe a possibilidade de haver precipitação química de sais de baixa solubilidade sobre a superfície da membrana ou ainda a obstrução dos poros da membrana. A principal desvantagem deste método de tratamento está no custo elevado, além do emprego de produtos para desentupimento das membranas (MACK et al., 2004; VOLESKY, 2004).

Tradicionalmente, entre os processos convencionais de remoção de metais pesados de soluções, o processo de precipitação química é o mais utilizado pelas indústrias de tratamento de superfícies (aproximadamente 75%), uma vez que se apresenta como um método relativamente simples e econômico, com o inconveniente de gerar grandes quantidades de lodo (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009).

O processo de precipitação é indicado para efluentes contendo altas concentrações de metais (>100 mgL<sup>-1</sup>), pois em concentrações diluídas o precipitado apresenta baixa cinética de sedimentação, havendo necessidade da adição extra de outros sais (como FeCl<sub>3</sub> e Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) ou de polieletrólitos. São comumente utilizados como agentes neutralizantes, hidróxidos, carbonatos, sulfetos ou alguma combinação destes (MARCHIORETO et al., 2005; FU et al., 2006; ISLAMOGLU et al., 2006).

Contudo, a aplicação do processo convencional de precipitação química gera uma grande quantidade de lodo metálico, cuja composição depende das linhas coletoras de efluentes instaladas na empresa. Esse lodo gerado é classificado como resíduo perigoso, e representa um grande problema ambiental, basicamente pela falta de espaço físico nas instalações industriais para seu armazenamento, pelo alto custo associado ao seu transporte, tratamento e disposição final. Em sua grande maioria as empresas utilizam sistemas de estocagem dos resíduos (lodo) em tambores de 200 litros. Muitas vezes o processo não permite atingir níveis de metais pesados suficientemente reduzidos às concentrações de lançamento estabelecidas pela legislação vigente, sendo necessária à aplicação de um processo complementar para o polimento final do efluente (NAVARRO et al., 2005; VANBROEKHOVEN et al., 2005; SHRIVASTAVA, 2009).

Dessa forma, em complementação ao processo de precipitação podem ser empregados os processos com membranas e os processos de sorção. A adsorção é uma das técnicas mais efetivas no tratamento de águas e águas residuárias. Processos de adsorção são largamente utilizados para remoção de cor, odores ou gosto no tratamento e purificação de águas, óleos, produtos farmacêuticos e efluentes de processo. O sucesso de um adsorvente industrial no campo das operações unitárias depende em grande parte da facilidade com que o adsorvato pode ser retirado, seja para fins de aproveitamento, como para regenerar o adsorvente (VOLESKY, 2004; MACK et al., 2004; VANBROEKHOVEN et al., 2005; . SHRIVASTAVA, 2009).

A adsorção consiste em um processo de separação relativamente simples, envolve o contato de uma fase fluida livre (líquida ou gasosa) com uma fase rígida permanente (adsorvente), granulada, que tem a propriedade de reter e de guardar seletivamente uma, ou mais de uma, entre as espécies contidas inicialmente no fluido. Uma vez que o adsorvato concentra-se na superfície do adsorvente, quanto maior for esta superfície, maior será a eficiência da adsorção. Por isso geralmente os adsorventes são sólidos com partículas porosas (SHRIVASTAVA, 2009).

Dentre as espécies de cátions que podem ser adsorvidas especificamente, estão os metais pesados, tais como, cobre, zinco, cobalto, cádmio. A adsorção específica de cátions ocorre porque os íons metálicos dos grupos IB e IIB apresentam elevado número atômico, pequeno tamanho iônico e elevada polaridade. Além disso, os metais pesados apresentam maior habilidade em modificar as suas características quando comparado aos metais alcalinos e alcalinos terrosos. Finalmente, os metais pesados existem na forma de cátions hidratados, o que contribui para a redução na quantidade média de carga elétrica por íon e, conseqüentemente, na redução da “barreira” que deve ser sobreposta quando os íons se aproximam da superfície dos adsorventes, facilitando então a interação entre os íons e a

superfície do sorvente (VOLESKY, 2004; MACK et al., 2004; VANBROEKHOVEN et al., 2005; . SHRIVASTAVA, 2009).

Dentre outros fatores, a carga superficial do adsorvente, o pH e a concentração de íons podem afetar a adsorção não-específica. O pH do sistema pode afetar a espécie química do metal em solução e, em adição, alterar a quantidade de cargas na superfície do adsorvente com carga variável. Com o aumento do pH, a superfície de cargas negativas é aumentada, favorecendo a atração eletrostática entre o adsorvente e o metal (VOLESKY, 2004; MACK et al., 2004; VANBROEKHOVEN et al., 2005; . SHRIVASTAVA, 2009).

O tipo de interação que irá predominar na adsorção dos metais depende de diversos fatores, dentre eles da quantidade e do tipo de sítios associados com a fase sólida do adsorvente, da concentração do metal e dos ligantes capazes de formar complexos organominerais, do pH, da condutividade elétrica e do potencial redox do substrato. Entretanto, em geral, é difícil distinguir experimentalmente as forças envolvidas na reação de sorção de metais (VOLESKY, 2004).

Dentre as características mais procuradas num adsorvente, pode-se citar capacidade, seletividade, regenerabilidade, compatibilidade e baixo custo. Para ser satisfatório em aplicações comerciais, um sorvente deve ter: (1) alta seletividade para possibilitar uma boa separação; (2) grande área superficial; (3) alta capacidade de adsorção; (4) cinética favorável e propriedade de transporte para rápida adsorção; (5) estabilidade térmica e química, incluindo solubilidade extremamente baixa em contato com o fluido, para preservar a quantidade de sorvente e as suas propriedades; (6) dureza e força mecânica para prevenir esmagamento e erosão; (7) nenhuma tendência para promover reações químicas indesejáveis; (8) custo relativamente baixo. (SHRIVASTAVA, 2009).

O custo é um importante parâmetro na avaliação de potencialidade de um material na remoção de poluentes. Entretanto, informação do custo é dificilmente relatada, e a despesa com adsorventes individuais varia dependendo do grau de disponibilidade requerida e o local. Como os processos convencionais anteriormente citados apresentam um elevado custo para a maioria das empresas, os processos de sorção têm recebido maior atenção nos últimos tempos, principalmente no que diz respeito, à busca de materiais alternativos (zeólitas, turfa, resíduos industriais e biomassas diversas) de baixo custo e capazes de remover metais pesados de meios aquosos (VOLESKY, 2004; MACK et al., 2004; VANBROEKHOVEN et al., 2005; . VEIT, 2006; SHRIVASTAVA, 2009).

### 1.3.1.3 Biorremediação

A biorremediação é uma alternativa promissora na descontaminação dos ambientes aquáticos e terrestres. Nos últimos anos, a bioremediação tem se destacado como uma importante novidade na comunidade científica, com potencial aplicação na indústria e no meio ambiente. Sua grande aplicabilidade é devido à existência de milhares de micro-organismos, tais como bactérias, leveduras, fungos, algas e plantas; e vários materiais biológicos como resíduos da produção agroindustrial, com capacidade para degradação, retenção, remoção ou recuperação de poluentes recalcitrantes. (CARNEIRO e GARIGLIO 2010; GADD, 2010)

A aplicação de processos biotecnológicos envolvendo, conjuntamente, micro-organismos e métodos convencionais, com o objetivo de solucionar ou minimizar problemas de poluição ambiental, tem se sido empregado já algum tempo. Os processos de biorremediação vêm sendo usados com sucesso no tratamento de efluentes industriais e esgotos domésticos, como também em processos biológicos de tratamento em aterros industriais de resíduos perigosos e aterros de resíduos urbanos. Também, tem crescido muito o interesse em a aplicação da biorremediação em áreas contaminadas pela descarga inadequada (intencional ou acidental) de resíduos sólidos. (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010). Apresenta as seguintes vantagens em comparação aos tratamentos convencionais: baixos custos operacionais, minimização do volume de lodos químicos e/ou biológicos a serem dispostos e alta eficiência em desintoxicação de efluentes muito diluídos.

As propriedades que tem alguns organismos como agentes quelantes naturais, (plantas, fungos e bactérias) tornaram a biorremediação uma alternativa eficaz no processo de sorção dos metais para o tratamento de efluentes. A absorção de metais pesados por biomassa pode, em alguns casos chegar até 50% do peso da biomassa seca. Os biosorventes como são chamados as biomassas podem ser manipulados com múltiplas reutilizações o que aumenta sua atratividade econômica (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA e ESPOSITO, 2010).

Os mecanismos de captação e remoção de metais em geral podem ser por duas maneiras: ativa e passiva. Na captação passiva (biosorção) os microrganismos geralmente sequestram o metal apenas através da fixação da superfície da parede celular. No processo ativo (bioacumulação), os metais são concentradas por meio de um combinação de reacções de superfície, intra e extracelulares com precipitação e complexação, dependendo este processo da atividade metabólica da célula (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010).

Ao escolher a biomassa para experimentos para bio sorção de metal, a sua origem é um fator importante a ter em conta. Alguns biosorventes podem ligar-se e coletar uma ampla gama de metais pesados, sem prioridade específica, enquanto outros são específicos para determinados tipos de metais ((VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010).

Os grupos funcionais presentes na superfície dos biosorventes como hidroxila, carboxila, tioéter, sulfidril, sulfonato, imina, amida, e fosfodiéster são responsáveis pela ligação e com o material a ser sorvido. A importância de um determinado grupo de bio sorção a um determinado metal por uma certa biomassa depende destes fatores. Por esta razão cada espécie de micro-organismo difere nas propriedades de relação com o metal a ser tratado. (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010; VEIRA; VOLESKY, 2010).

A utilização de micro-organismos nativos ou introduzidos em ambiente alterados, em locais de tratamento de disposição do resíduo sólidos tem sido realizados com sucesso em indústrias têxtil, de celulose, farmacêutica, dentre outras (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010; VEIRA e VOLESKY, 2010).

Entretanto, os mecanismos de tratamento em grande escala necessita de conhecimento e estudos acerca de novos microrganismos específicos e sua adaptação ao determinado contaminante. Como, nem sempre os indivíduos fundamentais para os processos de biorremediação estão presentes nos ambientes, a procura por aqueles que possuam os dispositivos metabólicos apropriados de tolerância aos diferentes poluentes, tem permitindo assim iniciar o processo desintoxicação ambiental (VOLESKY, 2004; SHRIVASTAVA, 2009; GADD, 2009; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010; VEIRA; VOLESKY, 2010; CARNEIRO; GARIGLIO, 2010).

Neste contexto, o emprego dos fungos filamentosos nos processos de biorremediação vem cada vez mais sendo uma alternativa eficaz e promissora, em virtude do alto potencial, bio sorativo a metais pesados, e dos mecanismos de resistência e tolerância em condições ambientais contaminados.

#### **1.3.1.4 Mecanismos de Toxicidade dos Metais Pesados e Estresse Oxidativo**

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de nitrogênio. Nas células e nos organismos mais complexos, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e



síntese de substâncias biológicas importantes (YU, 1994; DRODGE, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA et al., 2010; AUGUSTINIAK et al., 2010).

Uma vez que os sistemas vivos estão expostos constantemente a condições físicas, químicas e biológicas adversas, como presença de metais, compostos químicos xenobióticos, variações de temperatura, pH, luminosidade, disponibilidade de água e exposição a outros sistemas vivos, tais condições originam um fenômeno denominado, de modo geral, estresse (HALLIWEEL; GUTTERIDGE, 2007).

Xenobiontes, em geral, ativam as duas das primeiras etapas de defesa do organismo, as enzimas de biotransformação de fase I e II. As enzimas de fase I, conhecidas como monooxigenases (um grupo de enzimas composto pelas várias isoformas do citocromo P450, citocromo *b5* e NADPH citocromo P450 redutase), são responsáveis pela metabolização de compostos endógenos e xenobióticos, tornando-os hidrofílicos. Isto facilita sua eliminação da célula através de sistemas de transporte tipo ABC ou pela conjugação através de enzimas de fase II (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Assim, sob condições de estresse, como no caso da exposição a metais, podem ocorrer inúmeras e variáveis modificações nos sistemas vivos. Muitos metais pesados podem causar expressivo efeito no nível celular e são, portanto, denominados elementos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos. A tabela 1.1, apresenta o processo de formação de espécies reativas de oxigênio em resposta a exposição a metais pesados (GETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Tabela.1.1 Redução do oxigênio a espécies reativas

$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$	radical superóxido
$O_2^{\cdot-} + H_2O \longrightarrow H_2O_2 + OH$	radical hidroperóxido
$H_2O_2 + e^- + H \longrightarrow H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- \longrightarrow \cdot OH + OH^-$	radical hidroxila

Fonte: KOURY, 2003

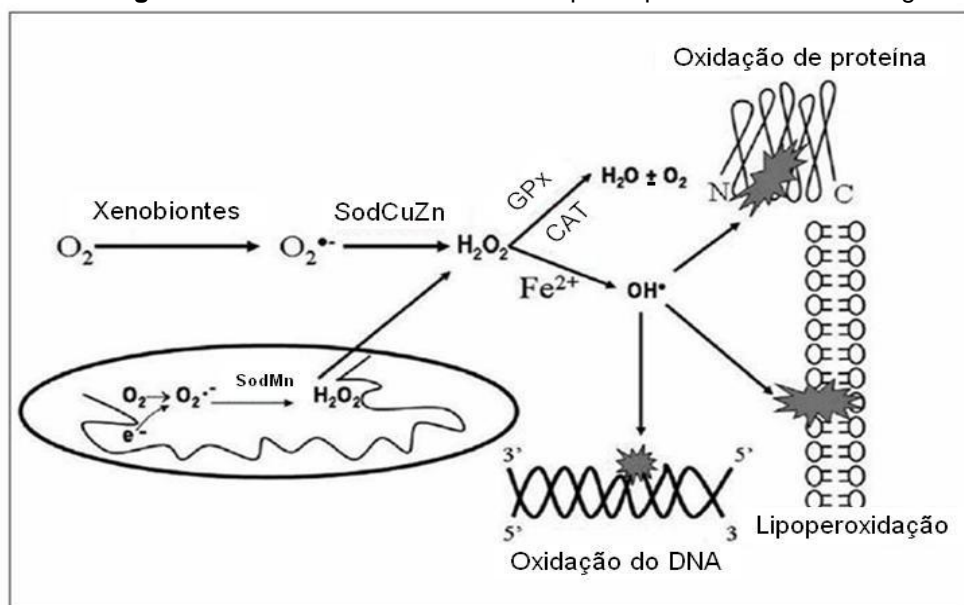
As espécies reativas de oxigênio são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. Tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons. Nessas reações são formados intermediários reativos (Tabela 1), como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), sendo este último o mais reativo das espécies (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

O desequilíbrio entre a liberação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidante leva ao estresse oxidativo. A elevada liberação das espécies reativas de oxigênio está associada com o aparecimento de várias doenças como isquemia, inflamação, trauma, doenças degenerativas e morte celular por ruptura da membrana (lipoperoxidação) e inativação enzimática (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA ; VALKO, 2011).

As espécies reativas de oxigênio podem reagir com determinadas estruturas celulares danificando as células, e induzir a morte celular programada conhecida como apoptose. A dosagem de efeitos genotóxicos e citotóxicos é uma importante ferramenta na avaliação do comprometimento das estruturas celulares (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática, e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação. A figura 1. 2 representa o mecanismo de ataque de EROs, partindo da redução monoelétrica do O<sub>2</sub> e os sistemas de defesa antioxidante (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

**Figura 1.2** Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio.



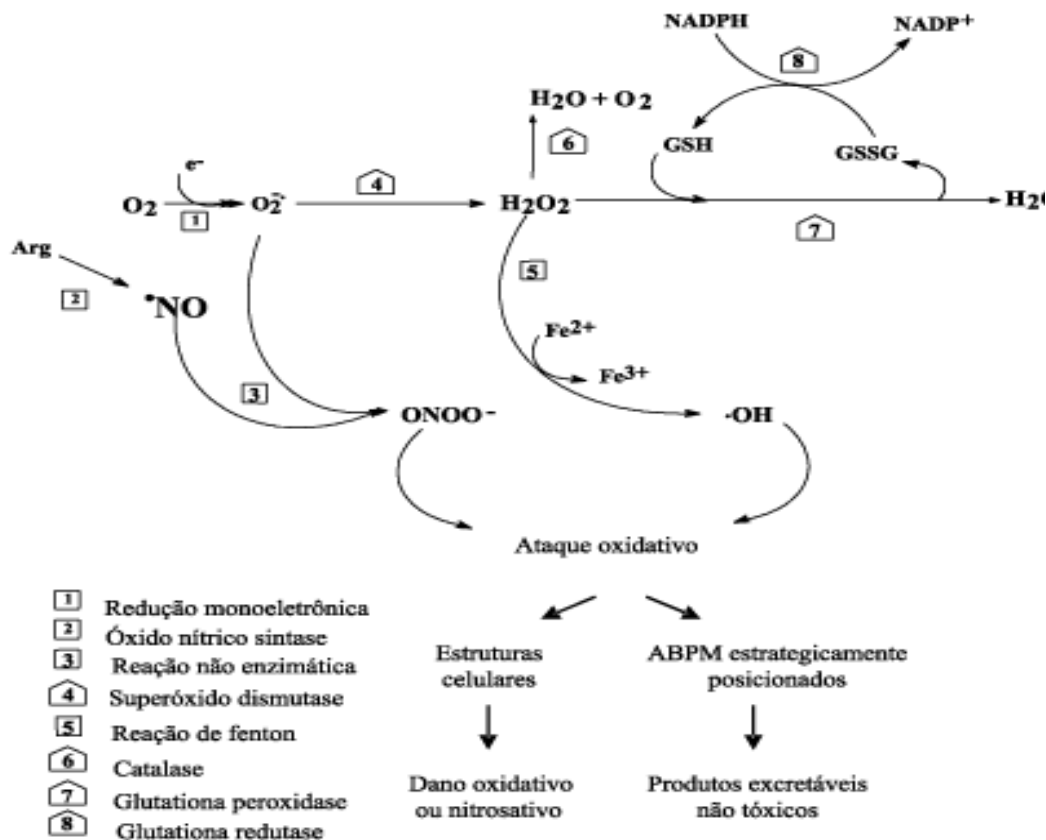
Fonte: RAMAKRISHNAN, RAJESH; SULOCHANA, 2007.

Dessa forma, todo sistema vivo dispõe de diversos mecanismos de defesa antioxidante para prevenir ou reduzir os efeitos causados pelo estresse oxidativo, O sistema de defesa antioxidante pode atuar de três formas: como antioxidantes de prevenção, que impedem a formação de radicais livres; como varredores, impedindo o ataque de radicais livres às células; e de reparo, favorecendo a remoção de danos da molécula de DNA e a

reconstituição das membranas celulares danificadas (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

Assim, com o objetivo de minimizar os efeitos danosos das EROs, os organismos, ao longo de sua evolução, desenvolveram sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Figura 1. 3).

Figura 1.3 Mecanismo de ataque de EROs e os sistemas de defesa antioxidante. O símbolo □ refere-se aos mecanismos de produção de EROs e o símbolo △, às principais enzimas de defesas antioxidante



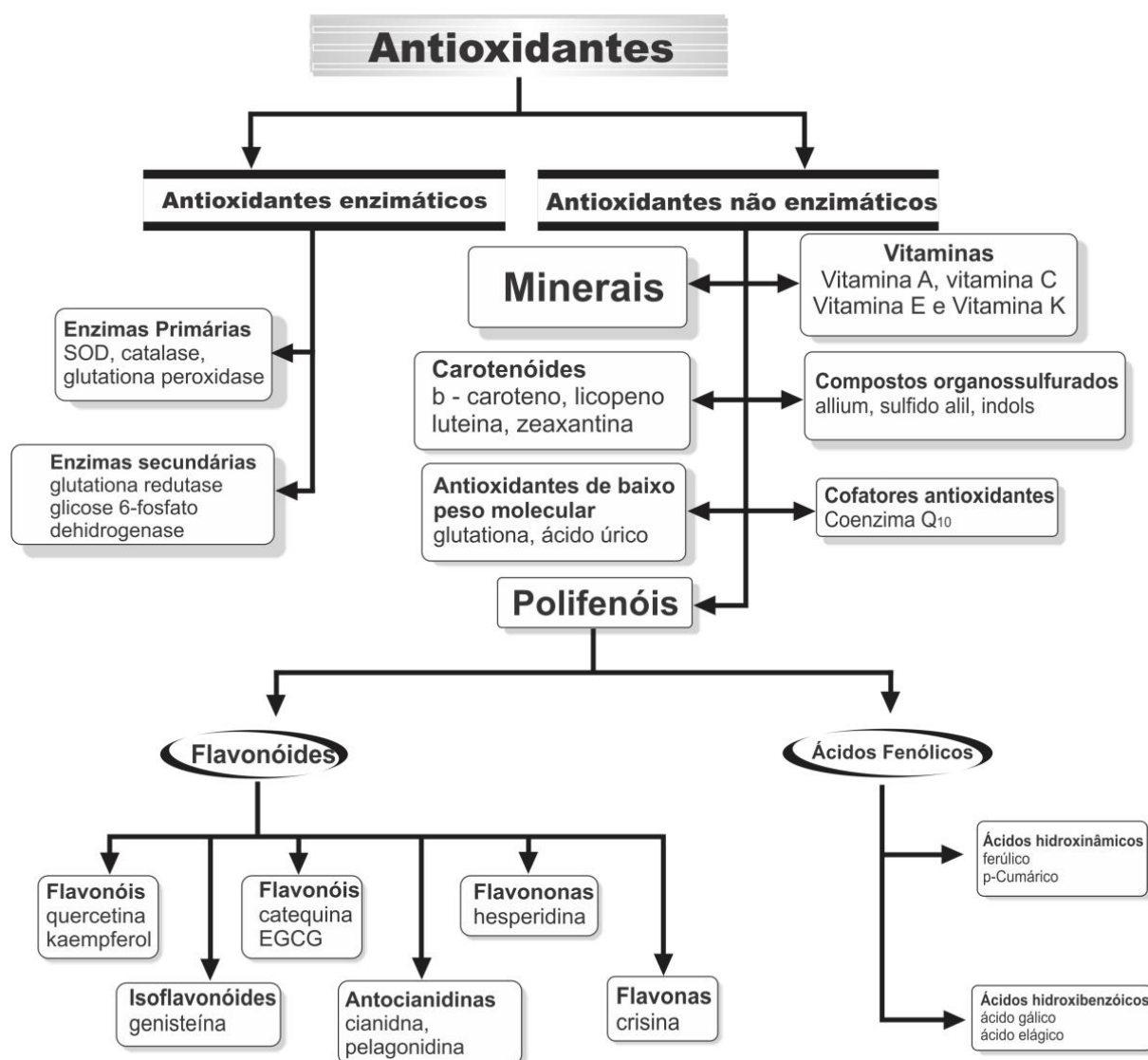
Fonte: GANDRA, et. al. 2004

No primeiro grupo estão enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a Glutationa peroxidase (GPx), as quais protegem diretamente contra o radical  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$ , neutralizando-os ou convertendo-os em espécies menos reativas. Entre as defesas não-enzimáticas estão as vitaminas C, E, beta caroteno, a glutathiona, o ácido úrico, o ubiquinol, a melatonina e os polifenóis (GAETKE; CHOW, 2003; VALKO, 2005; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

De modo geral, tais estratégias de defesa incluem diferentes níveis de proteção, que podem ser resumidos em três formas principais de atuação: evitar a formação de ERO, a

neutralização destas espécies reativas e a reparação de danos ocasionados por elas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A figura 1.4 apresenta a classificação dos sistemas antioxidantes (RATNAM et al, 2006).

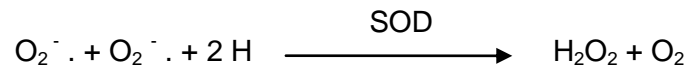
Figura 1.4 Classificação dos antioxidantes



Fonte: RATNAM et al, 2006

As defesas antioxidantes enzimáticas são fundamentais, uma vez que podem atuar diretamente contra as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou, ainda, reparar os danos causados ao organismo por essas espécies. Entre as principais estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), dismutando-o a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e protegendo a célula em até 97% dos alvos do ataque do ânion superóxido. como mostra a reação:



Em eucariotos são encontradas duas principais isoformas, no citosol a forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo), enquanto que na mitocôndria a forma SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

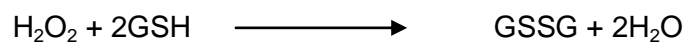
Para a eliminação de peróxidos produzidos, existem duas enzimas principais, A catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase GPx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A catalase (CAT) converte o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), conforme a reação descrita abaixo: .



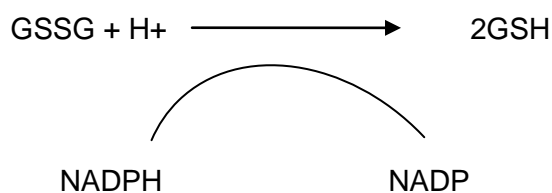
A glutathiona peroxidase (GPx) está relacionada à função antioxidante da Glutathiona reduzida (GSH) com atividade peroxidásica contra peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Processos oxidativos celulares e a atividade GPx geram o dissulfeto da glutathiona ou glutathiona oxidada (GSSG), como mostra a reação abaixo:



Como visto a enzima catalisa a oxidação de glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG), usando o peróxido de hidrogênio.

Para a manutenção do ambiente redutor intracelular a razão entre glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis muito altos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathiona redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular. O exemplo da reação e mostrado abaixo:



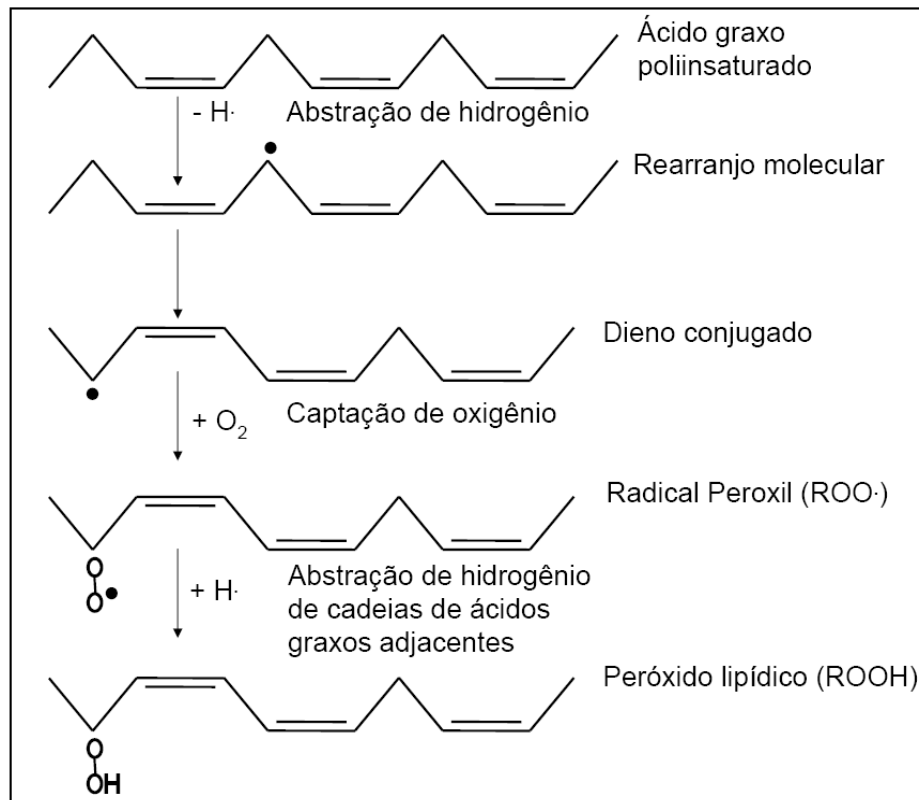
A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) não deixa de estar envolvida com as defesas antioxidantes, pois fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG. Quando o fornecimento de NADPH fica prejudicado, a função antioxidante da glutatona também fica afetada, pois a GSSG não pode ser regenerada, causando sérios danos ao metabolismo celular. Assim, a G6PDH também pode ser considerada uma enzima antioxidante co-adjuvante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A glutatona-S-transferase (GST) é responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos a GSH, reduzindo sua toxicidade, além de torná-los mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, metabolizados pela via do ácido mercaptúrico. A GST e o citocromo P450, por serem enzimas sensíveis a compostos exógenos, têm sido largamente utilizados como biomarcadores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O ataque a cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (com dois ou mais carbonos de sua cadeia com ligação dupla) pode ocorrer através de processos de peroxidação, que é uma reação em cadeia envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $-CH_2-$ ) através do ataque de uma molécula reativa, como ERO, metais, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil (ROO.). A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metileno de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo ROO. . Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (Figura 1.5) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

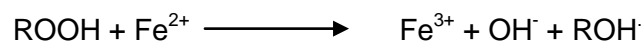
A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico (TREVISAN, 2008).

Figura 1.5 Lipoperoxidação ou peroxidação de lipídeos – LPO.



Fonte: MOSIALOU, 1993

Este peróxido é geralmente estável sob temperatura fisiológica, mas na presença de íons metálicos, pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia, quebrando a ligação O-O, formando um radical alcóxil (ROH·) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



Estes radicais alcóxilas também podem abstrair átomos de hidrogênio, tanto de outros peróxidos como de grupos metílicos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). Acredita-se que níveis elevados desses compostos atuem em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais, inibindo a ação de chaperonas e algumas isoformas de citocromos P450, síntese de DNA e de proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Resumindo, verifica-se que os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio a biomoléculas é contrabalanceado com as defesas antioxidantes, de sorte a manter o metabolismo e as atividades celulares normais. As conseqüências do estresse oxidativo são variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade (Figura 6). Segundo Halliwell; Gutteridge (2007), os principais efeitos são:

1. Proliferação celular: algumas células podem responder ao estresse oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular;
2. Adaptação: aumento das defesas celulares, como catalase, superóxido dismutase e glutathione, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida;
3. Dano celular: pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, etc. Em casos de dano menor, a célula pode sobreviver com algum dano oxidativo persistente e irreparável, ou ainda promover o seu reparo;
4. Senescência: sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido.
5. Morte celular: após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular. Além disso, danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.

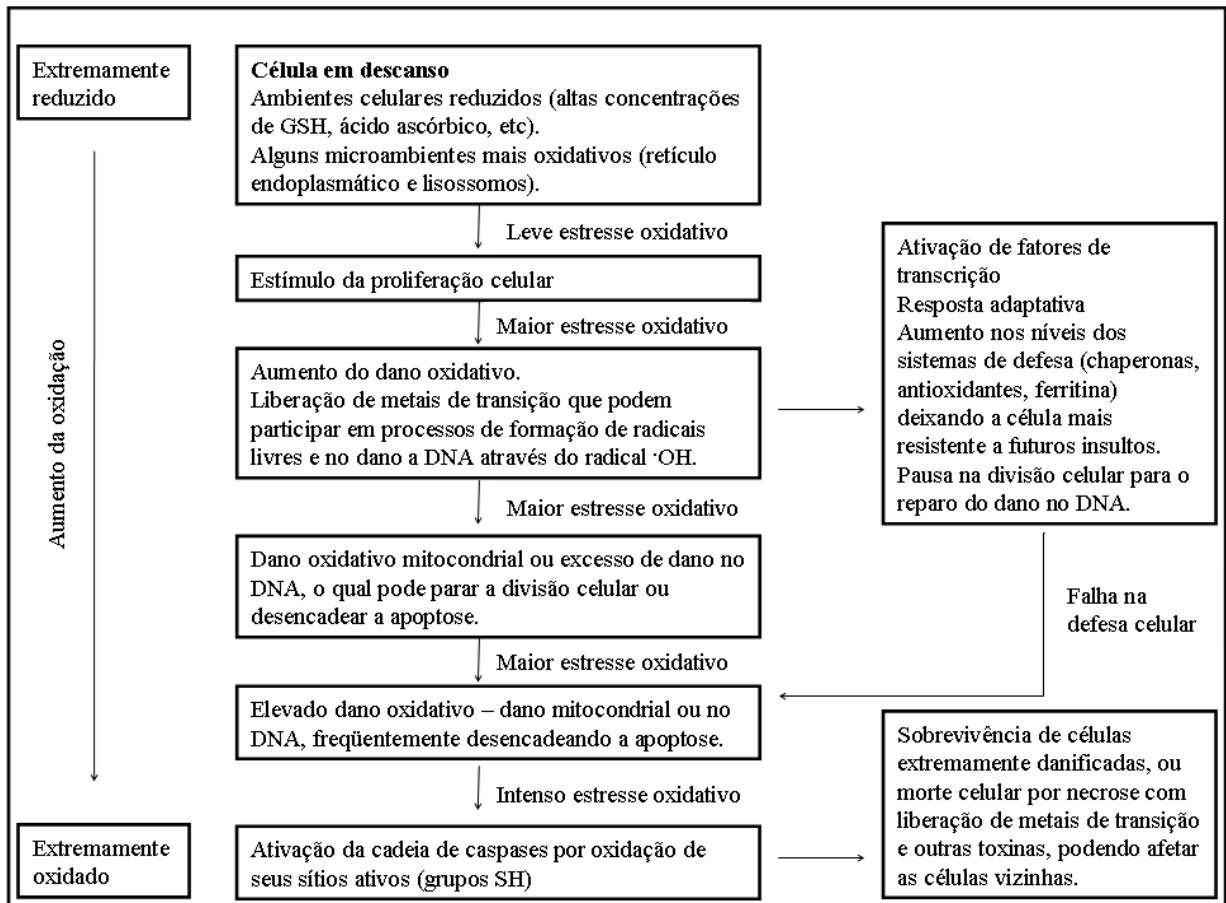
A figura 1.6 apresenta os diferentes graus de estresse oxidativo e as respostas celulares.

Mesmo sendo um micronutriente essencial, e componente de várias enzimas, principalmente as que atuam no fluxo de elétrons, catalisando reações redox, o cobre, ao nível celular, pode interferir de várias vias metabólicas e, assim, induzir respostas celulares diferentes. A toxicidade do cobre também pode causar estresse oxidativo, por catalisar a formação de espécies altamente reativas de oxigênio, como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^\bullet$  radical através da reação de Haber–Weiss, gerando a peroxidação de lipídios de membrana e alterações de DNA (GAETKE; CHOW, 2003).

Cobre também vincula moléculas contendo tiol como glutathione (GSH) ou metalotioneínas (MT), onde é sequestrado. Direta interação do cobre com proteínas pode ser uma fonte de inibição enzimática, como no caso da atividade de monooxigenases associadas à citocromo P450 (GAETKE; CHOW, 2003).



Figura 1.6 Respostas celulares a diferentes graus de estresse oxidativo.



Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007

Além disso, metais pesados, como o cobre, podem aumentar ou diminuir a atividade de enzimas como catalase, superóxido dismutase, glutathion peroxidase, glutathion redutase, o que pode causar um estado pró-oxidante e conseqüentemente estresse oxidativo (GAETK; CHOW, 2003; VALKO, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; JOMOVA, 2010; JOMOVA; VALKO, 2011).

### 1.3.1.5 Polifosfatos

Polifosfato Inorgânico (poli P) é um polímero linear de dezenas ou centenas de ortofosfato (Peu) resíduos ligados entre si por ligações de alta energia - fosfoanídricas. Especula-se seu papel na origem das espécies como uma fonte de energia do mundo anterior a adenosina monofosfato (ATP) (CALDWELL, et al., 2007; HASAN, 2007; RAO, 2009).

O polímero é encontrado em cada célula que tem sido estudado na natureza até então; bactérias, arqueas, fungos, protozoários, plantas e animais. É estável em uma ampla

faixa de temperaturas, pH. Atua como uma fonte de ATP para ~ 500 reações (CALDWELL, et al., 2007; SEUFFERHEAL et al., 2008; RAO, 2009). Por exemplo, poli P está envolvido no metabolismo e síntese de proteínas, nucleosídeos e açúcares fosforilados, e também serve como meio de ativar os precursores de ácidos graxos, fosfolipídios, polipeptídeos e ácidos nucleicos. Poli P foi primeiramente relatado em levedura e mais tarde em bactérias como grânulos metacromáticos, também chamados como grânulos de volutina (CALDWELL et al., 2007; SEUFFERHEAL et al., 2008; RAO, 2009).

Paralelamente, o Poli P está envolvida em numerosas e variadas funções biológicas, dependendo de sua localização e concentração. Em humanos, foram encontrados grânulos semelhantes a acidocalcisomes chamados grânulos densos de plaquetas (SMITH et al., 2006; HERNANDEZ-RUIZ et al., 2006). Em *Neurospora crassa*, poli P ocorre com aminoácidos básicos na proporção de 1:1 (CRAMER; DAVIS, 1984). Em *Saccharomyces cerevisiae*, poli P é amplamente distribuído em cada compartimento, incluindo o citosol, mitocôndria, vacúolos e núcleos. Quase, 80-90% do poli total P em *S. cerevisiae* é encontrado no citosol, enquanto 15% ocorre nos vacúolos. Fração mitocondrial de *S. cerevisiae* contido poli de cadeia curta (DOCAMPO et al., 2005; KULAKOVSKAYA et al., 2010).

Diferentes concentrações de polifosfato são demonstradas em diferentes espécies. Estes níveis são elevados durante a condição de estresse (KORNBERG et al., 1999; manganelli, 2007; RAO et al., 2009). Unicelulares eucariontes como *S. cerevisiae*, a concentração total de poli celular pode ir até 20% de seu peso seco total. Nos eucariontes multicelulares, poli P encontra-se em diferentes níveis, dependendo do tipo de tecido. Em todos os eucariontes superiores testados, estando presente em tecidos como o rim, fígado, pulmões, cérebro e coração e compartimentos subcellular como mitocôndrias (KORNBERG, 1995; KUMBLE; KORNBERG, 1995; KHEYHANI et al., 1996).

Poli P desempenha várias funções no crescimento celular e de sobrevivência, incluindo a manutenção da estrutura celular e metabolismo básico. O polímero é importante para a produção de ATP, replicação do DNA crescimento, motilidade, formação de biofilmes, quorum sensing, sinalização bacteriana, resistência aos antibióticos, sobrevivência na fase estacionária, resistência a estresse oxidativo, choque osmótico, calor, dessecação, aptidão competitiva, invasão e colonização intracelular (RASHID e KORNBERG, 2000; RASHID et al., 2000; TSUTSUMIO et al., 2000; SHI et al., 2004; ZHANG et al., 2005; AMADO; KUSMINOV, 2009; KEASLING, et al., 2000; LI et al., 2007; MCINERNEY et al., 2006; NOMURA et al., 2006; YANG et al., 2010).

Vários estudos anteriores mostraram que poli P desempenha um papel essencial na tolerância ao estresse em bactérias. Com a entrada em resposta ao estresse, os níveis de poli P aumentam inicialmente e diminuem lentamente ao nível basal. Aumento de níveis de

poli P em resposta a variedade de condições de estresse, tais como carbono, nitrogênio, fosfato e limitações do amino-ácido, pH, estresse osmótico, mudança de temperatura e estresse oxidativo (AULTO-RICHE *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2007; SEUFFERHELD *et al.*, 2008).

Outros estudos demonstram que alguns sistemas vivos ativam proteínas de reparo do DNA via polifosfato na mediação de resistência às espécies reativas. Polímeros extracelulares são também ativados para formação de biofilmes em presença de elevados níveis de metais pesados (MULLER *et al.*, 2007; FRALEY *et al.*, 2007).

Um equilíbrio dinâmico entre a síntese de poli P e sua degradação é fundamental para o funcionamento normal da célula (KORNBERG *et al.*, 1999; McGRATH *et al.*, 2005).

Poli P desempenha um papel importante na desintoxicação de cátions metálicos em muitas espécies. Este aspecto tem sido explorado em remediação de metais pesados como o mercúrio e arsênico (MULLER *et al.*, 2007).

Alguns estudos indicam a utilização da habilidade de produção de polifosfato como forma de ferramenta para problemas ambientais e biotecnológicos. Por exemplo, na remoção de fósforo e para aumento de tolerância e resistência a metais pesados. . A presença de metais como o cobre pode induzir acumulação de polifosfato existindo evidência de uma correlação entre a tolerância aos metais pesados e a acumulação de polifosfato. Isso, porque a superfície associada do polifosfato pode ser importante na quelação de cátions sobre a superfície da celular (KEASLING e HUPF, 1996; KEASLING, 1997; MACMAHON *et al.*, 2002; NISHIKAWA *et al.*, 2003; SEVIOR *et al.*, 2003; REMONSELLEZ *et al.*, 2006; CALDWELL, *et al.*, 2007; HASAN, 2007; SEUFFERHEAL *et al.*, 2008; RAO, 2009).

Diversos estudos realizados sobre o acúmulo de polifosfato em resposta a presença de metais pela célula indicam um papel relação ao aumento da resistência da célula em condições ambientais desfavorável podendo este desempenhar a função de regulação bioquímica em diferentes processos tendo sido relacionado sua função na desintoxicação celular (SOUSA *et al.*, 2005; LIMA, *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2011).

Avaliação dos comportamentos fisiológicos do metabolismo de micro-organismo cultivadas na presença de cobre e outros metais tem demonstrado um aumento dos níveis de polifosfato no perfil de crescimento (ALVAREZ e JEREZ, 2004; REMONSELLEZ *et al.*, 2006).

O comportamento de aculação de polifosfato pelos micro-organismos pode servir de base para o entendimento dos mecanismos que envolvam processos de poluição ambiental. Dessa forma, os distintos processos que resultam no acúmulo de polifosfato pelos micro-organismos que podem ser induzidos por diversos fatores ambientais, podem possibilitar implicações biotecnológicas como a biorremediação.

### 1.3.1.6 Fungos: *Aspergillus niger*

Os fungos compõem um grupo extenso e diversificado, podendo ser encontrados como organismos unicelulares (leveduriformes) ou pluricelulares (filamentosos), sendo a última, a forma mais abundante. Sua habilidade de degradar biomassa lignocelulósica faz com que este grupo seja capaz de se adaptar facilmente a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, permitindo-os ocupar uma série de nichos ecológicos como solos, madeira e outros resíduos de materiais orgânicos. Dentre os fungos saprofitos destacam-se os filos Ascomycota e Basidiomycota (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Os ascomicetos compreendem a maioria dos fungos conhecidos e alguns de seus representantes têm sido utilizados industrialmente com sucesso, como na indústria alimentícia, na indústria têxtil, na indústria farmacêutica e na produção de biocombustíveis como o etanol. Muito desse potencial biotecnológico se deve ao emprego de enzimas secretadas pelos fungos da classe (ALEXOPOULOS et al., 1996; BAKER, 2006; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; GUO ET AL., 2010; SANCHEZ et al., 2012).

O *Aspergillus* foi catalogado em 1729 pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli. Observando o fungo no microscópio, Micheli lembrou-se da forma de um aspergillum (borrifador de água santa), e nomeou a espécie de acordo com o objeto. As espécies de *Aspergillus* são aeróbicas e encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície onde vivem (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

O gênero *Aspergillus* consiste de fungos filamentosos, anamorfos (reprodução assexuada) e de dispersão cosmopolita, podendo ser encontrados principalmente em material vegetal em decomposição. Atualmente são conhecidas aproximadamente 250 espécies, demonstrando a grande diversidade e variabilidade encontradas dentro do gênero (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

É definido morfológicamente pelo formato característico de seu conidióforo, onde se encontram os conidiósporos (esporos), e das células da hifa de onde se ramificam os conidióforos (Figura 7). O tamanho, o arranjo e a cor dos conidiósporos são ainda características para a identificação e divisão interna do gênero em subgrupos, como o caso dos *Aspergillus* com esporos negros que são classificados na seção Nigri (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais estudados. As espécies que compõem este gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com a deterioração de materiais vegetais e alimentos,

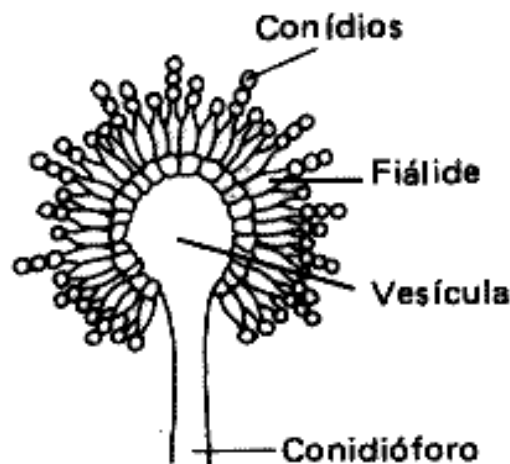
principalmente em regiões de clima tropical e sub-tropical (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

As colônias geralmente têm crescimento rápido e exuberante, inicialmente são brancas, amarelas, passando para marrom ou para o negro. A colônia é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente distribuído sobre a superfície do meio e farta produção de conídeos (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

Na identificação do gênero *Aspergillus* a cor é uma das principais características macroscópica que pode ser diferentes tons esverdeados, marrom, amarelo, branco, cinza e preto. A parte aérea (reprodutiva) com conídios apresentando quatro formas básicas: globular, radiante, colunar ou clavada. Também as dimensões do conidióforo, forma e textura dos esporos têm permitido o agrupamento em seções ou grupos estas espécies (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

Visualmente, os *Aspergillus* às vezes têm a aparência de pequenas arvores sobre o substrato. Os conídios constituem cadeias que se originam na célula conidiógenas ou fiálides e em algumas espécies podem possuir células adjacentes as fiálides que são denominadas Métulas (células de apoio). Figura 1. 7. (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010)

Figura 1.7 Aspecto da morfologia de *Aspergillus*. O conidióforo formando uma vesícula com células adjacente, metulas e fiálides com os conídios.



Fonte: PITT; HOCKING, 1997

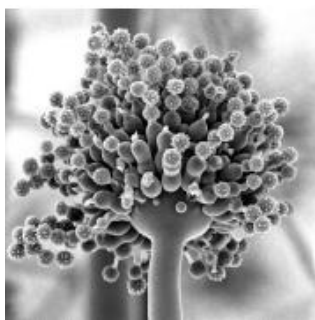
A ornamentação da superfície de ascósporos, observados com microscopia eletrônica de varredura, é um recurso muito confiável para a identificação das espécies desse gênero. Embora, atualmente, os métodos moleculares começaram a ser amplamente utilizado na identificação dos isolados, para fins taxonômicos, e para definir relações

evolutivas entre as espécies de fungos intimamente relacionados, como a comparação de seqüências complementaridade DNA, RNA ribossômico, e nuclear (nDNA) e restrição do DNA mitocondrial (mtDNA) fragmento de comprimento polimorfismo análise (RFLP) (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

Há espécies patogênicas para o homem, para os animais e há aquelas que durante seu metabolismo produzem tóxicos. O gênero *Aspergillus* tem um grande destaque como produtores de enzimas, e metabólitos de interesse industrial e biotecnológico, como na biossíntese química e na transformação de compostos (ALEXOPOULOS et al., 1996; BAKER, 2006; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; GUO et al., 2010; SANCHEZ et al., 2012; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

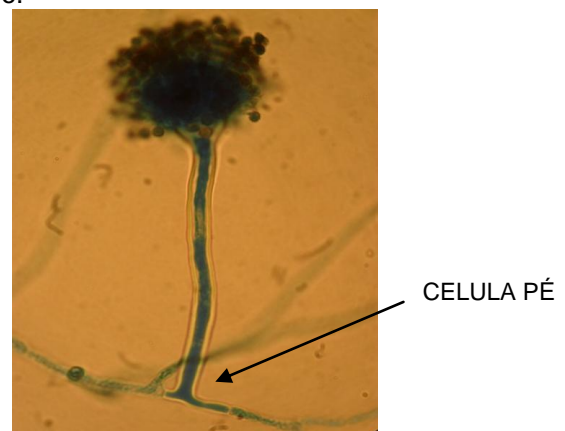
O *Aspergillus niger* é uma das espécies mais comuns do gênero. Também muito conhecido por provocar o chamado mofo-preto em frutas e legumes, sendo um contaminante muito comum em alimentos. A espécie se caracteriza por colônia de 4-5 cm de diâmetro, quando desenvolvida em agár Czapek a 25°C por 7 dias. Consiste de uma base compacta branca ou amarela, com uma densa camada de conidióforos marrom escuro ou preta. A cabeça tem forma radiada, preta, e composta de cadeias de conídeos que tendem a se dividir com a idade. Os conidióforos são formados por estípede liso hialino, também de coloração marrom, vesículas globulares com 50-100 µm de diâmetro, fialides ou métula com 7,0-9,5 µm x 3-4 µm, métulas hialina ou marrom, muitas vezes septada com 15-25 x 4,5-6,0 µm, conídios globular com 3,5-5 µm de diâmetro, marrom, ornamentadas com verrugas, lombadas e cume. ( Figuras 1. 8 e 1. 9). (ALEXOPOULOS et al., 1996; BENNET, 2010; CHAKRABORTHY et al., 2010).

Figura 1.8 *Aspergillus niger*.



Fonte: (Adaptado de Slivinski, 2007).

Figura 1.9 Aspecto da morfologia de *A.niger*, mostrando a célula pé característica peculiar do gênero.



Fonte: Próprio autor

*A. niger* é um fungo filamentosso haplóide, cosmopolita, sendo encontrado em solos, plantas, ar. Exibe ampla potencialidade de sobrevivência, é considerado xerófilo e termotolerante. Destaca-se pelo potencial biotecnológico e aplicabilidade na indústria, onde tem sido utilizado desde 1919 para a produção de ácidos orgânicos, em especial o ácido cítrico, aplicado extensivamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica ( XIE e WEST, 2007; MEIJER et al., 2009; ANDERSEN et al., 2011; ABDULLAH-AL-MAHIN et al., 2012). É considerado um organismo seguro (GRAS - generally recognized as safe) pela FDA (United States Food and Drug Administration GRAS) (BAKER, 2006; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; GUO ET AL., 2010;SANCHEZ et al., 2012).

É uma espécie classificada como segura para o manuseio, a manipulação e o uso na indústria, já que diferentemente de outras espécies classificadas dentro do mesmo gênero, não produz aflatoxinas. Tal fato foi avaliado em seu genoma (PEL *et al*, 2007), onde não foram encontrados genes ortólogos relacionados à biossíntese de aflatoxinas nem outros tipos de micotoxinas. Uma exceção é a presença de um *cluster* envolvido na biossíntese de Ocratoxina A. Entretanto, em análise posterior nenhum desses genes foi expresso em nível detectável, revelando uma realidade apresentada previamente por Schuster e colaboradores (2002), de que apenas aproximadamente 6% das linhagens conhecidas de *A. niger* são capazes de produzir tal toxina.

Desde a década de 60, *A. niger* tem sido reconhecido como importante fonte de secreção de enzimas, as quais têm sido extensivamente estudadas quanto à sua aplicabilidade industrial. Tais estudos também demonstraram que o fungo é também utilizado como hospedeiro para produção de proteínas heterólogas. De fato, uma  $\beta$ -glicosidase secretada por *A.niger* já é utilizada como aditivo a um coquetel enzimático de celulases de *Trichoderma reesei*, de modo a promover a hidrólise de celobiose em glicose, evitando assim a inibição das outras celulases e um maior rendimento na hidrólise de celulose (BAKER, 2006; ANDERSEN et al., 2008; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; GUO et al., 2010;SANCHEZ et al., 2012).

Em 2007 a espécie teve seu genoma seqüenciado por Pel e colaboradores. O estudo revelou um genoma de 33,9 Mb com 14.165 genes codificadores de proteína preditos. A análise das ORFs (*Open Reading Frames*) encontradas detectou 171 glicosidasas codificadas no genoma de *A. niger*, das quais 131 (77%) são possivelmente secretadas.

A espécie é citada como excelente produtora de enzimas com atuação *exocelular*: exo-glicanase, xilosidase, exo-poligalacturonase, exo-rhamnogalacturonase, manosidase e arabino-furanosidase, e enzimas com atuação *endocelular*: ndo-glicanase, xilanase, endo-poligalacturonase, endo-rhamnogalacturonase, mananase e arabinase (BAKER, 2006;

ANDERSEN et al., 2008; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; COUTINHO et al., 2009; GUO ET AL., 2010; SANCHEZ et al., 2012).

O enriquecimento protéico de resíduos têm sido proposto por muitos pesquisadores para o cultivo de micro-organismos com vistas a produção de biomassa como alimento ou como suplemento protéico tem atraído grande interesse. *A. niger* é capaz de crescer em diferentes tipos de subprodutos industriais, produzindo grandes quantidades de células, denominadas proteína unicelular ou proteína microbiana. A biomassa microbiana, considerada como um concentrado protéico natural contém proteínas completas, com todos os aminoácidos essenciais (FRANCO, 2010).

Paralelamente, *A. niger* é conhecido por sua capacidade de utilizar diferentes compostos considerados xenobiontes como substrato, transformando-os em compostos não tóxicos ou de baixa toxicidade, o que ocorre pela produção de enzimas extracelulares, as quais tornam o organopoluente acessível para assimilação (KANALY et al., 2005; BEJAQUI et al., 2006; VOLPE-SEPULVEDA et al., 2006; SINHA et al., 2009).

O fungo exibe metabolismo versátil, o que o capacita a crescer em vários tipos de substratos sob inúmeras condições ambientais; Sua habilidade de eliminar xenobióticos através de reações de oxidação, hidroxilação e demetilação são a base para seu uso potencial na biorremediação (BAKER, 2006; ANDERSEN et al., 2008; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; COUTINHO et al., 2009; GUO ET AL., 2010; SANCHEZ et al., 2012).

A espécie *Aspergillus niger*, em função das condições do meio, é capaz de produzir mais de 19 enzimas diferentes. É reconhecida por ser utilizada na produção de vários metabólitos secundários em nível industrial, tais como, ácido oxálico, ácido glicônico, amilases, lipases, cellulases, xilanases e proteases, lactases, lacases, peroxidases. Tal habilidade de excreção é extremamente explorada pela indústria nas fermentações submersas e em estado sólido (BAKER, 2006; ANDERSEN et al., 2008; ANDERSEN; NIELSEN, 2009; COUTINHO et al., 2009; GUO ET AL., 2010; SANCHEZ et al., 2012).

Nos últimos 20 anos, *A. niger* tem sido usado como um hospedeiro para transformação de enzimas alimentares. Uma das características mais interessantes da espécie é a realização do "Bioleaching", que corresponde a um processo de extração de metais dos minérios (MAGYAROSY et al., 2002; MULLIGAN et al., 2004; XU e TING, 2004; SANTHIYA; TING, 2005, 2006; YANG et al., 2009; AMIRI et al., 2011).

Também diversos autores citam o gênero *Aspergillus* em processo de biorremediação demonstrando uma boa eficiência na remoção de metais pesados em função de sua alta resistência e tolerância a diferentes íons metálicos (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1997, 1998, 1999; AUNG e TING, 2005; CANOVAS et al., 2004; DURSUN, 2006; LIU et al., 2006; MUKHOPADHYAY et al., 2007; AMINI et al., 2008; AMINI et al., 2009; MUDHOO et al., 2012).



### 1.3.1.7 Bioma Caatinga

Os ecossistemas terrestres provêm uma grande variedade de bens e serviços ao bem estar humano e em especial os serviços ambientais hidrológicos, como, por exemplo, o controle de inundação, redução da erosão e mitigação da sedimentação de canais e reservatórios, qualidade da água, estabilização de encostas, recarga da umidade do solo e aquíferos, em grande parte deles sob o controle da vegetação ripária. Além destes, são expressivos os serviços ambientais de conservação da biodiversidade, que se estendem todos de forma geral à segurança hídrica e alimentar regional. Esforços científicos e de conservação já alcançaram reconhecimento global. Além disso, instituições brasileiras deram diagnóstico abrangente sobre seus principais ecossistemas, que oferecem uma oportunidade interessante para apontar as diretivas relacionadas com a biodiversidade e com os esforços de conservação (AB`SABER, 2003; BRASIL, 2007; SANTOS et al., 2011).

O Brasil é um país mega-diverso, tendo seu território recoberto por uma infinidade de ecossistemas: florestas tropicais úmida (Amazônia e região Atlântica), savanas (vegetação do Cerrado), pantanais (Pantanal), pradarias (Campos Sulinos) e um bloco bem delimitado e grande de florestas tropicais sazonalmente secas: a vegetação de Caatinga (BRASIL, 2002, 2003, 2007; ALVES, 2007).

A Caatinga é uma ecorregião semi-árida, única no mundo, exclusivamente brasileira, cobrindo porção significativa do território nacional. O bioma tem sido considerado o mais ameaçado e transformado pela ação humana. Corresponde ao principal ecossistema existente na Região Nordeste, estendendo-se pelo domínio de climas semi-áridos, numa área de 73.683.649 ha, correspondendo a 6,83% do território nacional; ocupa parte dos Estados da BA, CE, PI, PE, RN, PB, SE, AL, MA e MG (BRASIL, 2007; SANTOS et al., 2011).

O clima na região semi-árida apresenta como característica marcante à irregularidade do regime pluviométrico, com duas estações definidas: a estação chuvosa (inverno) que dura de três a cinco meses e a estação seca (verão) que dura de sete a nove meses. As chuvas são torrenciais e irregulares no tempo e no espaço, provocando periodicamente a ocorrência de secas prolongadas (BRASIL, 2007; SANTOS et al., 2011; TRAVASSOS; SOUZA, 2011).

A Caatinga, em função de seus elementos físicos e climáticos, exibe uma biota singular que expressam morfologia, anatomia e mecanismos fisiológicos convenientes para resistir ao ambiente xérico. Apresenta uma grande biodiversidade com espécies de portes e arranjos fitossociológicos variados que o torna bastante complexo, onde pouco se conhece

sobre a sua dinâmica (SILVA et al., 2003; TABARELLI E SILVA, 2003; TRAVASSOS e SOUZA, 2011).

O bioma caatinga foi reconhecido como Reserva da Biosfera no ano de 2001 pela Unesco. Abriga sete parques nacionais, uma reserva biológica, quatro estações ecológicas, três florestas nacionais, cinco áreas de proteção ambiental, três parques estaduais, um parque botânico, um parque ecológico estadual e doze terras indígenas. A reserva biológica tem 190.000 km<sup>2</sup> e se estende pelos nove estados do Nordeste, além do Norte de Minas. A principal finalidade é proteger a biodiversidade, combater a desertificação, promover atividades sustentáveis e realizar estudos sobre o bioma (BRASIL, 2007).

De acordo com o IBGE, 27 milhões de pessoas vivem atualmente no polígono das secas. A extração de madeira, a monocultura da cana-de-açúcar e a pecuária nas grandes propriedades (latifúndios) deram origem à exploração econômica. Na região da Caatinga, ainda é praticada a agricultura de sequeiro. A degradação acelerada que a Caatinga vem sofrendo, principalmente em decorrência da atividade antrópica, gerou a necessidade de se desenvolver programas de conservação e recuperação ambiental. Uma das formas encontradas para preservar a vegetação de caatinga, foi a criação de Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN) (ACCIOLY, 2000; SOUZA, 2008; ALVES, 2009; SOUZA et al., 2009).

Diversos estudos comprovam que a manutenção dos ecossistemas depende da ciclagem de nutrientes, processo de transferência que influencia diretamente a produtividade primária do sistema. Assim, o entendimento dos processos que ocorrem nos solos é um elo fundamental na busca de informações para o estabelecimento de práticas de manejo apropriado para recuperação de áreas degradadas e manutenção da produtividade do sítio degradado em recuperação. Com a intensa devastação da Caatinga, a produtividade dos solos sofreu uma redução drástica, favorecendo a exposição direta do solo, deixando-os com baixos níveis de fertilidade (CNRBC, 2004; BARBOSA, 2005; SAMPAIO et al., 2005; AGUIAR, 2006; PRUSKI, 2006; SANTOS et al., 2006; CAVALCANTI e BRITO, 2012).

O solo é considerado um crítico componente da biosfera, funcionando não somente como base para a produção de alimentos e fibra, mas também na manutenção da qualidade do ambiente local, regional e global. Além dos graves problemas ambientais ligados à atividade humana como mudanças climáticas globais, depleção da camada de ozônio e sérias destruições da biodiversidade, a degradação e perda de terras produtivas são consideradas sérios problemas ecológicos (LAL, 1998). Pesquisas sobre a capacidade produtiva do solo indicaram que a degradação induzida pelo homem está em torno de 40% das terras agricultáveis mundiais (OLDEMAN, 1994). A degradação da qualidade do solo pelo cultivo é manifestada por processos erosivos, redução de matéria orgânica, perda de

nutrientes, compactação do solo, redução de populações microbianas, de atividades enzimáticas e pH (LEPRUN, 1988; SAMPAIO et al., 1995; SPOSITO e ZABEL, 2002).

Ainda, solos que recebem resíduos industriais são normalmente contaminados por metais pesados, comprometendo a qualidade dos mesmos. A conservação da qualidade do solo é particularmente importante nestes ecossistemas marginais, frágeis e ecologicamente sensíveis, pois a degradação pode ser irreversível, principalmente quando a pressão humana for excessiva (NOGUEIRA et al., 2006; BRASIL, 2007; MESSIAS et al., 2008). Assim, a manutenção e a produtividade de ecossistemas e de muitos agrossistemas dependem, em grande parte, do processo de decomposição da matéria orgânica no solo, e da conseqüente mineralização dos nutrientes.

Muitos atributos biológicos do solo como biomassa microbiana, atividade heterotrófica de microrganismos do solo e atividade de enzimas relacionadas a ciclos biogeoquímicos de nutrientes têm sido utilizados eficientemente como indicadores bioquímicos da qualidade do solo em áreas degradadas, solos sob impacto de metais pesados, solos que recebem xenobióticos diversos ou aqueles submetidos a diferentes sistemas de uso (ATLAS, 1984; MELLONI, 2007; AMORIM, 2009).

O trabalho de decomposição pela microbiota, reúne processos de despolimerização e reações oxidativas, através dos quais moléculas relativamente grandes, tais como as poli-aromáticas, carboidratos, lipídios e proteínas, provenientes tanto de dentro das células quanto as livres no ambiente do solo, são convertidas em moléculas menores, mais simples, como os ácidos carboxílicos, aminoácidos e CO<sub>2</sub> (SIQUEIRA et al., 1994; zilli ET AL., 2003; SILVEIRA et al., 2006; MELLONI, 2007).

A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto desconhecida. Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies. No entanto, até o presente momento, só foram descobertas e nomeadas, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas, dependendo do habitat estudado (MELLONI, 2007).

A microbiota do solo participa da formação da estrutura do solo, controla a disponibilidade de nutrientes às plantas pela mediação nos ciclos biogeoquímicos dos elementos, incluindo a fixação biológica do N<sub>2</sub> e a ciclagem de P, e melhora as limitações químicas como pH ou níveis tóxicos de agrotóxicos e metais pesados, proporcionando maior desenvolvimento da comunidade vegetal nestes ambientes (SIQUEIRA et al., 1994; Zilli ET AL., 2003; SILVEIRA et al., 2006; MELLONI, 2007).

Os micro-organismos apresentam grande potencial de utilização em estudos de qualidade do solo (HOFMAN et al., 2003) por apresentar as seguintes características: a) alta sensibilidade a perturbações antropogênicas; b) correlações com diversas funções benéficas do solo, incluindo armazenamento e disponibilidade de água, decomposição de

resíduos orgânicos, transformação e ciclagem de nutrientes, biorremediação, controle de fitopatógenos e outros; c) papel direto em muitos processos do ecossistema, incluindo conversão de nutrientes em formas disponíveis às plantas, supressão de organismos nocivos, formação da estrutura do solo e papel indireto em processos como infiltração de água; e d) facilidade de avaliação e baixo custo. Os índices de diversidade microbiana têm sido utilizados para descrever o estado das comunidades microbianas e o efeito das perturbações naturais ou antropogênicas.

Dentre os micro-organismos, os fungos apresentam grande diversidade e são amplamente difundidos em diferentes ambientes. Possuem grande importância na decomposição de material vegetal de origem terrestre que cai na água, influenciando de maneira decisiva no transporte de materiais entre o meio terrestre e o meio aquático. As regiões tropicais abrigam uma grande variedade de espécies de fungos, porém, os trabalhos publicados referentes a essa região são escassos. Dada a importância econômica e ecológica do grupo, estudos de biodiversidade acoplados aos estudos ecológicos são prioritários para o país (ZAK, 1993; ZAK, 1994; ZAK et al., 2003; KLAMER, 2004; CROWTHER; A'BEAR, 2012).

A diversidade fúngica em ecossistemas áridos e semiáridos pode ser igual ou superior quando comparada à de ambientes úmidos. Isso se deve ao baixo potencial hídrico do solo, inapropriado ao crescimento de bactérias, o que torna a cadeia alimentar em sistemas áridos baseada primariamente nos fungos (MELLONI et al., 2000, 2003; BARBOSA et al., 2005, 2007; CRUZ e GUSMÃO, 2009; CROWTHER; A'BEAR, 2012).

As influências antropogênicas podem alterar a diversidade e funcionabilidade dos microrganismos que são altamente sensíveis a distúrbios, afetando a estabilidade e a resiliência do solo. Logo, em decorrência do uso do solo pelas comunidades rurais, insumos agrícolas como pesticidas, calcários, fertilizantes minerais e orgânicos aparecem como as principais fontes de entrada de metais no solo. Os fertilizantes nitrogenados podem possuir até 1.450 mg de Pb por kg, e o calcário teores acima de 1% de Cu e Pb. Os pesticidas, por sua vez, contribuem com a entrada de As, Cu, Zn e Hg (SOARES et al., 2002; PRADO, 2003; NASCIMENTO; FONTES, 2004; NASCIMENTO; MELLONI, 2005; PRUVOT et al., 2006; PERIS et al., 2008; BIONDI, 2010; BIONDI et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Além das inúmeras justificativas para a conservação da Caatinga, baseadas na preservação da diversidade genética e na importância para outros recursos naturais como solo, água e fauna, o valor extrativista deste ecossistema é particularmente crucial em regiões onde atividades agrícolas são comuns como as queimadas constantes, uso do solo e extração de madeira para diferentes finalidades (SAMPAIO; MENEZES, 2002; SAMPAIO et al., 2009).

Portanto, a preocupação com a conservação e preservação dos recursos naturais será condição indispensável para se prever o uso regular da terra pelos seus proprietários, bem como descobrir e desenvolver métodos não destrutivos de usos dos recursos florestais que sejam aplicáveis à região. Desta forma torna-se evidente e urgente que o conhecimento da flora, fauna, microbiota, solo e clima são fundamentais para o desenvolvimento de quaisquer estratégias de ações, evidenciando o valor da biodiversidade, e que venha a contribuir para um melhor planejamento de manejo, usos e enriquecimento da caatinga.

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AB'SÁBER, A. **Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas**. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003. 159p.

ABDULLAH-AL-MAHIN , A.B.M. SHARIFUZZAMAN, M.O. FARUK, M.A. KADER, J. ALAM, R. BEGUM AND HARUN-OR-RASHID ., Improved Citric Acid Production by Radiation Mutant *Aspergillus niger* Using Sugarcane Bagasse Extract. **Biotechnology**, v. 11, p. 44-49, 2012.

ABOIM, M. C. R.; BARBOSA, J. C.; COUTINHO, H. L. C.; ROSADO, A. S. Avaliação de diversidade microbiana em amostras de solos: técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial) / Marcela Cristina Rosas Aboim . - Rio de Janeiro : **Embrapa Solos**, Documentos, v. 68, p.31, 2004.

ACCIOLY, L.J. de O. Degradação do solo e desertificação no Nordeste do Brasil. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas**, v. 25, (1), p.23-25, 2000.

ADRIANO DC, BOLAN NS, VANGRONSVELD, WENZEL WW. Heavy metals. **Enc Soils Environ**, p.175-182, 2004.

ADRIANO DC, WENZEL WW, VANGRONSVELD J, BOLAN NS. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. **Geoderma**. v. 122, p. 121-142, 2004

ADRIO, J. L., DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **Int Microbiol**. v. 6, p.191–199, 2003.

AGUIAR, MARIA IVANILDA DE, ET AL. Perdas de solo, água e nutrientes em sistemas agroflorestais no município de Sobral, CE. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n.3, p. 270-278, 2008.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons publishers, 1996, 233 p.

ALLOWAY, B. J The origin of heavy metals in soils. In: Alloway, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley & Sons, p.29-39, 1990..

ALVAREZ, S., AND C. A. JEREZ.. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. **Environ. Microbiol**. v. 70, p.5177-5182, 2004.

ALVES, J. J. A. Geoecologia da Caatinga no semi-árido do Nordeste Brasileiro. **Revista de Climatologia e Estudos de Paisagem**. Rio Claro, v.2, (1), p.58, 2007.

- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: Uma investigação Ecogeográfica. **Revista Caatinga**. Mossoró, v.22, (3), p.126-135, 2009.
- AMADO, L., AND KUZMINOV, A. Polyphosphate accumulation in *Escherichia coli* in response to defects in DNA metabolism. **J. Bacteriol.** v.191, p.7410-6, 2009.
- AMINI, M., YOUNESI, H., BAHRAMIFAR, N., LORESTANI, A. A. Z., GHORBANI, F., DANESHI, A., & SHARIFZADEH, M. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. **Journal of hazardous materials**, v. 154(1), p.694-702, 2008.
- AMINI, M., YOUNESI, M., BAHRAMIFAR, N. Statistical modeling and optimization of the cadmium biosorption process in an aqueous solution using *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. v. 337, p.67–73, 2009.
- AMIRI, F., YAGHMAEI, S., MOUSAVI, S. M., SHEIBANI, S. Recovery of metals from spent refinery hydrocracking catalyst using adapted *Aspergillus niger*. **Hydrometallurgy**. v. 109, p.65–71, 2011.
- AMORIM, LB., 2009. **Caracterização da serrapilheira em caatinga preservada e mudanças no carbono do solo após o desmatamento sem queima**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 62 p. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, 2009.
- ANDERSEN MR, NIELSEN ML, NIELSEN J. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. **Mol Syst Biol**. v. 4 (178), 2008.
- ANDERSEN MR, SALAZAR MP, SCHAAP PJ, ET AL., Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome Res**. v .21(6), p.885-889, 2011.
- ANDERSEN, MIKAEL RØRDAM, AND JENS NIELSEN. Current status of systems biology in Aspergilli. **Fungal Genetics and Biology** v. 46.(1), p.180-190, 2009.
- ATKINS, P. W., LORETTA J. **Princípios de Química: questionando a vida moderna eo meio ambiente**. Bookman, 2001.
- ATLAS, R.M. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stresses. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. Current perspectives in microbial ecology. Washington: **American Society for Microbiology**, p. 540-545, 1984.
- ATSDR, **Toxicological Profile for Cadmium** (Draft for Public Comment). US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 2008.

- AUGUSTYNIAK, AGNIESZKA, and ELŻBIETA SKRZYDLEWSKA. "The influence of L-carnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats." **Metabolic brain disease**, v.25, (4), p. 381-389, 2010.
- AULT-RICHE´ , D., Fraley, C. D., Tzeng, C.-M. & Kornberg, A. A novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v.180, p.1841–1847, 1998.
- AUNG, K.M.; TING, Y.P., Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. **J. Biotechnol.** v.116, p.159–170, 2005.
- BÅÅTH, ERLAND, MONTSERRAT DÍAZ-RAVIÑA, ÅSA FROSTEGÅRD, and COLIN D. CAMPBELL. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and environmental Microbiology* v. 64, (1), p. 238-245, 1998.
- BABICH, H., G. STOTZKY, e H. L. EHRLICH. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. **Critical reviews in microbiology**, v.8 (2), p.99-145, 1980.
- BAKER SE. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. **Med Mycol.** v. 44 (1), 17-20, 2006.
- BAKER, D.E.,. Copper: soil, water, plant relationships. **Fed. Proc.** 33, 1188-1193, 1974.
- BARBOSA, F.R.; GUSMÃO, L.F.P.; CASTAÑEDA-RUIZ, R.F.; MARQUES, M.F.O. & MAIA, L.C. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. New species *Deightoniella rugosa* & *Diplocladiella cornitumida* with new records for the neotropics. **Mycotaxon** v. 102, 39-49, 2007.
- BARBOSA, M. R. V.; CASTRO, R.; ARAÚJO, F. S. de.; RODAL, M. J. N. Estratégias para a conservação da biodiversidade de prioridades para a pesquisa científica no bioma Caatinga. In: ARAÚJO, F.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V. (Orgs.) **Análise das variações da biodiversidade do bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação.** Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2005.
- BEJAOUI H, MATHIEU F, TAILLANDIER P, LEBRIHI A. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. **FEMS Microbiol Lett.** v. 255:203–208, 2006.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors); *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics. Linton, UK: **Caister Academic Press**, 2010. p. 1-16.



BIONDI, C.M. **Teores naturais de metais pesados nos solos de referência do estado de Pernambuco. Recife**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010. 58p.

BIONDI, C.M.; NASCIMENTO, C.W.A.; FABRÍCIO NETA, A.B. & RIBEIRO, M.R. Teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co em solos de referência de Pernambuco. **R. Bras. Ci, Solo**, v. 35, (1), 057-066, 2011.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição da biodiversidade brasileira: Atualização – Portaria MMA Nº 09, de 23 de janeiro de 2007. MMA**, 328 p., 2007.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga**. Brasília, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2002.

BRASIL. Resolução CONAMA n. 357/2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Diário Oficial da União 2005; 18 mar.

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.** v. 6,252-266, 2007.

CALLENDER E. Heavy Metals in the Environment-Historical Trends **Treatise on Geochemistry**, v.9, p.67-105, 2003.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. 2001.

CANOVAS, D.; VOOIJS, R.; SCHAT, H.; DELORENZO, V. The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P 37 to arsenic. **J. Biol. Chem.** v. 279, 51234–51240, 2004.

CARNEIRO, D. A.; GARIGLIO, L. P.; A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos **Revista Tecer - Belo Horizonte** – v. 3, n. 4, 2010.

CAVALCANTI, N, B.; LIMA, L. T. PERDA DE SOLO E ÁGUA EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO NA CAATINGA - **Engenharia Ambiental** - Espírito Santo do Pinhal , v. 9, n. 2, p. 105-118, maio/ jun. 2012

CHAKRABORTY, S., GHOSH, U., CHAKRABORTY, S. Fungi: Its importance in biotechnology -A review on its past, present and future prospects. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n.12, p.3059-3060, 2010.

- CNRBC (Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Caatinga). **Cenários para o bioma Caatinga**. CNRBC, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, Recife, Brasil, 2004.
- COUTINHO PM, et. al. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet Biol.** v. 46, n.1, p. 161-169, 2009.
- CRAMER, C. L., DAVIS, R. H. Polyphosphate-cation interaction in the amino acid-containing vacuole of *Neurospora crassa*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 5152-5157, 1984.
- CRINI, G., BADOT, P.M. In: PUFC (Ed.), **Traitement et épuration des eaux industrielles**, 2007.
- CRINI, GREGORIO. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. **Bioresource Technology** v. 97, n.9, p.1061-1085, 2006.
- CROWTHER, T. W., A'BEAR, A. D. Impacts of grazing soil fauna on decomposer fungi are species-specific and density-dependent. **Funga L. E. Cology**. v. 5, p. 277-281, 2012.
- CRUZ, A. C. R., GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies associadas ao folhedo. **Acta Botânica Brasileira**. v. 23, p. 55-70, 2009.
- DABROWSKI, A., et al. Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method, **Chemosphere**, v. 56, n. 2, p. 91-106, 2004.
- DA SILVEIRA, Adriana Parada Dias; DOS SANTOS FREITAS, Sueli. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico, 2007.
- DAVYDOVA, S. Heavy metals as toxicants in big cities. **Microchemical Journal**, v. 79, n.1, p. 133-136, 2005.
- DOCAMPO, R., W. DE SOUZA, K. MIRANDA, P. ROHLOFF, AND S. N. MORENO. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, p. 251-261, 2005.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**, v.82, n. 1, p. 47- 95, 2002.
- DURSUN, A. Y. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper(II) and lead(II) ions onto pretreated *Aspergillus niger*, **Biochem. Eng. J.** v. 28, 187–195, 2006.
- FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. **Toxicology**, v. 205, n.3, p. 223-240, 2004.

- FILEP, G. **Soil chemistry. Processes and constituents**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 1999. 330p.
- FLEMMING, C. A., TREVORS, J. T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. **Water, Air, & Soil Pollution** v. 44, n. 1-2, p. 143–158, 1989.
- FLOREA, A. M., & BÜSSELBERG, D.. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. **Biometals**, v. 19, n. 4, p. 419-427, 2006.
- FRALEY, C. D., RASHID, M. H., LEE, S. S., GOTTSCHALK, R., HARRISON, J., WOOD, P. J., BROWN, M. R., AND KORNBERG, A. A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.104, p. 3526-3531, 2007.
- FRANCO, M.; SANTOS, T.C.; GOMES, P.P.; ABREU FILHO, G.; Enriquecimento protéico dos resíduos sólidos do processamento de frutas; **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, n.11; 2010
- FREITAS LIMA, A.de; FERREIRA de Moura, G., BARBOSA de LIMA, M. A., MENDES de SOUZA, P., ALVES da SILVA, C. A., de CAMPOS TAKAKI, G. M., & Do NASCIMENTO, A. E. Role of the morphology and polyphosphate in *Trichoderma harzianum* related to cadmium removal. **Molecules**, v.16, n. 3, p. 2486-2500, 2011.
- FRISVAD JC, LARSEN TO, THRANE U, MEIJER M, VARGA J, et al. Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. **Plos One**, v. 6, n.8, p. 23496, 2011.
- FU, F., CHEN, R., & XIONG, Y. Application of a novel strategy—Coordination polymerization precipitation to the treatment of Cu<sup>2+</sup> containing wastewaters. **Separation and purification technology**, v. 52, n.2, p. 388-393, 2006.
- GADD, GEOFFREY MICHAEL. Metals and microorganisms: a problem of definition. **FEMS microbiology letters**, v. 100, n. 1-3, p.197-203, 1992.
- \_\_\_\_\_. Interactions of fungi with toxic metals, **News Phytology**, v.124, p.25-60, 1993.
- \_\_\_\_\_. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 1, p.13–28, January 2009
- \_\_\_\_\_. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. **Microbiology** v. 156, n.3, p. 609-643, 2010.

GAETKE LM, CHOW CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 89, p.147-163, 2003.

GARIGLIO, MA., SAMPAIO, EVSB., CESTARO, LA. and KAGEYAMA, P., **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. p. 29-48, 2010.

GHORAI, S. BANIK, S. P., VERMA, D., CHOWDHURY, S., MUKHERJEE, S., KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**. v. 42, p. 577–587, 2009.

GANDRA, Paulo Guimarães; ALVES, Armindo Antônio; MACEDO, Denise Vaz de e KUBOTA, Lauro Tatsuo. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v .27, n.6, p. 980-985, 2004.

GUO Y, ZHENG P, SUN J. *Aspergillus niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**. v. 26, n. 10, p. 1410-1418, 2010.

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

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.

HERNANDEZ-RUIZ, L., GONZÁLEZ-GARCÍA, I., CASTRO, C., BRIEVA, J. A., AND RUIZ, F. A. Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells. **Haematologica**. v. 91, 1180-1186, 2006.

HERRERA, V. O. et al. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems / **Science of the Total Environment** , p. 412-413, 2011.

HOFMAN, J.; BEZCHLEBOVÁ, J.; DUSEK, L.; DOLEZAL, L.; HOLOUBEK, I.; AND-L, P.; ANSORGOVÁ, A.; ALY, S. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. **Environment International**, v.28, (8), 771-778, 2003.

HOGAN,C.M. **Heavy metal**. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment. eds. E. Monosson & C. Cleveland. Washington, D.C. 2010, 261p.

ISLAMOGLU, SEZIN, LEVENT YILMAZ, AND H. O. OZBELGE. Development of a precipitation based separation scheme for selective removal and recovery of heavy metals from cadmium rich electroplating industry effluents. **Separation science and technology**, v. 41, n. 15, p. 3367-3385, 2006.

JÄRUP, LARS,; Agneta Åkesson. "Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 201-208, 2009.

JOMOVA, A. MARIAN VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, 65–87, 2011.

JOMOVA, K., VONDRAKOVA, D., LAWSON, M., VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry** v. 345, n. 1-2, p. 91-104, 2010.

KALIN, M., FYSON, A., & WHEELER, W. N. The chemistry of conventional and alternative treatment systems for the neutralization of acid mine drainage. **Science of the Total Environment**, v. 366, n.2, p. 395-408, 2006.

KANALY R. A, KIM IS, HUR HG. Biotransformation of 3-methyl-4-nitrophenol, a main product of the insecticide fenitrothion, by *Aspergillus niger*. **J Agric Food Chem.** v. 53, 6426–6431, 2005.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T., CULLIMORE, D. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.** v. 70, p. 95–104, 1999.

KAPOOR, A., AND T. VIRARAGHAVAN. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. **Bioresource Technology** v. 63, n. 2, p. 109-113, 1998.

KAPOOR, A; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.** v. 61, p. 221–227, 1997.

KAPPOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technology**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KARTHIKA, T., THIRUNAVUKKARASU, A., RAMESH, S. Biosorption of copper from aqueous solutions using *Tridax procumbens*. Recent Research in **SCIENCE AND TECHNOLOGY**. v. 2, n. 3, p. 86–91, 2010.

KAVAMURA, V. N.; ESPOSITO E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals, **Biotechnology Advances** v. 28, p. 61–69, 2010.

KEASLING JD, VAN DIEN SJ, TRELSTAD P, RENNINGER N, MCMAHON K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. **Biochemistry**. v. 65, n. 3, p. 324-31, 2000.

KEASLING, J. D. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. **Bioremed. Surf. Subsurf. Contam.** v.829, p. 242-249, 1997.

KEASLING, J. D., AND HUPF, G. A. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. Appl. **Environ. Microbiol.** v. 62, p. 743-746, 1996.

- KEYHANI, S., LOPEZ, J. L., CLARK, D. S., AND KEASLING, J. D. Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. **Microbios**. v. 88, p. 105-114, 1996.
- KIM, S. U., Y. H., SEO, D. C., HUR, J. S., CHO, J. S. Characterization of heavy metal tolerance and absorption capacity of bacterial strain CPB4 ( *Bacillus spp.*) **Wat. Sc. Tech.**, v. 55, n. 1-2, p. 105-111, 2007
- KLAMER, D., JÖRGEN A. E., and LENNART S. The neuronal selective nitric oxide synthase inhibitor, propyl arginine, blocks the effects of phencyclidine on prepulse inhibition and locomotor activity in mice. **European journal of pharmacology**, v. 503, n.1, p.103-107, 2004.
- KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 491-496, 1995.
- KORNBERG, A., RAO, N. N., AND AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annu. Rev. Biochem.** v.68, p. 89-125, 1999.
- KOURY, Josely Correa; DONANGELO, Carmen Marino. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 4, Dec. 2003 .
- KULAEV, I.S; VAGABOV, V.M; KULAKOVSKAYA, T.V; LICHKO, L.P; ANDREEVA, N.A; TRILISENKO, L.V. The development of A.N. Belozersky's Ideas in Polyphosphate Biochemistry. **Biochemistry** , Moscow , v. 65, n. 3, p. 271-278, 2000.
- KULAKOVSKAYA, T. V. et al. Inorganic polyphosphates in mitochondria. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, n. 7, p. 825-831, 2010.
- KUMAR, A., BISHT, B. S., JOSHI, V. D. Bioremediation potential of three acclimated bacteria with reference to heavy metal removal from waste. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 2, p. 896-908, 2011.
- KUMBLE, K. D., AND KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 5818-5822, 1995.
- LAL, R. Basic concepts and global issues: soil quality and agricultural sustainability . In: LAL, R. (ed.) Soil quality and agricultural sustainability. **Ann Arbor Science, Chelsea**, 1998. p.3-12.
- LEPRUN, J. C. **Manejo e conservação de solos do Nordeste**. Recife: SUDENE, 1988.
- LEVINSKAITÉ , L. Effect of copper sulphate on assimilation of various substrata by soil fungi. **Development**, v. 1, n. 5, p. 15, 2001.

LI, L., RAO, N. N., AND KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate essential for lytic growth of phages P1 and fd. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 104, p. 1794-99, 2007.

LIMA, M. A. B. de et al. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 363-372, 2003.

LIU, Y.-G., FAN, T., ZENG, G., LI, X., TONG, Q., YE, F., ZHOU, M., . XU, W., HUANG, Y. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*, *Trans. Nonferr. Met. Soc. China* v. 16, p. 681–686, 2006.

MACK, DIETRICH, PETRA BECKER, INDRANIL CHATTERJEE, SABINE DOBINSKY, JOHANNES K-M. KNOBLOCH, GEORG PETERS, HOLGER ROHDE, and MATHIAS HERRMANN. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. **International journal of medical microbiology**, v. 294, n.2, p. 203-212, 2004.

MAGYAROSY, A., LAIDLAW, R.D., KILAAS, R., ECHER, C., CLARK, D.S., KEASLING, J.D. Nickel accumulation and nickel oxalate Precipitation by *Aspergillus niger*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 59, p. 382–388, 2002.

MANFIO, G. P. **Biodiversity**: Perspectives and Technological Opportunities. Capítulo 9: Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável (diversos documentos). <http://www.bdt.org.br/publicacoes/padctbio/cap9/>.1998.

MANGANELLI, R. Polyphosphate and stress response in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* v. 65, p. 258-260, 2007.

MARCHIORETTO, Marina Maya, HARRY Bruning, and WIM Rulkens. Heavy metals precipitation in sewage sludge, **Separation science and technology**, v. 40, n.16, p.3393-3405, 2005.

MCGRATH, J. W., KULAKOVA, A. N., KULAKOV, L. A., AND QUINN, J. P. *In vitro* detection and characterisation of a polyphosphate synthesising activity in the yeast *Candida humicola* G-1. **Res. Microbiol.** v. 156, p. 485-91, 2005.

MCINERNEY, P., MIZUTANI, T., AND SHIBA, T. Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity *in vitro* and *in vivo*. **Mol. Microbiol.** v. 60, p. 438-447, 2006.

MCCMAHON, K. D., DOJKA, M. A., PACE, N. R., JENKINS, D., AND KEASLING, J. D. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, p.4971-4978, 2002.

MEIJER S, NIELSEN ML, OLSSON L, NIELSEN J. Gene deletion of cytosolic ATP: citrate lyase leads to altered organic acid production in *Aspergillus niger*. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v. 36, n.10, p.1275-1280, 2009.

MELLONI, R. Quantificação microbiana e qualidade do solo. In: **Microbiota do solo e qualidade ambiental** /editoras Adriana Parada Dias da Silveira; Sueli dos Santos Freitas. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

MELLONI, R.; ABRAHÃO, R.S.; MOREIRA, F.M.M.; FURTINI NETO, A.E. Impacto de resíduo siderúrgico na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. **Revista Árvore**, v.24, n. 3, p. 309-315, 2000.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n. 2, p. 267-276, 2003.

MESSIAS, A. S.; SILVA, D. J.; FREIRE, F. J.; SILVA, M. C. L. Fertilizantes. In: Francisco José de A. Cavalcanti (coord.). **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. Recife: IPA, 2008, p. 89-103.

MOSIALOU, E. **Microssomal Glutathione Transferase and Oxidative Stress**. Dissertação de Pós- Doutorado, Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology. Estocolomo, Suécia. 1993.

MUDHOO, A., GARG, V. K., WANG, S. Removal of heavy metals by biosorption. **Environmental Chemistry Letters.** v. 10, n. 2, p. 109-117, 2012.

MUKHOPADHYAY, M., . NORONHA, S., . SURAISHKUMAR, G. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass, **Bioresour. Technol.** v. 98, p. 1781–1787, 2007.

MULLER, A., LEON-KEMPIS, M. D., DODSON, E., WILSON, K. S., WILKINSON, A. J., AND KELLY, D. J. A bacterial virulence factor with a dual role as an adhesin and a solute-binding protein: The crystal structure at 1.5 Å resolution of the PEB1a protein from the food-borne human pathogen *Campylobacter jejuni*. **J. Mol. Biol.** v.372, p. 160-171, 2007.

MULLIGAN, CA, Kamali M, Gibbs FB. Bioleaching of heavy metals from a low grade mining ore using *Aspergillus niger*. **J. Hazard. Mater.**, v. 3, p. 21–27, 2004.

NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, R. L. F. Correlação entre características de Latossolos e parâmetros de equações de adsorção de cobre e zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, n.6, p.965-971, 2004.



- NASCIMENTO, Y.D. dos S.; MELLONI, R. **Avaliação da qualidade de solos por meio de atributos microbiológicos e bioquímicos** – Estudo de caso de áreas pertencentes à UNIFEI, Itajubá/MG. Itajubá, UNIVERSITAS - Centro Universitário de Itajubá, 2005. 20p.
- NAVARRO, RONALD R., SHINJI WADA, AND KENJI TATSUMI. Heavy metal precipitation by polycation–polyanion complex of PEI and its phosphonomethylated derivative. **Journal of hazardous materials**, v. 123, n. 1, p. 203-209, 2005.
- NISHIKAWA, K., Y. YAMAKOSHI, I. UEMURA, AND N. TOMINAGA. Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.44, p. 253-259, 2003.
- NOGUEIRA, M.A. et. al. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration between natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.115, p. 237-247, 2006.
- 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.** v. 52, p. 22-29, 2006.
- OLDEMAN, L.R. The global extent of soil degradation. In: GREENLAND, D.J. & SZABOLCS, I. (eds.) Soil resilience and sustainable land use. **Wallingford: CAB International**, 1994. p.99-118.
- PEL HJ, DE WINDE JH, ARCHER DB et al., Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nat Biotechnol.** v. 25, n. 2, p. 221-231, 2007.
- PERIS, M.; RECATALÁ, L.; MICÓ, C.; SÁNCHEZ, R. & SÁNCHEZ, J. Increasing the knowledge of heavy metal contents and sources in agricultural soils of the European Mediterranean region. **Water Air Soil Poll.**, v. 92, p.25-37, 2008.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3rd edition. Springer. 1997.
- PRADO, D.E. As caatingas da América do Sul. In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.) **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco. p. 3-73, 2003
- PRUSKI, F. F. Prejuízos decorrentes da erosão hídrica e tolerância de perdas de solo. In: PRUSKI, F. **F Conservação de solo e água: práticas mecânicas para o controle da erosão hídrica**. Viçosa – MG: Editora UFV, 2006. p.13-23.
- PRUVOT, C.; Douay, F.; Herve, F.; Waterlot, C. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. **Journal of Soils and Sediments**, v.6, n. 4, p. 215-220, 2006.

- PUGLISI, E., HAMON, R., VASILEIADIS, S., COPPOLECCHIA, D., & TREVISAN, M. **Adaptation of soil microorganisms to trace element contamination: a review of mechanisms, methodologies and consequences for risk assessment and remediation.** 2011.
- RAO, N. N., GÓMEZ-GARCÍA, M. R., AND KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. **Annu. Rev. Biochem.** v. 78, p. 605-647, 2009.
- RASHID, M. H., AND KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 97, p. 4885-4890, 2000.
- RATNAM, D. V., ANKOLA, D. D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D. K., RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **J. Contr. Rele.** v. 113, p. 189-207, 2006.
- REMONSELLEZ, F., A. ORELL, AND C. A. JEREZ. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. **Microbiology**, v. 152, p. 59-66, 2006.
- RODRIGUES, A. B. C.; ALMEIDA, C. A. V.; ROCHA, C. P.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. **Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger***, 2009.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; ARAÚJO, M. S. B.; SAMPAIO, Y. S. B. Impactos ambientais da agricultura no processo de desertificação no Nordeste do Brasil. **Revista de Geografia do Departamento de Ciências Geográficas da UFPE**, v. 22, n.1, p. 93-113, 2005.
- SAMPAIO, E.V.S.B. Overview of the Brazilian Caatinga. In: S.H. Bullock, H.A. Mooney & E. Medina (eds.). Seasonally dry forests. Cambridge, Cambridge **University Press**. p. 35-58, 1995.
- SAMPAIO, EVSB., ARAÚJO, MSB., SALCEDO, IH. and MENEZES, RSC., **Manejo sustentável do semi-árido nordestino**. Recife: Editora Universitária. 2009,149 p.
- SANCHEZ JF, SOMOZA AD, KELLER NP, WANG CC. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. **Nat Prod Rep.** v. 29, n.3, p. 351-71, 2012.
- SANTHIYA, D., & TING, Y. P. Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. **Journal of biotechnology**, v. 121, n.1, p. 62-74, 2006.
- SANTHIYA, D.; TING, Y.P. Bioleaching of spent refinery processing catalyst using *Aspergillus niger* with high yield oxalic acid. **J. Biotechnol.** v. 116, p. 171-184, 2005.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; OLIVEIRA, J. B.; COELHO, M. R.; LUMBRERAS, J. F.; CUNHA, T. J. F. (Ed.). Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 2006. 306 p.

SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G.; W. & TABARELLI, M. Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical Forest. **Tropical Conservation Science**, v.4, p.276-286, 2011.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J.C. & VAN DIJCK, P.W. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 59, p. 426–435, 2002.

SEUFFERHELD, M. J., ALVAREZ, H. M., AND FARIAS, M. E. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 74, p. 5867-5874, 2008.

SEVIOUR, R. J., MINO, T., AND ONUKI, M. The microbiology of biological phosphorus removal in the activated sludge systems. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 27, p. 99-127, 2003.

SHARMA, RAJESH KUMAR, AND MADHOOLIKA AGRAWAL. Biological effects of heavy metals: an overview. **Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India** v.26, n. 2, p. 301, Suppl, 2005.

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

SHRIVASTAVA, A. K. A review on copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies. **Indian Journal of Environmental Protection**, v. 29, p. 552-560, 2009.

SILVA, J, M. C., TABARELLI, M., FONSECA, M. T., LINS, L. V. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 382 p.

SILVA, J. P. S. D., NASCIMENTO, C. W. A. D., BIONDI, C. M., & CUNHA, K. P. V. D. Heavy metals in soils and plants in mango orchards in Petrolina, Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n.4, p. 1343-1354, 2012.

SILVEIRA, R.B.; MELLONI, R.; MELLONI, E.G.P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em Itajubá/MG. **Revista Cerne**, Lavras, v.12, n.1, p. 48-55, 2006.

SIMEONOV, L. I.; KOCHUBOVSKI, M. V.; SIMEONOVA, B. 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 , XX, 361 p., Hardcover, 2011.

SINHA, R. K., VALANI, D., SINHA, S., SINGH, S., HEART, S. Bioremediation of contaminated sites: a low-cost nature's biotechnology for environmental clean up by versatile microbes, plants & earthworms. In: **Solid Waste Management and Environmental Remediation**. Cap. 1. ISBN: 978-1-60741-761-3. Editor: Timo Faerber and Johann Herzog. Nova Science Publishers, 2009.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: **EMBRAPA**, 1994. 142p.

SMITH, S. A., MUTCH, N. J., BASKAR, D., ROHLOFF, P., DOCAMPO, R., AND MORRISSEY, J. H. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 103, p. 903-908, 2006.

SOARES, C.R.F.S; ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados. In: **SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS**, 5, Belo Horizonte, Palestra, 2002. p.56-82.

SOUZA, B. I. **Cariri paraibano**: do silêncio do lugar à desertificação. Tese de Doutorado. UFRGS, Porto Alegre, 2008.

SOUZA, B. I.; SUERTEGARAY, D. M. A.; LIMA, E. R. V. de. Desertificação e seus efeitos na vegetação e solos do Cariri paraibano. **Mercator**, v. 8, p. 217-232, 2009.

SOUZA, P. M.; MARINHO, P. H.; LIMA, M. A. B; NASCIMENTO, A. E; CAMPOS, G. M. T; Copper Influence on Polyphosphate Metabolismo of *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 315 – 320, 2005.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, v.114, n. 3-4, p. 143-144, 2003.

SPRAGUE, RALPH H. **Decision support systems**. Prentice Hall Professional Technical Reference, 1990.

STARKEY, ROBERT L.; SELMAN A. WAKSMAN. Fungi tolerant to extreme acidity and high concentrations of copper sulfate. **Journal of Bacteriology** v. 45, n. 5, p. 509-519, 1943.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C.. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: **Editora da UFPE**, p. 719-734, 2003..

- TORTORA, GERARD J. **Microbiology**: An Introduction with MyMicrobiologyplace, *Website Plus...* Pearson Education, 2011
- TRAVASSOS, I. S., SOUZA, B. I. Solos e desertificação no sertão paraibano. **Cadernos do Logepa** v. 6, n.2, p. 101-114, 2011.
- TREVISAN, Rafael. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. Monografia do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (2008).
- TSEKOVA, K.; DENTCHEV, D. Effects of Copper on the Growth and Glucoamylase Activity of *Aspergillus Niger D-IV-8* **Acta Agriculturae Serbica**, v. 6, n.12, p. 37-42, 2001.
- TSUTSUMI, K., M. MUNEKATA, AND T. SHIBA. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. **Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Express.** v. 1493, n. 73-81, 2000.
- VALENZUELA, SERGIO O.; M. TINKHAM. Direct electronic measurement of the spin Hall effect. **Nature** v. 442, n. 7099, p.176-179, 2006.
- VALKO M, MORRIS H. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 1161–1208, 2005.
- VANBROEKHOVEN, K., W. DEJONGHE; L. DIELS. Treatment of contaminated soil and groundwater: In situ immobilization of metals. **Soil and sediment remediation. Mechanisms, technologies, and applications**, p. 248-263, 2005,.
- VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy** v. 59, n. 2, p. 203-216, 2001.
- VOLESKY, B., H. May, and Z. R. Holan. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 41, n. 8, p. 826-829, 2004.
- VOLESKY, Bohumil. Biosorption of chromate and vanadate species with waste crab shells. **Hydrometallurgy** v. 84, n.1, p. 28-36, 2006.
- VOLESKY, Bohumil. **Biosorption of heavy metals**. CRC, 1990.
- VOLKE-SEPULVEDA T, GUTIERREZ-ROJAS M, FAVELA-TORRES E. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. **Bioresour Technol.** v. 97, p. 1583–1591, 2006.
- WUCHERPFENNIG, T., LAKOWITZ, A., DRIOUCH, H., KRULL, R., WITTMANN, C. Customization of *Aspergillus niger* Morphology Through Addition of Talc Micro Particles. **J. Vis. Exp.** v. 61, p. 3791-4023, 2012.

- XIE, G. AND T.P. WEST. Citric acid production by *Aspergillus niger* on the ethanol dry milling coproduct thin stillage. Res. **J. Microbiol.** v. 2, p. 678-683, 2007.
- XU, T.J., TING, Y.P. Optimisation on bioleaching of incinerator fly ash by *Aspergillus niger* – use of central composite design. **Enzyme Microb. Technol.** v. 35, p.444–454 , 2004.
- YANG, J., WANG, Q., WU, T. Heavy metal extraction from MSW incineration fly ash using adapted metal tolerant *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.** v. 100, p. 254–260, 2009.
- YANG, Z. X., ZHOU, Y. N., YANG, Y., AND JIN, D. J. Polyphosphate binds to the principal sigma factor of RNA polymerase during starvation response in *Helicobacter pylori*. **Mol. Microbiol.** v. 77, p. 618-627, 2010.
- YU, B. P. Cellular Defenses against Damage from Reactive Oxygen Species. **Physiol Rev**, v.74, n. 1, p. 139-162, 1994.
- ZAK, DONALD R., WILLIAM E. HOLMES, DAVID C. WHITE, AARON D. PEACOCK, AND DAVID TILMAN. Plant Diversity, Soil Microbial Communities, And Ecosystem Function: Are There Any Links? **Ecology**. v. 84, p. 2042–2050, 2003.
- ZAK, J.C.. The enigma of desert ecosystems: the importance of interactions among the soil biota to fungal biodiversity. In: S. Isaac, J.C. Frankland, R. Watling & A.J. Whalley (EDS.) ASPECTS OF TROPICAL MYCOLOGY. **CAMBRIDGE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS**, p. 59-71, 1993.
- ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p. 1101-1108, 1994.
- ZHANG, H. Y., N. N. RAO, T. SHIBA, AND A. KORNBERG. Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: motility, development, and predation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 102, p. 13416-13420, 2005.
- ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v.20, n. 3, p. 391-411, 2003.

## **CAPÍTULO II**

Artigo submetido a revista de engenharia de saneamento ambiental

**INFLUÊNCIA DO COBRE SOBRE O CRESCIMENTO,  
MORFOLOGIA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *ASPERGILLUS  
NIGER* UCP/ WFCC 1261**

**COPPER INFLUENCE ON GROWTH, MORPHOLOGY AND  
ENZYMATIC ACTIVITY OF *Aspergillus niger* UCP/ WFCC  
1261**

Marcos Antônio Cavalcanti Luna<sup>1</sup>, Patrícia Mendes de Souza<sup>2</sup>, Kaoru Okada<sup>3</sup>, Aline Elesbão do Nascimento<sup>3\*</sup>,

1 .Mestrando do Programa Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Recife – PE;

2. Pós-Doutoranda – Universidade Católica de Pernambuco, Recife – PE;

3. Universidade Católica de Pernambuco Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Recife – PE.

\* Autor para correspondência: e-mail: elesbão@unicap.br

Tel.: 55 081- 2119 4017; Fax: 55 081- 2119 4050.



## RESUMO

O propósito do presente trabalho foi determinar os efeitos do cobre sobre o crescimento e atividade de enzimas extracelulares por *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261 obtido do solo da caatinga. O fungo foi cultivado em meio Sabouraud, contendo cobre, durante 144h, a 28° C. A expansão radial e a velocidade de crescimento variaram em função da presença e da concentração do cobre. O isolado foi capaz de utilizar amido, gelatina, carboximetilcelulose e ácido tânico como fontes de carbono. Os resultados obtidos para os halos de degradação demonstraram que a atividade de todas as enzimas foi semelhante àquela dos controles nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM e 3,0 mM de cobre. Para as concentrações de 4,0 mM e 5,0 mM os halos de degradação foram reduzidos. A presença do metal induziu redução significativa ao nível de 5% para a atividade da celulase em presença de 4,0 mM e 5,0 mM de cobre. Para a amilase houve redução de atividade significativa na concentração de 5,0 mM. Os dados apontam a habilidade de crescimento em altas concentrações de cobre, e o potencial para a produção de enzimas extracelulares, sugerindo a existência de tolerância ao cobre.

Palavras chave: *Aspergillus niger*, cobre; enzimas extracelulares, crescimento radial.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effects of copper on growth and extracellular enzymes production of *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261, obtained from caatinga soil. The fungus was grown in Sabouraud medium, containing copper, during 144 h, at 28° C. The radial expansion, and the growth rate varied according to the presence and copper concentration. The isolate was also able to use starch, gelatin, carboxymethylcellulose and tannic acid as carbon sources. The results obtained for the halos of degradation showed that the activity of all enzymes was similar to that of the controls at concentrations of 0.5 mM, 1.0 mM, 2.0 mM and 3.0 mM of copper. For concentrations of 4.0 mM and 5.0 mM the halos of degradation were reduced. The presence of metal induced significant reduction to the level of 5% for cellulase activity in presence of 4.0 mM and 5.0 mM of copper. For the amylase activity significant reduction was found in the concentration of 5.0 mM. The data indicate the ability to grow in high concentrations of copper and the potential for the production of extracellular enzymes, pointing out the existence of tolerance to copper.

Key words: *Aspergillus niger*, copper; extracellular enzymes, radial growth.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Dentre os agentes de grande potencial de contaminação e degradação ambiental estão os metais pesados, cuja contaminação decorre, além da ocorrência de processos naturais, do uso de práticas agrícolas inadequadas relativas ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas, pesticidas, fungicidas, que além de afetarem a biota, sofrem processo de lixiviação, interferindo e alterando drasticamente os ciclos biogeoquímicos, e conseqüentemente na manutenção das propriedades físicas e bioquímicas necessárias para a fertilidade do solo (BIONDI, 2011).

Apesar da toxicidade aparente, muitos micro-organismos conseguem se desenvolver em ambientes aparentemente contaminados com metais pesados, indicando uma variedade de mecanismos metabólicos, que contribuem com a tolerância e/ou resistência. A resistência é generalizada, com freqüências variáveis em função dos tipos de metal, sua biodisponibilidade, espécie e linhagem (GADD; RAVEN, 2010).

Os fungos constituem um dos grupos de micro-organismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou micelial, com produção de biomassa, que depende diretamente da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos. O potencial de utilização de fungos no tratamento dos mais diversos tipos de efluentes, resíduos e rejeitos, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos, baseia-se na sua capacidade de produzir enzimas extracelulares (BENNET, 2010).

Nas últimas décadas, a utilização de *Aspergillus niger* e seus metabólitos nos processos de biorremediação vêm crescendo, em virtude do alto potencial degradativo, biossorbitivo e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas. Assim, tem sido apontado como biossorbitivo de qualidade para íons metálicos, com alta capacidade para adsorver e acumular metais juntamente com excelentes propriedades mecânicas e estruturais de seu micélio, o fungo é uma excelente alternativa na sorção seletiva de íons de metal pesado na indústria e de resíduos e efluentes. Também é utilizado com sucesso na lixiviação de metais com cobre, níquel. Além disso, é amplamente utilizado na remoção de compostos aromáticos, como corantes têxteis, e compostos fenólicos de águas residuárias através da produção de enzimas catabólicas (GARCIA et al, 2000; SANTOS; LINARDI, 2004; BENNET, 2010).

Assim, considerando que o conhecimento da diversidade biológica e funcional do complexo bioma caatinga é de grande relevância para se entender a dinâmica de cadeias envolvidas no sistema, bem como a qualidade dos solos como base para a melhoria da produtividade local, e o potencial dos fungos associados a perfis bioquímicos e metabólicos únicos com vistas ao desenvolvimento econômico e ambiental, o objetivo do presente trabalho foi avaliar: o potencial enzimático de *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261, isolado do solo da caatinga e sua tolerância frente a exposição de altas concentrações de cobre a través da determinação do crescimento e características morfológicas, visando sua aplicação biotecnológica.

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1 Microrganismo**

O micro-organismo *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 126, isolado do solo da Caatinga mantido no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco foi selecionado para estudo do crescimento e detecção da atividade enzimática em diversas concentrações de cobre. O isolado foi mantido em Batata Dextrose Agar (BDA) a 5° C. Para a produção do pré-inóculo o isolado *Aspergillus niger* foi repicado em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubado a 28° C por 7 dias.

### **2.2.2 Solução Metálica**

Para o preparo da solução estoque 100 mM de íons de  $\text{Cu}^{2+}$  foi preparada dissolvendo-se 24,968 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre), em 1 L de água destilada. A partir das solução padrão estoque, foi preparada as soluções de trabalho 0,5mM; 1mM; 2mM; 3mM; 4mM; e 5mM de cobre utilizadas nos experimentos.

### **2.2.3 Determinação do crescimento radial e caracterização morfológica**

Discos de cultura, com um centímetro de diâmetro, foram inoculados em placa de Petri, com o meio SDA, contendo cobre, preparado em água destilada e deionizada, nas concentrações 0,5mM; 1mM; 2mM; 3mM; 4mM; e 5mM, em pH 5,0 e incubados a 28° C, durante 144 h. As amostras controle foram crescidas nos meios citados sem o metal. O crescimento foi avaliado através do crescimento radial, medido pelo diâmetro da colônia, em milímetros, a cada vinte e quatro horas de incubação. Os resultados foram expressos como média aritmética de triplicatas. A determinação das velocidades de crescimento radial em milímetros nas diferentes concentrações de cobre foi avaliada no período de 144h, conforme metodologia proposta por Gabiatti et al.(2006). O diâmetro das colônias foi medido a cada 24

h e a velocidade de crescimento radial foi determinada pela declividade da reta obtida por regressão linear, conforme a Equação (1).

$$r(t) = a + V_{cr} \cdot t \quad (1)$$

onde:  $r(t)$  é o raio da colônia (mm);  
 $a$  é a constante da regressão linear;  
 $V_{cr}$  é a velocidade de crescimento radial ( $\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$ );  
 $t$  é o tempo de cultivo (h).

Para a avaliação dos efeitos do cobre sobre os aspectos macroscópicos e microscópicos de *A. niger*, UCP/ WFCC 126, placas de culturas controle e expostas ao metal foram fotografadas. Para a avaliação microscópica, lâminas contendo amostras de micélio, de culturas controle tratadas com cobre, foram coradas com azul de Aman, observadas em microscópio de luz, Nikon modelo Alphaphot 2 Y52, e fotografadas com máquina Nikon FDX-35.

#### 2.2.4 Determinação da Atividade Enzimática

Para determinação das atividades enzimáticas extracelulares amilase, protease e tanase, o isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, foi inoculado em placas contendo meio ágar nutriente (AN) constituído de 5 g/L peptona, 3 g/L de extrato de carne e 15 g/L de ágar, acrescido dos substratos específicos, incubadas a 28° C, durante 96 horas. A determinação da atividade enzimática foi dada pela medição do diâmetro da colônia e do halo de degradação produzido, em milímetros, determinando assim o índice enzimático (IE), que é a relação direta entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). Deste modo quanto maior o índice maior é atividade enzimática. Adicionalmente, todos os ensaios foram preparados em triplicatas, sendo o resultado a média do diâmetro dos halos produzidos em milímetros.

**Atividade Proteolítica** – A habilidade do isolado em hidrolisar proteínas foi testada em meio contendo 0,4 % de gelatina, em meio AN, como única fonte de carbono. Após o período de incubação 96h, as placas foram inundadas com uma solução de KI para revelação da atividade. Uma zona clara em torno colônias em contrastes com o meio escuro indicou a presença de protease.

**Atividade Amilolítica** – A habilidade de degradar o amido a 0,2% , em meio AN, foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Após um período de 96h de incubação a 28 °C, as placas foram reveladas com KI, e a atividade amilolítica foi determinada pela zona clara ao redor da colônia em contraste com azul escuro do meio.

**Atividade da tanase** – O meio ágar nutriente foi acrescido de 0,2 % de ácido tânico. Após o periodo de incubação por 96h foi detectado uma zona transparente ao redor da colônia indicativo da degradação do ácido tânico.

**Atividade celulolítica** – Para a detecção da atividade da enzima celulase foi utilizado o meio contendo: carboximetilcelulose - 5 g/L, sulfato de amônia 0,5 g/L; fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) - 1g/L , sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) - 0,05 g/L, extrato de malte - 0,3 g/L, cloreto de potássio (KCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) – 1,9 g/L, citrato de sódio 5mM (1,29 g/L); água destilada – 500mL suplementado com de ágar 7,5 g/L Após o periodo de incubação de 96h, as placas foram reveladas com uma solução de Vermelho congo 0,025% em tampão TRIS-HCl 0,1M (pH 8,0) durante 30 minutos. Em seguida as placas foram lavadas com uma solução de NaCl 0,5M em tampão TRIS-HCl 0,1M (pH 8,0) durante 10 minutos. A formação de um halo claro foi evidenciada mostrando a presença da celulase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o resultado a média dos valores obtidos para o índice enzimático.

### 2.2.5 Análise Estatística

Para avaliação da influência do cobre sobre a atividade enzimática do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software Statistica 7.0. As médias entre os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Efeitos do cobre sobre o crescimento e morfologia

A análise do crescimento, determinado pela expansão radial das colônias, revela a influência do cobre em *A. niger* UCP/ WFCC 126. A Tabela 2.1 apresenta as médias do crescimento radial em milímetros em função do tempo, em um período de 144h de cultivo.

Tabela 2.1 Média dos resultados obtidos para as medidas do diâmetro (mm) em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) na ausência e presença de cobre

Tempo (h)	Concentrações de CuSO <sub>4</sub>						
	0 mM	0,5 Mm	1,0 mM	2,0 mM	3,0 mM	4,0 mM	5,0 mM
24	17 ± 1,2	17 ± 0,6	17 ± 1,2	17 ± 1,5	14 ± 0,6	14 ± 0,6	11 ± 2,3
48	32 ± 1,5	34 ± 1,5	34 ± 1,0	33 ± 1,2	27 ± 1,0	21 ± 7,2	16 ± 4,0
72	46 ± 1,7	45	43 ± 1,2	41 ± 1,0	37 ± 0,6	32 ± 0,6	27 ± 1,2
96	63 ± 1,5	63 ± 0,6	60 ± 2,5	52 ± 0,6	47 ± 1,5	41 ± 1,2	32 ± 0,6
120	72 ± 0,6	71 ± 1,2	67 ± 2,9	62 ± 0,6	56 ± 1,5	55	43 ± 1,7
144	80	80	78 ± 2,9	76 ± 1,7	72 ± 1,2	69 ± 3,5	55 ± 3,1

Em relação a cultura controle ocorreu um aumento progressivo no diâmetro da colônia, enquanto que para as culturas expostas ao metal foi observada redução do crescimento em função da concentração utilizada. Verificou-se que a presença do cobre no meio SDA, diminuiu a capacidade de assimilação do substrato em relação à cultura controle sem o cobre. Os dados foram confirmados pela determinação da velocidade de crescimento radial, que representa o coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo, portanto, quanto maior a inclinação da reta, maior é a velocidade de crescimento radial. As equações do raio em função do tempo, encontrada através da regressão linear dos resultados, estão apresentadas na tabela 2.2.

Tabela 2.2 Equação de regressão linear, coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e velocidade de crescimento radial ( $V_{cr}$  mm h<sup>-1</sup>) de *A. niger* UCP/ WFCC 126 no meio de cultivo na ausência e presença de cobre, em 144h.

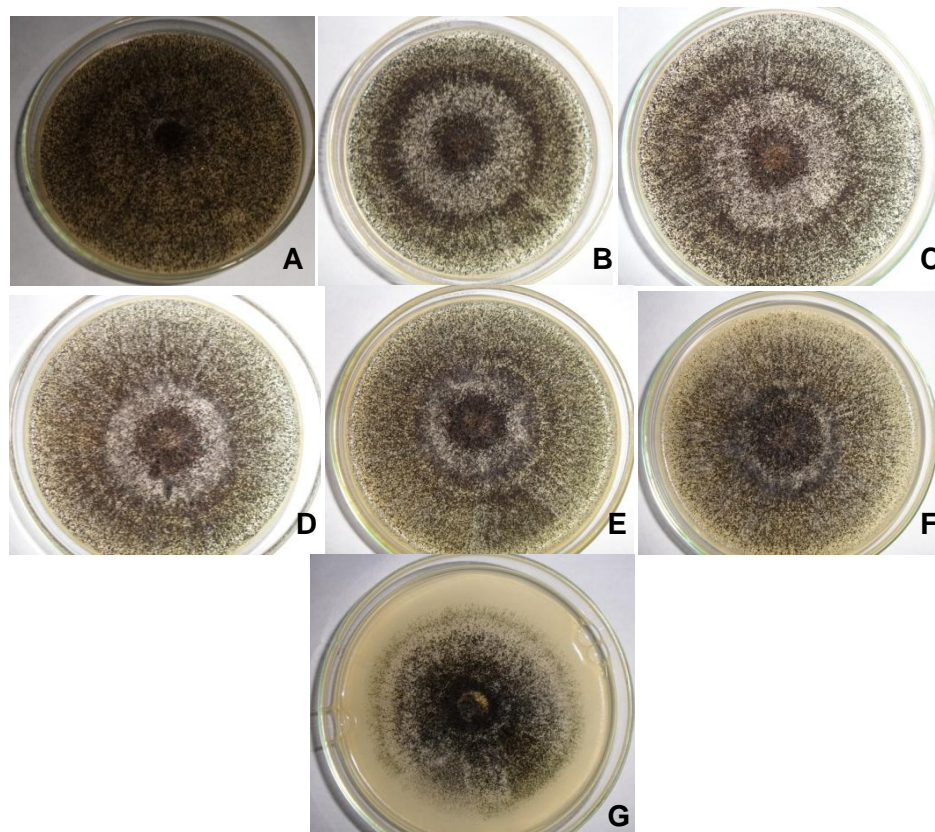
Concentrações	Equação	$R^2$	$V_{cr}$ (mm h <sup>-1</sup> )
Controle	$r = 0,2521t + 5$	$R^2 = 0,988$	0,2521
0,5 mM	$r = 0,2511t + 5$	$R^2 = 0,9872$	0,2511
1 mM	$r = 0,2397t + 5$	$R^2 = 0,9896$	0,2397
2 Mm	$r = 0,2216t + 5$	$R^2 = 0,9879$	0,2216
3 mM	$r = 0,1989t + 5$	$R^2 = 0,9788$	0,1989
4 Mm	$r = 0,182t + 5$	$R^2 = 0,9501$	0,1820
5 Mm	$r = 0,1207t + 5$	$R^2 = 0,9432$	0,1207

Dessa forma, a avaliação do crescimento radial da colônia de *A. niger* UCP/ WFCC 126, em placas demonstra que a redução da velocidade decorre da concentração utilizada,

sendo observado para a cultura controle uma maior velocidade de crescimento ( $0,2521 \text{ mm h}^{-1}$ ) enquanto que a menor velocidade foi obtida para a concentração de 5,0 mM de cobre ( $0,1207 \text{ mm h}^{-1}$ ). Verifica-se a partir dos dados obtidos que existe um comportamento linear em relação a velocidade de crescimento versus o tempo de cultivo, o que possibilita uma previsibilidade do crescimento da radial nas concentrações utilizadas.

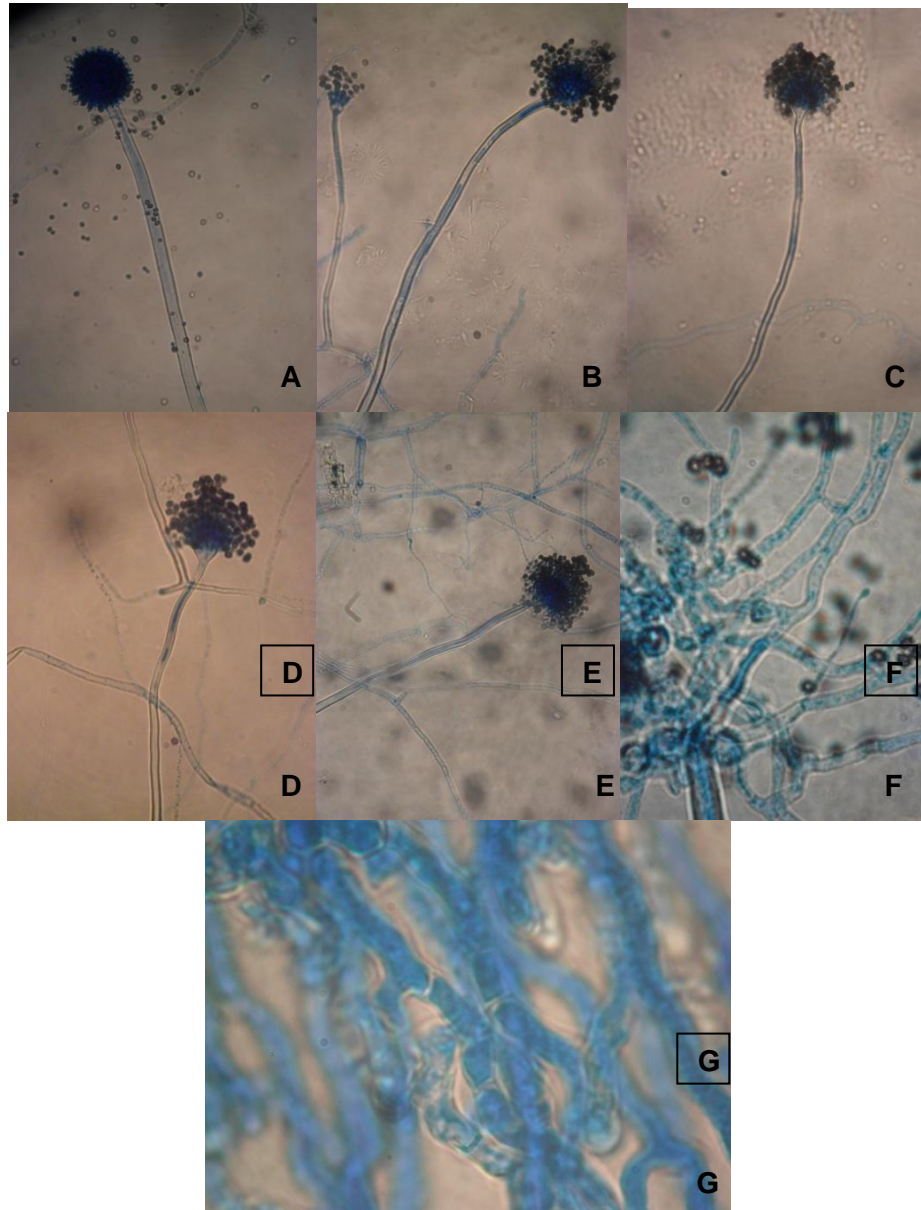
As observações sobre as características macroscópicas das culturas em meio sólido na presença e ausência de cobre estão apresentadas na figura 2.1. Macroscopicamente foi visível a alteração da expansão radial e aspecto da colônia em resposta a crescentes concentrações de sulfato de cobre. Redução de adensamento micelial e surgimento de setores. A intensidade das alterações observadas esteve diretamente relacionada a concentração do metal no meio de cultivo.

Figura 2. 1 Crescimento de *A. niger* UCP/ WFCC 126, em meio Sabouraud. cultura controle(A). cultura exposta ao cobre a 0,5 mM (B); 1,0 mM (C); 2,0 mM (D); 3,0 mM (E); 4,0 mM (F) e 5,0 mM (G)



A análise microscópica do crescimento de *A. niger* UCP/ WFCC 126, na diferentes amostras controle e tratadas com cobre permitiu a visualização da influencia do metal sobre a estrutura morfológica (Figura 2.2). Variações morfológicas das hifas foram observadas entre as culturas submetidas ao cultivo contendo diferentes concentrações de cobre.

Figura 2. 2 Micrografias de *A. niger* UCP/ WFCC 126, ampliação de 1000: cultura controle(A). cultura exposta ao cobre a 0,5 mM (B); 1,0 mM (C); 2,0 mM (D); 3,0 mM (E); 4,0 mM (F) e 5,0 mM (G) vezes.



Para a cultura controle, e aquelas submetidas a 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM e 3,0 mM observam-se hifas hialinas, septada e presença de conidióforo globoso, de espessura delgada, citoplasma apresentando-se homogeneamente claro e denso, e intensa presença de conidiósporos, figuras 2.2 A-D, respectivamente. O cultivo em presença do cobre nas concentrações de 4,0 mM e 5,0 mM induziu o surgimento de intensa septação nas hifas, percebendo-se também uma intensa granulação citoplasmática, apontado pela intensa



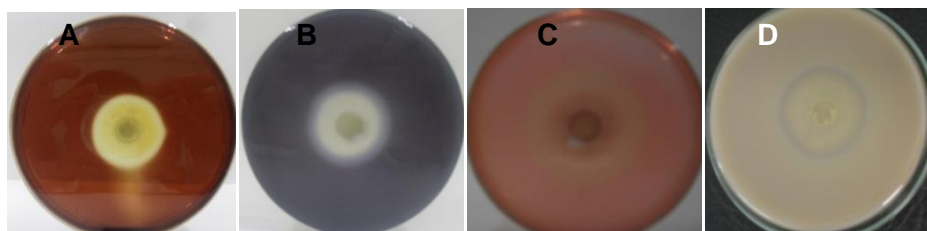
coloração das hifas, e presença de material depositado sobre a superfície externa das hifas, figuras 2.2 F e G.

### 2.3.2 Atividade enzimática

A determinação das atividades amilase, protease celulase e tanase, do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, cultivados em meio sólido por 96 h, na temperatura 28 °C, na ausência e presença de cobre nas concentrações de 0,5 mM a 5,0 mM, foi obtida pela medição direta do diâmetro médio do halo de degradação enzimática e o diâmetro médio da colônia, sendo expresso como índice enzimático (IE).

Macroscopicamente, as atividades enzimáticas são visualizadas como modificações da coloração e surgimento de zonas claras ao redor da colônia, halos de degradação, em contraste com a região escuro do meio conforme o protocolo de revelação utilizado. Os resultados estão apresentados na Figura 2.3 A-D, para protease, amilase, celulase e tanase, respectivamente

Figura 2. 3 Expressão da atividade enzimática de *A. niger* UCP/ WFCC 126, cultivado durante 96h a 28° C – atividade da protease(A); atividade da amilase (B); Atividade da celulase (C) e atividade da tanase (D).



Em primeiro lugar os dados revelam que o isolado é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono, utilizados como substratos indutores da expressão das enzimas avaliadas, como observado na cultura controle. Paralelamente, os resultados obtidos revelam o efeito do cobre sobre a expressão qualitativa das enzimas testadas.

As tabelas 2.3,2.4, 2.5 e 2.6 mostram as medições dos diâmetros das colônias, diâmetro dos halos de degradação e os índices enzimáticos (IE), obtidos respectivamente para as atividades celulase, amilase, protease e tanase do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, das culturas controle e expostas ao cobre.

Tabela 2.3 Atividade celulase do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, *niger* em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C

Amostras	Colônia	Halo	Índice
Controle	3,5 ± 0,6	5,1± 0,1	1,4 a*
0,5 mM	3,6 ± 0,3	5,3± 0,2	1,5 a
1 mM	3,8 ± 0,2	4,8± 0,6	1,3 a
2 mM	3,5	5,5± 0,3	1,6 a
3 mM	2,9 ± 0,1	5,1± 0,2	1,8 ab
4 mM	2,7	4,8± 0,1	1,8 ab
5 mM	1,6 ± 0,5	4,0± 0,2	2,4 bc

\*Os resultados foram dados pela média das triplicatas, \*\* Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente, segundo teste de Tukey a 5%

Tabela 2.4 Atividade amilase do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C

amostras	Colônia	Halo	Índice
Controle	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	1,0 a
0,5 mM	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	1,0 a
1 mM	4,3	4,5	1,0 a
2 mM	4,2 ± 0,2	4,7 ± 0,3	1,1 a
3 mM	4,0 ± 0,3	5,1 ± 0,2	1,3 a
4 mM	1,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1	1,6 a
5 mM	0,6 ± 0,2	2,5	4,2 b

Tabela 2.5. Atividade protease do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C

amostras	Colônia	Halo	Índice
Controle	4,3 ± 0,2	4,4 ± 0,1	1,0 a
0,5 mM	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,2	1,0 a
1 mM	4,2 ± 0,1	4,3 ± 0,2	1,0 a
2 mM	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	1,0a
3 mM	3,1 ± 0,1	3,9 ± 0,2	1,3 a
4 mM	2,8 ± 1,5	4,0 ± 0,1	1,4 a
5 mM	1,6 ± 0,5	3,8 ± 0,1	2,3 a

Tabela 2.6. Atividade tanase do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 126, em meio sólido, na ausência e presença de cobre, no intervalo de tempo (96 h) a 28°C

Controle	4,1 ± 0,1	4,8 ± 0,2	1,2 a
0,5 mM	4,0 ± 0,1	4,7 ± 0,2	1,2 a
1 mM	3,8 ± 0,1	4,7 ± 0,2	1,2 a
2 mM	3,8	4,5 ± 0,1	1,2 a
3 mM	3,7 ± 0,1	4,4 ± 0,1	1,2 a
4 mM	2,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,3 a
5 mM	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,3 a

\*Os resultados foram dados pela média das triplicatas, \*\* Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente, segundo teste de Tukey a 5%

Os resultados apresentados indicam que o isolado de *Aspergillus niger* obtido do solo da caatinga exibe atividade das enzimas testadas, determinadas através do halo de degradação dos substratos utilizados. A enzima de maior expressão no isolado foi a celulase, seguida da tanase, amilase e protease. Em relação à presença de cobre no meio de detecção da atividade enzimática, percebeu-se que com o aumento da concentração de cobre ocorreu uma redução no halo de degradação das enzimas testadas. Os maiores índices foram também observados para a celulase nas amostras tratadas, seguida da tanase, amilase e protease. Com a aplicação do teste de Tukey para as médias dos índices enzimáticos, foi possível determinar diferença significativa ao nível de p % 0,05 para a atividade da enzima celulase nas culturas submetidas a 3mM, 4,0 mM e 5,0 mM de cobre e para a amilase nas culturas expostas a 5,0 mM em relação à cultura controle.

## 2.4 DISCUSSÃO

Os efeitos da concentração de metais pesados no meio ambiente têm sido relatados em diversos estudos. Tais estudos revelam os efeitos adversos dos íons metálicos sobre os seres vivos, especificamente sobre a microbiota do solo, reduzindo o número e a atividade dos micro-organismos, o que por sua vez acarreta grandes perdas de áreas de ecossistemas nativos ou de uso humano. A maior preocupação em relação aos metais pesados reside na propriedade de acumulação nos ambientes, o que permitiria e facilitaria o seu transporte pelos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (TSEKOVA; DENTCHEV 2001; LEVINSKAITÉ 2001;

KAVAMURA; ESPOSITO 2010). Embora o cobre seja um metal essencial para o metabolismo celular, níveis elevados podem acarretar efeitos tóxicos, que podem culminar com a diminuição do crescimento e, em algumas circunstâncias a perda da viabilidade (GADD; RAVEN, 2010).

Como biodegradadores naturais, os fungos utilizam macromoléculas insolúveis e de grande peso molecular, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídios através da secreção de enzimas para o meio exterior. Assim, algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, os tornam potencialmente melhores degradadores do que as bactérias (GADD; RAVEN, 2010).

Dessa forma, diversos autores têm enfatizado o valor incalculável da biodiversidade ambiental, nos diferentes nichos ecológicos, como fonte de bens e serviços da inovação biotecnológica, devendo ser, a biodiversidade, considerada um recurso estratégico para o desenvolvimento sustentável (LI et al., 2012; SANCHEZ; DEMAIN, 2011).

Entre os fungos, a espécie *Aspergillus niger* é uma fonte de extrema utilidade para bioprocessos ambientais e industriais, sendo altamente cosmopolitas. As habilidades da espécie revelam o papel do organismo em processos ambientais, pelo envolvimento de seus metabólitos na degradação de biomassa vegetal e sua conversão em açúcares e em processos de defesa e resistência/tolerância em condições ambientais adversas, como na presença de xenobióticos (BENNET, 2010). Apresenta vantagens como facilidade de manuseio, habilidade de fermentar inúmeras fontes de materiais como substratos e gera altos rendimentos de metabólitos, sendo considerado um micro-organismo GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos (SCHUSTER et al., 2002; RODRIGUES *et al.*, 2009). Por isso, está entre os fungos de maior aplicação industrial. A espécie é utilizada, industrialmente, para a produção de ácidos orgânicos, como cítrico, glucônico, málico, enzimas extracelulares como protease, celulase, amilases, xilanase, glucoamilase e poligalacturonase (BENNET, 2010).

Neste estudo, o isolado de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, obtido do solo da caatinga, foi capaz de crescer em altas concentrações de cobre, os dados do crescimento radial revelam redução da expansão radial, como resultado da presença do metal e de sua concentração. Verificou-se que a incorporação do cobre no meio de cultivo diminuiu a capacidade de assimilação do substrato em relação à cultura controle, tendo como consequência menores velocidades de crescimento. Os dados revelaram um comportamento linear, o que poderia auxiliar na previsibilidade do crescimento nas concentrações utilizadas.

As características morfológicas, avaliadas macroscopicamente e microscopicamente, exibiram efeitos decorrentes das concentrações de cobre sobre o micro-organismo. Adicionalmente, as células em resposta a concentrações elevadas de sulfato de cobre apresentaram alterações morfológicas, como redução e espessamento das hifas e intensa ramificação, além da diminuição de esporulação, proporcionais à concentração.

Metabolicamente, a redução do crescimento celular resulta do fato de que as células reduzem os gastos energéticos para o crescimento, ativando processos direcionados para a sobrevivência em um ambiente com condições diferenciadas, como exposição à xenobióticos (GADD; RAVEN, 2010). Assim, variações no padrão de crescimento celular de eucariotos e procaríotos são citadas como efeitos induzidos pelo contato com metais. A intensidade das respostas está, via de regra, associada ao tempo de contato e a concentração do metal. Tais modificações podem estar relacionadas a alterações na estrutura da permeabilidade da membrana citoplasmática, produzindo progressiva alteração de forma e perda de atividade metabólica, resultando na redução e inibição do crescimento (KUMAR; PRASAD, 2004; MALIK, 2004)

Alterações morfológicas a exposição de altas concentrações de cobre como encurtamento de hifas, intensa septação, redução de esporulação foram citadas em *Mucor rouxii* (GARDEA-TORRESDAY et al., 1997). Tsekova, K.; Dentchev, (2001) também demonstraram a influencia de altas concentrações de cobre no crescimento e morfologia de *Aspergillus niger*, analisando também as mesmas alterações sobre o aspecto do crescimento da colônia em placas.

As enzimas microbianas estão entre os produtos de maior relevância na biotecnologia moderna, como resultado de sua capacidade de catalisar um grande número de reações em meios não convencionais, tais como solventes orgânicos, alta eficiência de conversão, seletividade, catálise sem geração de produtos tóxicos ou poluentes, além da economia de água e energia (LI et al., 2012; ALEWELL, 2012).

As enzimas extracelulares citadas proporcionam substratos para o crescimento dos fungos através da hidrólise de polímeros e também importantes metabólitos secundários. Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um micro-organismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Os atributos que distinguem os fungos filamentosos das outras formas microbianas apontam seu potencial de tolerância e resistência a altas concentrações de produtos tóxicos no microambiente externo. Apresentam, ainda, uma capacidade de sobrevivência em meios com baixa atividade de água maior do que as bactérias

e leveduras, propriedade esta que os apontam como os mais apropriados para trabalhar em condições de baixa umidade relativa. Sendo relevante a busca e o isolamento de linhagens microbianas aptas a serem utilizadas em processos industriais de bioconversão. As enzimas amilases, proteases, celulasas e tanases desempenham importantes papel em vários processos ambientais e industriais (BON et al., 2008; GADD; RAVEN, 2010; RAO et al., 2010). São usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase), de detergentes (celulase, protease), alimentícia (celulase, amilase, protease), de papel e de couro (protease, tanases), sendo de extrema importância estudos associados à busca e caracterização de isolados nativos com potencial produtor.

Considerando as habilidades de secreção, vários relatos expressam a atividade de enzimas extracelulares de *Aspergillus niger*. A espécie é amplamente avaliada em seu potencial industrial e biotecnológico para produção de amilases, celulasas, proteases, dentre outras. O interesse maior reside na formulação de meios de cultivo que induzam aumento nas atividades (GHORAL, 2009; CRUZ et al., 2011; RAMOS et al., 2011).

Nesse estudo, a habilidade de secretar amilase, protease, celulase e tanase, foi investigada. O isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261, foi cultivado em presença de substratos específicos, o que também revelou sua habilidade de assimilação de fontes de carbono além da glicose.

A atividade de todas as enzimas testadas foi observada no isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261, através da produção de halos de degradação dos substratos, determinando-se o índice enzimático, que expressam a habilidade de produzir e secretar enzimas, e compõem uma escala arbitrária que pode ser aplicada em função de níveis de habilidades de secreção. Atividades são consideradas como moderadas, quando os índices correspondem a valores maiores ou iguais a 1; atividade forte, aquelas cujos índices são superiores a 2. A avaliação das culturas controle permitiu verificar que o isolado apresentou maior potencial de secreção para a celulase, seguido da tanase, amilase e protease, como determinado pelo nível de degradação do substrato específico, sendo considerado um produtor moderado. Quando cultivado em presença de cobre, o isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261, apresentou aumento dos halos de degradação nas concentrações acima de 3 mM para todas as enzimas em relação ao controle. Os valores dos índices enzimáticos demonstraram variações significativas para a celulase e amilase. A relação entre crescimento e halo de degradação, revela que, embora o diâmetro da colônia tenha sido reduzido, de forma proporcional com a concentração do sulfato de cobre, o isolado foi capaz de secretar as enzimas. Diferenças nos perfis enzimáticos

demonstraram que o aumento da concentração de cobre no meio de cultivo induziu uma variação da resposta enzimática. Os resultados indicaram que maior atividade enzimática nos diferentes substratos foram obtidas com adição de 5mM de cobre. Os resultados apresentados revelaram que as enzimas extracelulares poderiam permanecer ativas em concentrações de metais pesados que inibem o crescimento micelial.

Existem várias metodologias para determinação da atividade enzimática, semiquantitativa, por difusão radial em meio sólido. Os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos micro-organismos (CESKA, 1971; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; VAN BELLEN, 2002). LEALEM & GASHE (1994), recomendam um valor do índice de atividade enzimática  $\geq 2,0$  para mostrar a habilidade do micro-organismo em degradar em meio sólido.

A habilidade de ciclagem de nutrientes depende de processos que são mediados por enzimas. Tem sido demonstrado que a biomassa microbiana e atividades enzimáticas diminuem com o aumento da poluição de metais pesados (WHITE et al., 1997; VALIX e LOON, 2003; ZAFAR et al., 2007). As enzimas produzidas no ambiente extracelular enfrentam muitas vezes altas concentrações de metais, uma vez que não são protegidos por mecanismos de desintoxicação associados à célula. Alguns estudos demonstram os efeitos da contaminação do solo por metais pesados, incluindo cobre na atividade de enzimas extracelulares de fungos e bactérias (CHAPERON; SAUVÉ, 2008; GADD, 2010; COCU et al., 2012).

Adicionalmente, a presença de metais pesados como contaminantes afetam as propriedades bioquímicas microbianas que são necessárias para o funcionamento do ecossistema, e tais atividades podem ser utilizadas como ferramentas para monitorar modificações ambientais induzidas pelas atividades antropogênicas (DOELMAN; HAANSTRA, 1994; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004, SILVA; ESPOSITO, 2004 ).

Para alguns autores, os estudos de avaliação da atividade enzimática *in vitro* representam uma ferramenta útil na triagem de vários agentes poluentes, sendo utilizados como métodos de análise semiquantitativa de poluentes orgânicos e metais pesados (WALZ; SCHWACK, 2007).

Assim, os resultados deste estudo apontam os efeitos do cobre sobre a atividade das enzimas extracelulares secretadas pelo isolado obtido do solo da caatinga. Tais informações são úteis na revelação de isolados com potencial de tolerância para continuar metabolizando e crescendo em ambientes contendo metais pesados em altas concentrações. Tal potencial

revela que o isolado seria capaz de continuar sua função enzimática envolvida na ciclagem do carbono.

## 2.5 CONCLUSÕES

Foi verificado que o isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261, mostrou-se tolerante a altas concentrações de cobre, sendo capaz de crescer em concentrações de até 5,0 mM. Contudo, o crescimento em presença de cobre resultou na variação da velocidade de crescimento das hifas;

O cobre induziu o surgimento de modificações macroscópicas e microscópicas;

O crescimento do isolado em meios para detecção de atividade enzimática permitiu demonstrar a habilidade de utilização de fonte de carbono como amido, gelatina, ácido tânico e carboximetilcelulose como fontes de carbono;

O isolado foi capaz de secretar enzimas celulase, amilase, protease e tanase, sendo considerado um produtor moderado. Na presença do metal, concentrações acima de 3, mM, induziram variações significativas na atividade e produção da celulase. Para a amilase, efeitos foram determinados na concentração de 5 mM;

Os dados apresentados, além de ampliarem o conhecimento acerca da biodiversidade fúngica da caatinga, revelam o potencial biotecnológico e ambiental do isolado *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261, apresentando sua habilidade metabólica que pode ser explorada como ferramenta em estudos ambientais mais profundos acerca de sua tolerância a altos níveis de sulfato de cobre, bem como biocatalisador com propriedades promissoras na produção de enzimas.



## 2.6 REFERÊNCIAS

- ALLEWELL N. M. Thematic minireview series on enzyme evolution in the post-genomic era.. *Journal of Biological Chemistry*. v. 287: p. 1-2. 2012.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors); *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*. Linton, UK: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.
- BIONDI, C.M., *et al.* Teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co em solos de referência de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. v. 35, n. 1, p.057-066, 2011.
- BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. *Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p.
- CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. *European Journal Biochemistry*, v.22, p.186-192, 1971.
- CHAPERON, S., SAUVE', S. Toxicity interactions of cadmium, copper, and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* . v.70, p. 1–9. 2008.
- COCU M., *et al.* The influence of nickel(II) and copper(II) coordination compounds based on benzoylacetone S-methylisothiosemicarbazone on enzymatic activity of micromycete *Aspergillus niger* *Revue Roumaine de Chimie*. v. 57, n. 1, p. 15-21, 2012.
- CRUZ, E.A., *et al.* Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. Unopar Científica. *Ciências Biológicas e Saúde*. v.13, n. 4, p. 245-249, 2011.
- DOELMAN P. & HAANSTRA L. Effects of heavy metals in soil microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, v. 17, p. 177-184, 1994.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004.
- GABIATTI JR., C., *et al.* Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediations. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v.49, p.29-34. 2006.
- GADD, G. M.; RAVEN, J. A. Geomicrobiology of Eukaryotic Microorganisms. *Geomicrobiology Journal*. v.27, p. 491-519. 2010.

- GARCIA, I.G. *et al.* Removal of phenol compounds from olive Mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 751-758, 2000
- GARDEA-TORRESDEY J.L. *et al.* Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* v.16, n. 3, p.435-441, 1997.
- GHORAI, S. *et al.* Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*. v. 42, p.577–587, 2009.
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v.67, p.597-607, 1975.
- KAVAMURA, V. N.; ESPOSITO E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals, *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 61–69, 2010.
- KUMAR, G. P.; PRASAD, M. N. Cadmium toxicity to *Ceratophyllum demersum* L.: morphological symptoms, membrane damage, and ion leakage. *Bulletin of Environmental Contamination. Toxicology*. v. 72, n.5, p. 1038-45. 2004.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A.. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). *Journal of Applied Microbiology*, v. 77, n. 3, p.348-352, 1994.
- LEVINSKAITÉ , L. Effect of copper sulphate on assimilation of various substrata by soil fungi. *Development*, v. 1, p.5-15, 2001.
- LI, S., *et al.* Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. v. 2, p. 2012-1017. 2012.
- MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells, *Environment International*, v.30, p.261-278, 2004.
- RAMOS, J. A T., *et al.* The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microbial Cell Factories*, v.10, p.78 -88, 2011.
- RODRIGUES, A. B. C., *et al.* Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*, 2009.

- SANTOS, V.L.; LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potencial. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1001-1006, 2004.
- SCHUSTER, E., *et al.* On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 59. p. 426-435, 2002.
- SILVA, M.; ESPOSITO, E. 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental. 337-378.
- SNEL, M.; BOT, A. “Some suggested indicators for land degradation assessment of drylands”. In: *Land Degradation Assessment of Drylands-LADA*, International Electronic Mail Conference, accomplished in October, 09, November, 11, 2002.
- TSEKOVA, K. and DENTCHEV, D. Effects of Copper on the Growth and Glucoamylase Activity of *Aspergillus Niger D-IV-8 Acta Agriculturae Serbicae*, v. 6, n. 12, p.37-42, 2001.
- VALIX, M; LOON, L. O. Adaptative tolerance behavior of fungi in heavy metals, *Minerals Engineering*, v. 16, p.193-198, 2003.
- VAN BEILEN, J.B. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 338-344, 2002.
- VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 65, 497–522, 2001
- WALZ, I., & SCHWACK, W. Multienzyme inhibition assay for residue analysis of insecticidal organophosphates and carbamates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 26, p.10563-10571, 2007.
- WHITE, C.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: key biogeochemical processes for treatment of contamination, *FEMS Microbiology Reviews*, v.20, p.503-516,1997.
- ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAB, I. Metal tolerance and biosorption potencial of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil, *Bioresource Technology*, v.98, p.2557-2561,2007.

## **CAPÍTULO III**

## **TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR COBRE EM *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261**

Marcos Antônio Cavalcanti Luna<sup>1</sup>, Patrícia Mendes de Souza<sup>2</sup>, Kaoru Okada<sup>3</sup> Aline Elesbão do Nascimento<sup>3\*</sup>

1. Mestrando Programa Desenvolvimento de Processos Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Recife – PE;
2. Pós-Graduanda, Universidade Católica de Pernambuco, RE – PE;
3. Universidade Católica de Pernambuco - Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, RE – PE.

\* Autor para correspondência: e-mail: elesbão@unicap.br

Tel.: 55 081- 2119 4017; Fax: 55 081- 2119 4050.

## RESUMO

Os efeitos da exposição ao cobre, sobre o perfil de crescimento: produção de biomassa, proteínas totais, polifosfato e pH, atividade das enzimas: catalase, glutatiiona S transferase, glutatiiona peroxidase, peroxidase, peroxidação de lipídeos, fosfatases ácida e alcalina, aspectos ultraestruturais e capacidade de remoção do metal pelo fungo *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 1261, obtido de solo da caatinga, foram avaliados. Todos os parâmetros testados foram influenciados pela concentração inicial do metal no meio de cultivo. A presença do metal induziu aumento na atividade das enzimas antioxidantes, incluindo a peroxidação de lipídeos, revelando o surgimento de resposta ao estresse oxidativo. A variação dos níveis de polifosfato apontam o papel do polímero em resposta ao estresse induzido pelo cobre. As atividades das fosfatases também foram positivamente influenciadas com o cultivo na presença do cobre. Alterações na superfície celular, eletrondensidade, espessura e septação foram visualizadas em células expostas a crescentes concentrações do metal. A remoção de metais das culturas expostas a 0,5 mM , 1 mM e 2 mM de cobre exibiu percentagens de remoção equivalente a 75,78 % , 66,04 % e 33,51 %. Os resultados indicam que o isolado avaliado foi capaz de crescer em altas concentrações de cobre, apresentando mecanismos de adaptação e tolerância à presença do cobre no meio de cultivo, assim como e eficiência de remoção deste metal. Tais dados são fundamentais para a compreensão das habilidades celulares de isolados nativos, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de bioprocessos nas áreas ambiental e industrial.

Palavras chave: *Aspergillus niger*; cobre; estresse oxidativo; polifosfato; ultraestrutura.

## ABSTRACT

The effects of copper sulphate exposure, during growth, on the biomass production, catalase, glutathione S transferase, glutathione peroxidase, peroxidase, polyphosphate, acid and alkaline phosphatases, ultrastructure and ability to remove the metal of *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261, obtained from caatinga soil were evaluated. All parameters tested were influenced by the initial metal concentration in culture medium. The metal presence induced high levels of antioxidant enzymes, including lipid peroxidation, revealing the appearance of oxidative stress response. The variation in polyphosphate levels indicate the polymer participation in response to stress induced by copper. The activities of the phosphatases were positively influenced by growing in the presence of copper. Ultrastructural changes in cell surface, electron density, thickness, and septation were visualized in cells exposed in crescent metal concentrations. The isolate was able to remove the agent from the growth medium, keeping its physiological functions. The results indicate that the isolate was able to grow in high concentrations of copper, activating mechanisms for adaptation and tolerance in presence of copper added to culture medium, and high efficiency to remove the agent. Such data are fundamentals to understanding the cellular and molecular abilities of native isolates, which can be used to develop bioprocesses in environmental and industrial areas.

**Key words:** *Aspergillus niger*; copper; oxidative stress; polyphosphate; ultrastructure.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são elementos químicos que fazem parte do grupo dos elementos vestigiais (*trace elements*). Tais elementos são naturalmente encontrados em quantidades baixas nos solos, plantas e águas. Quimicamente, os metais pesados são definidos como um grupo de elementos que possuem densidade superior a 4,0 g/cm<sup>3</sup> estando classificados na tabela periódica entre o cobre e o chumbo e pelo menos 20 metais são classificados como tóxicos sendo que a metade destes são emitidos para o meio ambiente em quantidades que representam riscos para os sistemas vivos, incluindo os humanos (ATKINS, 2001; JARUP, 2009; GADD, 2009; ATSDR, 2008).

Alguns metais como o Cd, Hg e Pb são considerados não essenciais, uma vez que não desempenham função metabólica, enquanto que Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Ni e B são nutrientes essenciais para os sistemas vivos, como constituintes de moléculas orgânicas ou desempenhando funções específicas no metabolismo, indispensáveis ao normal desenvolvimento celular (GADD, 1992, 1993; 2010).

No que diz respeito à toxicidade, tanto os elementos não essenciais, quanto os essenciais podem induzir o surgimento de efeitos tóxicos quando em níveis elevados. Tais elementos têm a propriedade de não serem degradados, o que resulta no aumento de sua concentração nos diferentes ambientes naturais, e em consequência nas cadeias tróficas. Assim, os metais pesados estão entre os poluentes de maior relevância e preocupação no mundo atual (HALL, 2002; GADD, 2010).

Em geral o nível da concentração dos metais no meio ambiente está associada à localização geográfica, sendo verificado o aumento do nível toxicidade, em locais próximos as atividades industriais e de mineração. Nestes locais, plantas e animais das proximidades podem absorvê-los e acumular em seu organismo (bioacumulação), provocando graves intoxicações ao longo da cadeia alimentar (CALLENDER, 2007; ATSDR, 2008; JARUP 2009; SIMEONOV et al., 2011).

A presença desses elementos em altas concentrações representa um grave risco ecológico, por causar da deterioração da qualidade do ar, do ambiente, e das águas subterrâneas e superficiais, e de saúde. A toxicidade dos metais, depende de diversos fatores: natureza do metal, forma tóxica existente, biodisponibilidade, solubilidade, mobilidade, taxa de acumulação nos seres vivos, local de acumulação, posição do organismo na cadeia alimentar, entre outros. A sua biodisponibilidade está relacionada tanto à sua associação com outras partículas, taxa de captação e eliminação. Já a sua toxicidade



é o resultado entre os efeitos diretos, a níveis celulares e moleculares, e a capacidade adaptativa do organismo frente a este poluente (GADD, 2010).

Um dos efeitos da toxicidade dos metais pesados, bem como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), bifenis policlorados (PCB), pesticidas organoclorados (e.g. DDT, Dieldrin) e organofosforados (e.g. Malathion), e outros produtos químicos/orgânicos, como agentes com potencial oxidante (JARUP, 2003; MENEZES et. al, 2007; REGINATTO, et al 2012), é a formação e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (BELLION, 2005). As espécies reativas de oxigênio (EROs): oxigênio *singlet*  $^1\text{O}_2$ , o ânion superóxido  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , o peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o radical hidroxila  $\text{HO}^\cdot$ , interagem com moléculas, alterando sua estrutura ou atividade metabólica, resultando na oxidação de proteínas e ácidos nucleicos e peroxidação de lipídeos. Fato interessante é que tais processos também resultam de atividades celulares normais e como consequência, as células e organismos vivos desenvolveram sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Alterações relacionadas ao ataque de ERO podem ser causadas por sua excessiva formação e/ou ineficiência em sua interceptação pelas defesas antioxidantes, gerando o chamado estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007; JOMOVA e VALKO, 2011).

As consequências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade. Os efeitos são: proliferação celular, algumas células podem responder ao estresse oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular; adaptação, aumento das defesas celulares, como catalase, superóxido dismutase e glutathione, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida. Além disto, os alvos de dano oxidativo podem ser redirecionados, ou ainda, a produção basal de ERO pode ser reduzida; dano celular: pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, etc. Em casos de dano menor, a célula pode sobreviver com algum dano oxidativo persistente e irreparável, ou ainda promover o seu reparo.; senescência: sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometida e morte celular: após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular. Danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Logo, a quantificação de danos oxidativos e os níveis de defesas contra danos celulares, têm o potencial de serem usados como ferramentas moleculares e celulares fundamentais para a compreensão dos mecanismos utilizados pelos sistemas vivos para sobrepor os efeitos letais de xenobiontes, incluindo os metais pesados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007; JOMOVA e VALKO, 2011).

Micro-organismos como eficientes ferramentas de ciclagem biogeoquímica exibem, ainda, outros mecanismos para lidar com metais pesados. Dentre esses, são citados: mecanismos externos – que atuam na restrição da absorção e do transporte do metal, sendo substâncias e moléculas presentes na superfície celular ou produzidas e excretadas e que atuam no sequestro e exclusão dos metais por absorção seletiva e retenção, impedindo sua entrada na célula; e os mecanismos internos de tolerância, incluem estratégias de imobilização, complexação e compartimentação no interior da célula. Em função do tipo de metal pode ocorrer a produção de ligantes, que atuam na quelatação dos metais: ácidos orgânicos (como o cítrico e o málico), aminoácidos livres (como a prolina e a histidina) e peptídeos, e polifosfatos (HALL, 2002; (BELLION, 2005; RAO, et al 2010).

Os estudos sobre a resposta ao tratamento com metais permite a obtenção de informações acerca dos efeitos tóxicos, efeitos em funções biológicas, bioquímicas, fisiológicas e estruturais dos sistemas vivos, com vistas a geração de mecanismos para a proteção dos sistemas vivos e remoção de metais do meio ambiente. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar os efeitos do cobre sobre o crescimento, proteínas totais, sistema antioxidante enzimático, peroxidação de lipídeos, polifosfato, fosfatases ácida e alcalina, ultraestrutura e potencial de remoção do metal utilizando um isolado de *A. niger* UCP/ WFCC 126, obtido do solo da caatinga.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

**3.2.1 Micro-organismo e condições de cultivo** – O micro-organismo *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 126, isolado do solo da Caatinga mantido no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco foi selecionado para estudo do crescimento em diversas concentrações de cobre. O isolado foi mantido em Batata Dextrose Agar (BDA) a 5° C. Para a produção do pré-inóculo, o isolado *Aspergillus niger* foi repicado em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubado a 28° C por 7 dias.

### 3.2.2 Solução Metálica

Para o preparo da solução estoque 100 mM de íons de  $\text{Cu}^{2+}$  foi preparada dissolvendo-se 24,968 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre), em 1 L de água destilada. A partir da solução padrão estoque, foi preparada as soluções de trabalho 0,5mM; 1mM e 2mM de cobre utilizadas nos experimentos.

**3.2.3 Determinação da curva de crescimento** – Pré-inóculos correspondentes a 5% de suspensão esporica da cultura de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, foram inoculados em frascos

de Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de meio Sabouraud líquido contendo Sulfato de cobre, preparado em água destilada e deionizada, nas concentrações 0,5mM; 1mM; e 2mM no pH 5,0 e incubados a 28°, sob agitação de 150 rpm durante 15 dias. As amostras controle foram crescidas na ausência do metal. O micélio coletado durante os intervalos de cultivo citados foram submetido ao processo de liofilização, sendo, posteriormente mantido em dessecador à vácuo até peso constante. A média do peso seco em triplicata foi utilizada para estabelecer o gráfico correspondente à curva de crescimento.

### **3.2.4 Determinações Bioquímicas**

**3.2.4.1 Consumo de Glicose** – Amostras correspondentes aos sobrenadantes de culturas cultivadas em meio Sabouraud, controle e tratadas serviram para determinação do consumo de glicose no meio. A glicose foi dosada através do método enzimático-colorimétrico (Lab-Test), que se fundamenta na oxidação enzimática da glicose, presente nas amostras, pela enzima glicose oxidase. Após a reação é formado um complexo cromógeno vermelho-cereja cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose, que pode ser determinada por leitura da absorbância a 510 nm. Foi elaborada uma curva padrão utilizando a solução de glicose (0,5 – 5,0 g/mL) (Henry et al., 1974). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital (Spectronic Mod. Genesys 2)

**3.2.4.2 Determinação do pH** - As variações de pH dos meios de cultura foram acompanhadas ao longo do crescimento. O valor do pH em cada ponto do intervalo correspondeu à média de três aferições. Posteriormente, uma curva de pH foi estabelecida com esses valores.

**3.2.4.3 Extração e determinação de proteínas totais** – Amostras de micélio de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, coletadas nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias de cultivo, foram coletadas e lavadas em tampão salina fosfato, pH 7,2 por três vezes para retirada de resíduos. Amostras de 10 mg de micélio foram liofilizadas e submetidas ao processo de extração com uso do tampão uréia/ácido tricloroacético. Inicialmente as amostras foram incubadas em 0,5 ml de ácido tricloroacético a 10%, durante cinco minutos, a temperatura ambiente, lavadas três ves com acetona 90% e deixadas a secar ao ar. Posteriormente, as amostras foram incubadas em 0,2 mL de tampão contendo 1% de SDS, 9M de uréia, 25 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1 mM de EDTA e 0,7 M de mercaptoetanol. A amostra foi mantida sob agitação, fervida por dois minutos, agitada novamente e fervida por mais um minuto. As amostras foram submentidas à quantificação através do método de biureto (LOWRY, 1951), que se baseia no princípio de que os íons cobre em meio alcalino (reagente de biureto) irão interagir com as ligações peptídicas das proteínas, formando cor púrpura, que tem absobância a 545 nm, sendo proporcional à concentração das proteínas na amostra.

**3.2.4.4 Preparação das amostras para determinação das enzimas oxidativas** - Amostras de 1 g de micélio, coletado nos intervalos de 3, 6, 9 12 e 15 dias foram coletadas por filtração, lavadas com água deionizada e homogeneizadas com uma solução contendo cloreto de potássio 1,15% fluoreto de fenil metil sulfanila (inibidor de proteases) na concentração de 100 mM em isopropanol. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas por 10 minutos, a 3000 rpm em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a determinação das atividades enzimáticas antioxidantes e peroxidação de lipídeos.

**Catalase (Cat)** - A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa "afinidade", permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). A atividade foi determinada pela velocidade de consumo da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no primeiro minuto da reação, 240nm ( $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (AEBI, 1984). É descontado ainda o desaparecimento do peróxido de hidrogênio sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 40 segundos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,012% de Triton X-100. Como substrato iniciador utiliza-se 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A absorbância basal é descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. Aos dados foram expressos como U./mg de proteína. As proteínas foram dosadas pelo método de biureto (LOWRY, 1951).

**Glutathione-S-transferase (GST)** - A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm ( $\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABIG & JAKOBY, 1981). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 5 minutos foi realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH. Como substrato iniciador foi utilizado 1 mM de CDNB. A absorbância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. Aos dados foram expressos como U./mg de proteína. As proteínas foram dosadas pelo método de biureto (LOWRY, 1951).

**Glutathione peroxidase (GPx)** - Acompanhada indiretamente pelo desaparecimento do NADPH. A enzima, ao utilizar GSH para degradar um peróxido orgânico, como o peróxido de t-butil (t-BOOH) ou de cumeno, gera glutathione oxidada (GSSG), que por sua vez, é reduzida pela glutathione redutase, adicionada ao meio de reação, com o consumo de NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Este consumo de NADPH é acompanhado espectrofotometricamente em 340nm, similar à determinação da glutathione redutase (WENDEL, 1981). Desta velocidade de consumo é descontado o consumo basal de NADPH, obtido pela leitura do ensaio enzimático sem a presença do substrato (peróxido). O

ensaio enzimático de 5 minutos é realizado em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA 0,5 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH e 0,2 U/ml de GR purificada de levedura. É necessário 5-10 minutos de incubação com os reagentes (exceto substrato iniciador) para a ativação da enzima. Como substrato iniciador utiliza-se 1 mM de CuOOH (Hidroperóxido de cumeno). Aos dados foram expressos como U./mg de proteína. As proteínas foram dosadas pelo método de biureto (LOWRY, 1951).

**Peroxidase** - A presença de atividade de peroxidase foi determinada de acordo com a metodologia de Halpin *et al.* (1989), utilizando pirogalol e peróxido de hidrogênio como substratos. As amostras (0,1 mL para cada medida de atividade) foram submetidas a reação com 0,5 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mmol L<sup>-1</sup>) e 1,0 mL de solução de pirogalol (12,69 mmol L<sup>-1</sup>) em 1,4 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0. A leitura da atividade foi feita a 420 nm, após 1 min de reação. A atividade enzimática foi medida em unidades de enzima mg<sup>-1</sup> de proteína. As proteínas foram dosadas pelo método de biureto (LOWRY, 1951).

**3.2.4.5 Peroxidação de Lipídeos** - A lipoperoxidação foi estimada pelo método de TBARS (DRAPER & HADLEY, 1990) com algumas modificações. O método utilizado tem como princípio básico a formação de um pigmento vermelho-róseo composto por duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) e uma de malondialdeído (MDA). Uma alíquota (100 µl) da amostra foi adicionada a 1 ml de solução contendo 400 µl de tampão ácido acético 1,3M, HCl, 0,27 M, pH 3,4, 400 µl de TBA 0,8% e 200 µl de sódio dodecil sulfato - SDS 8,1%. A mistura foi incubada a 95 °C por 60 minutos. A reação de MDA com o TBA produz um cromóforo que pode ser medido fotometricamente a 532nm. Os dados foram expressos em nmol/mg de proteína. As proteínas foram dosadas pelo método de biureto (LOWRY, 1951).

**3.2.4.6 Extração e dosagem de polifosfato total** – O polifosfato total foi extraído e dosado segundo o método descrito por Mcgranth e Quinn (2000). Amostras de 10 mg de micélio (peso seco), obtidas no meio de incubação, durante os intervalos de cultivo do fungo, foram coletadas e lavadas duas vezes em solução de NaCl 1,5 M contendo EDTA 0,01 M e NaF 1mM. Em seguida, foram colocadas na solução de lavagem e sonicadas, em gelo por 12 períodos de 2 minutos com intervalos de 1 minutos em 16 KHz. O extrato resultante foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4°C para remover os fragmentos celulares. Para determinar o conteúdo do polifosfato celular total, 100ul de HCl concentrado foi adicionado a 0,5ml do extrato celular e aquecido a 100°C por 45 minutos. O fosfato liberado foi dosado utilizou-se o método colorimétrico (Fiske-Subbrow, 1925), que se baseia na reação do fósforo inorgânico com o molibdato de amônio em meio ácido, resultando em um complexo fosfomobdato de cor azul, quantificado espectrofotometricamente a 600 nm, e cuja

intensidade é diretamente proporcional à concentração do fósforo. Uma curva padrão foi elaborada, utilizou-se uma solução de fósforo (0,5 – 5,0 mg/dL). As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro digital, Spectronic, modelo Genesys 2. A concentração do polifosfato foi expressa em miligramas de fósforo por decilitro, e dadas como médias de triplicatas. Uma amostra não hidrolisada foi utilizada como um controle para determinar o nível de fosfato livre da célula. O polifosfato total é expresso em miligramas por grama de biomassa.

**3.2.4.7 Atividade das fosfatases ácida e alcalina** - Para determinar da atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina em meio de cultivo, alíquotas do sobrenadante do líquido metabólico e biomassa foram coletadas nos intervalos de 3, 6, 9, 12, e 15 dias de cultivo. Amostras de 36 mg de micélio (peso úmido) oriundas do meio com e sem cobre foram coletadas nos intervalos de 3, 6, 9, 12, e 15 dias de cultivo, e posteriormente lavadas com água deionizada e incubadas em 3ml de solução extratora composta de tampão acetato de sódio 0,02M, pH 4,5, para fosfatase ácida e para a fosfatase alcalina tampão Tris – HCL 50 mM, pH7,5, contendo 5% de glicerol. As amostras foram maceradas através de almofariz e pistilo por 5 minutos e em seguida homogeneizadas por 2 minutos, em gelo.

O extrato resultante foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4°C para remover os fragmentos celulares.

Para a determinação da atividade enzimática, nos extratos celulares utilizou-se o Kit Lab-Test foram coletadas e submetidas a determinação espectrofotométrica com utilização dos Kits Lab-Teste, que se fundamentam na hidrólise enzimática da timolftaleína monofosfato liberando a timolftaleína liberada na sua forma azul, em diferentes valores de pH. A cor resultante da reação é diretamente proporcional a concentração da enzima, sendo medida a 590 nm. Os valores obtidos foram das concentrações foram dados na Unidade Internacional (U.I.), que corresponde a quantidade de enzimas que catalisa o desdobramento de 1µmol de substrato/minuto/litro da amostra. A atividade intracelular das enzimas foi determinada com a utilização do método descrito por JOH et. al 1996.

**3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura** - A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com ferramenta para examinar superfície dos micélios das culturas controle e expostas as diferentes concentrações de sulfato de cobre, após 3 e 15 dias de contato. O micélio foi coletado após centrifugação e filtração, lavado duas vezes com tampão salina fosfato, pH 7,2, e fixado com tampão cacodilato 0,1M, contendo glutaraldeído 2,5%, pH 7,2. Após 3 horas, o micélio foi lavado duas vezes com tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. As amostras foram pós-fixadas em tampão cacodilato 0,1M, contendo verde malaquita 0,05%, por duas horas, no escuro. Seguiu-se lavagem em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, glutaraldeído 2,5%, pH 7,2. O micélio foi desidratado em etanol (v/v): 50%, 70%; 90% e

100%. Os micélios foram então montados em suportes metálicos, observados e fotografados em microscópio de varredura JEOL LV5.600, operando a 20 KeV.

**3.2.6 Determinação da Remoção do Cobre** – Para determinar a remoção do cobre do meio de cultura, amostras do sobrenadante retiradas nos intervalos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, foram submetidas a espectrofotometria de absorção atômica, espectrofotômetro modelo (GBC 932 AA).

**3.2.7 Análise Estatística** – Para avaliação da influencia do cobre sobre crescimento, proteínas totais, atividade das enzimas antioxidantes, peroxidação de lipídeos, polifosfato, fosfatases ácida e alcalina, e remoção de cobre do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software Statistica 7.0. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste-t de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Efeitos do cobre sobre o perfil de crescimento

Inicialmente, o comportamento do isolado foi avaliado acerca das características de crescimento em presença de concentrações crescentes de cobre no meio, determinando-se também o consumo da fonte de carbono, a glicose. O perfil de crescimento de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, nos intervalos de tempo de cultivos na ausência e presença de cobre nas concentrações de 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM, foi relacionada com o correspondente consumo de glicose. A figura 3.1, apresenta os dados obtidos para o crescimento do isolado em presença de cobre, durante 15 dias.

O consumo de glicose nos intervalos de tempos indicou que a cultura-controle nos primeiros 3 dias de cultivo consumiu cerca de 58,45 % e culturas tratadas com 0,5mM, 1 mM e 2 mM consumiram respectivamente 63,1% e 50,4 %, e 23,6 %.

Como observado no gráfico sobre a curva de crescimento, verifica-se que ao final dos 15 dias de cultivo, embora, tenha ocorrido consumo de glicose, de forma diferente entre as culturas todas mantiveram o crescimento mesmo após a exaustão da fonte de carbono na presença do metal, o que representa a tolerância de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, a presença do cobre.

Os parâmetros de análise de significância com relação a influencia do cobre no crescimento estão representados pela análise de variância, (Tabela 3.1 ) foi verificado que o tempo e a concentração tiveram influencia significativa sobre a biomassa de *A. niger* UCP/

WFCC 1261, sendo que os tratamentos com 0,5 mM e 1,0 mM não se diferiram estatisticamente da cultura controle e observa-se ao final de 15 dias de cultivo um aumento da biomassa na concentração de 1,0 mM com 1,7 g/L e a amostra controle com 1,3 g/L. Contudo foi observado uma diminuição significativa da biomassa na concentração de 2,0 mM de cobre obtendo 1,0 g/L.

Figura 3.1 Perfil de crescimento de *A. niger* na ausência e presença de cobre em cultivo líquido no período de 15 dias, a 28° C e 150 rpm.

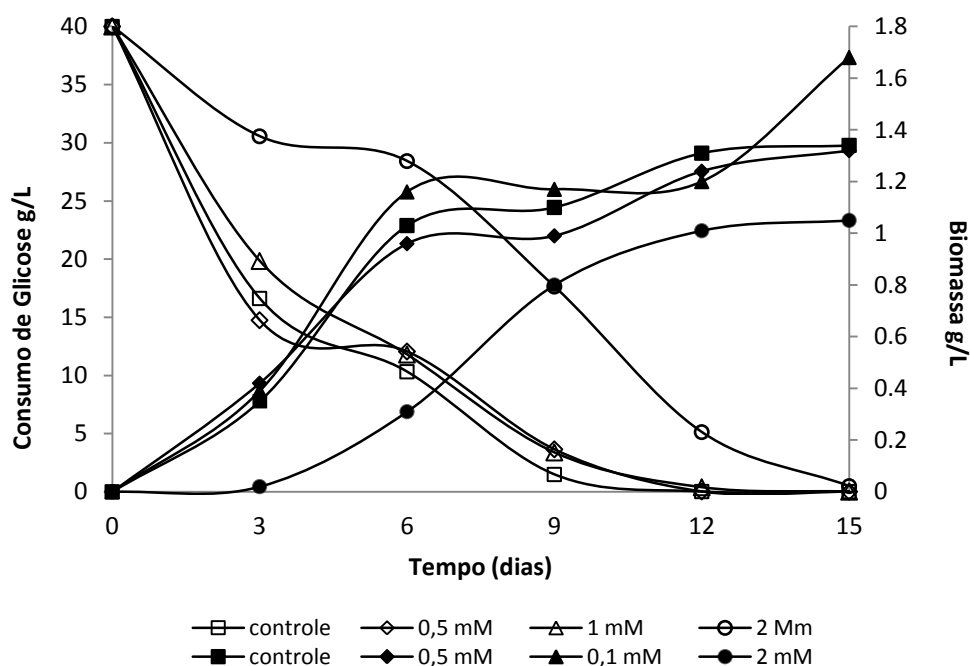


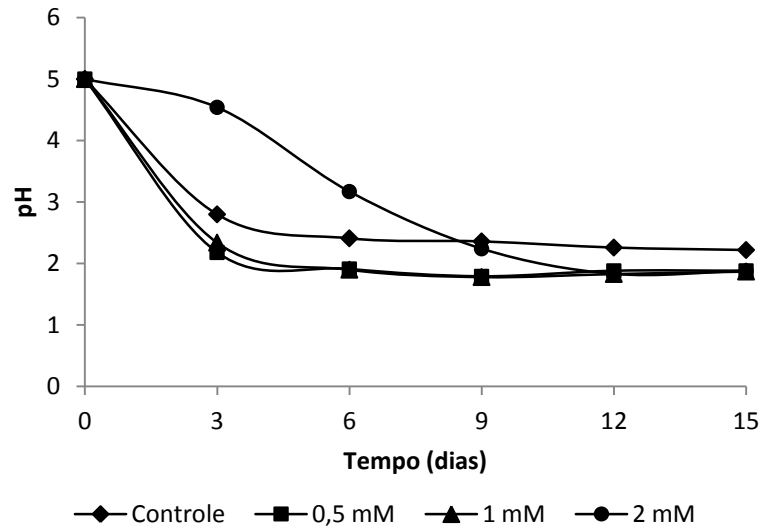
Tabela 3.1 Análise de variância da produção de biomassa, na ausência e presença de cobre no meio de cultura em relação ao tempo de cultivo

FV	SQ	GL	QM	F	valor-P
Bloco	17,76613	1	17,76613	1084,844	0,000000
Tempo	2,62320	4	0,65580	40,045	0,000001
Conc.	0,66546	3	0,22182	13,545	0,000369
Resíduo	0,19652	12	0,01638		
Total		20			

Uma análise da curva de pH permitiu observar que a partir da inoculação dos esporos no meio Sabouraud com e sem concentrações, pH 5,0 no decorrer dos intervalos houve uma discreta diminuição do pH, correspondendo a influencia do crescimento de *A. niger* UCP/ WFCC 1261. Aos 9 dias de cultivo os valores de pH se mantêm aproximadamente constantes para todas as culturas, na faixa de 2,83 e 1,87 como apresentado no gráfico da figura 3.



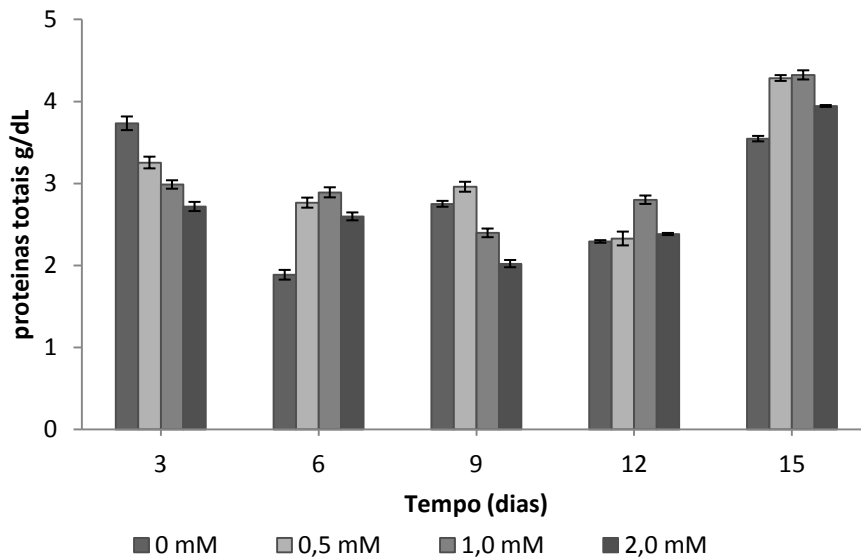
Figura 3.2 Variação do pH do meio de cultivo após crescimento de *A. niger* com e sem concentração de cobre em 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



### 3.3.2 Efeito do cobre sobre as proteínas totais

Os dados obtidos na análise do perfil de proteínas totais das amostras controle e tratadas com 0,5 mM; 1 mM e 2 mM de cobre estão apresentados na figura 3.3. O tratamento com cobre nas diferentes concentrações induziu o surgimento de um perfil de proteínas totais distintos para as amostras avaliadas.

Figura 3 3 Perfil do conteúdo de proteínas totais de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, cultivado na ausência e na presença de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.

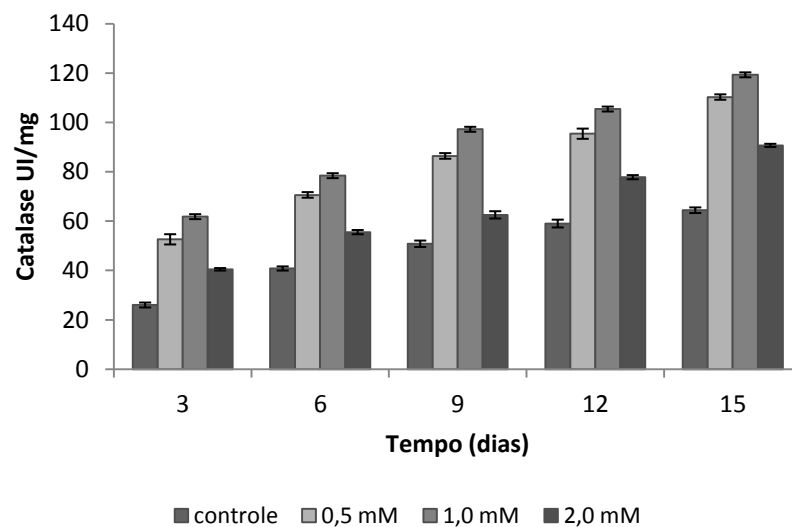


Nos primeiros 3 dias o conteúdo de proteínas totais para a cultura controle foi de 3,73 g/dL e para as culturas tratadas com 0,5 mM; 1 mM e 2 mM conteúdos de 3,25 g/dL, 2,99 g/dL e 2,72g/dL foram obtidos. Aos 6 dias de cultivo houve uma diminuição do conteúdo de proteínas para todas as amostras testadas havendo um gradual aumento até o final dos 15 dias de cultivo, onde conteúdos de 3,55 g/dL para a cultura controle e 4,28 g/dL, 4,32 g/dL e 3,94 g/dL, para as culturas expostas a 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, respectivamente. Observa-se um aumento em relação ao controle o que pode demonstrar o efeito indutivo do cobre no conteúdo de proteínas do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261.

### 3.3.3 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade catalase (CAT) nos intervalos de tempo de cultivo entre as amostras controle e tratadas demonstram um aumento progressivo da atividade da enzima (Figura 3.4).

Figura 3.4 Atividade da enzima catalase em resposta a presença e ausência de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



Verifica-se que a atividade da enzima aumenta com o intervalo de tempo de cultivo. A presença do metal no meio de cultivo resultou no aumento da atividade em relação a cultura controle. Além disso, a presença de cobre nas concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM induziu um aumento progressivo na atividade enzimática em comparação com a concentração de 2,0 mM.

Quanto ao tempo, constatou-se no período de 3 dias de cultivo houve uma elevação de 50 % na atividade da catalase para as amostras tratadas 0,5 mM e 1,0 mM em relação ao controle. Em todos os intervalos de tempo a atividade da enzima catalase permanece

maiores nas amostras tratadas com cobre, tendo-se o nível máximo atingido da CAT obtido ao final do período experimental 15 dias de cultivo.

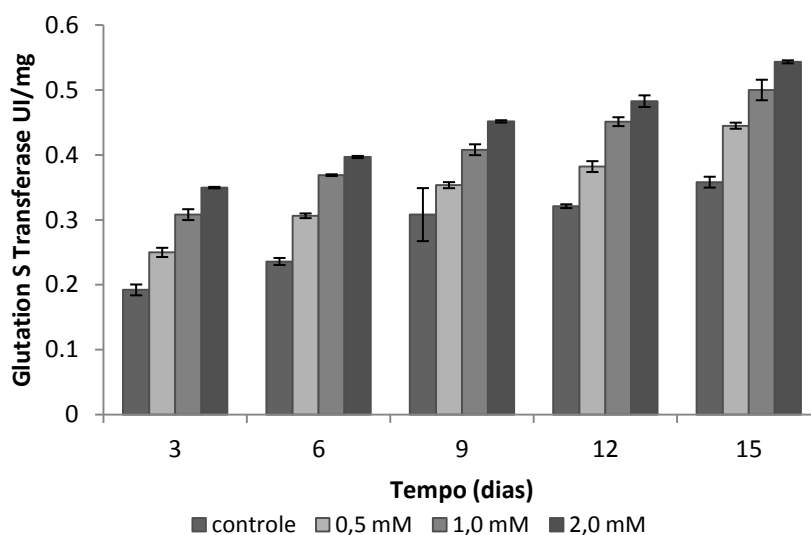
A análise de variância dos dados obtidos, revelou que o tempo e exposição as concentrações de cobre induziu a atividade catalase (Tabela 3.2). O tratamento com 1,0 mM obteve média superior aos demais tratamentos.

Tabela 3 2 Análise de variância da atividade da catalase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias)

FV	SQ	GL	QM	F	valor-P
Bloco	104441.7	1	104441.7	6433.267	0.000000
Tempo	6291.1	4	1572.8	96.877	0.000000
Conc.	5743.1	3	1914.4	117.919	0.000000
Resíduo	194.8	12	16.2		
Total		20			

Com a determinação da atividade glutaciona S transferase (GST) foi observado o efeito positivo da exposição ao sulfato de cobre em relação à cultura controle e ao tempo de cultivo. A resposta enzimática foi dependente da concentração de cobre utilizada (Figura 3.5).

Figura 3.5 Atividade da enzima glutacion S transferase em resposta a presença e ausência de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



A atividade da enzima glutaciona S-transferase (GST) diferiu significativamente entre as amostras (Tabela 3.3).

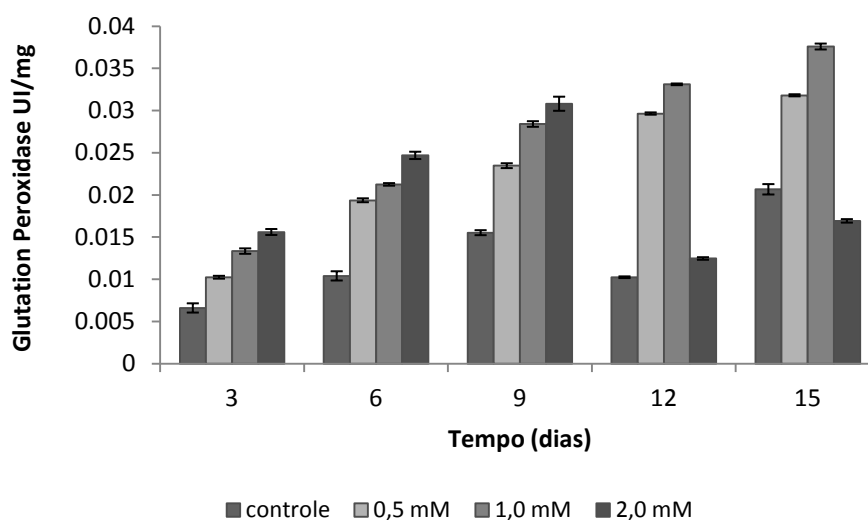
Os dados demonstram que a atividade a enzima foi maior quando as células foram expostas a 2,0 mM de sulfato de cobre.

Tabela 3.3 Análise de variância da atividade glutathion S transferase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo(dias)

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Bloco	2.747073	1	2.747073	39271.87	0.000000
Tempo	0.083799	4	0.020950	299.50	0.000000
Conc.	0.075339	3	0.025113	359.01	0.000000
Resíduo	0.000839	12	0.000070		
Total		20			

A atividade glutathion peroxidase (GPx), em resposta da presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo, nas amostras controle e tratadas, está representada na figura 3.6.

Figura 3.6 Atividade da enzima glutathion peroxidase) em resposta a presença e ausência de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



Quanto ao tempo de cultivo, verifica-se que no intervalo de 12 dias de cultivo ocorreu diminuição da atividade em enzimática nas amostras controle e tratadas com 2mM, verificando-se, no mesmo período, um aumento de cerca 65% e 69% para as amostras tratadas com 0,5mM e 1,0mM, e nota-se uma progressão da atividade até o fim dos 15 dias de cultivo.

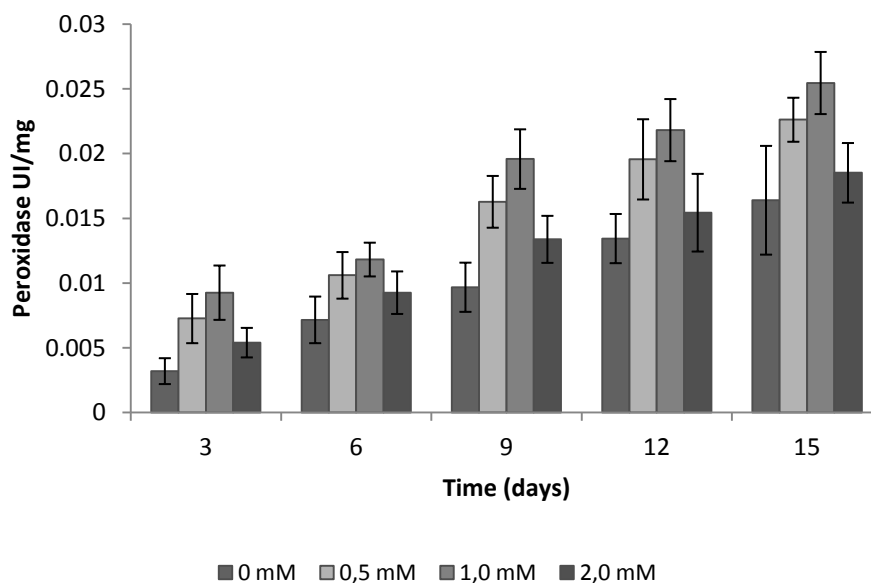
Os níveis para atividade glutathion peroxidase no período de 3, 6 e 9 dias de cultivo demonstram um aumento entre as amostras controle e tratadas. Constatou-se que ao o tratamento com 1,0 mM foi superior aos demais ao nível de 5% de significância. (Tabela 3.4). Podendo-se concluir que nesta concentração estimula uma resposta da GPx nos períodos de tempo estudados.

Tabela 3.4 Análise de variância da atividade da glutatona peroxidase, em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias)

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Bloco	0.008489	1	0.008489	226.1508	0.000000
Tempo	0.000562	4	0.000140	3.7424	0.033601
Conc.	0.000529	3	0.000176	4.6982	0.021565
Resíduo	0.000450	12	0.000038		
Total		20			

A análise da atividade peroxidase nos intervalos de tempo de cultivo entre as amostras controle e tratadas demonstram um aumento progressivo da atividade da enzimática, ao longo do tempo de cultivo, gráfico (Figura 3.7).

Figura 3.7 Atividade da enzima peroxidase em resposta a presença e ausência de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



Observa-se uma tendência maior para o aumento da atividade peroxidase nas amostras tratadas verificando-se diferenças estatísticas entre as médias, como apresentado pela análise de variância Tabela 3.5.

O tratamento com 1 mM de cobre obteve o maior nível da atividade peroxidase, como também é demonstrado que o tempo foi um fator significativo para expressão enzimática.

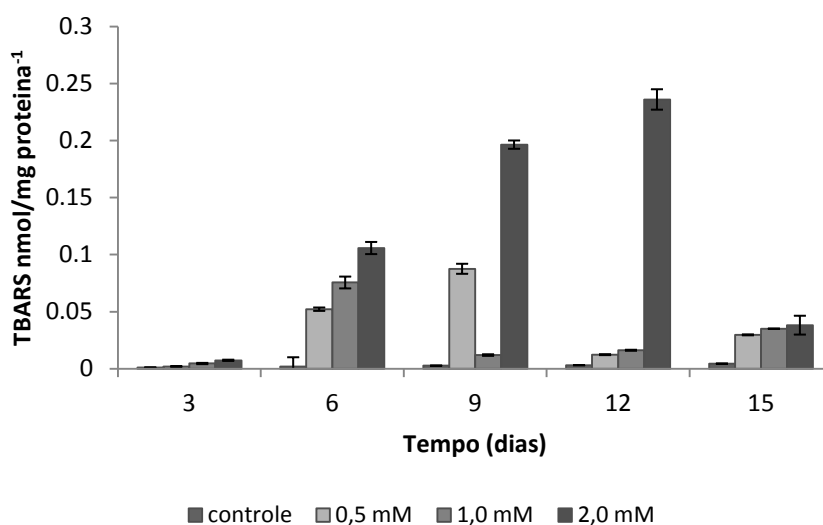
Tabela 3.5 Análise de variância dos resultados provenientes da atividade peroxidase em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias).

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Bloco	0,003800	1	0,003800	3687,826	0,000000
Tempo	0,000550	4	0,000138	133,514	0,000000
Conc.	0,000167	3	0,000056	53,927	0,000000
Resíduo	0,000012	12	0,000001		
Total		20			

### 3.3.4 Influência do cobre na peroxidação de lipídeos (TBARS)

Os níveis de Lipoperoxidação tecidual (TBARS) em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo de cultivo está representada na figura 3.8.

Figura 3.8 Peroxidação de lipídeos em *A. niger* UCP/ WFCC 1261, induzido pela exposição ao cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



Ao longo do período experimental verifica-se que a cultura controle permaneceu com níveis inferiores em relação às culturas tratada. Para cultura tratada com 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0mM houve variações quanto os níveis máximos atingidos para TBARS entre os intervalos de tempo, sendo o tratamento com 2,0 mM aquele que induziu os maiores níveis de TBARS diferindo da média em relação e ao tratamento 0,5 mM e 1,0 mM.

Nota-se que os níveis de TBARS entre as amostras tratadas variaram nos intervalos de tempo de cultivo diferindo significativamente da média em relação à amostra controle ao longo dos intervalos de tempo cultivados (Tabela 3.6).

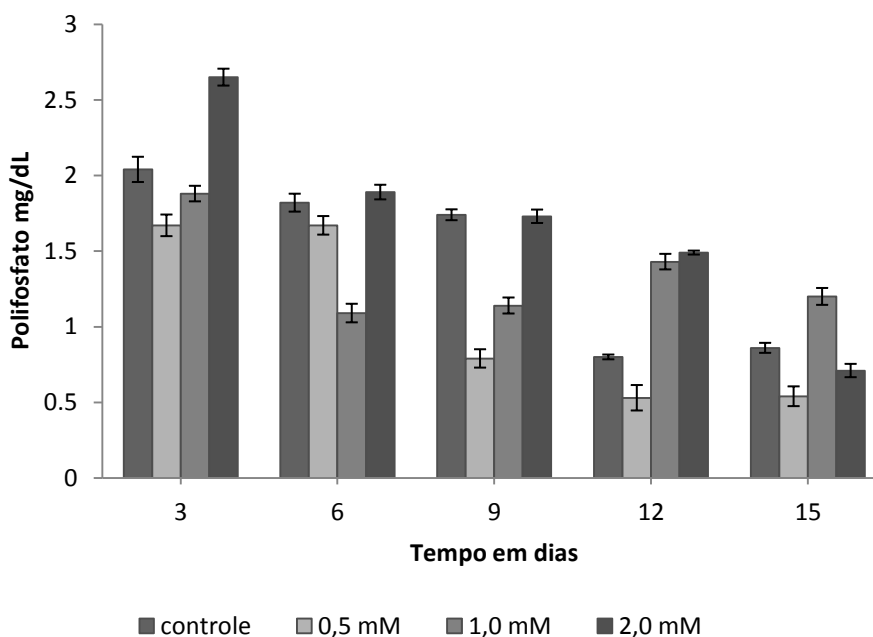
Tabela 3.6. Análise de variância da peroxidação de lipídeos em resposta a presença e ausência de cobre nos intervalos de tempo (dias)

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Bloco	0.042729	1	0.042729	15.80602	0.001841
Tempo	0.014311	4	0.003578	1.32345	0.316631
Conc.	0.036349	3	0.012116	4.48189	0.024872
Resíduo	0.032440	12	0.002703		
Total		20			

### 3.3.5 Efeitos do cobre no comportamento do polifosfato celular

O comportamento do polifosfato do isolado *A. niger* UCP/ WFCC 1261, ao longo do tempo para as amostras controle e tratadas com sulfato de cobre está aprentado na figura 3.9.

Figura 3.9 Perfil do polifosfato celular de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, cultivado na ausência e na presença de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm.



Os maiores conteúdos de polifosfato foram obtidas com 3 dias de cultivo para as culturas controle e tratada com 2 mM, com valores de 2,04 mg/dL e 2,65 mg/dL, respectivamente. Os tratamentos com 0,5 mM e 1,0 mM geraram, respectivamente, 1,67 mg/dL e 1,88 mg/dL. O conteúdo do polímero decresceu ao longo do tempo de cultivo. Verificou-se, para o tratamento com 2,0 mM, um consumo de mais de 73% ao final de 15 dias.

Os resultados em relação ao conteúdo de polifosfato nas amostras das culturas controle e tratadas demonstram que o tempo e as concentrações foram determinantes no

comportamento do polímero, apresentando variações significativas ao nível de 5%, (Tabela 3.7)

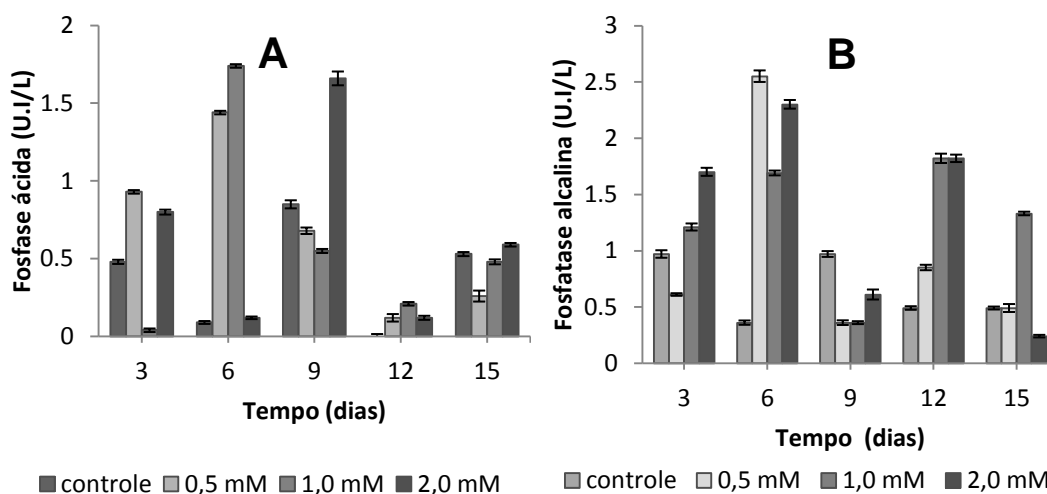
Tabela 3.7 Análise de variância – conteúdo de polifosfato na ausência e presença de cobre no meio de cultura nos intervalos de tempo(dias)

FV	SQ	GL	QM	F	valor-P
Bloco	38,28145	1	38,28145	330,9039	0,000000
Tempo	3,70283	4	0,92571	8,0018	0,002205
Conc.	1,10178	3	0,36726	3,1746	0,063509
Resíduo	1,38825	12	0,11569		
Total		20			

### 3.3.6 Perfil da atividade das fosfatases ácida e alcalina em resposta a exposição ao cobre

Os resultados da detecção das enzimas fosfases ácida e alcalina no sobrenadante de culturas de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, estão apresentados na figura 3.10, gráficos A-B, respectivamente.

Figura 3.10 Comportamento da atividade das enzimas fosfase no sobrenadante de culturas por *A. niger* UCP/ WFCC 1261, cultivado na presença e ausência de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm. (A) fosfatase ácida. (B) fosfatase alcalina.



Os maiores níveis atingidos da atividade da fosfatase ácida foram obtidos aos 6 dias de cultivo para as amostras tratadas 0,5 mM e 1,0 mM correspondendo respectivamente aos níveis de 1,44 U./L e 1,74 U./L com um aumento de mais de 93% em relação a amostra controle que obteve nível de 0,09 U./L. Também verifica-se que aos 9 dias de cultivo a culturas tratadas 2,0 mM atingiu o nível com 1,66 U./L sendo superior a controle e aos outros tratamentos. Aos 12 dias de cultivo a amostra controle não obteve nível da atividade enzimática sendo mantidas nas amostras tratadas. O cobre exibiu efeito estimulador sobre a atividade desta enzima.

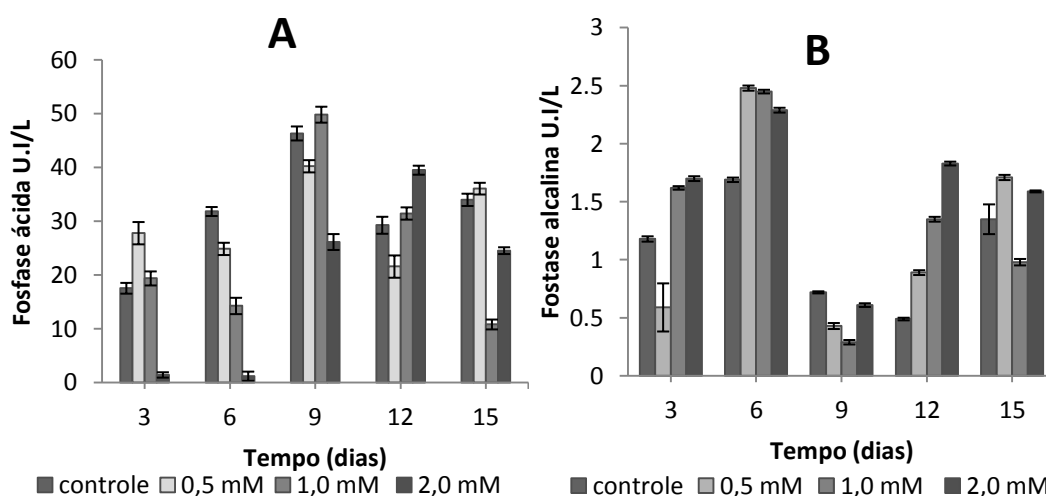


Os resultados obtidos para atividade fosfatase alcalina, também demonstraram valores diferenciados entre as amostras ao longo dos intervalos de tempo, sendo a atividade enzimática, nas amostras tratadas com cobre superior ao controle, cerca de 2 vezes maior para a amostra tratada com 2,0 mM e 1,9 vezes superior para o tratamento com 1,0 mM.

Os maiores níveis da enzima foram obtidos aos 6 dias cultivo para as cultura tratadas atingindo valores de 2,55 U.I/L 1,69 U.I/L e 2,3 U.I/L respectivamente para amostras tratadas com 0,5 mM ; 1 mM e 2 mM foi obtido um aumento de 78% em relação a cultura controle com nível de 0,36 U.I/L.

Com relação aos resultados da detecção das enzimas fosfases ácida e alcalina, na biomassa de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, nas amostras controle e tratadas, os níveis também demonstraram um perfil semelhante aos do sobrenadante da cultura. Contudo foi evidenciado maiores concentrações de fosfatase ácida entre as amostras. A figura 3.11, gráficos A- B respectivamente apresentam os perfis da atividade fosfatase ácida e alcalina biomassa de *A. niger* UCP/ WFCC 1261.

Figura 3.11 Comportamento da atividade das enzimas fosfases na biomassa por *A. niger* UCP/ WFCC 1261, cultivado na presença e ausência de cobre durante 15 dias, a 28° C e 150 rpm. A. fosfatase ácida. B. fosfatase alcalina



Altos níveis de atividade da fosfatase ácida entre as amostras controle e tratadas com cobre foram avaliados em relação ao tempo de cultivo, (Tabela 3.8) da análise de variância demonstram variações significativas para o tempo de cultivo.

O nível de fosfatase ácida no sobrenadantes aos 3 primeiros dias de cultivo para a cultura controle foi de 17,56 U.I/L e as amostras tratadas 0,5 mM ; 1 mM e 2 mM apresentaram 27,8 U.I/L. , 19,39 U.I/L. e 1,45 U.I/L, respectivamente. Aos 9 dias de cultivo foram obtidos as maiores atividades enzimáticas. A cultura controle não expostas ao cobre exibiu nível de 46,24 U.I/L. e o tratamento com 0,5 mM e 1,0 mM atividades correspondentes a 40,24 U.I/L, 49,83 U.I/L. Aos 12 dias de cultivo o tratamento com 2,0

mM atingiu 39,51 U.I/L sendo neste período superior as demais. Contudo, em relação ao controle as médias para a fosfatase ácida foram inferiores para as culturas tratadas.

Tabela 3. 8. Análise de variância fosfatase ácida no extrato micéial de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, nos intervalos de tempo (dias)

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Bloco	13952,40	1	13952,40	133,2587	0,000000
Tempo	1544,40	4	386,10	3,6876	0,035109
Conc.	528,73	3	176,24	1,6833	0,223297
Resíduo	1256,42	12	104,70		
Total		20			

Os resultados obtidos para atividade fosfatase alcalina, também demonstraram efeito significativo do tempo de cultivo na expressão da atividade enzimática como apresentado na tabela 3.9

Tabela 3.9 Análise de variância fosfatase alcalina no extrato micéial de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, nos intervalos de tempo (dias)

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Bloco	34,42688	1	34,42688	219,5709	0,000000
Tempo	6,07042	4	1,51761	9,6791	0,000979
Conc.	0,72740	3	0,24247	1,5464	0,253387
Resíduo	1,88150	12	0,15679		
Total		20			

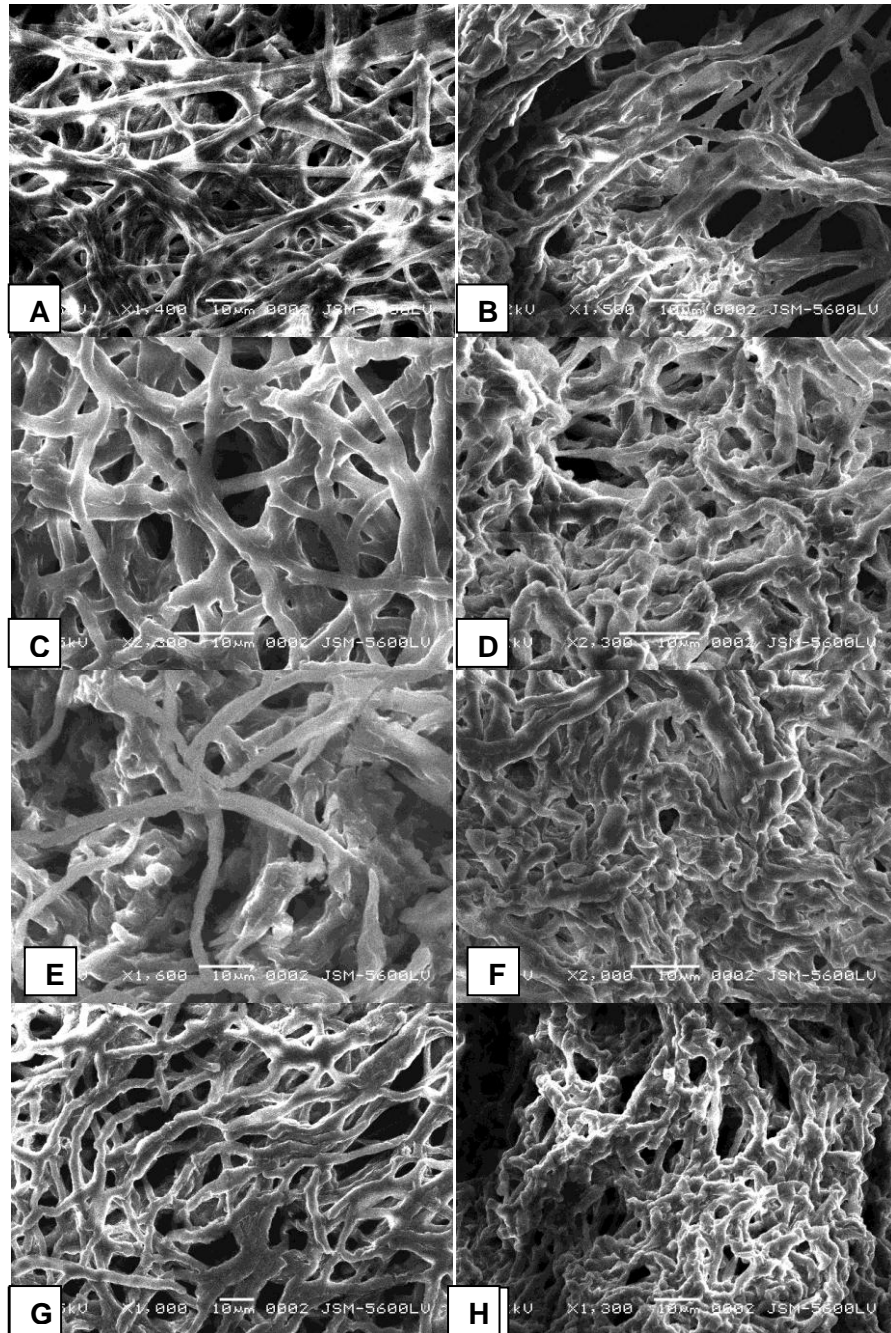
Aos 6 dias de cultivo foram detectados os maiores níveis da enzima encontrado para as culturas tratadas com 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de cobre, respectivamente com 2,48 U.I/L, 2,45 U.I/L e 2,29 U.I/L demonstrando um aumento de mais de 25% em relação ao controle com 1,69 U.I/L. Nos intervalos de 9 e 12 dias a atividade da fosfatase oscilou para as amostras tratadas 0,5 mM, 1,0 e 2,0 mM mantendo um comportamento semelhante a cultura controle. Até o final dos 15 dias de cultivo, foram encontrados valores muito próximos entre as amostra tratadas e o controle. Como demonstrado pela análise de variância ao nível de 5% de probabilidade, não houve efeito significativo sobre as concentrações utilizadas na expressão da atividade enzimática. Contudo, foi identificado que as culturas tratadas com cobre tiveram um ligeiro aumento nas médias da fosfatase sendo proporcional a concentração utilizada, o que demonstra um efeito indutivo do cobre.

### 3.3.7 Efeito do cobre sobre a ultraestrutura

A análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica de varredura permitiu detectar alterações no adensamento do micélio, no padrão de eletrondensidade, textura da

superfície celular e espessura das hifas em relação à cultura controle. A intensidade das variações está relacionada à concentração do metal à qual as células foram expostas (Figura 3.12)

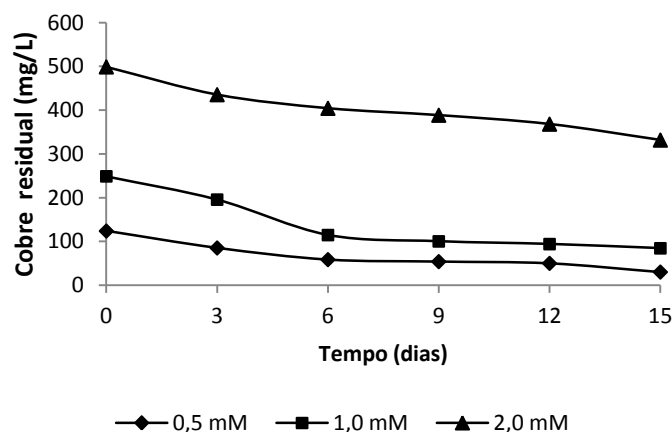
Figura 3.12 Eletromicrografias de *A. niger* UCP/ WFCC 1261 cultivado na presença e ausência de cobre 28°C a 150 rpm, A- B amostras controle, com 3 e 15 dias; C-H – amostras expostas a sulfato de cobre; C-D - 0,5 mM, com 3 e 15 dias; E- F - a 1,0 mM, com 3 e 15 dias e G-H - 2,0 mM, com 3 e 15 dias



### 3.3.8 Remoção do metal do meio de cultivo

Os resultados obtidos quanto à habilidade de remoção do cobre do meio de cultura, ao longo de tempo, demonstram uma diminuição progressiva da concentração do metal no sobrenadante da cultura. Adicionalmente, verifica-se que a remoção foi dependente da concentração inicial utilizada. Na figura está apresentada a quantificação do cobre residual no meio de cultivo (figura 3.13).

Figura 3.13 Remoção de íons de cobre por *A. niger* durante 15 dias a 28° C e 150 rpm.



A partir do gráfico, pode-se calcular a habilidade de remoção do metal do sobrenadante de cultivo. Percebe-se que ao longo dos intervalos de tempo as amostras tratadas com 0,5 mM e 1,0 mM de sulfato de cobre apresentaram maiores percentuais de remoção em relação a culturas tratadas com 2,0 mM. Verifica-se que no intervalo de 3 dias de cultivo, percentuais de remoção correspondentes a 31,76%, 21,39% e 12,72% foram obtidos para cultivos expostos a 0,5 mM, 1,0mM e 2,0mM, respectivamente. Ao final de 15 dias de cultivo, as culturas expostas a 0,5mM, 1,0mM e 2,0mM exibiram percentuais de remoção correspondentes a 75,78%, 66,04% e 33,51%.

Os percentuais de remoção foram utilizados para efetuar a análise de variância relacionando o tempo de cultivo e a concentração de cobre. Os dados expressam a significância dos parâmetros ao nível de 5% (tabela 3.10).

Tabela 3.10 Análise de variância no percentual de remoção de cobre por *Aspergillus niger* no intervalos de tempo (dias)

FV	SQ	GL	QM	F	valor-P
Bloco	28503.94	1	28503.94	657.2365	0.000000
Tempo	2195.89	4	548.97	12.6581	0.001544
Conc.	3291.97	2	1645.99	37.9527	0.000083
Resíduo	346.96	8	43.37		
Total		15			

### 3.4 DISCUSSÃO

Considerando a relevância dos fungos na reciclagem da matéria orgânica, mecanismo essencial para a manutenção dos ecossistemas e de seu potencial para a estabilidade dos recursos naturais e de seu potencial em processos biotecnológicos para o desenvolvimento de tecnologias alternativas para remediação de metais pesados, torna-se óbvia a importância dos estudos associados a sua habilidade de sobreviver em ambientes contendo metais, sendo importante a geração de informações para elucidar os mecanismos celulares e moleculares que asseguram a adaptação, tolerância e resistência desses sistemas vivos.

Adicionalmente, estudos que revelem as habilidades genéticas e metabólicas dos fungos têm importância na caracterização da biodiversidade. As propriedades dos solos da caatinga e seu papel no desenvolvimento econômico da região, transformam o bioma em um local de grande interesse nacional. Além disso, o fungo *Aspergillus niger* exibe significativo papel como organismo modelo em estudos de pesquisa básica, como fábricas celulares para a produção de ácidos orgânicos, fármacos, enzimas extracelulares, vetores de expressão, apresentando grande aplicação nos processos industriais e biotecnológicos.

Avaliando o potencial de crescimento de *A. niger* em presença de cobre, foi determinado que o fungo é capaz de crescer em concentrações de até 300 mg/L em meio de cultivo (TSEKOVA e TODOROVA, 2002 )

Metais pesados são conhecidos por induzirem o surgimento de modificações morfológicas e estruturais, além de inibirem o crescimento (GUIMARÃES-SOARES, 2005; EZZOUHRI, 2009; DOSOCORRO-VALE et al., 2011), reprodução (RODRIGUES, 2002) germinação e esporulação de fungos. Além disso, em ambiente naturais diminuem a diversidade fúngica (PASCOAL et al., 2005; KRAUSS et al., 2005). O cobre, por exemplo é citado como indutor de alterações na estrutura e atividade da comunidade de hifomicetos (DUARTE et al., 2004, 2008 ; SRIDHAR et al., 2005; EZZOUHRI, 2009).

Apesar disto muitos trabalhos comparativos apresentam o cobre como um dos metais pesados de menor potencial tóxico (GADD, 1993; BLAUDEZ et al., 2000; RODRIGUES, 2002; GUIMARÃES-SOARES, 2005).

Neste estudo, o crescimento celular de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, acompanhado pela produção de biomassa, em meio líquido, revelou que o sulfato de cobre, nas concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 2 mM tem efeito positivo sobre tal variável. Contudo, altas concentrações induziram ampliação da fase lag de crescimento e diminuição do consumo da fonte de carbono. Os dados apresentados neste estudo corroboram as informações em relação aos efeitos do cobre sobre o crescimento de *A. niger*.

Respostas celulares relativas ao processo de adaptação quando da ocorrência de estresse oxidativo incluem o aumento de atividade de enzimas antioxidantes e/ou aumento da concentração de componentes antioxidantes não enzimáticos (GAETKE; CHOW, 2003).

Enzimas como catalase (CAT), que detoxifica peróxido de hidrogênio; glutathione peroxidase (GPx), que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, com a utilização de glutathione como doadora de elétrons; glicose-6-fosfato desidrogenase, primeira enzima limitante da via pentose fosfato, importante para a geração de NADPH, essencial para manter o balanço redox celular, são ativadas em situações de estresse induzidas por metais pesados (POCSI *et al.*, 2004 ; HALLIWELL ; GUTTERIDGE, 2007). Adicionalmente, a glutathione S-transferase é a enzima responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos a glutathione, reduzindo sua toxicidade, e os torna mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, metabolizados pela via do ácido mercaptúrico (TREVISAN, 2008).

No presente estudo, foi possível demonstrar que o isolado de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, obtido do solo da caatinga, exibiu aumento da das enzimas catalase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase e peroxidase.

Os dados obtidos para a catalase, revelam o aumento da atividade enzimática com a exposição ao cobre refletem a indução de formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O incremento na atividade representa um mecanismo para detoxificação do metal via degradação do peróxido de hidrogênio, confirmando os dados da literatura

*Aspergillus niger* apresenta atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase em resposta a estresse oxidativo induzido pela presença de peróxido de hidrogênio. A existência e atividade das enzimas antioxidante catalase, superóxido dismutase têm sido relatadas na proteção de conidiosporos de *A niger* submetido a stresse termico (ABRASHEV *et al.*, 2005 ; ABRASHEV *et al.*, 2008).

Diferentes espécies de fungos sob estresse induzido pelo cobre exibem ativação de enzimas como catalase. Aumento na atividade peroxidase e redução na glutathione reductase também são relatados (GIUMARÃES-SOARES, 2005; BRAHA *et al.*, 2007).

Os efeitos tóxicos do cobre incluem a permeabilização da membrana citoplasmática com efluxo do potássio celular (GADD, 1993; AVERY *et al.*, 1996). Adicionalmente, o metal exibe habilidade para catalisar a geração de radicais livres, promovendo a peroxidação de lipídeos (STOHs and BACHI, 1995; ). Como as propriedades físicas das membranas dependem da composição lipídica, especificamente do grau de instauração dos ácidos graxos, esse seria um importante fator na sensibilidade diferenciada de micro-organismos a

toxicidade do cobre. Tal susceptibilidade estaria relacionada a um elevado grau de peroxidação lipídica (AVERY *et al.*, 1996; HOWLETT; AVERY, 1997).

Entre os principais danos celulares causados pela formação de radicais livres com a exposição ao cobre está a oxidação dos lipídios das membranas celulares, levando à perda da fluidez e aumento da permeabilidade das membranas, com liberação de nutrientes e substâncias tóxicas à célula no espaço extracelular, e até mesmo sua ruptura (GAETKE; CHOW, 2003). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um dos principais marcadores biológicos desse tipo de lesão em membranas celulares (DRAPER; HADLEY, 1990).

Outro dado interessante é que durante o metabolismo celular normal, os altos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico podem ser minimizados pela atividade da glutatona peroxidase, uma vez que a enzima atua na conversão dos hidroperóxidos de lipídeos em seus correspondentes ácidos graxos (DAVIES, 1995).

Em *A. niger* UCP/ WFCC 1261, uma elevação na peroxidação de lipídeos foi observada em função da concentração de cobre. Dados semelhantes são citados no *Scenedesmus sp.* (TRIPATHI *et al.*, 2006). Por outro lado, hifomicetes cultivados na presença de cobre não apresentaram peroxidação de lipídeos, mas o metal induziu a perda de integridade da membrana citoplasmática (GUIMARÃES-SOARES, 2005).

A detoxificação de metais pesados, incluindo o cobre, também é relatada como dependente do metabolismo do polifosfato. O polímero está associado ao potencial de tolerância a metais pesados, bem como resistência ao estresse induzido por diversos metais pesados em bactérias e leveduras e fungos filamentosos (KEASLING e HUPF, 1996; KEASLING, 1997; KEASLING *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2003; ALVAREZ e JEREZ, 2004; SOUZA *et al.*, 2005; REMONSELLEZ *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2011).

Na presença de metais pesados, as células podem ativar dois mecanismos: aumentar a acumulação do polímero ou iniciar ciclos de degradação e síntese para liberação de fósforo, quelação e sequestro dos íons metálicos reduzindo o fluxo intracelular e, conseqüentemente, a sua toxicidade (KORNBERG *et al.*, 1999; SEUFERHELD, 2008; RAO *et al.*, 2009).

No presente estudo foi verificada a variação dos conteúdos de polifosfato entre as culturas controle e expostas ao sulfato de cobre. Tal variação esteve relacionada ao tempo de cultivo, fase de crescimento, e concentração do metal. Assim, a redução do conteúdo do polímero nas culturas de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, expostas ao metal revelam a redução do polímero, o que indica sua utilização para manter a viabilidade celular, o que corrobora as funções do metal na manutenção do metabolismo celular. Adicionalmente, os dados

obtidos para as culturas controle também demonstram a utilização do metal nas diferentes fases de crescimento. Esses dados são os primeiros relatos do comportamento do polímero em *A. niger*.

Os metais pesados são relatados como indutores de modificações estruturais, estando os efeitos associados ao tipo de metal e sua concentração. Basicamente, a exposição aos metais, e sua consequente ligação, modificam as propriedades da estrutura, como eletrondensidade e textura, indicando a presença do metal (GUIMARÃES-SOARES, 2005; SOUZA et al., 2005; FREITAS et al., 2011). Os dados obtidos neste estudo confirmam os efeitos do cobre na ultraestrutura de *A. niger* UCP/ WFCC 1261, isolado do solo da caatinga.

Os relatos acerca da tolerância de micro-organismos ao cobre exibem dados que indicam que dentro do mesmo gênero, espécies e linhagens reagem diferentemente aos diferentes tipos de metais e suas concentrações. Adicionalmente, a sensibilidade também está relacionada à fase de crescimento celular. Dessa forma, os estudos não permitem determinar uma concentração limite. Por exemplo, alguns micro-organismos podem tolerar até 6000 mg/kg do metal, apresentando como mecanismos de resistência ao metal, a adsorção e a compartimentalização intracelular (UMRANIA, 2006).

Neste estudo, os dados revelam que o isolado foi capaz de apresentar crescimento, mesmo com redução da produção de biomassa, em concentrações de até 2,0 mM de sulfato de cobre. O que indica e foi confirmado pela expressão de respostas adaptativas e de tolerância que possibilitaram a sobrevivência celular.

O gênero *Aspergillus* é considerado um dos fungos de maior potencial biotecnológico e industrial na atualidade em função de seu potencial de produção de inúmeros metabólitos (BENNET, 2010; GUO et al., 2010).

Células microbianas são utilizadas em processos de biotransformação e biorremediação de corantes têxteis, petróleo e seus derivados, pesticidas e metais pesados (ADRI, 2003; KANALI et al., 2005; GADD, 2010). Sendo a biomassa de fungos excelente material biossorvente para íons metálicos (GADD 2010; FREITAS et al., 2011)

Dados na literatura revelam que micro-organismos exibem elevado potencial para a remoção/imobilização do cobre. Esta remoção pode ser realizada de forma eficiente por bactérias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, leveduras como *Candida*, *Sacharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccaromyces* e fungos filamentosos, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Cunninghamella* (GADD, 2010)

Neste sentido, foi avaliado o potencial de remoção de cobre em *A. niger* UCP/ WFCC 1261, isolado do solo da caatinga. Os dados apresentados revelam que o isolado removeu o



cobre de forma progressiva, durante o crescimento, atingindo ao final do experimento percentuais de 75,78%, 66,04% e 33,51%, para concentrações de 0,5mM, 1,0mM e 2,0mM, indicando maiores eficiências para os menores conteúdos do metal.

A espécie *A. niger* tem sido demonstrada como hábil na biotransformação de pesticidas (KANALI et al., 2005). Além disso, inúmeras linhagens de *A. niger* têm sido amplamente testadas em suas habilidades de lixiviação e remediação de metais pesados, com chumbo, cádmio, níquel, zinco, cobre, com base nas suas habilidades fisiológicas de adaptação, tolerância e resistência (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995, 1997, 1998, 1999; MAGYAROSI et al., 2002; CANOVAS et al., 2004; LIU et al., 2006; SANTHYIA TING, 2005, 2006; DURSUN, 2006; MUKHOPADHYAY et al., 2007; AMINI et al., 2008, 2009; YANG et al., 2009; AMIRI et al., 2011).

As paredes celulares dos fungos atuam como primeira barreira restringindo a internalização de solutos. Quitina, quitosana, glicoproteínas e melanina, principais componentes das paredes celulares dos fungos conferem proteção contra íons metálicos (Gadd, 2010). Os metais ligam-se às paredes via processos não metabólicos, como troca iônica, adsorção, complexação, precipitação e cristalização (GADD, 2010; CERVANTES; GUTIERREZ-CORONA, 1994; BLAUDEZ et al., 2000). Dessa forma, tem sido relatado que fungos tolerantes a metais exibem potenciais superiores de ligação de metais a sua parede em relação aos de menor tolerância (GARDEA-TORRESDEY et al., 1997). Alguns estudos demonstram que as paredes de fungos podem reter de 37% a 77% de cobre (GABRIEL et al., 2001).

Neste estudo, os dados acerca da habilidade de remoção revelaram que o isolado foi capaz de remover altos percentuais do metal, quando exposto ao cobre durante o crescimento, estando as células metabolicamente ativas, o que sugere o envolvimento de processos acumulativos e de ligação a superfície celular, considerando a presença de quitina e quitosana de sua paredes.

### 3.6 CONCLUSÕES

Constatou-se que houve influência do cobre, sobre o crescimento do isolado *Aspergillus niger* UCP/ WFCC 126, usado neste estudo observado uma diminuição significativa da biomassa na concentração de 2,0 mM;

O isolado apresentou variações nos perfis de proteínas, diretamente relacionados à concentração do sulfato de cobre; indicando que as amostras tratadas com o cobre não tiveram diferenças significativas em relação ao controle, e que o micro-organismo foi capaz

de manter o conteúdo de proteínas na presença do cobre no meio de cultivo o que pode sugerir um possível mecanismo desintoxicação a exposição ao metal .

O isolado exibiu atividade das enzimas catalase, glutathione S transferase, glutathione peroxidase, e peroxidase, cujas atividades, nas células expostas ao sulfato de cobre, foram aumentadas, revelando a ativação da resposta antioxidante frente ao estresse induzido pelo metal;

A peroxidação de lipídeos foi observada como resultado da exposição ao cobre;

O comportamento do polifosfato foi alterado, indicando o papel do polímero nas respostas moleculares de tolerância ao estresse induzido pelo cobre;

Modificações da estrutura fina, como aumento da eletrondensidade, septação e encurtamento das hifas foram visualizadas no isolado. A intensidade das modificações foi proporcional a concentração do cobre;

O isolado foi capaz de remover o metal do meio de cultivo apresentando potencial para estudos de remediação;

Tais dados indicam o potencial fisiológico, bem como biotecnológico do isolado, que deverá ser avaliado de forma mais específica para o desenvolvimento de bioprocessos.

## **Agradecimentos**

Os autores são gratos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudo dentro do Projeto – Rede SISBIOTA, a Universidade Católica de Pernambuco e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela concessão do espaço para desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

### 3.6 REFERÊNCIAS

- ABRASHEV R., PASHOVA S. B., STEFANOVA L. N., VASSILEV S. V., DOLASHKA P. A. A., ANGELOVA M.B. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26 Can. J. Microbiol. v.54, p.977–983, 2008
- ABRASHEV, R., DOLASHKA, P., CHRISTOVA, R., STEFANOVA, L., & ANGELOVA, M. (2005). Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. Journal of applied microbiology, v. 99, n. 4, p. 902-909, 2005.
- ADRIO, J. L., DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. Int Microbiol. v. 6, p.191–199, 2003
- ALVAREZ, S., AND C. A. JEREZ.. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. v. 70, p.5177-5182, 2004.
- AMINI, M., YOUNESI, H., BAHRAMIFAR, N., LORESTANI, A. A. Z., GHORBANI, F., DANESHI, A., & SHARIFZADEH, M. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. Journal of hazardous materials, v. 154(1), p.694-702, 2008.
- AMINI, M., YOUNESI, M., BAHRAMIFAR, N. Statistical modeling and optimization of the cadmium biosorption process in an aqueous solution using *Aspergillus niger*. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. v. 337, p.67–73, 2009.
- AMIRI, F., YAGHMAEI, S., MOUSAVI, S. M., SHEIBANI, S. Recovery of metals from spent refinery hydrocracking catalyst using adapted *Aspergillus niger*. Hydrometallurgy. v. 109, p.65–71, 2011.
- ATKINS, P. W., LORETTA J. *Princípios de Química: questionando a vida moderna eo meio ambiente*. Bookman, 2001.
- ATSDR, Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, 2008.
- AVERY SV, HOWLETT NG, RADICE S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*:dependence on plasma membrane fatty acid composition. Applied and EnvironmentalMicrobiology v.62, p.3960-3966, 1996.

- BELLION, M., COURBOT, M., JACOB, C., BLAUDEZ, D., & CHALOT, M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS microbiology letters*, v. 254, n. 2, p. 173-181, 2005.
- BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: MACHIDA, M. & GOMI, K. (editors); *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*. Linton, UK: Caister Academic Press, 2010. p. 1-16.
- BLAUDEZ D, JACOB C, TURNAU K, COLPAERT JV, AHONEN-JONNARTH U, FINLAY R, BOTTON B, CHALOTM. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro*. *Mycological Research*, v.104, p.1366-1371, 2000.
- BRAHA B, TINTEMANN H, KRAUSS G, EHRMAN J, BÄRLOCHER F, KRAUSS G-J. Stress response in two strains of the aquatic hyphomycete *Heliscus lugdunensis* after exposure to cadmium and copper ions. *Biometals* v.20, p.93-105, 2007.
- CALLENDER E. Heavy Metals in the Environment—Historical Trends Treatise on Geochemistry, v.3, p.67-105, 2007.
- CANOVAS, D.; VOOIJS, R.; SCHAT, H.; DELORENZO, V. The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp. P 37 to arsenic. *J. Biol. Chem.* v. 279, p.51234–51240, 2004.
- CERVANTES C, GUTIERREZ-CORONA F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, v.14, p.121-137, 1994.
- DAVIES KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia*, v.61, p.1-31, 1995.
- DO SOCORRO VALE, Maria et al. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. *Eng. Sanit. Ambient*, v. 16, n. 3, 2011.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, New York, v. 186, p.421-431, 1990.
- DUARTE S, PASCOAL C, ALVES A, CORREIA A, CÁSSIO F. Copper and zinc mixtures induce shifts in microbial communities and reduce leaf litter decomposition in streams. *Freshwater Biology*, v.53: p.91-102, 2008.
- DURSUN, A. Y. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper(II) and lead(II) ions onto pretreated *Aspergillus niger*, *Biochem. Eng. J.* v. 28, p.187–195, 2006

- EZZOUHRI, L. *et al.* Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco, African journal of microbiology research, v.3, n.2, p.35-48, 2009.
- FISKE, C. H. & SUBBAROW – The colorimetric determination of phosphorus. Journal Biology Chemical. 66 : 375 – 400, 1925.
- FREITAS L. de, A., FERREIRA de M., G., BARBOSA de LIMA, M. A., MENDES de SOUZA, P., ALVES da SILVA, C. A., De CAMPOS TAKAKI, G. M., & Do NASCIMENTO, A. E. Role of the morphology and polyphosphate in *Trichoderma harzianum* related to cadmium removal. Molecules, v.16(3), p. 2486-2500, 2011
- FUJS S, GAZDAG Z, POLJŠAK B, STIBILJ V, MILACIC R, PESTI M, RASPOR P, BATIC M. Theoxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. Journal of Basic Microbiology v.45, p.125-135, 2005.
- GABRIEL J, BALDRIAN P, HLADÍKOVÁ M. Copper sorption by native and modified pellets of wood-rotting basidiomycetes. Letters in Applied Microbiology, v.32, p.194-198, 2001.
- GADD GM. Interactions of fungi with toxic metals. New Phytologist, v.124, p.25-60, 1993.
- GADD, G. M. Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS microbiology letters, v. 100.(1-3) p.197-203, 1992.
- GADD, GEOFFREY MICHAEL. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology v. 156 (3), p. 609-643, 2010.
- GAETKE LM, CHOW CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology v. 89, p.147-163, 2003.
- GAETKE, Lisa M.; CHOW, Ching Kuang. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology, v. 189, n. 1, p. 147-163, 2003.
- GARDEA-TORRESDEY JL, CANO-AGUILERA I, WEBB R, GUTIERREZ-CORONA F. Enhanced copper adsorption and morphological alterations of cells of copper-stressed *Mucor rouxii*. Environmental Toxicology and Chemistry v.16, p.435-441, 1997.
- GUIMARÃES-SOARES L. Biochemical and physiological responses of the aquatic fungi *Fontanospora fusiformis* and *Flagellospora curta* to cadmium, copper and zinc. 2005. PhD thesis, University of Minho, Braga, Portugal, 2005.
- GUO Y, ZHENG P, SUN J. *Aspergillus niger* as a potential cellular factory: prior knowledge and key technology. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**. v. 26,(10), 1410-1418, 2010.
- HALL J.L. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. **J. Exp. Bot.** v.53, (366), p.1-11, 2002.

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

HOWLETT, NG, AVERY SV. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. Applied and Environmental Microbiology, v.63, p.2971-2976, 1997.

JÄRUP, LARS,; Agneta Åkesson. "Current status of cadmium as an environmental health problem. Toxicology and applied pharmacology, v. 238, n. 3, p. 201-208, 2009.

JÄRUP, Lars. Hazards of heavy metal contamination. British medical bulletin, v. 68, n. 1, p. 167-182, 2003.

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

JOMOVA, A. MARIAN VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology, v. 283, p.65–87, 2011.

KANALY RA, KIM IS, HUR HG. Biotransformation of 3-methyl-4-nitrophenol, a main product of the insecticide fenitrothion, by *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. v. 53, 6426–6431, 2005.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. v. 61, p.221–227, 1997.

KAPOOR, A., VIRARAGHAVAN, T., CULLIMORE, D. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. v. 70, p.95–104, 1999.

KAPOOR, A., AND T. VIRARAGHAVAN. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. Bioresource Technology v. 63(2), p.109-113, 1998.

KAPOR, A., VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. Bioresource Technology, v. 53, p.195-206, 1995.

KEASLING, J. D. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. Bioremed. Surf. Subsurf. Contam. v.829, p.242-249, 1997.

KEASLING, J. D. VAN DIEN SJ, TRELSTAD P, RENNINGER N, MCMAHON K. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. Biochemistry. v. 65(3), p.324-31, 2000.

- KEASLING, J. D., AND HUPF, G. A. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. v. 62, p.743-746, 1996.
- KORNBERG, A., RAO, N. N., AND AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu. Rev. Biochem. v.68, 89-125, 1999.
- KRAUSS G, SCHLOSSER D, KRAUSS G-J. Aquatic fungi in heavy metal and organically polluted habitats. S.K. Deshmukh, M. K. Rai. Biodiversity of Fungi: their Role in Human Life. Science Publishers, Inc, New Hampshire, United States of America. 2005
- LIMA, M. A. B. de et al. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. Braz. J. Microbiol. v. 34, (4), p.363-372, 2003.
- LIU, Y.-G., FAN, T., ZENG, G., LI, X., TONG, Q., YE, F., ZHOU, M., . XU, W., HUANG, Y. Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*, Trans. Nonferr. Met. Soc. China v. 16, p.681–686, 2006.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. chem, v.193(1), p.265-275, 1951.
- MAGYAROSY, A., LAIDLAW, R.D., KILAAS, R., ECHER, C., CLARK, D.S., KEASLING, J.D. Nickel accumulation and nickel oxalate Precipitation by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 59, p. 382–388, 2002.
- MCGRATH, J. W., QUINN, J. P., Intracellular Accumulation of Polyphosphate by the *Candida humicola* G-1 in Response to Acid pH. Applied Environmental Microbiology. v. 66: p. 4068-4073. 2000.
- MENEZES, R. J. S. J. F., ANTONIOLLI, B. Z. I., & de OLIVEIRA CAMARGO, F. A. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Ciência Rural, v. 37, n. 4, 2007.
- MUKHOPADHYAY, M., . NORONHA, S., . SURAIHKUMAR, G. Kinetic modeling for the biosorption of copper by pretreated *Aspergillus niger* biomass, Bioresour. Technol. v. 98, p.1781–1787, 2007.
- MULLER, A., LEON-KEMPIS, M. D., DODSON, E., WILSON, K. S., WILKINSON, A. J., AND KELLY, D. J. A bacterial virulence factor with a dual role as an adhesin and a solute-binding protein: The crystal structure at 1.5 Å resolution of the PEB1a protein from the food-borne human pathogen *Campylobacter jejuni*. J. Mol. Biol. v.372, p.160-171, 2007.
- PASCOAL C, CÁSSIO F, MARCOTEGUI A, SANZ B, GOMES P. Role of fungi, bacteria, and invertebrates in leaf litter breakdown in a polluted river. Journal of the North American Benthological Society, v.24, p.784-797, 2005a.

- PÓCSI I, PRADE RA, PENNINGCKX J. Glutathione altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, v.49, p.1-76, 2004.
- RAO, M.A; SCELZA, R; SCOTTI, R y GIANFREDA, L. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *J. Soil Sci. Plant Nutr*, v.10, n.3, . 2010.
- RAO, N. N., GÓMEZ-GARCÍA, M. R., AND KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* v. 78, 605-647, 2009.
- REGINATTO, C.; COLLA, L. M.; THOMÉ, A. Biorremediação de resíduos oleosos em solos. *Revista CIATEC-UPF*, v. 3, n. 2, p. 19-31, 2012.
- REMONSELLEZ , F; ORELL A. e JEREZ C. A. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism, *Microbiology*, v.152, p.59–66, 2006.
- RODRIGUES A. Efeito do zinco, cobre, níquel e cádmio no crescimento e na esporulação de hifomicetos aquáticos *Tricladium splendens* e *Heliscus submersus*. 2002. Tese de Licenciatura Universidade do Minho, Braga, Portugal. 2002.
- SANCHEZ JF, SOMOZA AD, KELLER NP, WANG CC. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. **Nat Prod Rep.** 29(3), p.351-71, 2012.
- SANTHIYA, D., & TING, Y. P. Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *Journal of biotechnology*, v. 121, n.1, p. 62-74, 2006.
- SANTHIYA, D., TING, Y.P. Bioleaching of spent refinery processing catalyst using *Aspergillus niger* with high yield oxalic acid. *J. Biotechnol.* v. 116, p.171–184, 2005.
- SEUFFERHELD, M. J., ALVAREZ, H. M., AND FARIAS, M. E. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 74, p.5867-5874, 2008.
- SIMEONOV, L. I.; KOCHUBOVSKI, M. V.; SIMEONOVA, B. 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 , XX, 361 p., Hardcover, 2011.
- SOUZA, P. M.; MARINHO, P. H.; LIMA, M. A. B; NASCIMENTO, A. E; CAMPOS, G. M. T; Copper Influence on Polyphosphate Metabolism of *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p.315 – 320, 2005.
- SRIDHAR KR, BÄRLOCHER F, KRAUSS G-J, KRAUSS G. Response of aquatic hyphomycetes communities to changes in heavy metal exposure. *International Review of Hydrobiology*, v.90, p.21-32, 2005.



STOHS SJ, BAGCHI D. "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions". Free Radic. Biol. Med. v18 (2), p.321–36, 1995.

TREVISAN, Rafael. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. Monografia do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (2008).

TRIPATHI, B. N. MEHTA, S. K., AMAR, A., & GAUR, J. P. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short-and long-term exposure to Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. Chemosphere, v. 62, n. 4, p. 538-544, 2006.

TSEKOVA, K., e DESSLAVA TODOROVA. Copper (II) accumulation and superoxide dismutase activity during growth of *Aspergillus niger* B-77. Zeitschrift Fur Naturforschung C, v. 57, p. 319-322, 2002.

UMRANIA, Valentina V. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. Bioresource technology, v. 97, n. 10, p. 1237-1242, 2006.

VALKO M, MORRIS H, CRONIN MT. Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry, v. 12, p.1161-208, 2005.

YANG, J., WANG, Q., WU, T. Heavy metal extraction from MSW incineration fly ash using adapted metal tolerant *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. v. 100, p.254–260, 2009.

## CAPÍTULO IV

### ANEXO I



engenharia sanitária e ambiental

[PÁGINA INICIAL](#)   [SOBRE](#)   [PÁGINA DO USUÁRIO](#)

Página inicial > Usuário > Autor > **Submissões Ativas**

### Submissões Ativas

ATIVO
ARQUIVO

ID	MM-DD ENVIADO	SEÇÃO	AUTORES	TÍTULO	SITUAÇÃO
ESA-827	02-18	AT	Nascimento	INFLUÊNCIA DO COBRE SOBRE O CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E...	Aguardando designação

1 a 1 de 1 itens

**Iniciar nova submissão**  
[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

**ABES**

Av. Beira Mar, 216 - 13º Andar - Castelo  
 20021-060 Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
 Tel.: +55 21 2277-3900  
 Fax.: +55 21 2262-6838

**USUÁRIO**  
 Logado como:  
**aline\_elsbao**  
 Meus  
 periódicos  
 Perfil  
 Sair do  
 sistema

**AUTOR**  
 Submissões  
 Ativo (1)  
 Arquivo (0)  
 Nova  
 submissão

**IDIOMA**  
Português (Brasil)

## engenharia sanitária e ambiental

Órgão oficial de informação técnica da ABES - Rio de Janeiro – Brasil

setembro 2012

# Regulamento para apresentação de contribuições

## 1. Objetivo

O presente regulamento objetiva uniformizar a apresentação das contribuições a serem encaminhadas para publicação na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.

## 2. Formas de contribuição

2.1. As formas de contribuição são:

- Artigo Técnico
- Nota Técnica
- Revisão da Literatura
- Discussão de Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura

2.2. Artigo Técnico é uma exposição completa e original, totalmente documentada e interpretada, de um trabalho de relevância.

2.3. Nota Técnica é um trabalho sumário podendo corresponder a:

- artigo com resultados ainda parciais
- considerações sobre aspectos pouco abrangentes da área
- desenvolvimento de considerações técnicas relativas a algum aspecto da Engenharia Sanitária e Ambiental
- alguma outra abordagem sumária pertinente, a juízo dos Editores.

2.4. Revisão da Literatura corresponde a um artigo, no qual é levantado o estado da arte de algum tema relevante e inovador, na área de Engenharia Sanitária e Ambiental, cuja abordagem deve ser suficientemente crítica e capaz de identificar avanços, lacunas e desafios científicos, à luz da literatura nacional e internacional. Trabalhos de revisão sistemática e meta-análise podem ser incluídos nessa categoria de artigo.

2.5. Discussão é uma avaliação crítica ou ampliação do conteúdo de uma Nota Técnica, Artigo Técnico ou Revisão da Literatura publicado na Revista. As discussões serão publicadas, sempre que possível, conjuntamente com a resposta do(s) autor(es). A Revista tem como linha editorial o incentivo à publicação de artigos de discussão.

2.6. Não serão aceitos relatórios, traduções e nem artigos já publicados ou submetidos à publicação em outros veículos, ou que impliquem em promoção comercial de determinada marca, produto ou empresa.

## 3. Encaminhamento das contribuições

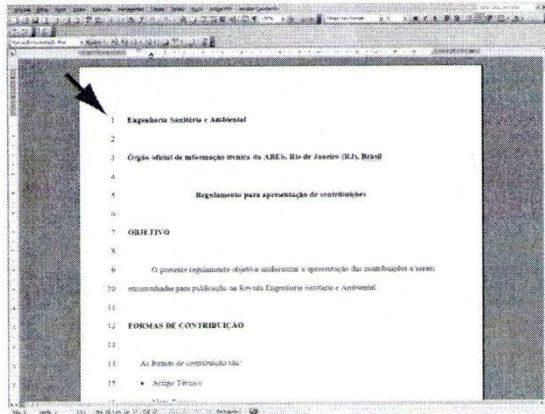
3.1. A inscrição das contribuições será feita pelo sistema da SCielo, através do link <http://submission.scielo.br/index.php/esa/index>. Não serão aceitas inscrições de artigos por fax, e-mail ou correio.

3.2. O primeiro passo para o acesso ao sistema é o Cadastro, bastando clicar em "Cadastrar-se" no link no canto superior direito. A partir daí, clicar em "Engenharia Sanitária e Ambiental", que fará a vinculação do cadastro junto à Revista.

- 3.3. Feito isso, o próprio sistema mostrará, passo a passo, como submeter a sua contribuição.
- 3.4. Realizada a submissão, o autor receberá um e-mail acusando o recebimento da mesma. E a partir do código dado pelo próprio sistema que o autor poderá acompanhar o processo de avaliação do seu trabalho.
- 3.5. Qualquer dúvida, favor enviar e-mail para [resa@abes-dn.org.br](mailto:resa@abes-dn.org.br) ou pelo telefone (21) 2277-3918.

#### 4. Formato das contribuições

4.1. As contribuições devem ser preparadas pelos autores no formato ".doc" aberto para edição usando o recurso de numeração de linhas do Microsoft Word (Arquivo – Configurar página – Layout – Números de linha – Numerar linhas – Contínua – OK – OK).



- 4.2. As contribuições devem ser enviadas no formato ".doc" pelo Sistema de Envio de Artigos. Todos os demais formatos de arquivos, inclusive os compactados, serão bloqueados.
- 4.3. Após o processo avaliativo, as contribuições aprovadas para publicação deverão sofrer correções e ser enviadas em sua versão final para diagramação.
- 4.3 Os trabalhos submetidos devem estar de acordo com as normas da ABNT/NBR 14724:2011– Trabalhos Acadêmicos
- 4.4. Poderão ser incluídos figuras, gráficos e ilustrações, desde que o tamanho do arquivo não ultrapasse 10MB.
- 4.5. O texto integral do artigo não poderá exceder 20 (vinte) páginas para Artigo Técnico e Revisão da Literatura e 8 (oito) páginas para Nota Técnica e Discussão, atendendo ao formato estabelecido nos itens a seguir.
- 4.6. O Artigo Técnico e a Nota Técnica deverão seguir a seguinte sequência de apresentação:
  - Título do artigo em português (até 200 caracteres) e em inglês
  - Resumo em português e em inglês, de 100 a 250 palavras (conforme NBR 14724).
  - Palavras-chave em português e em inglês
  - Título resumido do artigo em português (até 60 caracteres) para o cabeçalho

- Texto do artigo (sem divisão em colunas)
  - Referências
  - Anexos (se houver)
    - i. Agradecimentos, se houver, deverão ser incluídos somente na versão final do artigo aprovado para publicação.
    - ii. O Nome do(s) autor(es), Currículo resumido(s) do(s) autor(es), endereço para correspondência (profissional) devem constar somente nos metadados do Sistema Scielo, preenchidos no momento de cadastro. **IMPORTANTE:** não colocar estas informações no envio da contribuição original.
- 4.7. O texto deverá ser formatado para um tamanho de página A-4, margens 3 cm para esquerda e superior, e 2 cm inferior e direita (conforme NBR 14724). As páginas deverão ser devidamente numeradas. Deve ser empregada fonte Times New Roman, corpo 12, exceto no título que deverá ter corpo 16. O espaçamento entre as linhas deverá ser 1,5.
- 4.8. O corpo do artigo deve ser organizado segundo um encadeamento lógico, segundo subtítulos "Introdução", "Metodologia", "Resultados", "Discussão", (ou "Resultados e Discussão"), "Conclusões" e "Referências". Na redação não deve ser empregada a primeira pessoa e o estilo a ser adotado deve ser objetivo e sóbrio, compatível com o recomendável para um texto científico.
- 4.10. Deverá ser evitada a subdivisão do texto em um grande número de subtítulos ou itens, admitindo-se um máximo de cabeçalhos de terceira ordem.
- 4.11. O conteúdo do trabalho deve ser submetido a criteriosa revisão ortográfica.
- 4.12. Termos grafados em itálico ou negrito poderão ser utilizados no corpo do artigo.
- 4.13. As discussões deverão ser submetidas no máximo até 6 (seis) meses após a publicação do Artigo, Nota Técnica ou Revisão da Literatura.

## 5. Figuras e ilustrações

As figuras e ilustrações devem observar os seguintes critérios:

- 5.1. Os arquivos das figuras e ilustrações, sem bordas ao redor, devem ser inseridas no arquivo do texto, de maneira que possam ser editados por meio do MS Word for Windows.
- 5.2. Os textos e legendas não devem ficar muito pequenos ou muito grandes em relação à figura.
- 5.3. As figuras devem ser intercaladas nos locais apropriados e apresentar um título.
- 5.4. A inclusão de fotografias não é aconselhável; porém, se os autores julgarem que são importantes para esclarecer aspectos relevantes do artigo, deverão ser inseridas em resolução mínima de 300 dpi.
- 5.5. Todos os gráficos, desenhos, figuras e fotografias devem ser denominados "Figura", e numerados sequencialmente em algarismos arábicos. Toda figura deve ser mencionada no texto.
- 5.6. O número e título da Figura devem ser colocados centralizados, imediatamente abaixo da figura. O título deve ser claro e autoexplicativo.
- 5.7. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos gráficos e diagramas.

## 6. Quadros e tabelas

Os quadros e tabelas deverão atender os seguintes critérios:

- 6.1. Os quadros e tabelas devem ser claros e objetivos, sem linhas de grade. As unidades correspondentes a todos os termos usados devem ser claramente identificadas.
- 6.2. Todos os quadros ou tabelas devem ser denominados "Quadro" ou "Tabela", numerados sequencialmente em algarismos arábicos e mencionados no texto.
- 6.3. Cada quadro e tabela, além da numeração, deve possuir um título. O número e o título devem ser colocados centralizados, imediatamente acima do quadro ou tabela. O título deve ser claro e autoexplicativo.

- 6.4. Um quadro e uma tabela não poderão ser maiores do que uma folha A-4.
- 6.5. Quadros e tabelas devem aparecer, preferencialmente, intercalados nos locais apropriados do texto, a critério do autor.
- 6.6. As páginas internas da Revista são impressas em uma só cor, não sendo permitida, portanto, a adoção de cores na diferenciação das variáveis nos quadros e tabelas.

## 7. Equações

As equações podem ser editadas pela equipe responsável pela diagramação. Portanto, os seguintes critérios devem ser satisfeitos:

- 7.1. As equações devem ser claras e legíveis, e escritas com a mesma fonte do corpo do texto, sem a utilização de itálico ou negrito.
- 7.2. As equações e fórmulas devem ser denominadas "Equação" e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. A numeração à direita da equação deve ser entre parênteses. Todas as equações devem ser mencionadas no texto.
- 7.3. Todos os símbolos usados devem ser definidos imediatamente após a equação (caso não tenham sido definidos anteriormente), incluindo as suas unidades ou dimensões.

## 8. Unidades

- 8.1. Todas as unidades mencionadas no texto, tabelas, quadros e figuras devem ser expressas de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI).
- 8.2. Deve-se evitar o uso da barra de fração na expressão das unidades. Exemplo: Ao invés de mg/L ou m<sup>3</sup>/s, deve-se utilizar mg.L<sup>-1</sup> e m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>.

## 9. Referências

As referências citadas no texto e listadas ao final do artigo deverão estar de acordo com a norma NBR 6023/2002. A título de esclarecimento são apresentadas algumas diretrizes:

- 9.1. As referências citadas no texto devem conter o sobrenome do(s) autor(es), em caixa alta, seguidos pelo ano da publicação, observando-se os seguintes critérios:
- 9.1.1. Quando houver mais de um trabalho, as citações devem ser em ordem alfabética.
- 9.1.2. Trabalhos com mais de três autores devem ser referenciados ao primeiro autor, seguido por "*et al.*" (em itálico e com ponto).
- 9.1.3. Quando houver mais de uma publicação do mesmo autor, no mesmo ano, o ano da publicação deve ser seguido dos componentes "a, b, c...", em ordem alfabética.
- Exemplos: ... estudos efetuados por Silva (1994a, 1994b) e por Machado *et al.* (1995a) revelaram...; ... estudos recentes (SOUZA, 1993; SILVA, WILSON e OLIVEIRA, 1994; MACHADO *et al.*, 1995b) revelaram...
- 9.2. Ao final do trabalho deverá ser apresentada uma lista de todas as referências citadas no texto, de acordo com os seguintes critérios, entre outros:
- 9.2.1. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor.
- 9.2.2. Devem ser referenciados todos os autores (independentemente do número de autores) pelo sobrenome seguido pelas iniciais de cada autor, separados por vírgulas.
- Exemplo: SMITH, P.J.; WATSON, L.R.M.; GREEN, C.M...
- 9.2.3. O título do periódico referenciado deverá ser apresentado em itálico. As indicações de volume, número e página deverão ser identificados pela letra inicial ("v", "n" ou "p"), seguida de ponto. Não devem ser utilizadas aspas antes e depois do título do trabalho.

Exemplo: JEWELL, W.J.; NELSON, Y.M.; WILSON, M.S. Methanotrophic bacteria for nutrient removal from wastewater: attached film systems. *Water Environment Research*, v. 64, n. 6, 1992, p. 756-65.

9.2.4. O título do livro deve ser apresentado em itálico. Devem ser incluídos a edição, o local, a editora, o número de páginas e a data.

Exemplo: FRANÇA, J.L.; VASCONCELOS A.C. *Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas*. 8 ed. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2007, 255 p.

9.2.5. Em capítulos de livros e trabalhos de congressos, a obra principal (título do livro ou denominação do congresso) é referenciada em itálico e vem precedida da expressão "In".

Exemplos: Anais - CAIXINHAS, R.D. Avaliação do impacto ambiental de empreendimentos hidro-agrícolas. In: *Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 5 Anais...* Lisboa: APRH, 1992, p. 203-11.

Capítulo de Livro - KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.; IVES, K. Diversity of toluene degradation following exposure to BTEX in situ. In: KAMELY, D.; CHAKABARTY, A.; OLSEN, R.H. (Eds.) *Biotechnology and Biodegradation*. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, E.U.A., 1989, p. 405-421.

## 10. Julgamento

10.1. Após avaliação prévia realizada pelos Editores da Revista, se considerado pertinente, cópias da contribuição, sem identificação dos autores, serão enviadas a pelo menos dois avaliadores, especialistas da área, indicados pelos Editores.

10.2. Em qualquer etapa de julgamento do trabalho, serão levados em consideração a obediência às disposições regulamentares, o relacionamento do tema à Engenharia Sanitária e Ambiental, adequação do título, do resumo e das palavras-chave, existência de encadeamento lógico, ineditismo e qualidade da contribuição.

10.3. Na análise dos editores e dos avaliadores a contribuição será classificada segundo uma das seguintes categorias:

- Aceito, sem modificações;
- Aceito, com sugestão de revisões;
- Recusado.

## 11. Comunicação aos autores

O autor principal será comunicado do resultado da avaliação e no caso de artigos recusados, receberão as devidas justificativas.

## 12. Responsabilidades e direitos

O conteúdo dos artigos é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es), que declaram se responsabilizar por qualquer reclamação de terceiros quanto a conflitos envolvendo direitos autorais, assumindo e isentando a ESA/ABES de qualquer pendência envolvendo suas publicações. Os autores que encaminharem seus artigos cedem à ESA/ABES os respectivos direitos de reprodução e/ou publicação. Os casos omissos serão resolvidos pelos editores do periódico.