

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Bruna de Almeida Martins

**BIORREMEDIAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO COMO
ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS PARA REMOÇÃO DE
POLUENTES AMBIENTAIS E FUNCIONALIZAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS**

Belo Horizonte

2023

UFMG/ICEX/DQ. 1.531

T. 696

Bruna de Almeida Martins

**BIORREMEDIAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO COMO ALTERNATIVAS
TECNOLÓGICAS PARA REMOÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS E
FUNCIONALIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

M379b Martins, Bruna de Almeida.
2023 Biorremediação e biotransformação como alternativas tecnológicas para remoção
T de poluentes ambientais e funcionalização de compostos orgânicos [manuscrito] / Bruna
de Almeida Martins. 2023.
180 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de
Química.

Bibliografia: f. 153-165.

Apêndices: f. 166-180.

1. Química ambiental – Teses. 2. Química orgânica – Teses. 3. Fungos filamentosos
– Teses. 4. Biorremediação – Teses. 5. Metais pesados – Teses. 6. Poluentes – Teses. 7.
Produtos naturais – Teses. 8. Biotransformação (Metabolismo) – Teses. 9. Água –
Purificação – Tratamento biológico – Teses. 10. Fungos – Biotecnologia – Teses. 11.
Espectroscopia de absorção atômica – Teses. 12. Espectroscopia de ressonância nuclear
– Teses. I. Takahashi, Jacqueline Aparecida, Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UFMG
Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEX



"Biorremediação e Biotransformação como Alternativas Tecnológicas para Remoção de Poluentes Ambientais e Funcionalização de Compostos Orgânicos"

Bruna de Almeida Martins

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Prof. Antonio Alves de Melo Filho
UFRR

Prof. Fabrício Vieira de Andrade
UNIFEI

Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Prof. Diogo Montes Vidal
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Alves de Melo Filho, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Aparecida Takahashi, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosemeire Brondi Alves, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 19:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício Vieira de Andrade, Usuário Externo**, em 07/03/2023, às 15:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Montes Vidal, Professor do Magistério Superior**, em 09/03/2023, às 22:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2100161** e o código CRC **57065F4E**.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi pela confiança e orientação durante meu percurso na pós graduação.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios pelo convívio, colaborações e amizades construídas.

A Universidade Federal de Minas Gerais, ao colegiado e a secretaria do Programa de Pós-graduação em Química.

Aos técnicos administrativos e demais funcionários responsáveis por manter a infraestrutura do Departamento de Química. Em especial à Dra. Ivana Silva Lula, Mirra Angelina Neres da Silva, Antônio Gustavo Novais Diniz e Ana Cristina Morgado, pelo auxílio nas análises de ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida, absorção atômica e infravermelho, respectivamente.

Ao Centro de Microscopia-UFMG. À Altair Mendes e Wesller Schmidt pela assistência técnica.

À Me. Larissa Batista dos Santos e ao Prof. Dr. Rodinei Augusti pelas análises de espectrometria de massas. À Me. Larissa também pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa pelo tempo dedicado e as melhorias propostas ao trabalho. A todos os demais professores que contribuíram para a minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa. A CAPES, FAPEMIG e INCT BioNat pelo financiamento da pesquisa.

A minha família e amigos por todo o apoio e torcida.

A todos, minha gratidão.

RESUMO

Biorremediação e Biotransformação como Alternativas Tecnológicas para Remoção de Poluentes Ambientais e Funcionalização de Compostos Orgânicos

Garantir a qualidade dos recursos hídricos mundiais é uma necessidade, sendo cada vez mais evidente a presença de altas concentrações de poluentes nos corpos de água. No presente trabalho foram abordadas duas alternativas biotecnológicas para remoção de poluentes por meio da ação de fungos filamentosos. A primeira abordagem consistiu na avaliação da capacidade de biossorção de íons metálicos Cu(II), Fe(II) e Mn(II) pelas biomassas de *Penicillium janthinellum* e *Syncephalastrum racemosum*. Os resultados foram analisados por espectroscopia de absorção atômica, indicando consideráveis porcentagens de remoção dos íons por ambos microrganismos desde a primeira hora (9,0-42,4%) e atingindo elevados percentuais (65,8-98,1%) ao final de 96 h de experimento. A remoção de íons Fe(II) se destacou, com uma eficiência final de mais de 90%, independentemente da utilização das biomassas em sua forma fresca ou seca e pulverizada. Na segunda abordagem foi avaliada a ação de fungos sobre compostos orgânicos, técnica conhecida como biotransformação. Foi avaliada a capacidade de biotransformação do poluente emergente ibuprofeno (**18**) por *Aspergillus niger* e *S. racemosum*, sob diferentes condições de cultivo (tempo e meio de cultura). Por meio da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear dos extratos produzidos, foram definidas as condições mais eficientes para a decomposição do substrato, direcionando as etapas posteriores até o isolamento dos produtos de biotransformação. A caracterização destes produtos levou ao **ibu-01 (40)**, derivado isolado pela primeira vez, com a inserção de um grupo metoxila pela ação de *A. niger* sobre o ibuprofeno, e ao produto hidroxilado **ibu-02 (20)**, resultante da ação de *S. racemosum* e *A. niger*. Também foi investigada a ação de fungos filamentosos na funcionalização de ligações C-H de alguns produtos naturais, como ácido traquilobânico, longifoleno e isosteviol. Para o isosteviol (**43**), derivado do aditivo alimentar esteviosídeo, foi verificada sua transformação pela ação de *A. niger* e obtenção dos produtos hidroxilados **iso-01 (45)** e **iso-02 (46)**, e o di-hidroxilado **iso-03 (47)**, que poderão ter sua ação frente a atividades biológicas avaliada. A partir dos resultados pode-se inferir o potencial destas espécies na remoção de poluentes inorgânicos e funcionalização de poluentes ambientais e produtos naturais, indicando as diversas possibilidades de uso e o interesse no aperfeiçoamento destas abordagens ecológicas.

Palavras-chave: fungos filamentosos, biorremediação, metais, poluentes emergentes, biotransformação, produtos naturais

ABSTRACT

Bioremediation and Biotransformation as Technological Alternatives for Environmental Pollutants Removal and Organic Compounds Functionalization

Ensuring the quality of the world's water resources is necessary since high concentrations of pollutants in water bodies are increasingly evident. In the present work two biotechnological alternatives for the removal of pollutants through the action of filamentous fungi were addressed. The first approach consisted of the evaluation of the biosorption capacity of the metallic ions Cu(II), Fe(II), and Mn(II) by *Penicillium janthinellum* and *Syncephalastrum racemosum* biomasses. The results were analyzed by atomic absorption spectroscopy, indicating considerable percentages of removal of the ions by both microorganisms from the first hour (9.0-42.4%) and reaching high percentages (65.8-98.1%) at the end of 96 h of the experiment. The removal of Fe(II) ions stood out, with a final efficiency greater than 90%, regardless of the biomass use in its fresh form or after drying and spraying. In the second approach, the action of fungi on organic compounds was evaluated in a technique known as biotransformation. The biotransformation capabilities of the emerging pollutant ibuprofen (**18**) by *Aspergillus niger* and *S. racemosum* were evaluated under different culture conditions (time and culture medium). Through the analysis of the nuclear magnetic resonance spectra of the extracts produced, the most efficient conditions for the substrate decomposition were defined, directing the later steps until the isolation of the biotransformation products. The characterization of these products led to **ibu-01 (40)**, a derivative isolated for the first time, with the insertion of a methoxyl group by the action of *A. niger* on ibuprofen, and the hydroxylated product **ibu-02 (20)**, resulting from the action of *S. racemosum* and *A. niger*. The filamentous fungi action for C-H bonds functionalization of some natural products such as trachylobanic acid, longifolene, and isosteviol was also investigated. For isosteviol (**43**), derived from the food additive stevioside, its transformation by the action of *A. niger* was verified, obtaining the hydroxylated products **iso-01 (45)** and **iso-02 (46)**, and the dihydroxylated product **iso-03 (47)**, which, in the future, may have their action against biological activities evaluated. From the results is possible to infer the potential of these species in the removal of inorganic pollutants and functionalization of environmental pollutants and natural products, indicating the various possibilities of use and the interest in improving these ecological approaches.

Key-words: filamentous fungi, bioremediation, metals, emerging pollutants, biotransformation, natural products

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas químicas de alguns contaminantes emergentes comumente encontrados em matrizes aquosas urbanas.....	31
FIGURA 2 – Estruturas químicas do ibuprofeno (18) e de alguns de seus produtos de degradação: 1-hidroxi-ibuprofeno (19), 2-hidroxi-ibuprofeno (20), e carboxi-ibuprofeno (21).	32
FIGURA 3 – Estruturas químicas do estigmasterol (22), colesterol (23) e classes de derivados esteroides oxidados (24-27) – substituinte R varia de acordo com o esteroide de origem (POUDEL <i>et al.</i> , 2022).	33
FIGURA 4 – Estruturas químicas dos moduladores epigenéticos inibidores de DNTMs: hidralazina (28) e procaína (29).	36
FIGURA 5 – Representação de interações químicas entre grupos funcionais (carboxilato, sulfato, fosfato) presentes em superfícies fúngicas e íons metálicos (M^{n+}) presentes em matrizes aquosas contaminadas. Fonte: autoria própria.....	38
FIGURA 6 – Estrutura química da laxogenina (30) com a indicação dos sítios de mono e poli-hidroxilação mais recorrentes segundo estudo de Wang <i>et al.</i> (2019).....	39
Figura 7 – Estrutura química do diclofenaco (31) com a indicação de sítios de mono e poli-hidroxilação recorrentes (OLICÓN-HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2019).....	40
FIGURA 8 – Estruturas químicas do ácido traquilobânico (32) e derivados (33-35), obtidos como produtos de biotransformação por <i>S. racemosum</i> (DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2018).	41
FIGURA 9 – Estruturas químicas do ácido artemisínico (36) e derivados (37-39), obtidos como produtos de biotransformação por <i>T. roseum</i> (SINGH <i>et al.</i> , 2019).....	41
FIGURA 10 – Esquema dos experimentos de biorremediação de soluções aquosas contendo os íons metálicos Cu(II), Mn(II) e Fe(II) pelas biomassas fúngicas de <i>P. janthinellum</i> e <i>S. racemosum</i>	48
FIGURA 11 – Processo de obtenção dos extratos dos micélios (EM) e extratos dos meios aquosos (EA) após experimentos de biotransformação do ibuprofeno por (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>P. janthinellum</i> e (c) <i>S. racemosum</i>	54
FIGURA 12 – Esquema da produção de extratos da biorremediação de ibuprofeno por <i>A. niger</i> e isolamento dos produtos de biotransformação ibu-01 e ibu-02.	56
FIGURA 13 – Esquema da produção de extratos da biorremediação de ibuprofeno por <i>S. racemosum</i> , com e sem o uso de cloridrato de hidralazina, e isolamento do produto de biotransformação ibu-02.	57
FIGURA 14 – Esquema da produção de extratos dos experimentos de biorremediação de estigmasterol por <i>M. plumbeus</i> , com e sem a adição do modulador cloridrato de procaína (CP).	61
FIGURA 15 – Esquema da produção de extratos da biorremediação de ácido traquilobânico, isosteviol e (+)-longifoleno pelos fungos <i>A. niger</i> (AN), <i>B. bassiana</i> (BB) e <i>S. racemosum</i> (SR). Descrição das colunas cromatográficas e do isolamento de produtos de biotransformação.....	63

FIGURA 16 – Esquema da classificação taxonômica dos fungos filamentosos utilizados neste trabalho: <i>A. niger</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>B. bassiana</i> , <i>M. plumbeus</i> e <i>S. racemosum</i> . Fonte: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi	64
FIGURA 17 – Características morfológicas observadas macroscopicamente e em microscópio ótico para <i>A. niger</i> , <i>M. plumbeus</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>S. racemosum</i> (40x) e <i>B. bassiana</i> (100x).....	66
FIGURA 18 – Crescimento radial de fungos filamentosos em placas de Petri com ágar batata (PDA) após 4 dias do repique, frente e verso. (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>B. bassiana</i> , (c) <i>P. janthinellum</i> , (d) <i>M. plumbeus</i> , (e) <i>S. racemosum</i>	67
FIGURA 19 – Porcentagens médias de remoção de (a) Cu, (b) Fe e (c) Mn de suas respectivas soluções a 50 mg L ⁻¹ pela biomassa de <i>P. janthinellum</i> , em diferentes tempos de biorremediação – médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste Tukey, P < 0,05).	70
FIGURA 20 – Porcentagens médias de remoção de (a) Cu, (b) Fe e (c) Mn de suas respectivas soluções a 50 mg L ⁻¹ pela biomassa de <i>S. racemosum</i> , em diferentes tempos de biorremediação – médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste Tukey, P < 0,05).	72
FIGURA 21 – Análise de componentes principais - gráfico score PC 1 x PC 2 obtido com os percentuais de remoção de metais no processo de biorremediação em triplicata.	75
FIGURA 22 – Análise de componentes principais - gráfico score PC 2 x PC 3 obtido com os percentuais de remoção de metais no processo de biorremediação em triplicata.	75
FIGURA 23 – Gráfico <i>loadings</i> em PC 1.	76
FIGURA 24 – Gráfico <i>loadings</i> em PC 2.	76
FIGURA 25 – Gráfico <i>loadings</i> em PC 3.	76
FIGURA 26 – Biomassas ER de <i>P. janthinellum</i> e <i>S. racemosum</i> (a) em sua forma fresca e (b-c) secas e pulverizadas.....	77
FIGURA 27 – Porcentagens médias de remoção de Fe(II) pelas biomassas ER frescas e após secagem de <i>P. janthinellum</i> em diferentes tempos de biorremediação.	78
FIGURA 28 – Porcentagens médias de remoção de Fe(II) pelas biomassas ER frescas e após secagem de <i>S. racemosum</i> em diferentes tempos de biorremediação.	78
FIGURA 29 – Espectro no infravermelho das biomassas de <i>P. janthinellum</i> controle e após biorremediação de Fe(II), Cu(II) e Mn(II) – KBr, 400-4000 cm ⁻¹	82
FIGURA 30 – Espectro no infravermelho das biomassas de <i>S. racemosum</i> controle e após biorremediação de Fe(II), Cu(II) e Mn(II) – KBr, 400-4000 cm ⁻¹	82
FIGURA 31 – Imagens de MEV da biomassa de <i>P. janthinellum</i> : (a) sem contato com metal; após contato com (b) Fe(II), (c) Cu(II) e (d) Mn(II) – aumento 5000x.....	85
FIGURA 32 – Imagens de MEV da biomassa de <i>S. racemosum</i> : (a) sem contato com metal; após contato com (b) Fe(II), (c) Cu(II) e (d) Mn(II) – aumento 5000x (a, b e d) e 10000x (c).....	86

FIGURA 33 – Imagens de MEV da biomassa de <i>S. racemosum</i> : (a) após tratamento com Fe(II), região rugosa, aumento de 1000x e 5000x; (b) após tratamento com Mn(II), rachadura, aumento de 100x e 1000x.....	87
FIGURA 34 – Mapa químico (a) e espectro de impressão digital (b) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>P. janthinellum</i> na ausência de metal (500x, 15kV).	88
FIGURA 35 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>P. janthinellum</i> após bioissorção de Fe(II) (2000x, 15kV).	88
FIGURA 36 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>P. janthinellum</i> após bioissorção de Cu(II) (2000x, 15kV).	89
FIGURA 37 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>P. janthinellum</i> após bioissorção de Mn(II) (200x, 15kV).	89
FIGURA 38 – Mapa químico (a) e espectro de impressão digital (b) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>S. racemosum</i> na ausência de metal (500x, 15kV).	90
FIGURA 39 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>S. racemosum</i> após bioissorção de Fe(II) (500x, 15kV).....	90
FIGURA 40 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de <i>S. racemosum</i> após bioissorção de Cu(II) (500x, 20kV).	91
FIGURA 41 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassas de <i>S. racemosum</i> após bioissorção de Mn(II) (200x, 15kV).	91
FIGURA 42 – Espectro de RMN de ¹ H do ibuprofeno (400 MHz, CDCl ₃).	93
FIGURA 43 – Espectro de RMN de ¹ H do extrato (EA) obtido após contato de (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>P. janthinellum</i> e (c) <i>S. racemosum</i> com ibuprofeno por 6 dias em meio aquoso (400 MHz, CDCl ₃).....	95
FIGURA 44 – Espectro de RMN de ¹ H do extrato do micélio (EM) obtido após contato de <i>S. racemosum</i> com ibuprofeno por 6 dias em meio aquoso (400 MHz, CDCl ₃) – perfil semelhante foi obtido para os micélios das outras espécies fúngicas utilizadas.....	96
FIGURA 45 – Espectro de RMN de ¹ H dos extratos obtidos após 10 dias de contato de <i>A. niger</i> com ibuprofeno (a) em meio aquoso (EA) e (b) em meio PDB (EC) (400 MHz, CDCl ₃).	98
FIGURA 46 – Espectro de RMN de ¹ H dos extratos obtidos após 10 dias de contato de <i>S. racemosum</i> com ibuprofeno (a) em meio aquoso (EA) e (b) em meio PDB (EC) (400 MHz, CDCl ₃). A seta em (a) indica um simpleto não observado em (b).	99
FIGURA 47 – Estrutura química proposta para ibu-01.....	100
FIGURA 48 – Espectros de RMN de ¹ H do (a) ibuprofeno e do (b) produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl ₃).	102
FIGURA 49 – Espectro de RMN de ¹³ C do produto de biotransformação ibu-01 (100 MHz, CDCl ₃).	103
FIGURA 50 – Subespectro DEPT 135 do produto de biotransformação ibu-01 (100 MHz, CDCl ₃).	103

FIGURA 51 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl ₃).	104
FIGURA 52 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl ₃) – região de 0,7 a 3,1 ppm.	104
FIGURA 53 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl ₃) – região de 3,4 a 7,4 ppm.	105
FIGURA 54 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo positivo, para o composto ibu-01.	105
FIGURA 55 – Estrutura química proposta para ibu-02.	107
FIGURA 56 – Espectros de RMN de ¹ H do (a) ibuprofeno (400 MHz, CDCl ₃) e do (b) produto de biotransformação ibu-02 (400 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD).	108
FIGURA 57 – Espectro de RMN de ¹³ C do produto de biotransformação ibu-02 (100 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD).	109
FIGURA 58 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação ibu-02 (400 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD).	109
FIGURA 59 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação ibu-02 (400 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD).	110
FIGURA 60 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto ibu-02.	110
FIGURA 61 – Espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) dos extratos obtidos pelo contato de ibuprofeno com <i>A. niger</i> por (a) 6, (b) 8, (c) 10, (d) 12 e (e) 14 dias – as setas indicam sinais adicionais e o X indica regiões onde um sinal observado nos demais espectros não foi observado.....	114
FIGURA 62 – Perfil cromatográfico do ibuprofeno, produtos de biotransformação e extratos obtidos com diferentes tempos de reação entre ibuprofeno e <i>A. niger</i> (detecção a 220 nm).	116
FIGURA 63 – Espectro de RMN de ¹ H do (a) estigmasterol, (b) do controle do meio complexo, (c) do extrato do caldo de <i>M. plumbeus</i> -estigmasterol, e (d) do extrato do caldo de <i>M. plumbeus</i> -estigmasterol-cloridrato de procaína (400 MHz, CDCl ₃) – as setas destacam sinais novos de interesse.	118
FIGURA 64 – Estrutura química do cloridrato de procaína (41) e estrutura proposta para o produto CP-01 (42).	119
FIGURA 65 – Espectros de RMN de ¹ H do (a) modulador cloridrato de procaína e (b) seu derivado (CP-01) (400 MHz, CDCl ₃).	120
FIGURA 66 – Subspectros DEPT 135 do (a) modulador cloridrato de procaína e (b) seu derivado (CP-01) (100 MHz, CDCl ₃).	121
FIGURA 67 – Estruturas químicas dos produtos naturais utilizados em experimentos de biotransformação por <i>A. niger</i> , <i>B. bassiana</i> e <i>S. racemosum</i> : ácido traquilobânico (32), isosteviol (43) e (+)-longifoleno (44).	122
FIGURA 68 – Espectros de RMN de ¹ H do (a) (+)-longifoleno (400 MHz, CDCl ₃) e (b) fração sólida do extrato obtido após contato do substrato com <i>S. racemosum</i> por 10 dias em meio PDB (400 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD).	124

FIGURA 69 – Espectros de RMN de ^1H do (a) ácido traquilobânico (400 MHz, CDCl_3) e do (b) extrato EC obtido após contato do substrato com <i>A. niger</i> por 10 dias em meio PDB (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).	124
FIGURA 70 – Espectros de RMN de ^1H do (a) isosteviol (400 MHz, CDCl_3) e do (b) extrato EC obtido após contato do substrato com <i>A. niger</i> por 10 dias em meio PDB (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).	125
FIGURA 71 – Espectro de RMN de ^1H do isosteviol (400 MHz, CDCl_3).	126
FIGURA 72 – Subespectro DEPT 135 do isosteviol (100 MHz, CDCl_3).	126
FIGURA 73 – Espectro de RMN de ^{13}C do isosteviol (a) completo e (b) ampliação da região de δ_c entre 10-60 ppm (100 MHz, CDCl_3).	127
FIGURA 74 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto iso-01.	129
FIGURA 75 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto iso-02.	129
FIGURA 76 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto iso-03.	129
FIGURA 77 – Estrutura química proposta para iso-01.	130
FIGURA 78 – Espectro de RMN de ^1H do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	131
FIGURA 79 – Subespectro DEPT 135 do produto de biotransformação iso-01 (100 MHz, CD_3OD).	131
FIGURA 80 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	132
FIGURA 81 – Mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-01, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CD_3OD).	132
FIGURA 82 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	133
FIGURA 83 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	133
FIGURA 84 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação iso-01 (100 MHz, CD_3OD).	134
FIGURA 85 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CD_3OD).	134
FIGURA 86 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	135
FIGURA 87 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	135
FIGURA 88 – Seção expandida (3) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	136
FIGURA 89 – Seção expandida (4) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).	136

FIGURA 90 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD ₃ OD).	137
FIGURA 91 – Estrutura química proposta para iso-02.	138
FIGURA 92 – Espectro de RMN de ¹ H do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	139
FIGURA 93 – Subespectro DEPT 135 do produto de biotransformação iso-02 (100 MHz, CDCl ₃).	139
FIGURA 94 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	140
FIGURA 95 – Mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-02, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CDCl ₃).	140
FIGURA 96 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	141
FIGURA 97 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	141
FIGURA 98 – Espectro de RMN de ¹³ C do produto de biotransformação iso-02 (100 MHz, CDCl ₃).	142
FIGURA 99 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CDCl ₃).	142
FIGURA 100 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	143
FIGURA 101 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	143
FIGURA 102 – Seção expandida (3) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	144
FIGURA 103 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl ₃).	144
FIGURA 104 – Estrutura química proposta para iso-03.	145
FIGURA 105 – Espectro de RMN de ¹ H em janela reduzida do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	146
FIGURA 106 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	147
FIGURA 107 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	147
FIGURA 108 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	148
FIGURA 109 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	148
FIGURA 110 – Seção expandida (3) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	149
FIGURA 111 – Seção expandida (4) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C ₅ H ₅ N).	149

FIGURA 112 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-03, com as correlações que explicam OH-7 em posição β destacadas (600 MHz, C₅H₅N).
..... 150

FIGURA 113 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-03, com as correlações que explicam OH-1 em posição α destacadas (600 MHz, C₅H₅N).
..... 150

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Prevalência dos níveis de metais sobre valores de referência (VR) em uma amostragem da população de Brumadinho, de acordo com os estudos de MOTA <i>et al.</i> , 2022.	28
TABELA 2 – Parâmetros variados nos experimentos de biotransformação de compostos orgânicos.....	52
TABELA 3 – Remoção de cobre pela biomassa de <i>P. janthinellum</i> após 60 min de contato.....	68
TABELA 4 – Porcentagens médias de remoção de Fe(II) entre 24-96 h por biomassas frescas de <i>P. janthinellum</i> e <i>S. racemosum</i> , em uso contínuo e com troca de biomassa a cada 24 h.....	80
TABELA 5 – Frequências (cm ⁻¹) e atribuições de bandas no infravermelho para biomassas de <i>P. janthinellum</i> e <i>S. racemosum</i> sem (controle) e com o tratamento com soluções aquosas de 50 mg L ⁻¹ de Fe(II), Cu(II) e Mn(II).....	83
Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) obtidos para o ibuprofeno, e deslocamentos químicos de hidrogênio (500 MHz, CD ₃ OD) e carbono (125 MHz, CD ₃ OD) apresentados por Marco-Urrea <i>et al.</i> (2009).	93
TABELA 7 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl ₃) do produto de biotransformação ibu-01	106
TABELA 8 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD, 400MHz) do produto de biotransformação ibu-02	111
TABELA 9 – Respostas dos ensaios ecotoxicológicos para ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno (2-OH-IBU) realizados por Grabarczyk <i>et al.</i> (2020).....	113
TABELA 10 – Dados espectroscópicos de RMN de ¹³ C (100 MHz) para o isosteviol e os produtos de biotransformação iso-01, iso-02 e iso-03	128

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Método para obtenção do perfil cromatográfico dos extratos obtidos após contato ibuprofeno- <i>A. niger</i> em diferentes números de dias.....	59
QUADRO 2 – Formulação do meio de cultura complexo a base de sacarose (DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2018)	59

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
2-OH-IBU	2-hidroxi-ibuprofeno
AN	<i>Aspergillus niger</i>
BB	<i>Beauveria bassiana</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CM	Centro de Microscopia
CP	Cloridrato de procaína
d	Dupleto
DEPT	Do inglês, <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> – Intensificação da distorção por transferência de polarização
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
DQ	Departamento de Química
EA	Extrato do meio aquoso
EC	Extrato do caldo
EM	Extrato do micélio
ER	Em repouso
ESI-IT-MS	Do inglês, <i>Electrospray Ionisation and Ion-Trap Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador <i>ion-trap</i>
FAAS	Do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> – Espectrometria de absorção atômica com chama

FTIR	Do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GRAS	Do inglês, <i>Generally Recognized as Safe</i> – Geralmente reconhecido como seguro
<i>J</i>	Constante de acoplamento
HMBC	Do inglês, <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i> – Correlação heteronuclear em múltiplas ligações
HPLC	Do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
HSQC	Do inglês, <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i> – Correlação heteronuclear de múltiplo <i>quantum</i>
IC	Intervalo de confiança
La β B	Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios
LAREMAR	Laboratório de ressonância magnética de alta resolução
LC ₅₀	Do inglês, <i>50% Lethal Concentration</i> – Toxicidade aguda
LDL	Do inglês, <i>Low density lipoprotein</i> – Lipoproteínas de baixa densidade
m	Multiplete
MEV-EDS	Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por dispersão em energia em raios-X
MS	Do inglês, <i>Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas
NOESY	Do inglês, <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> – Espectroscopia de efeito nuclear <i>Overhauser</i>
OECD	Do inglês, <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> – Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico
ODS	Objetivos de desenvolvimento sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas

P.A.	Do latim, <i>pro Analyse</i> – Para análise
PCA	Do inglês, <i>Principal Component Analysis</i> – Análise por componentes principais
PDA	Do inglês, <i>potato dextrose agar</i> – Agar batata dextrose
PDB	Do inglês, <i>potato dextrose broth</i> – Caldo batata dextrose
PIB	Produto interno bruto
PJ	<i>Penicillium janthinellum</i>
PMA	Do inglês, <i>phosphomolybdic acid</i> – Ácido fosfomolibdico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sl	Sinal largo
SR	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
TOCSY	Do inglês, <i>Total Correlation Spectroscopy</i> – <i>Espectroscopia de correlação total</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNICEF	Do inglês, <i>United Nations Children's Fund</i> – Fundo das Nações Unidas para a Infância
UV	Ultravioleta
VR	Valores de referência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	DESASTRES AMBIENTAIS RECENTES E OS IMPACTOS NO AMBIENTE E NA SOCIEDADE	24
2.2	POLUENTES EMERGENTES	28
2.3	AGENDA 2030 PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL	34
2.4	A BIOTECNOLOGIA NA BUSCA DE SOLUÇÕES AMBIENTAIS E FARMACOLÓGICAS	35
2.4.1	Biorremediação de metais.....	36
2.4.2	Biotransformação de poluentes emergentes e produtos naturais	38
3	EXPERIMENTAL	42
3.1	REAGENTES E MATERIAIS	42
3.2	EQUIPAMENTOS	43
3.3	METODOLOGIA	45
3.3.1	Cultivo e armazenamento das espécies fúngicas	45
3.3.2	Biorremediação de metais.....	46
3.3.2.1	Preparação das biomassas.....	46
3.3.2.2	Biorremediação de íons Cu(II) em diferentes concentrações.....	46
3.3.2.3	Biorremediação de íons Cu(II) e Mn(II) a 50 mg L ⁻¹	47
3.3.2.4	Biorremediação de íons Fe(II) a 50 mg L ⁻¹ com diferentes tratamentos das biomassas fúngicas	47
3.3.2.5	Determinação e análise dos resultados de biorremediação.....	48
3.3.2.5.1	Análise estatística	49
3.3.2.6	Caracterização das biomassas após biorremediação de metais	49
3.3.3	Biotransformação de compostos orgânicos	51
3.3.3.1	Procedimento geral	51
3.3.3.2	Biotransformação do contaminante emergente ibuprofeno.....	53
3.3.3.2.1	Isolamento de produtos de biotransformação do ibuprofeno por <i>A. niger</i>	54
3.3.3.2.2	Isolamento de produto de biotransformação do ibuprofeno por <i>S. racemosum</i>	55
3.3.3.2.3	Caracterização espectrométrica dos produtos de biotransformação do ibuprofeno	58
3.3.3.2.4	Biotransformação de ibuprofeno por <i>A. niger</i> em diferentes tempos de contato e análises espectroscópicas.....	58

3.3.3.3	Biotransformação do contaminante emergente estigmasterol	59
3.3.3.3.1	Isolamento de compostos	60
3.3.3.4	Biotransformação de produtos naturais	60
3.3.3.4.1	Biotransformação de (+)-longifoleno por <i>S. racemosum</i>	61
3.3.3.4.2	Biotransformação de isosteviol por <i>A. niger</i> e isolamento de produtos..	62
3.3.3.4.3	Biotransformação de ácido traquilobânico por <i>A. niger</i>	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESPÉCIES FÚNGICAS.....	64
4.2	BIORREMEDIAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS	68
4.2.1	Biorremediação de íons Cu(II) (10-50 mg L ⁻¹) por <i>P. janthinellum</i>	68
4.2.2	Biorremediação de íons Cu(II), Mn(II) e Fe(II) a 50 mg L ⁻¹	69
4.2.2.1	Biorremediação por <i>P. janthinellum</i>	69
4.2.2.2	Biorremediação por <i>S. racemosum</i>	71
4.2.2.3	Teste t pareado - comparação entre métodos	73
4.2.2.4	Análise por Componentes Principais (PCA)	74
4.2.3	Biorremediação de íons Fe(II) a 50 mg L ⁻¹ por <i>P. janthinellum</i> e <i>S. racemosum</i> variando o tratamento das biomassas	77
4.2.3.1	Biomassas frescas e secas	77
4.2.3.1.1	Teste t pareado - comparação entre métodos.....	79
4.2.3.2	Uso contínuo e troca de biomassas	80
4.2.3.2.1	Teste t pareado - comparação entre métodos.....	80
4.2.4	Caracterização das biomassas após biorremediação.....	81
4.2.4.1	Espectroscopia no infravermelho	81
4.2.4.2	Microscopia eletrônica (MEV-EDS)	84
4.3	BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS	92
4.3.1	Biotransformação do ibuprofeno	92
4.3.1.1	Triagem inicial	94
4.3.1.1.1	Avaliação da taxa de recuperação do ibuprofeno pós extração	96
4.3.1.2	Biotransformação de ibuprofeno por <i>A. niger</i> e <i>S. racemosum</i>	96
4.3.1.3	Caracterização dos produtos de biotransformação do ibuprofeno ..	100
4.3.1.3.1	Caracterização do composto ibu-01	100
4.3.1.3.2	Caracterização do composto ibu-02.....	107
4.3.1.4	Biotransformação de ibuprofeno por <i>A. niger</i> em diferentes tempos de contato	113
4.3.1.4.1	Análise por HPLC	115
4.3.2	Biotransformação de estigmasterol.....	117

4.3.2.1	Caracterização do composto CP-01	119
4.3.3	Biotransformação de produtos naturais	122
4.3.3.1	Caracterização do isosteviol e seus produtos de biotransformação	125
4.3.3.1.1	Caracterização do composto iso-01	130
4.3.3.1.2	Caracterização do composto iso-02	138
4.3.3.1.3	Caracterização do composto iso-03	145
5	CONCLUSÕES	151
	REFERÊNCIAS	153
	APÊNDICES	166

1 INTRODUÇÃO

Desastres ambientais ocorridos recentemente no estado de Minas Gerais ressaltaram a importância da preservação de solos e qualidade da água. O rompimento de grandes barragens contendo rejeitos de mineração gerou mortalidade, destruição e impactos ambientais cujos efeitos poderão ser notados durante as próximas décadas. O aumento da concentração de diversos metais pesados em importantes bacias hidrográficas brasileiras pode gerar graves problemas de saúde humana, seja devido ao contato direto, como por meio da contaminação da cadeia alimentar.

Esta preocupação se torna mais complexa, pois além dos poluentes provenientes de eventos como os acima citados, existem também diversos poluentes emergentes nos corpos de água. Estes poluentes, por definição, são compostos químicos que ainda não são comumente monitorados. Desta forma, não há tratamentos específicos para eles nas estações de tratamento e reabastecimento de água. Estes compostos, por exemplo produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, provém de diversas fontes, são amplamente utilizados e muitas vezes descartados inadequadamente ou eliminados pelas excreções dos seres vivos, podendo estar presentes em elevadas concentrações em águas superficiais e na água potável.

A escassez dos recursos hídricos mundiais, assim como a poluição dos mesmos por consequência de desastres ambientais, descartes domésticos, agrícolas e industriais, e diversas fontes de poluentes emergentes, vem alertando órgãos governamentais e a comunidade científica para a necessidade de estudo e desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento de corpos de água.

Neste sentido, a biotecnologia visa propor alternativas eficientes e sustentáveis para a remoção ou degradação de contaminantes, que possam ser aliadas das técnicas de tratamentos de águas já implementadas. Uma destas alternativas consiste na utilização de fungos filamentosos como agentes de biorremediação, um processo que visa a remoção de poluentes, inclusive íons metálicos. Esta remoção pode ocorrer por diferentes processos, como por adsorção dos mesmos na superfície da biomassa fúngica. Outro mecanismo de biorremediação consiste na produção de modificações nas estruturas de poluentes orgânicos (biotransformação), degradando-os ou transformando-os em outros compostos que podem apresentar menor toxicidade em relação ao poluente inicial. A funcionalização de compostos orgânicos pelas espécies fúngicas também pode gerar substâncias, novas ou conhecidas, que apresentem atividades biológicas de interesse. Estas substâncias podem ser funcionalizadas com grande seletividade, o que por vezes é desafiador em reações convencionais de síntese.

Biorremediação e biotransformação são processos que podem ser considerados metodologias verdes, pois as reações podem ser realizadas em água e em condições brandas de temperatura e pressão, diminuindo o gasto de energia elétrica, e com uso reduzido de solventes, minimizando a produção de novos resíduos. As biomassas fúngicas são materiais biodegradáveis cuja reprodução e manutenção são relativamente fáceis e de baixo custo e, além disso, a diversidade fúngica existente possibilita inúmeras combinações de estudo.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar novos processos de biorremediação e biotransformação por fungos filamentosos que possam gerar novas aplicações ambientais e/ou farmacológicas. Para tanto, os objetivos específicos são: a) verificar a capacidade de biorremediação de íons metálicos pelos fungos selecionados, variando as condições empregadas; b) caracterizar as biomassas utilizadas como materiais bioSORVENTES; c) verificar a capacidade de biotransformação dos contaminantes emergentes (+/-)-ibuprofeno e estigmasterol pelos fungos selecionados, com e sem a aplicação de moduladores epigenéticos, variando as condições empregadas; d) verificar a capacidade de biotransformação dos produtos naturais ácido traquilobânico, isosteviol e (+)-longifoleno pelos fungos selecionados; e) isolar e caracterizar os produtos de biotransformação fúngica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desastres ambientais recentes e os impactos no ambiente e na sociedade

O aumento das atividades industriais, da exploração dos recursos minerais, do desenvolvimento urbano e do crescimento populacional tem gerado aumento significativo na demanda por água, energia e infraestrutura (VOUMIK & SULTANA, 2022). Estudos indicam uma relação de longo prazo entre o desenvolvimento financeiro dos países, indicado pelo crescimento do produto interno bruto (PIB), e a industrialização, o consumo de energia, as emissões de dióxido de carbono (CO₂) e outros tipos de resíduos (OSOBAJO *et al.*, 2020; VAN BAY, 2020). A China exemplifica bem este efeito, pois com três décadas de rápido desenvolvimento econômico, atingiu mais de 10% de crescimento anual (ABBASS *et al.*, 2022), tornando a segunda economia (PIB estimado em 18,32 trilhões de dólares em 2022) (IMF, 2022) e o maior poluidor (emissão de 9,9 bilhões de toneladas de CO₂ em 2020) do mundo (BP, 2021).

Como consequência destas atividades antropogênicas, associadas a processos naturais de degradação, houve aumento dos níveis de contaminação do ar, do solo e dos cursos de água com diversos resíduos tóxicos advindos de fontes comerciais, industriais, radioativas e agrícolas (CHANDNANI *et al.*, 2022). Dentre estes poluentes, podem-se destacar os metais, que são liberados nas matrizes aquosas por indústrias de diferentes segmentos: têxtil, de moldagem de metais, mineração, nuclear, de produção de combustíveis, baterias, pesticidas e fertilizantes, entre outras (SARAVANAN *et al.*, 2022). Os íons metálicos, ao se acumularem em plantas (HUSSAIN *et al.*, 2021) e organismos aquáticos (BHAT *et al.*, 2023), entram nas cadeias tróficas que interligam os seres vivos podendo causar a emergência de doenças nos seres humanos. O alto consumo de metais pode resultar na deposição deles nos tecidos e em danos oxidativos nas células, assim como podem gerar cânceres, mutagenicidade, genotoxicidade, desregulação endócrina e neurotoxicidade a longo prazo (HUSSAIN *et al.*, 2021). A acumulação de Fe, Mn e Cu no cérebro, por exemplo, é associada a diversas doenças neurodegenerativas como manganismo (exposição longa a Mn), doença de Parkinson, aceruloplasminemia (deposição cerebral de Fe), doença de Wilson e de Alzheimer (deposição cerebral de Cu) (AASETH & NURCHI, 2022).

Áreas de mineração representam uma das principais fontes de contaminação ambientais por metais (DOUMAS *et al.*, 2018). A atividade mineradora no Brasil é muito

explorada, e a região de Minas Gerais possui uma das maiores jazidas de minério de ferro do mundo (ORLANDO *et al.*, 2020). O ferro é essencial para a vida humana, pois sua falta pode causar anemia, mas pode levar a graves problemas de saúde quando em excesso, como a geração de danos ao fígado e ao sistema nervoso central, e agravamento de distúrbios hematológicos (NAIRZ & WEISS, 2020). Em um curto período, o estado de Minas Gerais, Brasil, registrou dois grandes desastres ambientais com o rompimento de barragens de mineração de ferro, que ocasionaram muitas perdas humanas e graves impactos ambientais, de saúde pública e sociais (FREITAS *et al.*, 2019), cujas proporções dos efeitos ainda vêm sendo avaliadas.

O desastre de Mariana, ocorrido em 5 de novembro de 2015, consistiu no rompimento da barragem de Fundão, sendo considerado o maior desastre ambiental registrado no Brasil e o maior desastre de mineração do mundo (CORDEIRO *et al.*, 2019). Mais de 50 milhões m³ de lama de rejeitos foram liberados, dentre os quais 39 milhões de m³ atingiram a bacia hidrográfica do Rio Doce, causando a morte de 19 seres humanos e afetando a vida aquática e terrestre no entorno (SEGURA *et al.*, 2016). Os rejeitos percorreram 663 km até a foz do rio Doce no Espírito Santo, atingindo neste percurso 36 municípios (FREITAS *et al.*, 2019), muitos dos quais utilizam a captação de água do Rio Doce para abastecimento público, que teve de ser imediatamente interrompida devido à turbidez que impossibilitava o tratamento da água (QUADRA *et al.*, 2019). Estima-se que 150.000 toneladas do sedimento inicial tenham chegado à costa marítima, representando mais de 25.000 toneladas de Fe (SCHETTINI & HATJE, 2020). Após o derramamento, amostras de água contendo lama apresentaram concentrações de Fe e Mn quase quatro vezes maiores do que o limite máximo estabelecido na legislação brasileira para a qualidade dos corpos de água, assim como outros metais em menores teores (Ba, Pb, As, Sr e Al), que também apresentam potencial de mobilização da lama para a água (SEGURA *et al.*, 2016). Concentrações de Fe e Mn acima dos limites estabelecidos continuaram sendo detectadas em pontos ao longo da bacia do Rio Doce nos dois anos seguintes (REIS *et al.*, 2019). Essa mobilização de metais traço é favorecida devido ao ciclo redox do Fe. Quando óxidos de ferro presentes nos rejeitos depositados no estuário e nas margens do rio são estimulados pela matéria orgânica no solo proveniente da atividade de plantas, estes podem ser reduzidos gerando a liberação de metais traço para os corpos de água (QUEIROZ *et al.*, 2018). Em quatro anos de acompanhamento desses processos geoquímicos, uma diminuição no tamanho médio dos cristais dos óxidos de ferro e na cristalinidade foi detectada. O menor tamanho das partículas infere em um aumento das interações com espécies catiônicas e aniônicas e conseqüente maior reatividade, enquanto o decréscimo da cristalinidade aumenta a área superficial e a desordem natural. Estes fatores somados geram uma maior

susceptibilidade a dissolução redutiva, levando a liberação de poluentes (QUEIROZ *et al.*, 2022).

Os efeitos do aumento da concentração de metais nas águas do Rio Doce e em sua foz vêm sendo analisados desde o rompimento da barragem. Foram confirmadas correlações positivas entre a concentração do patógeno do adenovírus humano (HAdV) e a presença de As, Ba, Fe, Pb, Mn e Ni (REIS *et al.*, 2019). Efeitos citogenotóxicos persistentes foram detectados a mais de 300 km do rompimento, como aumento da frequência de aberrações cromossômicas em células de *Allium cepa* quando em contato com a água contendo concentrações extremamente altas de partículas de Fe, Al e Mn (QUADRA *et al.*, 2019). Em uma pesquisa realizada em 2016 com moradores do distrito de Barra Funda, diretamente expostos pela lama de rejeitos, sintomas clínicos foram relatados. Foram realizados exames de sangue em uma amostragem da população, que indicaram níveis de Al, As, Cd, Cu, Pb, Mn e Ni acima dos valores de referência para a população brasileira, resultado que se manteve em alguns participantes em nova análise realizada em 2018 (VORMITTAG *et al.*, 2021). A sustentabilidade das pescarias regionais também foi impactada, uma vez que concentrações de metais significativamente mais altas, principalmente de Fe e Mn, foram verificadas em larvas de peixes com sedimentos avermelhados aderidos ao corpo e/ou danos no trato digestivo (BONECKER *et al.*, 2019). Além disso, peixes que habitam a zona estuarina apresentaram alterações no nicho isotópico, indicando um esgotamento dos recursos basais da comunidade após o impacto (ANDRADES *et al.*, 2020).

Comunidades biológicas vêm sendo utilizadas como marcadores dos efeitos dos rejeitos a longo prazo na bacia do Rio Doce. Após o monitoramento e análises de componentes principais (PCA), constatou-se grande influência da sazonalidade nas respostas obtidas. A análise de tecidos de camarões mostrou maior biodisponibilidade de Cd, Cr, Cu e Mn durante o período seco (2018), enquanto maior biodisponibilidade de Fe foi inferida ao período úmido (2019), principalmente na zona estuarina (MARASCHI *et al.*, 2022). Este resultado está de acordo com a correlação observada entre a presença de Fe na foz do Rio Doce e os efeitos sob comunidades marinhas, também após quatro anos do desastre, com a indicação de uma diminuição da diversidade de zoo e ictioplânctons, principalmente em condições de alto fluxo do rio (BONECKER *et al.*, 2022). Estudos *in situ* em folhas da espécie *Byrsonima sericea* após 4-5 anos do desastre também indicaram maior concentração de Fe na área costeira e no período chuvoso, e de Mn, Zn e Cu durante o período seco em outros trechos do percurso da lama analisados (OLIVEIRA *et al.*, 2022a). O monitoramento de metais traços no sangue e penas de pássaros de áreas impactadas indicaram uma contaminação ainda significativa após cinco anos, sendo mais pronunciada em amostras coletadas no inverno, quando o material sedimentado é suspenso e carregado pelos ventos, com teores de Pb, Hg, As e Cd acima dos limites toleráveis (ZEBRAL *et al.*, 2022). Em geral, estes estudos

sugerem que os metais carreados pela lama até a foz do rio continuam biodisponíveis, afetando o ecossistema envolvido, e que os impactos podem ser refletidos ao longo dos anos no entorno da bacia hidrográfica do Rio Doce.

Três anos após a desastre de Mariana, um novo grande derramamento foi registrado. O desastre de Brumadinho, ocorrido em 25 de janeiro de 2019, consistiu no rompimento da barragem do Córrego do Feijão (FREITAS *et al.*, 2019), e foi marcado pela grande tragédia humana, com 270 pessoas entre mortos e desaparecidos (VERGILIO *et al.*, 2020). Embora o volume de rejeitos liberados tenha sido menor, 11,7 milhões de m³, as consequências ambientais foram alarmantes (PORSANI *et al.*, 2019). O leito do rio Paraopeba foi atingido, gerando imediatamente altos níveis de turbidez (30 vezes acima dos limites) (THOMPSON *et al.*, 2020). A lama de rejeitos percorreu mais de 300 km em direção à bacia do rio São Francisco, um dos mais importantes cursos de água da América do Sul (PORSANI *et al.*, 2019). Em amostras de água coletadas neste trajeto foram detectadas altas concentrações de Fe, Al, Mn, Ti, e vários outros metais detectados em menores teores, que mesmo assim, excederam os limites máximos de qualidade de águas (Zn, Cu, Pb, Cd e U) e de sedimentos (Cr, Ni, Cu e Cd) (VERGILIO *et al.*, 2020).

Este novo desastre reativa a preocupação com a avaliação dos riscos para a saúde dos indivíduos expostos a lamas de rejeitos ricas em metais. As chances de exposição a microrganismos potencialmente patogênicos aumentaram, uma vez que foram detectadas mudanças nos perfis microbianos a 115 km do derramamento, com o crescimento de colônias microbianas tolerantes a Fe estimulado em até 60 vezes (THOMPSON *et al.*, 2020). O aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares também ressalta a necessidade de monitoramento da saúde dos indivíduos diretamente atingidos (VALENTI & GARNER, 2019). Fonseca *et al.* (2022) ao analisarem 16 pontos ao longo de 336 km do curso do rio Paraopeba durante o ano que se sucedeu ao desastre, inferiram que há uma regeneração do rio com o tempo, pois embora a contaminação de metais seja detectada, apenas Mn estaria acima do limite máximo regulatório ao final da pesquisa em 2020. Entretanto, análises de metais na urina (As, Cd e Hg) e no sangue (Pb e Mn) de uma amostra representativa de moradores de Brumadinho, realizadas em 2021, exibiram a prevalência de níveis de metais acima dos valores de referência para boa parte dos indivíduos participantes, como apresentado na Tabela 1 (p. 28) (MOTA *et al.*, 2022).

Assim como no desastre do rio Doce, a vida aquática do rio Paraopeba foi comprovadamente afetada. A toxicidade de amostras de água e sedimento foi confirmada para a alga *Raphidocelis subcapitata*, o microcrustáceo *Daphnia similis* e o peixe *Danio rerio* (peixe zebra), representantes dos níveis tróficos primário, secundário e terciário, respectivamente. Também foram detectadas as acumulações de Fe, Al e Mn no tecido muscular de peixes expostos às mesmas amostras (VERGILIO *et al.*, 2020). Houve aumento

de efeitos teratogênicos e da mortalidade de embriões do peixe zebra em pontos do rio entre 6 e 464 km do local do rompimento da barragem (THOMPSON *et al.*, 2020), e em experimentos com soluções que reproduziram as concentrações de Fe, Al e Mn detectadas em trechos do rio após 8 meses do desastre (PEIXOTO *et al.*, 2022).

TABELA 1 – Prevalência dos níveis de metais sobre valores de referência (VR) em uma amostragem da população de Brumadinho, de acordo com os estudos de MOTA *et al.*, 2022.

Metal	Material biológico	Valores de referência (VR)	Prevalência de metais acima dos VR na população
As	Urina	$\leq 10 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatina	33,37%
Cd	Urina	$\leq 2 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatina	0,17%
Hg	Urina	$\leq 5 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatina	0,76%
Mn	Sangue	4-15 $\mu\text{g L}^{-1}$	38,08%
Pb	Sangue	$\leq 10 \mu\text{g dL}^{-1}$	5,04%

Embora os exemplos recentes tenham impactos mais diretos para a população brasileira, a preocupação com a qualidade de solos e águas é antigo e mundial, com o desafio de reverter a escassez de recursos hídricos. A preservação dos rios e mares é fundamental, assim como o aperfeiçoamento de tecnologias para tratamento de corpos de água já contaminados por causas naturais e/ou antropogênicas.

2.2 Poluentes emergentes

A água consiste no recurso de maior preocupação no que diz respeito à conservação e reciclagem. Como já mencionado, é evidente o aumento do consumo doméstico, industrial e agrícola e, conseqüentemente, o surgimento de problemas de escassez. Entre o início da década de 90 e os anos 2000 a captação de água para utilização nestas atividades passou de 0,67 para 3,79 trilhões de m^3 por ano, e a previsão é de um aumento de 55% até 2050, segundo a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (MANNINA *et al.*, 2022).

Para o tratamento de águas residuais de origem industrial e doméstica, os principais componentes de contaminação analisados são: sólidos suspensos, orgânicos biodegradáveis, patógenos, nutrientes, metais e compostos orgânicos industriais (ROUSSAK & GESSER, 2013). Entretanto, mesmo com a aplicação de tratamentos de efluentes

avançados, uma porção significativa de compostos químicos permanece nas águas residuais, sendo introduzidos no ciclo da água e encontrados com frequência em águas superficiais (ZAHMATKESH *et al.*, 2022). Estes compostos também podem estar presentes na água potável, mesmo após passar por estações de tratamento para abastecimento (ORTÚZAR *et al.*, 2022). Alguns contaminantes presentes nas matrizes aquosas não passam por sistemas específicos para detecção e tratamento. Estes contaminantes, denominados poluentes emergentes, são substâncias orgânicas, inorgânicas ou particuladas, de origem sintética ou natural, que não são comumente monitorados no ambiente, embora apresentem riscos para os ecossistemas e para a saúde humana (GEISSEN *et al.*, 2015). Laboratórios e centros de pesquisa que monitoram as substâncias ambientais emergentes se uniram para a criação da rede NORMAN, a fim de se ter um registro destes contaminantes. A última atualização da lista, em fevereiro de 2016, contava com 1036 substâncias (NORMAN, 2016).

Dentre os poluentes emergentes orgânicos têm-se como exemplo substâncias contidas em pesticidas (MALI *et al.*, 2023), produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, cosméticos (KUMAR *et al.*, 2023), filtros ultravioletas (SU *et al.*, 2023), drogas ilícitas (KRISHNAN *et al.*, 2023), produtos de uso veterinário, retardadores de chama e produtos químicos industriais diversos (GEISSEN *et al.*, 2015). Os inorgânicos constituem os metais traço e, os contaminantes particulados, são nanopartículas e microplásticos (NGUYEN *et al.*, 2023). Estes contaminantes chegam até as águas subterrâneas e superficiais pelos aterros, pelo estrume animal, pela aplicação de pesticidas em pragas, pelos dejetos humanos, por meio de águas residuais domésticas, hospitalares, industriais e vazamentos (GAVRILESCU *et al.*, 2015).

Estes poluentes e seus derivados podem persistir no ambiente por tempo considerável e podem ser bioacumulados, neste caso atingindo a cadeia alimentar. Muitos apresentam toxicidade, como os disruptores endócrinos, *i.e.*, substâncias que alteram as funções do sistema endócrino, como por exemplo os hormônios sexuais e de crescimento veterinário, glicocorticoides e alguns medicamentos não esteroidais (EBELE *et al.*, 2017). A exposição crônica a estes compostos, mesmo quando em baixas concentrações nas matrizes aquosas, pode gerar problemas de tireoide, no sistema reprodutivo, assim como câncer, Alzheimer e outras doenças (KASONGA *et al.*, 2021). Por sua vez, a presença de altos níveis de antibióticos nas matrizes aquosas vem potencializando a criação de cepas resistentes em populações bacterianas naturais no ecossistema (REIS *et al.*, 2020).

A falta de monitoramento e incapacidade de efetuar a remoção completa destes poluentes durante o tratamento de água faz com que estejam presentes em concentrações suficientes para gerar riscos aos organismos aquáticos e seres humanos, em estações de tratamento de água potável e de água residual. Isto foi observado não somente nos efluentes, mas também nos afluentes (PENÃ-GUZMÁN *et al.*, 2019) que, a princípio, seriam cursos de

água já tratados e adequados para uso. Penã-Guzmán e colaboradores (2019) reuniram trabalhos realizados na América Latina que mostram a presença de poluentes emergentes em todos os diferentes componentes do ciclo da água urbana. Nesta pesquisa, houve identificação de 197 poluentes emergentes, dentre os quais se destacaram pela maior ocorrência os hormônios sexuais 17β -estradiol **(1)**, estrona **(2)**, 17α -etinilestradiol **(3)** e o composto bisfenol A **(4)**, usado na produção de plásticos e resinas. Todos são disruptores endócrinos de amplo consumo e produção. Em outro estudo realizado com amostras de um rio urbano no sul do Brasil, 33 poluentes emergentes foram detectados, sendo 20 produtos farmacêuticos e 13 pesticidas. Alguns se destacaram por serem detectados em todas as amostras analisadas, como o analgésico e antipirético paracetamol **(5)**, os betabloqueadores metoprolol **(6)** e propranolol **(7)**, os antibióticos sulfametoxazol **(8)** e trimetoprima **(9)**, além da cafeína **(10)**, substância presente em muitos medicamentos e produtos alimentícios. A presença de lidocaina **(11)** também é destacada, pois apesar de ser um medicamento de uso restrito, tem sido utilizada como adulterante de drogas ilícitas. Entre os pesticidas, a presença do fungicida azoxistrobina **(12)** chama a atenção, por ser muito utilizado em culturas de frutas e grãos no Brasil (ARSAND *et al.*, 2023). Entretanto, os compostos mais utilizados como pesticidas mundialmente consistem na classe dos organofosforados ($O=P(OR)_3$). São poluentes emergentes com estruturas diversas, uso amplo e diferentes tempos de meia-vida e toxicidade. Por exemplo, enquanto o herbicida glifosato **(13)** apresenta meia vida de 174 dias e $LC_{50} = 3530$ mg/kg (ingestão por peso do animal testado), o acaricida coumafós **(14)** apresenta estes parâmetros muito mais pronunciados, 1400 dias e $LC_{50} = 41$ mg/kg, respectivamente (MALI *et al.*, 2023). Outra classe preocupante de contaminantes emergentes são os compostos orgânicos halogenados encontrados em alimentos de origem animal, apresentando elevada persistência e toxicidade, como carbazóis e fenóis halogenados, exemplificados pelo 2,7-dibromocarbazol **(15)** e 4-bromofenol **(16)**, respectivamente (LI *et al.*, 2023). Os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais consistem no grupo de poluentes emergentes mais vasto (KUMAR *et al.*, 2023). De acordo com a OECD, o consumo de produtos farmacêuticos vem crescendo por décadas. O uso de antidepressivos, por exemplo, dobrou entre 2000 e 2017 nos países estudados (OECD, 2019). A paroxatina **(17)** é uma das substâncias anti-depressivas mais utilizadas e danosas ao meio ambiente e a saúde humana quando considerado seu potencial como poluente emergente (ANTONOPOULOU *et al.*, 2022). As estruturas químicas dos compostos orgânicos mencionados são apresentadas na Figura 1 (p. 31).

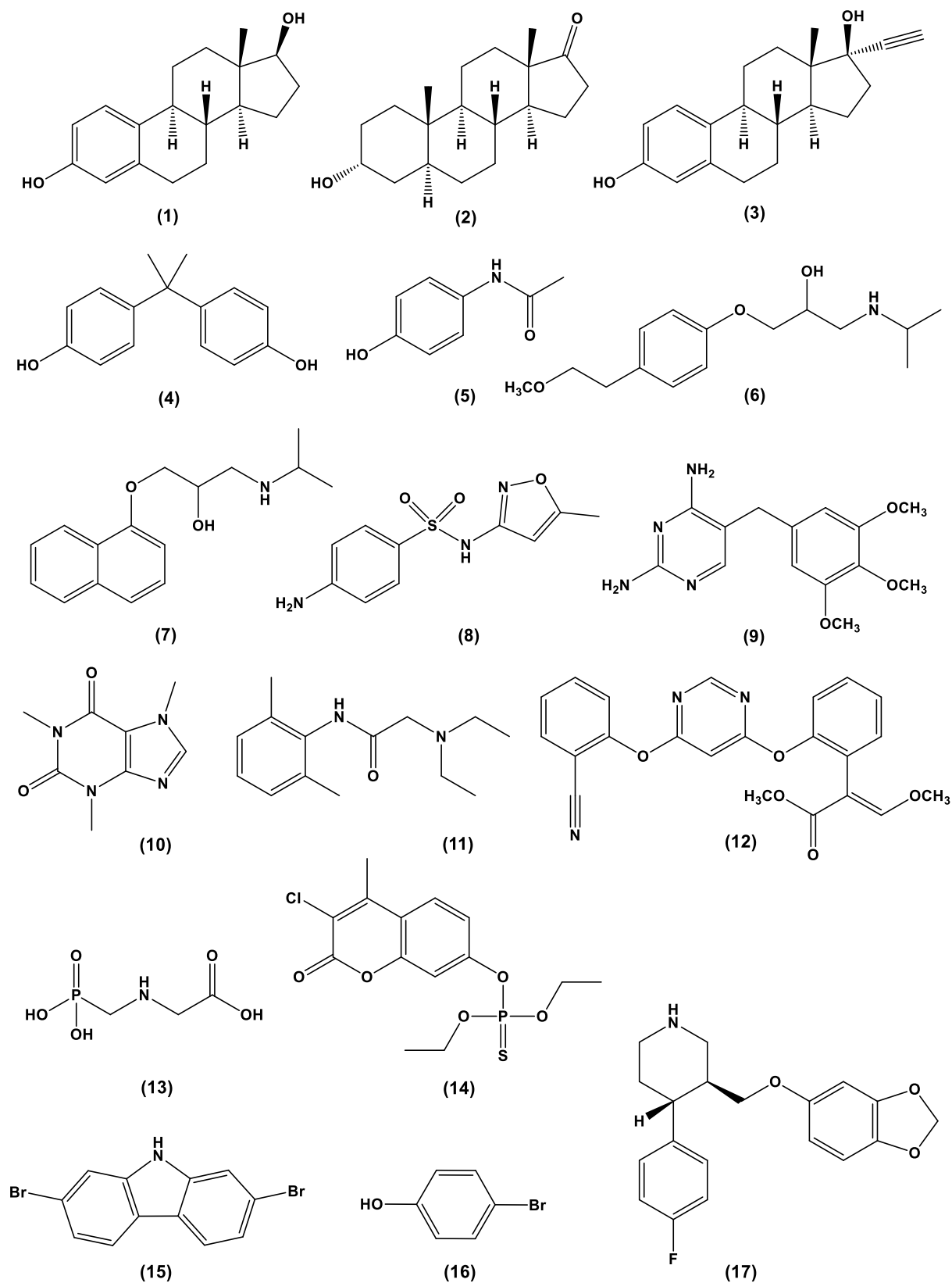


FIGURA 1 – Estruturas químicas de alguns contaminantes emergentes comumente encontrados em matrizes aquosas urbanas.

O grande consumo de inúmeros medicamentos, o fato de que a metabolização deles no organismo é parcial, e o frequente descarte inadequado, fazem com que esse grupo de poluentes emergentes ganhe maior destaque em ações de visam sua degradação (ANWAR *et al.*, 2021). O ibuprofeno (18) (Figura 2) é um exemplo de produto farmacêutico que é um contaminante emergente de ampla recorrência nos corpos de água. Este composto anti-inflamatório não-esteroidal tem prescrição livre em muitos países e, portanto, é amplamente utilizado para controle de dor e febre (RAINSFORD, 2009). No Brasil, é um dos fármacos mais utilizados por automedicação, por apresentar baixo custo e fácil acesso (ARRAIS *et al.*, 2016). Desta forma, o amplo consumo e sua eliminação tanto por urina e fezes, quanto por descarte impróprio, fazem com que esteja comumente presente nos corpos de água, afetando o equilíbrio ecológico (JIA *et al.*, 2020). De acordo com Löffler e colaboradores (2005), o ibuprofeno apresenta relativa baixa persistência em águas superficiais (< 6 dias). Entretanto, como sua liberação no ambiente é constante, acaba se comportando de maneira efetiva como contaminante. Ferrando-Climent e colaboradores (2012) verificaram taxas de redução acima de 90% para o ibuprofeno em experimentos em estações de tratamento de águas residuais. Entretanto, esta redução é atribuída à formação de produtos a partir da degradação do mesmo, seja por metabolismo humano ou de microrganismos presentes em estações de tratamento, águas e sedimentos. As estruturas químicas de alguns dos metabólitos derivados do ibuprofeno frequentemente detectados (19-21) são apresentadas na Figura 2. Apesar disso, o ibuprofeno pode ser encontrado em amostras de água potável em quantidades consideráveis, como relatado no trabalho de Maldaner e Jardim (2012), no qual foi detectado em cinco amostras de água potável coletadas na cidade de Campinas, São Paulo, fornecidas por diferentes estações de tratamento, com concentrações variando entre 87,5 e 625,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

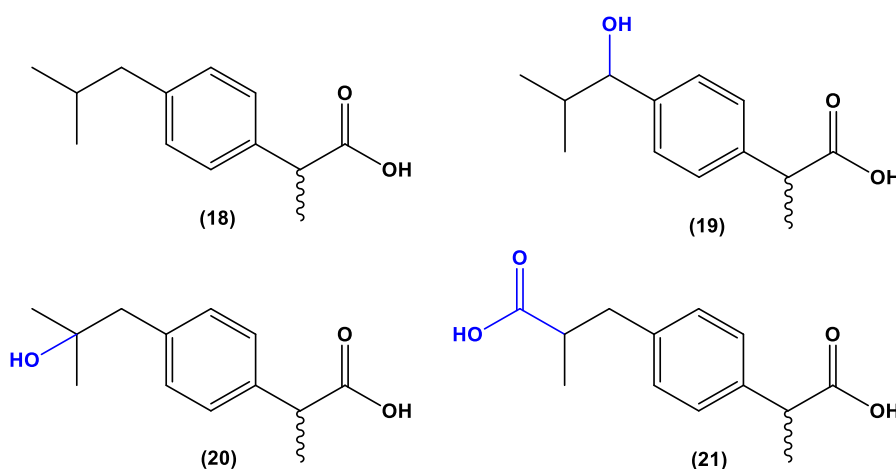


FIGURA 2 – Estruturas químicas do ibuprofeno (18) e de alguns de seus produtos de degradação: 1-hidroxi-ibuprofeno (19), 2-hidroxi-ibuprofeno (20), e carboxi-ibuprofeno (21).

Além dos esteroides já mencionados (1-3), diversos outros são classificados como poluentes emergentes da classe dos disruptores endócrinos. É o caso do estigmasterol (22), esteroide encontrado em espécies vegetais, e do colesterol (23) substância com estrutura análoga encontrada nos mamíferos. O estigmasterol é associado a diversos benefícios a saúde e muitas propriedades farmacológicas continuam sendo investigadas (BAKRIM *et al.*, 2022), uma vez que muitos fitoesteroides são utilizados em formulações nutraceuticas como agentes redutores de colesterol LDL (POUDEL *et al.*, 2022). Entretanto, o aumento do consumo pode ampliar a tendência de encontrá-los como poluentes emergentes em matrizes aquosas. O estigmasterol foi detectado em concentrações de até 85.500 ng L⁻¹ em amostras de águas superficiais e 4.500 ng L⁻¹ em água potável (PENÁ-GUZMAN *et al.*, 2019). Em outras amostras de água potável, coletadas no Brasil em 2006, se destacou como um dos principais poluentes emergentes encontrados (concentração média máxima de 0,34 ± 0,13 µg L⁻¹), assim como o colesterol (0,27 ± 0,07 µg L⁻¹) (SÓDRE *et al.*, 2010). Além disso, fitoesteroides degradam-se facilmente à derivados oxidados, que possuem efeitos aterogênicos e inflamatórios associados, como as classes 5,6-di-hidroxi- (24), 7-hidroxi- (25), 5,6-epoxi- (26) e 7-cetoesteróis (27) (Figura 3) (POUDEL *et al.*, 2022).

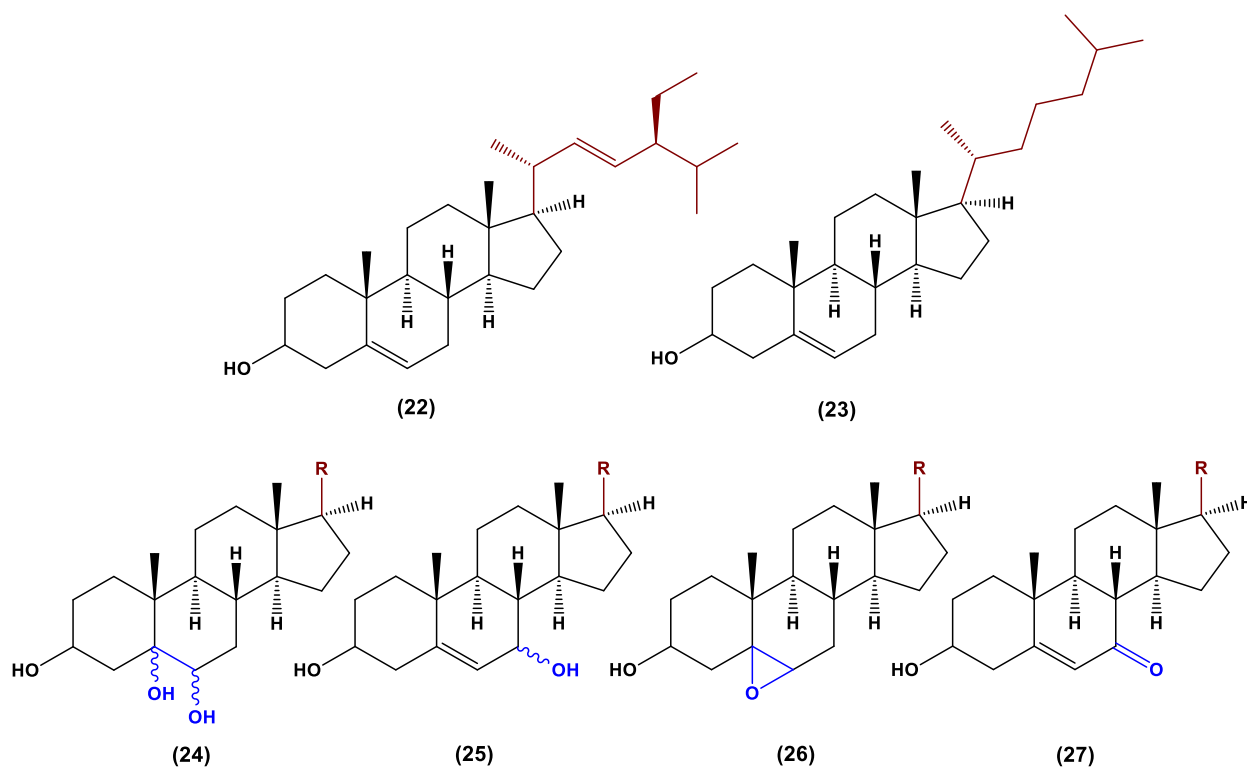


FIGURA 3 – Estruturas químicas do estigmasterol (22), colesterol (23) e classes de derivados esteroides oxidados (24-27) – substituinte R varia de acordo com o esteroide de origem (POUDEL *et al.*, 2022).

2.3 Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável

Apesar de 71% da superfície da Terra ser coberta por água, menos de 0,3% está disponível como água doce (CHANDNANI *et al.*, 2022). Dados do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) (2018) apontavam que até o final de 2015, em todo o mundo, cerca de 844 milhões de pessoas não possuíam uma fonte básica de água potável; para 159 milhões de pessoas a água potável utilizada seria oriunda de fontes de água de superfície desprotegidas, ou seja, sem controle ou tratamento. Em relação ao saneamento básico, os números são mais alarmantes, sendo este serviço inacessível para 2,3 bilhões de pessoas, ou seja, cerca de 30% da população mundial no referido ano. A Somália é um dos países com mais problemas neste quesito, com apenas 40% de seus habitantes com acesso a fontes básicas de água (UNICEF, 2018). Apesar de o Brasil ser privilegiado no quesito de fontes naturais de águas, 73% se concentram na bacia amazônica, contemplando cerca de 5% de população. Além disso, a escassez (principalmente na região Nordeste) e deterioração da qualidade da água (principalmente no Sudeste) se relacionam a outros fatores, como o crescimento da população, da indústria e das atividades agrícolas (PONÇANO & PLONSKI, 2017), ou mesmo períodos de seca em algumas regiões. O UNICEF, assim como outros órgãos mundiais, vem programando suas ações em relação à água e saneamento para atender os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Agenda 2030.

A Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável consiste em um plano de ação proposto por líderes mundiais na sede da ONU em Nova Iorque, em 2015. Os intuitos são aplicar ações durante 15 anos visando a erradicação da pobreza, a proteção do planeta, e a garantia de paz e prosperidade para a população mundial. Para atingir estes desafios globais, indispensáveis para o desenvolvimento sustentável, foram definidos 17 ODS, que contemplam 169 metas (UNITED NATIONS, 2015).

Neste trabalho é destacado o ODS nº 6 - Água Potável e Saneamento. Este objetivo propõe ações para assegurar a disponibilidade e a gestão sustentável da água e saneamento para todos. Uma das metas a ser alcançada até 2030 é: “melhorar a qualidade da água, reduzindo a poluição, eliminando despejo e minimizando a liberação de produtos químicos e materiais perigosos, reduzindo à metade a proporção de águas residuais não tratadas, e aumentando substancialmente a reciclagem e reutilização segura globalmente” (PLATAFORMA AGENDA 2030, 2015).

Os problemas recentes que envolvem disponibilidade e qualidade da água, juntamente com o incentivo da Agenda 2030, evidenciam a necessidade de integração entre tecnologias no tratamento de águas residuais, assim como o desenvolvimento de novas metodologias. Desta forma, a busca por processos biotecnológicos eficientes, que possam

atuar como ferramentas com abordagens mais sustentáveis é de interesse da comunidade científica e dos governantes (GAN *et al.*, 2022).

2.4 A biotecnologia na busca de soluções ambientais e farmacológicas

Diversas técnicas mecânicas e físico-químicas são usadas tradicionalmente no tratamento de águas residuais, por exemplo, precipitação química, troca iônica, floculação e separação por membrana, tratamento eletroquímico, entre outras. Estas técnicas apresentam limitações de eficiência, que dependem do volume do efluente a ser tratado, da concentração de matéria orgânica complexante e de íons metálicos presentes. Porém, alguns problemas para a implementação, custo elevado, e formação de resíduos e produtos secundários tóxicos ainda precisam ser melhor estudados (GAN *et al.*, 2022; ZNAD *et al.*, 2022).

O tratamento biológico de águas superficiais e residuais tem sido cada vez mais apontado como uma ferramenta sustentável para remoção de íons metálicos e outros poluentes, que podem conferir toxicidade aos organismos vivos mesmo em baixas concentrações representando riscos a longo prazo (RAMRAKHIANI *et al.*, 2016). Diversas biomassas podem ser utilizadas para esta finalidade, como carvão ativado, subprodutos agrícolas, plantas, algas, bactérias e fungos (SARAVANAN *et al.*, 2022). A capacidade dos fungos em degradar uma ampla diversidade de poluentes emergentes também foi constatada, e seu uso têm se apresentado como uma alternativa interessante aos processos convencionais de tratamento de águas (KASONGA *et al.*, 2021). Outra aplicabilidade das espécies fúngicas consiste no estudo do direcionamento de sua biossíntese buscando a formação de metabólitos que possam ser utilizados na medicina ou na agricultura (TORRES-MENDOZA *et al.*, 2020).

Muitos medicamentos de ampla utilização são produzidos a partir de metabólitos secundários derivados de fungos, como redutores de colesterol, antibióticos, imunossupressores, entre outros (TAKAHASHI *et al.*, 2022). Metabólitos com novos esqueletos e/ou estereoquímica diferenciada, que não são biossintetizados naturalmente, ou em condições ótimas de cultivo, podem ter sua produção induzida a partir dos avanços na área genética, que exploram vias silenciosas e crípticas do genoma fúngico (BIND *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2020). Diversas estratégias experimentais podem ser utilizadas para a elicitação destas rotas biossintéticas não usuais, como: alterações nutricionais no meio no qual o microrganismo se desenvolve (LIMA *et al.*, 2018a), indução de estresse biótico por meio de experimentos de co-cultivo entre espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2022b), e modulação epigenética (LIMA *et al.*, 2018b). Os moduladores epigenéticos atuam promovendo modificação na

cromatina, ou seja, no complexo de DNA e proteínas, principalmente histonas, resíduos do aminoácido lisina. Promovem assim uma expressão gênica diferenciada, sem alterar o sequenciamento do DNA (BIND *et al.*, 2022). Hidralazina (**28**) e procaína (**29**) (Figura 4) são exemplos de moduladores epigenéticos da classe dos inibidores de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (ALMEIDA, 2014), enzimas que atuam adicionando uma metila aos átomos de carbono na posição 5 da citosina, silenciando genes específicos (BIND *et al.*, 2022). Essa técnica tem ganhado destaque como ferramenta biotecnológica, embora ainda seja pouco explorada.

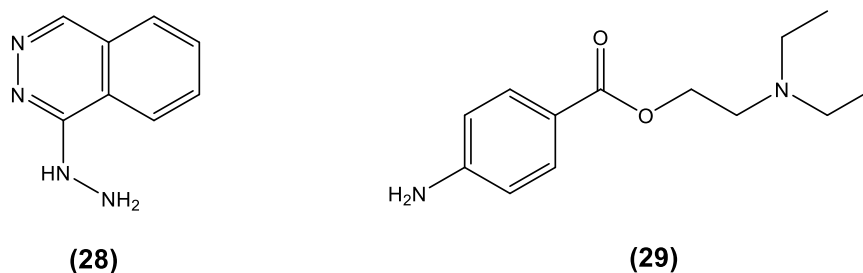


FIGURA 4 – Estruturas químicas dos moduladores epigenéticos inibidores de DNMTs: hidralazina (28) e procaína (29).

Desta forma, metodologias como a biorremediação e a biotransformação fúngicas surgem como processos biotecnológicos que visam entender e utilizar o metabolismo fúngico frente a diferentes substratos, em processos de custo baixo e que apliquem os preceitos da química verde (TAKAHASHI *et al.*, 2017). Dentre os preceitos atendidos podem ser citados a menor utilização de solventes, o aumento da eficiência energética ao utilizar condições brandas de reação (temperatura e pressão ambiente), e a utilização de fontes renováveis como são as biomassas (KÜMMERER & CLARK, 2016).

2.4.1 Biorremediação de metais

A técnica de biorremediação compreende a utilização de biomassas com capacidade de retenção de íons metálicos e substâncias orgânicas presentes em soluções aquosas (TAKAHASHI *et al.*, 2017). As biomassas fúngicas são materiais adsorventes de fácil obtenção e provenientes de recursos renováveis tornando, portanto, o processo mais viável economicamente. Os fungos filamentosos são organismos de eficiência comprovada como agentes de biorremediação que apresentam propriedades únicas decorrentes de sua adaptação ao ambiente e são espécies tolerantes à toxicidade de diversos poluentes (XU *et*

al., 2015). O processo corrobora com alguns princípios da química verde, uma vez que pode ocorrer em água, em pH praticamente neutro, e utilizando pequenos volumes de solventes orgânicos (KUMAR *et al.*, 2021).

Na biorremediação fúngica, ou micorremediação, podem ser utilizadas células em crescimento (bioacumulação) ou em repouso/mortas (biossorção). Embora a bioacumulação consista em um processo mais simples, em geral maiores taxas de remoção são obtidas na biossorção, quando as células estão menos susceptíveis à toxicidade dos metais e não há formação de metabólitos no meio (DE FREITAS *et al.*, 2019).

Em situações práticas, após a sorção dos metais na superfície celular da biomassa, essa biomassa pode ser retirada do meio por processos de filtração, carregando consigo os contaminantes. No processo estão envolvidas substâncias presentes nas paredes celulares fúngicas, como proteínas, lipídios, polissacarídeos como quitina e glucanas, e grupos funcionais carregados negativamente ou com pares de elétrons disponíveis naturalmente nas superfícies das biomassas, como grupos carboxilato, alcóxido, amino, fosfato e sulfato (KAPAHÍ & SACHDEVA, 2019). Estes grupos, capazes de fazer interações físico-químicas, por meio de mecanismos como trocas iônicas, formação de complexos e adsorção física, atuam como uma armadilha natural para íons catiônicos metálicos (Figura 5, p. 38). Esta captura pode ser seletiva para determinado metal ou não (RAMRAKHIANI *et al.*, 2016).

Martins *et al.* (2016) avaliaram o potencial de oito espécies do gênero *Penicillium* em processos de biorremediação dos íons metálicos Cd(II), Co(II), Cu(II), Li(I), Ni(II) e Pb(II), em soluções preparadas com cada íon individualmente, ou em misturas entre eles. Resultados expressivos foram obtidos para a remoção de Pb(II), com a remoção de 91,2% por células de *Penicillium janthinellum* em crescimento, assim como a remoção de 74,4% por células de *Penicillium brasilianum* em repouso atuando sob uma mistura Pb-Li. Estudos também vêm mostrando o potencial da biorremediação fúngica em amostras reais, como por exemplo, a utilização de colunas empacotadas com *Aspergillus flavus* na remoção de mais de 90% de Cd(II), Hg(II) e Pb(II) em amostras de águas superficiais providas de resíduos de estações de encanamento, mares, águas salobras e doce (MAHMOUD *et al.*, 2017). Outra cepa de *A. flavus* em consórcio com duas outras cepas de *Aspergillus fumigatus* exibiram a remoção de 69,1% de Cd(II) e 68,0% de remoção de Cr(IV) em amostras de efluentes industriais (TALUKDAR *et al.*, 2020).

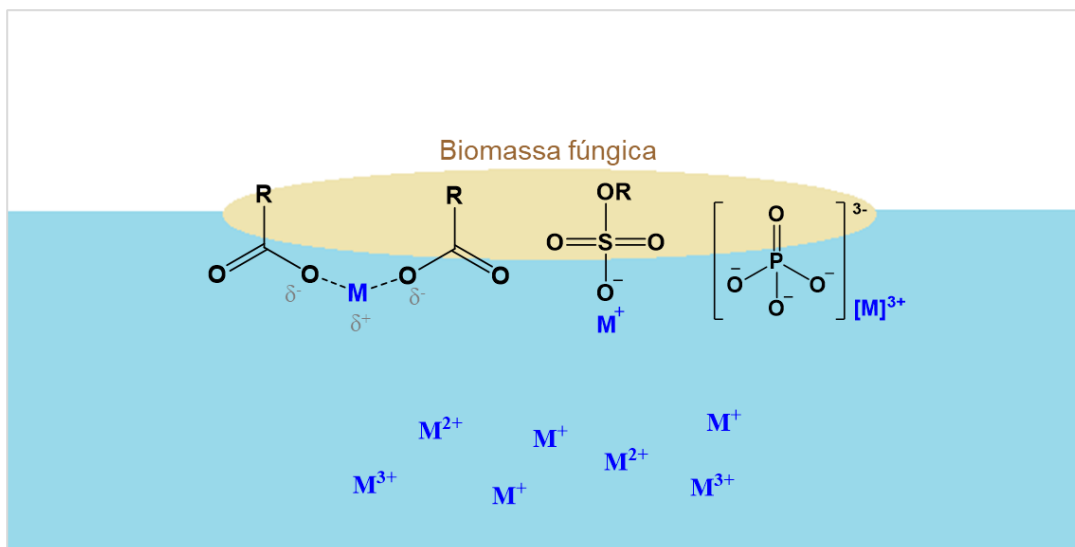


FIGURA 5 – Representação de interações químicas entre grupos funcionais (carboxilato, sulfato, fosfato) presentes em superfícies fúngicas e íons metálicos (M^{n+}) presentes em matrizes aquosas contaminadas. Fonte: autoria própria.

2.4.2 Biotransformação de poluentes emergentes e produtos naturais

Reações diretas em ligações $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ e $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$ são consideradas um desafio e, por muito tempo, esses sítios foram considerados quimicamente inativos (LIAO *et al.*, 2017). Entretanto, a utilização de enzimas em processos industriais para funcionalização de carbonos não-ativados de esteroides foi relatada por Mazur em 1975. Nesta data, havia apenas 15 anos de estudos de reações intramoleculares para ataque destes carbonos não reativos, que incluíam a introdução de átomos de oxigênio entre ligações C-H pela utilização de oxi-radicais ou cromóforos de carbonila irradiado, ou a epimerização de centros quirais de carbono terciários com o uso de reagentes específicos (MAZUR, 1975).

Embora a síntese orgânica tenha avançado nos últimos anos em relação à funcionalização das ligações C-H para formação de ligações carbono-carbono, carbono-oxigênio e outros átomos, por meio de reações de arilação, alquilação, aminação, oxidação, borilação, halogenação, entre outras (YAMAGUCHI *et al.*, 2012), o controle da seletividade é difícil, uma vez que os compostos orgânicos podem apresentar diversas ligações C-H semelhantes (LIAO *et al.*, 2017). Sofisticadas reações catalíticas utilizando metais de transição também têm sido utilizadas para promoção destas funcionalizações (RASHEED & SUN, 2018), como o uso de catalisadores de Rh(III) e, muito menos explorado, de Co(III) , em sistemas que visam aumentar a regio e enantiosseletividade destas transformações (YOSHINO, 2022). Entretanto, muitos esforços ainda são necessários para aumentar a

eficiência; evitar etapas adicionais nos processos, como a introdução e remoção de grupos diretores (RASHEED & SUN, 2018); e substituir os compostos tóxicos e/ou de custo elevado utilizados (MORI, 2022).

Nos processos de biotransformação a partir de fungos, funcionalizações podem ocorrer em centros considerados não reativos, apresentando vantagens como regio, estereo e enantiosseletividade, condições reacionais brandas e, na maioria dos casos, sem a necessidade do uso de grupos protetores e outros reagentes químicos (HANSON, 1995). Estas reações são promovidas pelos sistemas enzimáticos presentes nos organismos e em muitos casos as enzimas responsáveis permanecem desconhecidas (KLENK *et al.*, 2019). Outras, em contrapartida, são bastante exploradas, como as enzimas do citocromo P450, conhecidas por estarem comumente envolvidas nestes processos, atuando na oxifuncionalização de substratos (KLENK *et al.*, 2019; OLICÓN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019) de maneira regio e estereosseletiva (YANG & LI, 2015; LIAO *et al.*, 2017). Além das monooxigenases, grupo do qual a família das enzimas CY P450 pertence, outros grupos importantes de enzimas oxirredutases atuam em biotransformações, como as peroxidases (GAN *et al.*, 2022), lacases (ARREGUI *et al.*, 2019) e flavoenzimas (CHANKHAMJON *et al.*, 2016).

A introdução de grupos hidroxila em carbonos não-ativados pela ação do sistema enzimático de fungos filamentosos é uma funcionalização recorrente (TAKAHASHI *et al.*, 2014), como na biotransformação do hormônio vegetal laxogenina (**30**) pelo fungo *Syncephalastrum racemosum*, levando a treze produtos de biotransformação, principalmente a partir da mono e poli-hidroxilação dos átomos de carbono C-7, C-11, C-12, C-14, C-15 e C-25 (Figura 6) (WANG *et al.*, 2019). A hidroxilação torna o composto mais hidrossolúvel e, assim, diminui sua afinidade pela membrana e, conseqüentemente, sua presença no interior do fungo, minimizando efeitos tóxicos.

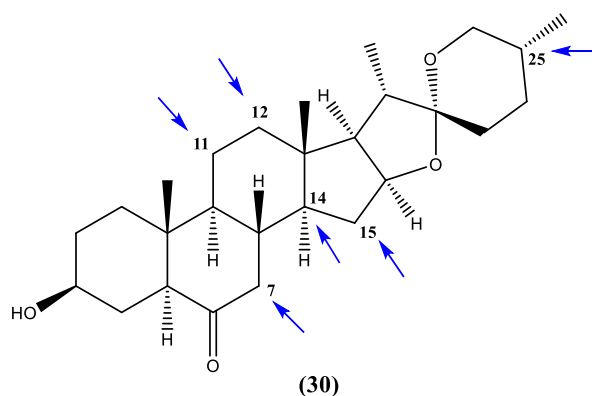


FIGURA 6 – Estrutura química da laxogenina (**30**) com a indicação dos sítios de mono e poli-hidroxilação mais recorrentes segundo estudo de Wang *et al.* (2019).

A biotransformação fúngica pode ser aplicada visando modificações químicas nas estruturas de contaminantes orgânicos de forma a degradá-los ou diminuir sua toxicidade (KUMAR *et al.*, 2021). Isto foi mostrado por Llorca *et al.* (2016) que, em uma abordagem utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução, detectaram em amostras de águas residuais tratadas com o fungo *Trametes versicolor*, 113 produtos de degradação derivados de 33 produtos farmacêuticos. Entretanto, deve-se ressaltar que as propriedades dos produtos formados muitas vezes são desconhecidas. Eles podem ser tóxicos ou apresentar interações sinérgicas tóxicas, sendo importante o acompanhamento e avaliação de riscos a fim de evitar uma maior poluição (KUMAR *et al.*, 2021). A biotransformação do anti-inflamatório diclofenaco (**31**) (Figura 7) pelo fungo *Penicillium oxalicum* em um biorreator de bancada gerou a degradação do mesmo em 36 h, sendo detectados derivados no processo, com hidroxilação nos átomos de carbono C-4', C-5 e em ambos simultaneamente. Neste caso, foi avaliada a toxicidade aguda durante o processo, evidenciando uma redução significativa da toxicidade do meio no decorrer da degradação do substrato inicial (OLICÓN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Para situações em que o poluente emergente não sofre a degradação microbiana/enzimática, alternativas modernas vêm sendo propostas para a modificação destes microrganismos, como engenharia genética, engenharia de proteínas, modificações da parede celular, processos de encapsulamento ou imobilização, entre outros. As vantagens do design destes biocatalisadores modificados na proteção ambiental são muitas, como promoção de maior estabilidade e tolerância, processos mais ecológicos e com custos mais competitivos (SHARMA *et al.*, 2022).

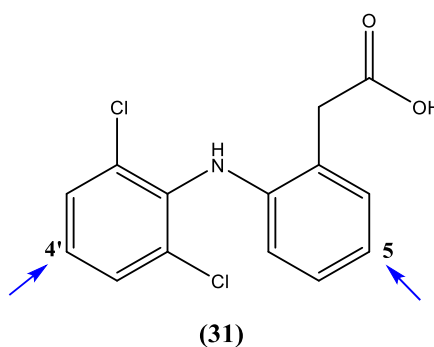


Figura 7 – Estrutura química do diclofenaco (31) com a indicação de sítios de mono e poli-hidroxilação recorrentes (OLICÓN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Outra aplicação da biotransformação consiste na funcionalização de derivados com propriedades farmacológicas como no caso da reação do diterpeno ácido traquilobânico (**32**) (Figura 8, p. 41) com o fungo *S. racemosum* por Dos Santos *et al.* (2018). Foram obtidos

dois produtos hidroxilados (**33**, **34**) e um produto de rearranjo (**35**) (Figura 8), que apresentaram maior atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase, diretamente relacionada com a doença de Alzheimer, em relação ao material de partida (**32**). A atividade do composto **34** foi ainda maior que a do padrão positivo utilizado no teste, galantamina, alcançando as pretensões propostas pela técnica (DOS SANTOS *et al.*, 2018). Outro exemplo é a biotransformação do ácido artemisínico (**36**) por *Trichothecium roseum*. Foi gerado um produto hidroxilado (**37**), um di-hidroxilado (**38**) e outro com uma nova carbonila (**39**) (Figura 9). A atividade antifúngica do composto (**39**) sob cepas de *Candida albicans* e *Candida kefyr* foi de 4 a 16 vezes mais pronunciada do que a apresentada pelo substrato inicial (**36**) (SINGH *et al.*, 2019).

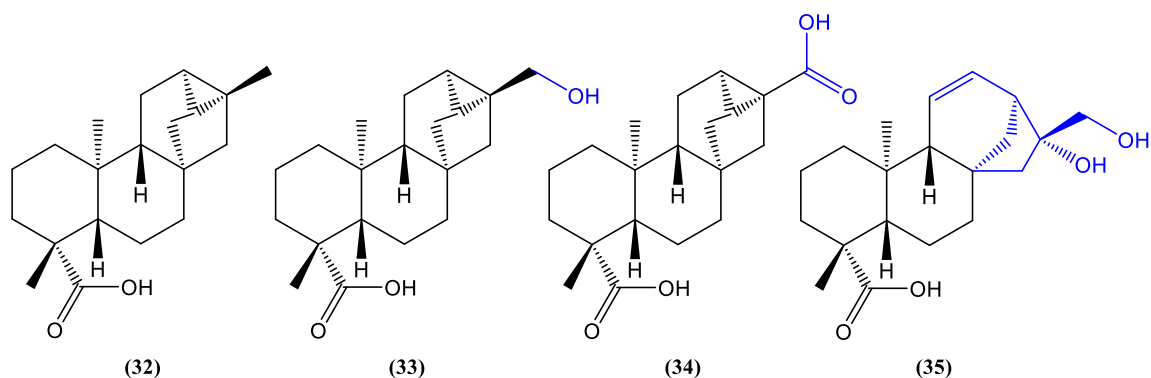


FIGURA 8 – Estruturas químicas do ácido traquilobânico (32) e derivados (33-35), obtidos como produtos de biotransformação por *S. racemosum* (DOS SANTOS *et al.*, 2018).

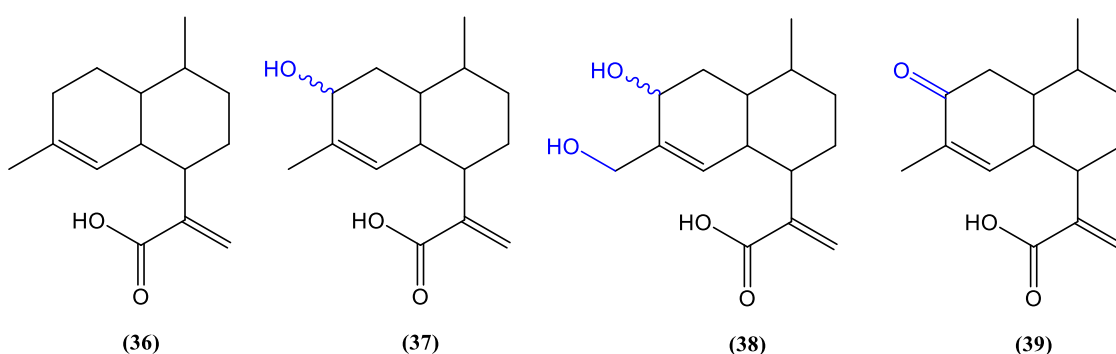


FIGURA 9 – Estruturas químicas do ácido artemisínico (36) e derivados (37-39), obtidos como produtos de biotransformação por *T. roseum* (SINGH *et al.*, 2019).

3 EXPERIMENTAL

As atividades experimentais descritas a seguir foram realizadas, em sua maioria, no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaßB) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (DQ/UFMG).

3.1 Reagentes e materiais

I – Solventes

- Acetato de etila *P.A.* ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) (Nox Lab Solutions, Synth, CRQ, Fmaia);
- Acetona *P.A.* (CIAVICCO);
- Água destilada (H_2O);
- Álcool metílico *P.A.* (CH_3OH) (CRQ);
- Álcool metílico deuterado (CD_3OD) (CIL);
- Clorofórmio *P.A.* (CHCl_3) (Synth);
- Clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Aldrich®, MagniSolv™);
- Hexano *P.A.* (C_6H_{12}) (Synth);
- Piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Acros Organics).

II – Reagentes

- Ácido nítrico 65% *P.A.* (HNO_3) (Anidrol);
- Azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{S}$) (Vetec);
- Cloreto de potássio *P.A.* (KCl) (Synth);
- Cloridrato de hidralazina (Sigma-Aldrich);
- Cloridrato de procaína ($\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$) 97% (Sigma-Aldrich);
- D (+) sacarose *P.A.* ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (Nox Lab Solutions);
- (+/-)-Ibuprofeno ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$) (Sigma-Aldrich);
- Estigmasterol ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$) (Sigma);
- Extrato de levedura puríssima (Vetec);
- Fosfato Potássio Dibásico *P.A.* (K_2HPO_4) (Spectrum);
- (+)-Longifoleno ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) (MP Biomedicals);
- Nitrato de sódio (NaNO_3) (Fmaia);

- Sulfato de cobre II (ico) anidro *P.A.* (CuSO_4) (Anidrol);
- Sulfato de ferro II (oso) heptaidratado *P.A.* ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Fmaia);
- Sulfato de magnésio *P.A.* heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Synth);
- Sulfato de manganês monoidratado *P.A.* ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Synth);
- Sulfato de sódio anidro *P.A.* (Na_2SO_4) (NEON).

III – Suportes para cromatografia em camada delgada e em coluna

- Placas prontas TLC Sílica gel F254 (Merck);
- Revelador: iodo metálico *P.A.* (I_2) (Vetec);
- Revelador: solução de vanilina – 15 g de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) (Synth), 250 mL de álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) (CIAVICCO), 2,5 mL ácido sulfúrico *P.A.* (H_2SO_4) (Anidrol);
- Revelador: solução de ácido fosfomolibdico – PMA ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$);
- Sílica gel 60 para cromatografia em coluna 230-400 mesh (Macherey-Nagel).

IV – Meios de cultura

- Ágar batata dextrose – PDA (Fluka Analytical);
- Caldo batata dextrose – PDB (KASVI, ACUMEDIA).

3.2 Equipamentos

- Agitador orbital, Biosan PSU-10i (para frascos de 125 mL);
- Agitador orbital com incubadora, IKA KS 4000i control (para frascos de 500 mL);
- Autoclaves verticais, Phoenix e Fanem 415;
- Balança analítica, Shimadzu AUW2220D;
- Balança semi-analítica, Shimadzu BL320H;
- Bombas a vácuo, Millipore e Primatec;
- Câmara escura com lâmpadas ultravioleta, Marconi MA 544;
- Capela de fluxo laminar, Labconco;
- Coluna cromatográfica analítica C18, Kromasil (250 mm x 4,6 mm x 5 μm);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu 20A – bombas gradientes LC-20AT e detector UV-Visível (SPD-20A);

- Espectrofotômetro de absorção atômica por chama, VARIAN AA240FS;
- Espectrômetro de massas (ESI-IT-MS), Thermo Fisher LCQ-Fleet;
- Espectrômetro de ressonância magnética, Bruker AVANCE III NANOBAY;
- Espectrômetro de ressonância magnética, Bruker AVANCE III ONEBAY (ASCEND) 400 MHz;
- Espectrômetro de ressonância magnética, Bruker AVANCE NEO 600 MHz;
- Espectrômetro de infravermelho, Perkin Elmer FT-IR System Spectrum RXI;
- Estufas de secagem, Quimis, Fanem 002 CB e Nova Ética 400-3ND;
- Estufa incubadora, Quimis;
- Evaporadores rotatórios, IKA RV10 e BuchiR-114;
- Leitor de ponto de fusão, Gehaka PF 1000;
- Microscópio Eletrônico de Varredura de Feixe Duplo, FEI Quanta 3D FEG, equipado com detector de dispersão de energia (EDS), Bruker;
- Microscópio ótico, Olympus CX40;
- Ultrassom, Cristófoli Biossegurança.

3.3 Metodologia

3.3.1 Cultivo e armazenamento das espécies fúngicas

As espécies fúngicas utilizadas neste trabalho foram: *Aspergillus niger* (NRRL 3), *Beauveria bassiana* (NRRL 3108), *Penicillium janthinellum* (NRRL 35451) e *Syncephalastrum racemosum* (NRRL 2496), obtidas por doação da *ARS Culture Collection* (USA), e *Mucor plumbeus*, espécie isolada de amostras de solo de Belo Horizonte. Todas estas cepas são mantidas na coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaβB). O repique dos fungos para promover a esporulação foi realizado em ambiente asséptico, isto é, em capela de fluxo laminar e próximo a chama do bico de Bunsen, em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose (PDA), devidamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após sete dias de crescimento, à temperatura ambiente, foi conduzida a sequência dos experimentos. Durante este período pôde-se analisar características macroscópicas como coloração e textura das colônias.

Para realizar a caracterização microscópica, as espécies foram repicadas em placas de Petri contendo ágar PDA, devidamente esterilizado em autoclave, que foram armazenadas à temperatura ambiente por 3 dias. Em seguida transferiram-se porções para lâminas de vidro e, corando com solução de azul de metileno, obtiveram-se imagens no microscópio óptico para visualização das colônias e hifas e confirmação da pureza das colônias.

No intuito de preservar as colônias, estas foram armazenadas de acordo com o método Castellani (DE CAPRILES *et al.*, 1989). Para tanto, as espécies foram repicadas em placas de Petri contendo ágar PDA, ambos devidamente esterilizados. Em seguida foram cortados discos das colônias puras, acondicionando-os em frascos de vidro contendo água destilada estéril, que foram armazenados à temperatura ambiente. Desta forma, obteve-se um estoque seguro dos microrganismos alvo deste trabalho.

3.3.2 Biorremediação de metais

Para esta sequência de experimentos os microrganismos utilizados foram *P. janthinellum* e *S. racemosum*. Foi avaliada a capacidade de suas biomassas na retenção de íons metálicos de Cu(II), Mn(II) e Fe(II), seguindo os procedimentos descritos a seguir e esquematizados na Figura 10 (p. 48).

3.3.2.1 Preparação das biomassas

Após a reativação das espécies fúngicas, segundo item 3.3.1 (p. 45), as biomassas foram obtidas com a inoculação de *P. janthinellum* e *S. racemosum* em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo batata dextrose previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min). Para tanto, o inóculo foi preparado com a adição de 3 mL de água destilada estéril em cada tubo de ensaio contendo os fungos cultivados. Após agitação do conteúdo dos tubos com alça de platina, em ambiente estéril, as suspensões de esporos obtidas foram transferidas para Erlenmeyers contendo caldo batata dextrose (PDB) estéril. Após o crescimento das espécies até a observação do alcance da fase estacionária, as biomassas produzidas foram filtradas a vácuo e padronizadas quanto às respectivas massas para a realização dos experimentos de biorremediação.

3.3.2.2 Biorremediação de íons Cu(II) em diferentes concentrações

Para uma primeira avaliação da capacidade de retenção de íons Cu(II), por biomassas fúngicas, foi proposto um experimento no qual soluções aquosas de sulfato de cobre anidro foram preparadas em diferentes concentrações, e estas foram colocadas em contato com biomassas frescas de *P. janthinellum*, preparadas conforme item 3.3.2.1.

Desta forma, foram adicionados 100 mL de solução aquosa de sulfato de cobre anidro nas concentrações de íons Cu(II) equivalentes a 10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹ em Erlenmeyers de 250 mL. Adicionaram-se as biomassas frescas de *P. janthinellum* (aproximadamente 2,0 g cada) aos frascos, em triplicata, mantendo-os em agitação (130 rpm, em agitador orbital) por 1 hora, à temperatura ambiente. Ao término, foram retiradas alíquotas de 4 mL, que foram filtradas e reservadas para análise, incluindo alíquotas controle contendo 4 mL da solução estoque de sulfato de cobre anidro.

3.3.2.3 Biorremediação de íons Cu(II) e Mn(II) a 50 mg L⁻¹

Para a avaliação da adsorção de íons Cu(II) e Mn(II) pelas biomassas de *P. janthinellum* e *S. racemosum* estas foram produzidas conforme item 3.3.2.1 (p. 25), utilizando-se aproximadamente 2,0 g em cada replicata. O processo de biorremediação foi realizado em triplicata, sob agitação a 130 rpm em agitador orbital, à temperatura ambiente.

Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de solução aquosa de sulfato de cobre anidro ou 100 mL de solução aquosa de sulfato de manganês monoidratado, com respectiva concentração de íons Cu(II) e Mn(II) de 50 mg L⁻¹. Adicionaram-se as biomassas frescas de *P. janthinellum* e *S. racemosum* a seis frascos cada, três contendo a solução de cobre e três contendo a solução de manganês. Para cada frasco, cinco alíquotas de 4 mL foram coletadas na primeira hora (5, 10, 20, 40 e 60 min) e uma alíquota de 4 mL a cada 24 horas, durante quatro dias. Todas as alíquotas coletadas foram filtradas e reservadas para análise, incluindo alíquotas controle, contendo 4 mL das soluções estoque de sulfato de cobre anidro ou de sulfato de manganês monoidratado.

3.3.2.4 Biorremediação de íons Fe(II) a 50 mg L⁻¹ com diferentes tratamentos das biomassas fúngicas

Para a avaliação da adsorção de íons Fe(II) pelas biomassas fúngicas estas foram produzidas conforme item 3.3.2.1 (p. 46) e passaram por diferentes tratamentos. Utilizaram-se as biomassas frescas (2,3 g para *P. janthinellum* e 1,3 g para *S. racemosum*) e biomassas secas, obtidas após secagem de biomassa fresca em estufa (2 h a 100 °C) e posterior pulverização com gral e pistilo (0,5 g para *P. janthinellum* e 0,3 g para *S. racemosum*). O processo de biorremediação foi realizado em triplicata, sob agitação a 130 rpm em agitador orbital, à temperatura ambiente.

Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de solução aquosa de sulfato de ferro heptaidratado com concentração de íons Fe(II) de 50 mg L⁻¹. Adicionaram-se biomassas frescas e secas a três frascos contendo a solução de ferro em cada. Cinco alíquotas de 4 mL foram coletadas na primeira hora (5, 10, 20, 40 e 60 min) e uma alíquota a cada 24 horas, de cada frasco, durante quatro dias. Em um terceiro experimento, para avaliação da saturação da biomassa, adicionaram-se biomassas frescas a três frascos contendo a solução de ferro, e a troca da biomassa por uma biomassa nova foi realizada a cada 24 horas, por três vezes, sendo feita coleta de alíquotas de 4 mL a cada troca. Todas as alíquotas coletadas foram filtradas e reservadas para análise, incluindo alíquotas controle, contendo 4 mL da solução estoque de sulfato de ferro heptaidratado.

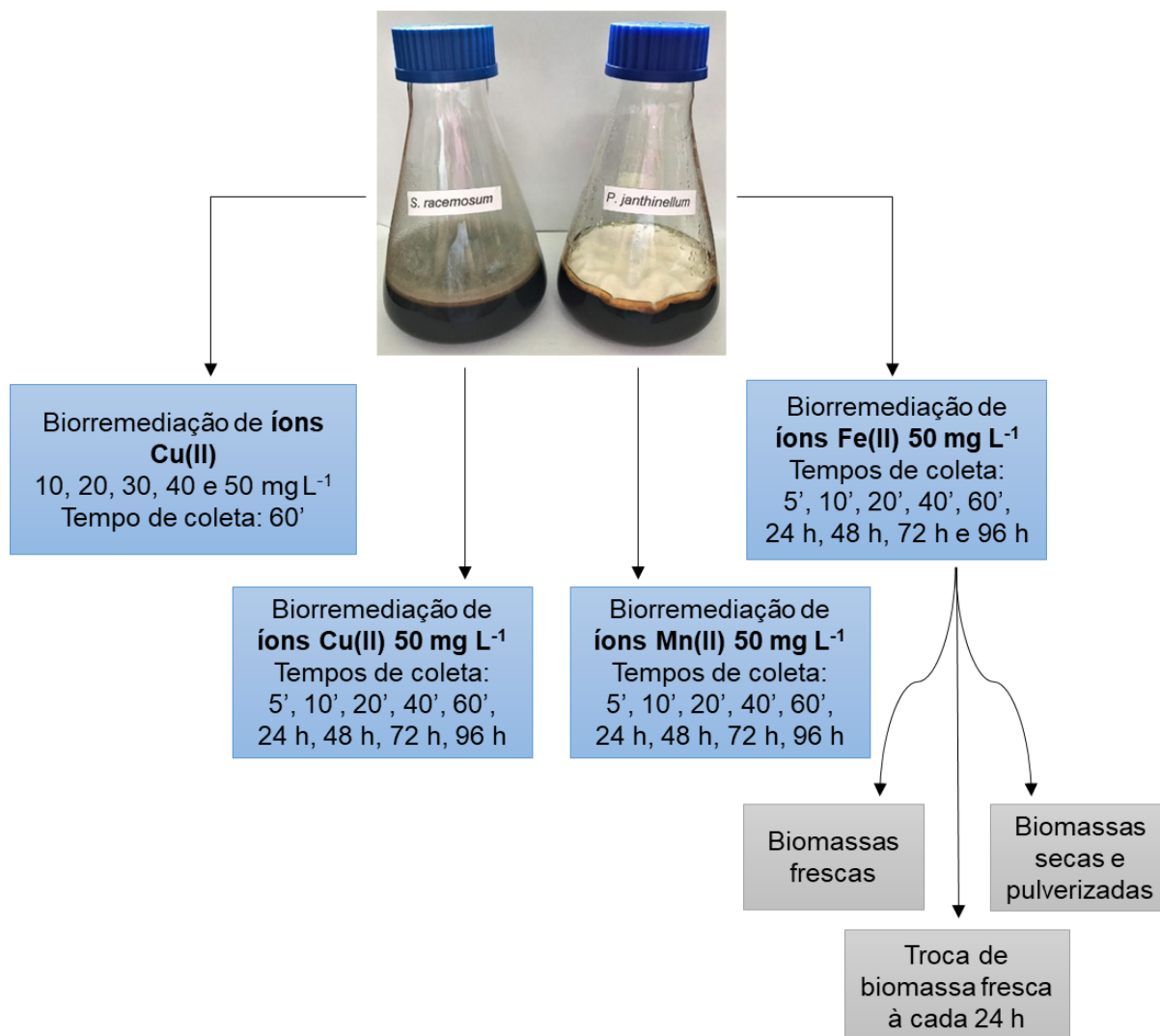


FIGURA 10 – Esquema dos experimentos de biorremediação de soluções aquosas contendo os íons metálicos Cu(II), Mn(II) e Fe(II) pelas biomassas fúngicas de *P. janthinellum* e *S. racemosum*.

3.3.2.5 Determinação e análise dos resultados de biorremediação

Todas as alíquotas (4 mL) retiradas durante os processos de biorremediação fúngica foram digeridas com 1 mL de ácido nítrico 65% e analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS) para quantificação dos íons metálicos residuais em cada solução. Análises realizadas no Laboratório de Espectrometria de Absorção Atômica do DQ/UFMG.

As análises de absorção foram realizadas com método de rotina utilizando gás combustível/oxidante C₂H₂/Ar. Os demais parâmetros instrumentais foram: comprimento de onda 324,8 nm, largura da fenda 0,5 nm e corrente da lâmpada 5,0 mA para íons cobre;

comprimento de onda 279,5 nm, largura da fenda 0,2 nm e corrente da lâmpada 5,0 mA para íons manganês; e comprimento de onda 248,3 nm, largura da fenda 0,2 nm e corrente da lâmpada 5,0 mA para íons ferro.

De posse da concentração média dos íons metálicos da triplicata de cada amostra [Cm_A] e da concentração média na triplicata das amostras controle [Cm_C], determinou-se a concentração final dos íons metálicos em solução após o processo, em porcentagem [% Cm_F], por meio da Equação (1). Em seguida, determinou-se a porcentagem de eficiência da biorremediação promovida pelas biomassas fúngicas, por meio da Equação (2).

$$\%[Cm_F] = \frac{[Cm_A]}{[Cm_C]} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ biorremediação} = 100 - \%[Cm_F] \quad (2)$$

3.3.2.5.1 Análise estatística

As porcentagens médias de remoção dos íons metálicos foram submetidas à diferentes análises estatísticas a depender do objetivo, como:

- Teste ANOVA (*one-way*) para análise de variância e teste Tukey de comparação múltipla, considerando $p < 0,05$, ou seja, intervalo de confiança (IC) de 95%, para a identificação de médias significativamente diferentes – *software* Minitab 18;
- Teste F para análise de variância e teste t pareado para comparação entre métodos, considerando IC = 95% – *software* Microsoft Excel;
- Análise de componentes principais (PCA), para observação de tendências de comportamento entre conjuntos de dados, entre as triplicatas de remoção de cada combinação metal-fungo – *software* MATLAB 7.10.

Estas análises foram realizadas em colaboração com a mestra Larissa Batista dos Santos (UFMG).

3.3.2.6 Caracterização das biomassas após biorremediação de metais

Ao término dos experimentos de biorremediação de metais, as biomassas utilizadas foram filtradas a vácuo, secas à 34 °C por uma hora em estufa, e então armazenadas em freezer para posterior análise de suas superfícies. O mesmo foi feito com

biomassas controle de cada fungo utilizado, as quais não tiveram contato com soluções aquosas contendo íons metálicos.

Uma porção de cada biomassa foi triturada, com auxílio de gral e pistilo, e encaminhada para análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no Laboratório de Espectroscopia Vibracional do DQ-UFMG. A obtenção dos espectros se deu em pastilhas em KBr, na região de infravermelho médio, 400-4000 cm^{-1} . Foram identificados os grupos funcionais presentes nas superfícies das biomassas fúngicas por meio da identificação das bandas correspondentes e o número de onda destas bandas foi comparado entre amostras teste e amostras controle, no intuito de verificar deslocamentos relacionados ao processo de biorremediação (CHEN *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2020).

Outras amostras das biomassas foram submetidas à caracterização microscópica de suas superfícies pela técnica de microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por dispersão em energia em raios-X (MEV-EDS) no Centro de Microscopia (CM) da UFMG. Para tanto, as amostras foram fixadas em solução Karnovsky modificado (paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5%) em tampão fosfato 0,1M pH 7,2-7,4 por 24-72 horas, transferidas para solução tampão fosfato 0,1M, ambas cedidas pelo CM-UFMG, e encaminhadas para preparo da amostra e posterior análise. O preparo de amostras se deu por fixação secundária, desidratação, secagem em ponto crítico de CO_2 , montagem e metalização com ouro/paládio. Desta forma, foram obtidas as imagens microscópicas das amostras, além do mapa químico e espectro de impressões digitais dos elementos presentes nessas superfícies, por meio das análises por MEV-EDS.

3.3.3 Biotransformação de compostos orgânicos

3.3.3.1 Procedimento geral

Para a avaliação do potencial de biotransformação de espécies fúngicas selecionadas sobre os compostos orgânicos (+/-)-ibuprofeno (comercial), estigmasterol (comercial), ácido traquilobânico (isolado), isosteviol (isolado) e (+)-longifoleno (comercial), foi seguido o procedimento padrão detalhado a seguir. As variações de parâmetros aplicadas em cada caso são apresentadas na Tabela 2 (p. 52). Todos os materiais e meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min) e os experimentos foram realizados em condições assépticas para evitar contaminações.

Inicialmente, os fungos foram cultivados em tubos de ensaio com meio de cultura sólido PDA por 5-7 dias. Posteriormente, foram preparadas suspensões de esporos adicionando 3 mL de água destilada a cada tubo e homogeneizando o conteúdo. Os esporos foram transferidos para Erlenmeyers de 500/125 mL contendo o meio de cultura líquido 200/50 mL para crescimento das biomassas. Nos experimentos com biomassas produzidas em modo estático (em repouso) em meio de cultura líquido esta produção se sucedeu semelhantemente ao descrito no item 3.3.2.1 (p. 46) e o restante do experimento em meio aquoso, com a transferência das biomassas para Erlenmeyers contendo solução aquosa do substrato, solubilizado em solvente orgânico, e agitação do conteúdo em agitador orbital por um número fixo de dias. Para os experimentos com biomassas em crescimento em meio de cultura, o substrato foi adicionado semelhantemente, mas após 3-4 dias da inoculação dos esporos fúngicos e crescimento da biomassa no meio. Após o período de contato substrato-fungo, em todos os casos, micélios e meios líquidos foram separados por filtração a vácuo. O meio líquido foi particionado em funil de separação por três vezes com acetato de etila destilado. Removeu-se o solvente da porção orgânica obtida após extração com a utilização de evaporador rotatório, obtendo-se os extratos do meio aquoso (EA) e os extratos do caldo (EC). Os micélios foram deixados em contato com acetato de etila por 4 dias, seguido de 20 minutos em ultrassom, para a extração dos constituintes. Os conteúdos foram então filtrados a vácuo, submetidos ao evaporador rotatório, obtendo-se os extratos dos micélios (EM). Para os experimentos realizados com crescimento contínuo em meio de cultura, foram produzidos paralelamente frascos controle nos quais não foram adicionados os substratos, apenas o mesmo volume do solvente utilizado para solubilização destes.

TABELA 2 – Parâmetros variados nos experimentos de biotransformação de compostos orgânicos

Substrato	Concentração substrato e solvente	Fungo	Células	Modulador (concentração)	Número de frascos	Volume por frasco e meio	Agitação	Número de dias		
(±)-Ibuprofeno	50 µg mL ⁻¹ de meio de cultivo ^a	<i>A. niger</i>	Em repouso*	-	2	200 mL água	120 rpm	6		
			Em crescimento	-	2					
			<i>P. janthinellum</i>	Em repouso*	-	2	200 mL água	120 rpm	6	
				Em crescimento	-	2				
		<i>S. racemosum</i>	Em crescimento	-	Hidralazina (100 µM)	2	190 mL PDB	130 rpm	10	
					Hidralazina (500 µM)	2				
					-	6	200 mL PDB			
					-	4	200 mL meio complexo			
		Estigmasterol	50 µg mL ⁻¹ de meio ^b	<i>M. plumbeus</i>	Em crescimento	Procaína (500 µM)	2	190 mL meio complexo	130 rpm	10
		Ácido traquilobânico	200 µg mL ⁻¹ de meio ^b	<i>A. niger</i> <i>B. bassiana</i> <i>S. racemosum</i>	Em crescimento	-	1	50 mL PDB	160 rpm	10
2										
	50 µg mL ⁻¹ de meio ^b	<i>A. niger</i>			30	200 mL PDB	130 rpm			
					2					
Isosteviol	200 µg mL ⁻¹ de meio ^b	<i>A. niger</i> <i>B. bassiana</i> <i>S. racemosum</i>	Em crescimento	-	2	50 mL PDB	160 rpm	10		
					2					
					50 µg mL ⁻¹ de meio ^b	<i>A. niger</i>			30	200 mL PDB
(±)-Longifoleno	4,0 µL mL ⁻¹ de meio	<i>A. niger</i> <i>B. bassiana</i> <i>S. racemosum</i>	Em crescimento	-	1	50 mL PDB	160 rpm	10		
					2					
					2,5 µL mL ⁻¹ de meio	<i>S. racemosum</i>			6	200 mL PDB

*biomassas produzidas em modo estático em meio de cultura líquido e filtradas para utilização nos experimentos; ^a = solubilizado em 1 mL de metanol por frasco; ^b = solubilizado em 1 mL de acetato de etila por frasco

Em alguns experimentos foram adicionados moduladores epigenéticos. Nestes casos, o modulador, solubilizado em 10 mL de água destilada, foi adicionado aos frascos com meio de cultura após a esterilização e esfriamento dos mesmos. A suspensão de esporos foi adicionada em seguida, prosseguindo com o experimento.

Todos os extratos obtidos (EA, EC e EM) para os frascos teste e frascos controle foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando diferentes sistemas de eluição em proporções de hexano-acetato de etila, e diferentes reveladores, como vapores de iodo, luz UV (254 e 365 nm), solução de vanilina e solução de ácido fosfomolibdico (PMA). Também foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 400 MHz) dos extratos e dos substratos. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do DQ/UFMG, com processamento dos espectros com a utilização do *software* MestReNova. A partir da resposta conjunta destas análises foram selecionados os extratos para se prosseguir com a investigação, produzindo-os em maior escala e seguindo com técnicas para isolamento de possíveis produtos de biotransformação.

3.3.3.2 Biotransformação do contaminante emergente ibuprofeno

Para uma primeira avaliação da capacidade de biorremediação do poluente emergente (+/-)-ibuprofeno (comercial) por espécies fúngicas, foi proposto um experimento utilizando os fungos filamentosos *A. niger*, *P. janthinellum* e *S. racemosum* em meio aquoso por 6 dias (Figura 11, p. 54). A partir da resposta das análises cromatográficas e espectroscópicas, optou-se por otimizar os experimentos para *A. niger* e *S. racemosum*, descartando *P. janthinellum*. Foram então realizados os experimentos em meio aquoso e em caldo PDB, ambos por 10 dias.

Realizou-se também um experimento para determinação da taxa de recuperação do ibuprofeno utilizando a mesma técnica de extração. Neste, realizou-se a extração líquido-líquido de 200 mL do meio de cultura líquido PDB puro, e de 200 mL do mesmo meio de cultura com a adição de ibuprofeno ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), sem a inoculação fúngica, no intuito de verificar a eficiência da extração com acetato de etila.

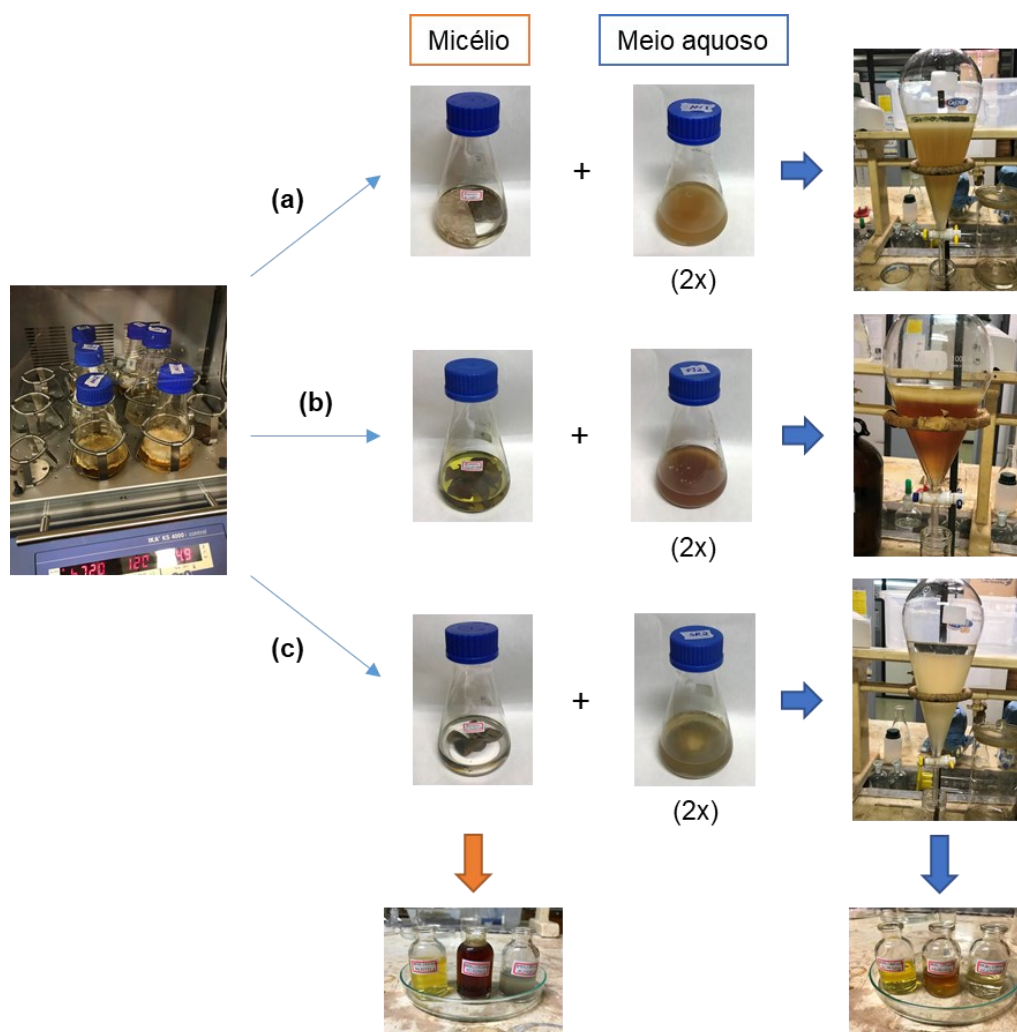


FIGURA 11 – Processo de obtenção dos extratos dos micélios (EM) e extratos dos meios aquosos (EA) após experimentos de biotransformação do ibuprofeno por (a) *A. niger*, (b) *P. janthinellum* e (c) *S. racemosum*.

3.3.3.2.1 Isolamento de produtos de biotransformação do ibuprofeno por *A. niger*

A partir da análise das placas de CCD e espectros de RMN de ^1H , o extrato EC obtido após crescimento contínuo de *A. niger* em contato com ibuprofeno por 10 dias (2 frascos; 0,4 L PDB) (73,4 mg), foi submetido a cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica gel 60. Foi realizada uma eluição gradiente com 64,6 mg do EC utilizando diferentes proporções de hexano-acetato de etila, totalizando 35 frações coletadas. Estas frações foram combinadas em oito. A combinação 4 (6,4 mg) se apresentou como um sólido levemente amarelo que, após análise por CCD e RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), mostrou-se tratar de um produto de biotransformação, que foi nomeado **ibu-01**. As demais combinações analisadas não apresentaram resultados promissores.

A partir do EC obtido em maior escala (12 frascos; 2,4 L de PDB) foi realizada nova CC, visando a isolamento de maior quantidade do composto. Foi realizada uma eluição gradiente com 253,7 mg do EC utilizando diferentes proporções de hexano-acetato de etila e metanol, totalizando 44 frações coletadas. Estas frações foram combinadas em 15 por meio da análise das placas de CCD. A combinação 11 (52,9 mg) se apresentou como um sólido branco, que após análise de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), ^{13}C e DEPT-135 (100 MHz), mostrou-se tratar do composto denominado **ibu-02**, cujo isolamento foi registrado pela biotransformação com *S. racemosum* nos experimentos que serão descritos a seguir no item 3.3.3.2.2. As demais combinações analisadas não apresentaram resultados promissores. O esquema da produção dos extratos resultantes da biotransformação de ibuprofeno por *A. niger*, assim como o isolamento dos produtos de biotransformação é apresentado na Figura 12 (p. 56).

3.3.3.2.2 Isolamento de produto de biotransformação do ibuprofeno por *S. racemosum*

A partir da análise das placas de CCD e espectros de RMN de ^1H , o extrato EC obtido após crescimento contínuo de *S. racemosum* em contato com ibuprofeno por 10 dias em maior escala (6 frascos; 1,2 L de PDB) (207,4 mg), foi submetido a CC empacotada com sílica gel 60. Foi realizada uma eluição gradiente com 205,5 mg do EC utilizando diferentes proporções de hexano-acetato de etila, totalizando 46 frações coletadas. Estas frações foram combinadas em 13, das quais a combinação 11 (18,2 mg) se apresentou como um sólido levemente amarelo que após análise de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) mostrou tratar-se de um produto de biotransformação, que foi nomeado **ibu-02**. As demais combinações analisadas não apresentaram resultados promissores. O esquema da produção dos extratos resultantes da biotransformação de ibuprofeno por *S. racemosum*, assim como o isolamento do produto de biotransformação é apresentado na Figura 13 (p. 57).

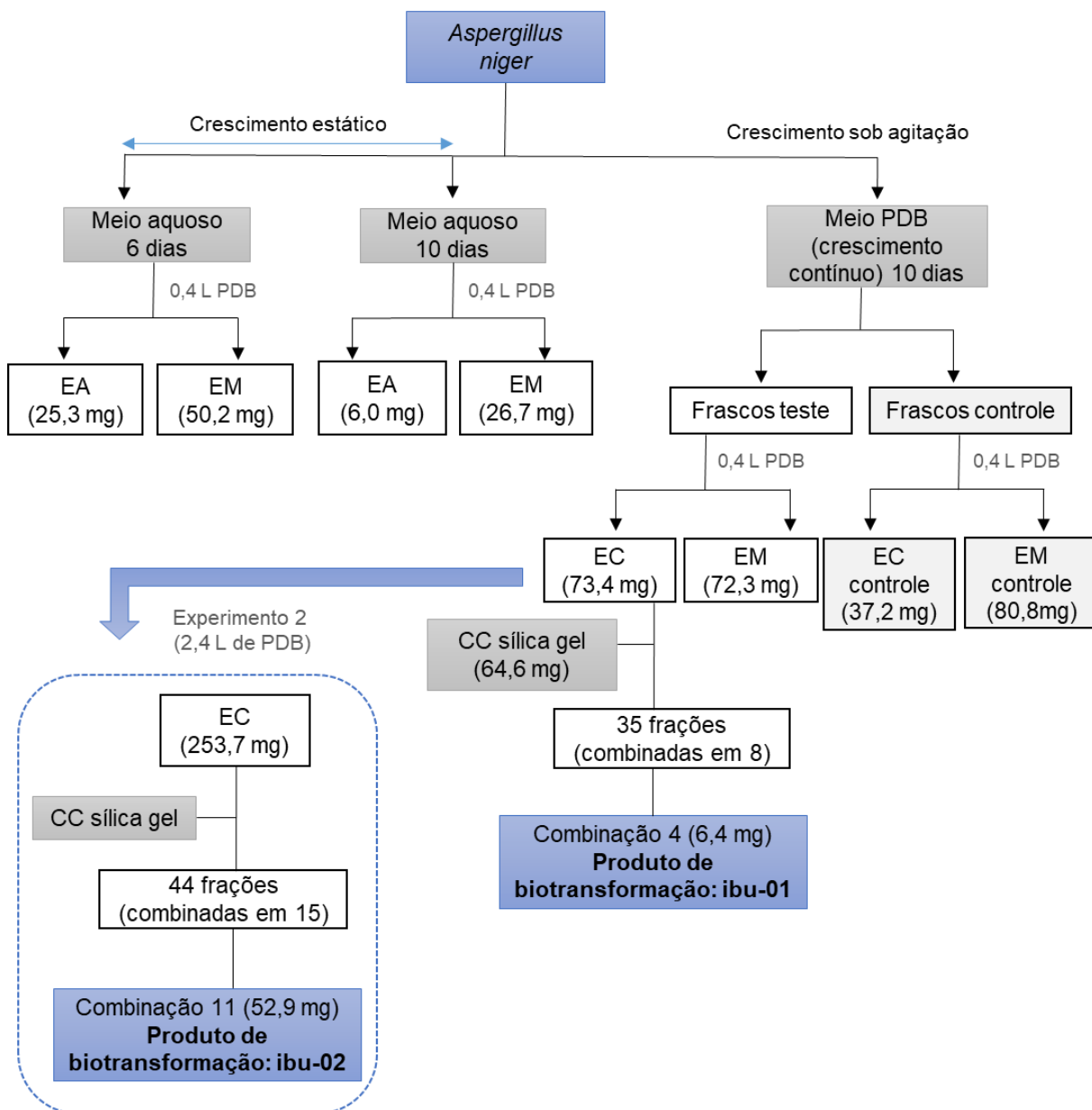


FIGURA 12 – Esquema da produção de extratos da biorremediação de ibuprofeno por *A. niger* e isolamento dos produtos de biotransformação ibu-01 e ibu-02.

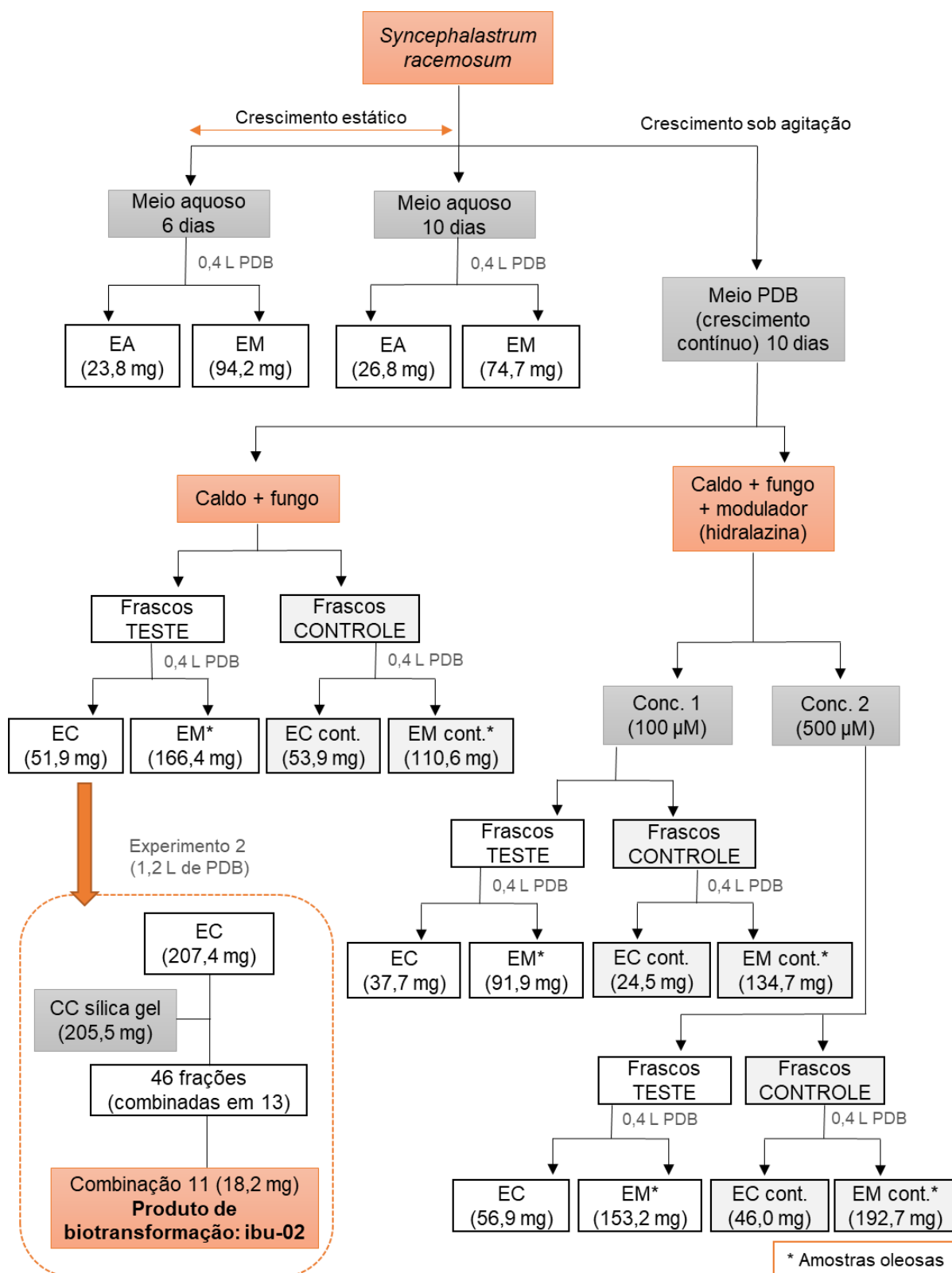


FIGURA 13 – Esquema da produção de extratos da biorremediação de ibuprofeno por *S. racemosum*, com e sem o uso de cloridrato de hidralazina, e isolamento do produto de biotransformação ibu-02.

3.3.3.2.3 Caracterização espectrométrica dos produtos de biotransformação do ibuprofeno

Os produtos de biotransformação do ibuprofeno, **ibu-01** e **ibu-02**, isolados conforme descrito nos itens 3.3.3.2.1 (p. 54-55) e 3.3.3.2.2 (p. 55) foram submetidos à análise espectroscópica por RMN e espectrometria de massas (MS) para caracterização estrutural. As análises por RMN incluíram experimentos unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT-135) e bidimensionais (HSQC e HMBC). As análises por espectrometria de massas foram realizadas em espectrômetro de massas Thermo Fisher LCQ-Fleet com fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas de baixa resolução do tipo *Ion Trap* (ESI-IT-MS), sendo realizadas pela mestra Larissa Batista dos Santos, no laboratório do professor Dr. Rodinei Augusti (DQ/UFMG), com processamento dos espectros com a utilização do *software* Thermo Xcalibur.

3.3.3.2.4 Biotransformação de ibuprofeno por *A. niger* em diferentes tempos de contato e análises espectroscópicas

Experimentos em crescimento contínuo de *A. niger* em meio de cultura PDB com diferentes números de dias de contato substrato-fungo foram realizados no intuito de verificar variações na produção dos produtos de biotransformação no decorrer do processo. Foram preparados dois frascos (0,4 L de PBD) para cada intervalo: 6, 8, 10, 12 e 14 dias. Além disso, também com o intervalo de 10 dias foram preparados dois frascos com a utilização de metanol deuterado (CD_3OD) para solubilização do ibuprofeno, ao invés de metanol *P.A.*, no intuito de verificar se haveria influência do solvente na formação dos produtos. Após cada período determinado, foi realizada a extração em acetato de etila destilado e os mesmos foram analisados por RMN de ^1H e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para a obtenção do perfil cromatográfico por HPLC dos extratos produzidos em diferentes tempos de contato entre ibuprofeno e *A. niger*, assim como dos compostos isolados (**ibu-01** e **ibu-02**), os extratos foram preparados na concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e os compostos isolados na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, em metanol grau UV/HPLC, e devidamente filtrados com filtro de seringa $0,45 \mu\text{m}$. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do DQ/UFMG (cromatógrafo Shimadzu 20A, coluna C18 Kromasil), e dados processados por meio do *software* LCsolution. Os parâmetros utilizados são apresentados no Quadro 1 (p. 59).

QUADRO 1 – Método para obtenção do perfil cromatográfico dos extratos obtidos após contato ibuprofeno-*A. niger* em diferentes números de dias

Parâmetros	Condições cromatográficas
Fases móveis	(A) Água Milli-Q 0,1% ácido fórmico (B) Metanol grau UV/HPLC
Volume de injeção	10 µL
Fluxo	0,8 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	220 nm
Temperatura do forno de coluna	40 °C
Gradiente de eluição	0,01-4,00 min: 50% (B); 4,01-10,00 min: 50-90% (B); 10,01-24,00 min: 90% (B); 24,00-26,00 min: 90-50% (B).

3.3.3.3 Biotransformação do contaminante emergente estigmasterol

Em uma avaliação de experimentos prévios do grupo de pesquisa sobre a biotransformação do estigmasterol (comercial), optou-se por estudar a interação de *M. plumbeus* com este poluente emergente. Para estes ensaios o meio de cultura utilizado foi um meio complexo preparado com as proporções descritas no Quadro 2. O procedimento de biotransformação, conforme descrito no item 3.3.3.1 (p. 51-53), foi realizado com e sem a utilização do modulador epigenético, cloridrato de procaína, nas condições indicadas na Tabela 2 (p. 52).

QUADRO 2 – Formulação do meio de cultura complexo a base de sacarose (DOS SANTOS et al., 2018)

Reagente	Proporção
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
KCl	0,5 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	1,0 g L ⁻¹
NaNO ₃	3,0 g L ⁻¹
Extrato de levedura	10,0 g L ⁻¹
Sacarose	20,0 g L ⁻¹

3.3.3.3.1 Isolamento de compostos

A partir da análise das placas de CCD e espectros de RMN de ^1H , optou-se pela separação cromatográfica, em coluna empacotada com sílica gel 60, do extrato EC obtido pelo contato de *M. plumbeus* com o estigmasterol na presença do modulador cloridrato de procaína por 10 dias (78,3 mg). Foi realizada uma eluição gradiente com diferentes proporções de hexano-acetato de etila, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 68 frações, que foram combinadas em nove. Após novas análises de CCD, a combinação 6 (4,7 mg) se destacou como um possível produto de biotransformação. Análises por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) evidenciaram se tratar de um produto obtido a partir de modificações na estrutura da substância moduladora, que foi nomeado **CP-01**. As demais combinações analisadas não apresentaram resultados promissores. O esquema da produção dos extratos resultantes da biorremediação de estigmasterol por *M. plumbeus*, assim como o isolamento do composto, é apresentado na Figura 14 (p. 61).

3.3.3.4 Biotransformação de produtos naturais

Para a realização destes experimentos foram utilizados alguns produtos naturais disponíveis no LaBB: (+)-longifoleno (comercial), isosteviol obtido a partir da hidrólise do esteviosídeo, isolado do adoçante Stevita Cristal® (MILAGRE *et al.*, 2009) e ácido traquilobânico, isolado de sementes de *Xylopia sericea* (TAKAHASHI *et al.*, 2001). O procedimento de biotransformação descrito no item 3.3.3.1 (p. 51-53) foi realizado primeiramente em menor escala (frascos de 125 mL com 50 mL de meio PDB) com as espécies fúngicas *A. niger* (AN), *B. bassiana* (BB) e *S. racemosum* (SR).

Após a obtenção os extratos (EC e EM) e análise dos mesmos por CCD e RMN de ^1H , foram definidas as espécies mais promissoras como agente de biotransformação de cada produto natural em estudo e realizados novos experimentos em maior escala (frascos de 500 mL com 200 mL de meio PDB) para isolamento de possíveis produtos. A produção dos extratos em maior escala e o isolamento de produtos de biotransformação a partir destes são descritos nos tópicos a seguir e esquematizados na Figura 15 (p. 63).

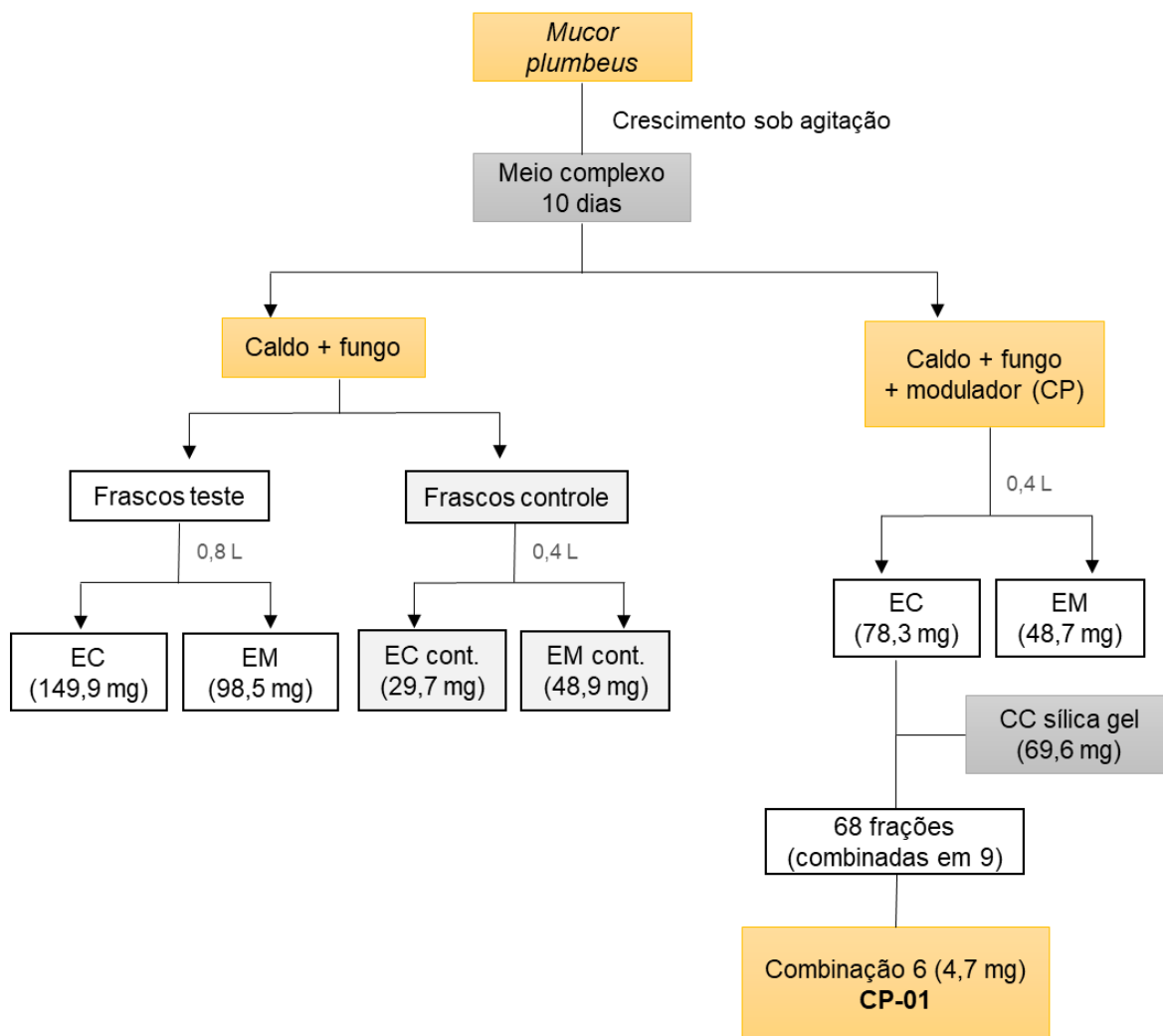


FIGURA 14 – Esquema da produção de extratos dos experimentos de biorremediação de estigmasterol por *M. plumbeus*, com e sem a adição do modulador cloridrato de procaina (CP).

3.3.3.4.1 Biotransformação de (+)-longifoleno por *S. racemosum*

O extrato do caldo (EC) obtido após crescimento contínuo de *S. racemosum* em contato com (+)-longifoleno por 10 dias, aumentando-se a escala (6 frascos; 1,2 L PDB) apresentou-se fracionado em uma porção líquida e outra sólida. Estas porções foram separadas e analisadas por RMN de ^1H . A porção sólida (386,2 mg) foi submetida a separação em CC empacotada com sílica gel 60. Foi realizada uma eluição gradiente com diferentes proporções de hexano-acetato de etila e metanol, totalizando 56 frações coletadas. Estas frações foram combinadas em 12, das quais algumas foram escolhidas para análise por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) com base no perfil obtido na CCD e aspecto visual. Entretanto, pela análise dos espectros de RMN de ^1H das frações que se destacaram, infere-se que não houve

isolamento de compostos, e estas não apresentavam quantidades suficientes para prosseguir com a purificação.

3.3.3.4.2 *Biotransformação de isosteviol por A. niger e isolamento de produtos*

O extrato do caldo (EC) obtido após crescimento contínuo de *A. niger* em contato com isosteviol por 10 dias em maior escala (30 frascos; 6,0 L PDB) (442,2 mg) foi submetido a CC empacotada com sílica gel 60. Foi realizada uma eluição gradiente com 429,8 mg do extrato com diferentes proporções de hexano-acetato de etila e metanol. Foram coletadas 94 frações, que foram combinadas em 20. Após a observação da formação de cristais em algumas das combinações, estas foram redivididas e analisadas por RMN de ^1H . A combinação 10 foi separada em uma porção insolúvel em clorofórmio 10(1) e outra solúvel 10(2). A porção 10(1) (34,1 mg), um sólido branco solúvel em metanol (CD_3OD), mostrou tratar-se de um produto de biotransformação, que foi nomeado **iso-01**. A porção 10(2) (43,6 mg), levemente amarelada, solúvel em clorofórmio (CDCl_3), apresentou-se como outro produto que foi nomeado **iso-02**. A combinação 17 também gerou cristais, desta vez insolúveis em metanol, que foram separados na porção denominada 17(1). O sólido branco da porção 17(1) (5,1 mg), solúvel em piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), apresentou-se como o produto nomeado **iso-03**. As demais combinações analisadas não apresentaram resultados promissores.

Semelhantemente ao descrito no item 3.3.3.2.3 (p. 58) para os produtos de biotransformação do ibuprofeno, os compostos **iso-01**, **iso-02** e **iso-03** foram caracterizados por meio de análises espectroscópicas por RMN e por espectrometria de massas (ESI-IT-MS). As análises por RMN foram realizadas em espectrômetro de 400 MHz (^{13}C e DEPT-135) e 600 MHz (^1H , HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, NOESY), e os espectros foram tratados utilizando-se o *software* TopSpin 4.2.0

3.3.3.4.3 *Biotransformação de ácido traquilobânico por A. niger*

O extrato do caldo (EC) obtido após o crescimento contínuo de *A. niger* em contato com ácido traquilobânico por 10 dias em maior escala (30 frascos; 6,0 L PDB) (432,81 mg) foi analisado por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3). A observação do espectro indicou ser interessante o fracionamento do extrato por cromatografia em coluna para isolamento de possíveis produtos de biotransformação. Entretanto, a separação não foi realizada neste trabalho.

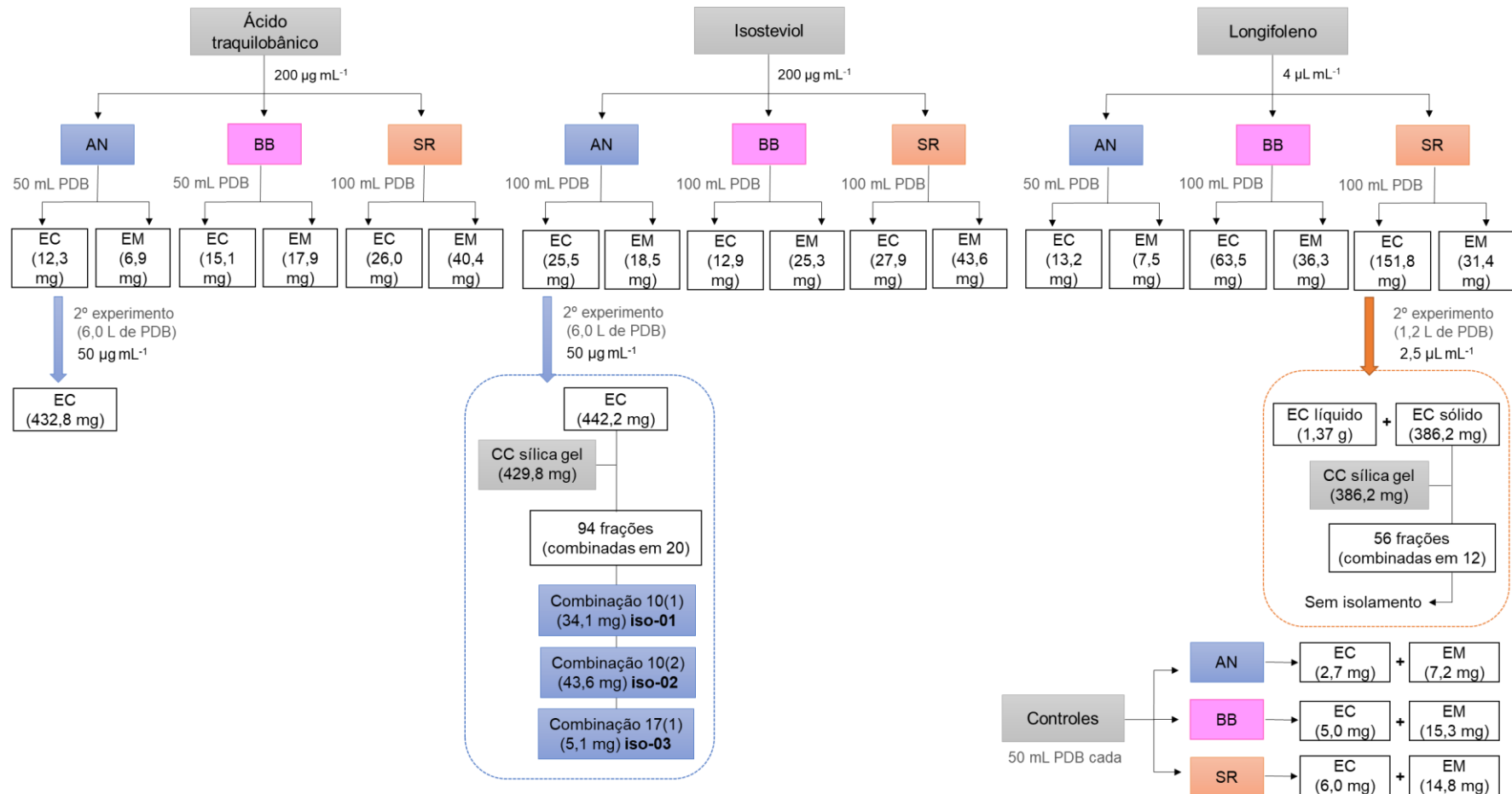


FIGURA 15 – Esquema da produção de extratos da biorremediação de ácido traquilobânico, isosteviol e (+)-longifoleno pelos fungos *A. niger* (AN), *B. bassiana* (BB) e *S. racemosum* (SR). Descrição das colunas cromatográficas e do isolamento de produtos de biotransformação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características morfológicas das espécies fúngicas

A classificação taxonômica das cinco espécies de fungos filamentosos utilizadas neste trabalho é apresentada na Figura 16. Estas espécies foram avaliadas micro (Figura 17, p. 66) e macroscopicamente (Figuras 17 e 18, p. 66-67), e as características observadas são discutidas a seguir.

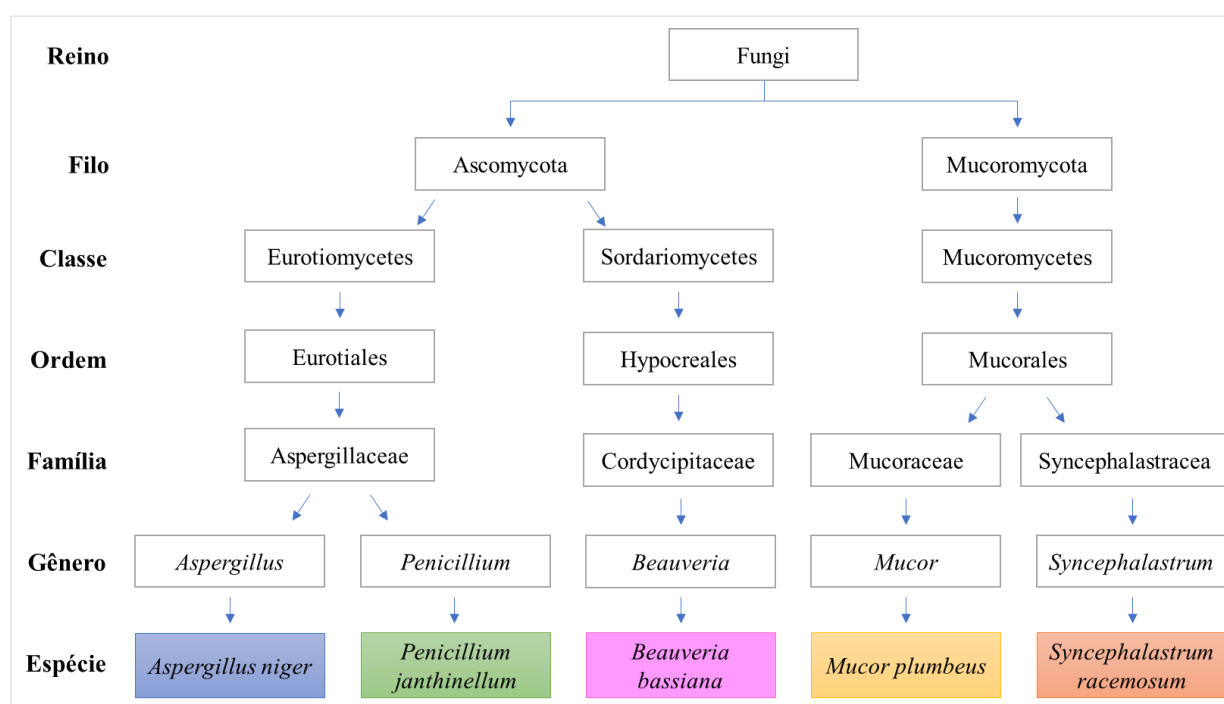


FIGURA 16 – Esquema da classificação taxonômica dos fungos filamentosos utilizados neste trabalho: *A. niger*, *P. janthinellum*, *B. bassiana*, *M. plumbeus* e *S. racemosum*. Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

A. niger é um fungo filamentoso conhecido por sua utilização industrial em processos fermentativos para a obtenção de diversos aditivos alimentares, como os ácidos cítrico e glucônico originados da fermentação de glicose ou sucralose (COPETTI *et al.*, 2019). É aprovado pela *Food and Drug Administration*, agência federal dos Estados Unidos, como um fungo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (JIAO *et al.*, 2018). As colônias de *A. niger* se apresentam inicialmente brancas e rapidamente se tornam pretas na medida que a esporulação ocorre, como mostrado na Figura 17 (p. 66). Nesta mesma figura apresenta-se a

imagem microscópica com a indicação de um conidióforo longo, uma vesícula esférica larga e os conídios liberados para germinação. Além disso, *A. niger* possui hifas septadas e, cobrindo toda a vesícula, células estéreis chamadas métulas que suportam as fiálides, estruturas a partir das quais são produzidos os conídios/espores. Desta forma, toda a superfície da vesícula está envolvida na esporulação (TILLE, 2016).

B. bassiana é uma espécie com ação micoinseticida, sendo assim uma alternativa de interesse para a agronomia no controle de pragas. Este fungo também é conhecido pela ação como agente de biotransformação (KLENK *et al.*, 2019). Possui aparência densa, crescimento em forma de almofada e coloração branca ou branca-amarelada, como observado na Figura 17 (p. 66). Sua estrutura microscópica apresenta hifas vegetativas ramificadas, septadas e transparentes (hialinas); e aglomerados de células conidiogênicas em arranjo em ziguezague (BICH *et al.*, 2021; REHNER *et al.*, 2011).

O gênero *Mucor* compreende diversas espécies, dentre as que geram impactos positivos (fabricação de alimentos e agentes biotecnológicos) ou negativos (micoses). *M. plumbeus* é uma espécie com alta taxa de crescimento e muito utilizada em estudos de biotransformação de terpenos (MORIN-SARDIN *et al.*, 2017). Na Figura 17 (p. 66) podemos notar seu crescimento de aspecto cotonoso e coloração marrom, assim como sua estrutura microscópica em diferentes estágios. Estão presentes esporangióforos ramificados, columela em formato ovóide-elipsoidal, e o esporângio maduro (globoso) ou deliquescente, o último liberando aglomerados de esporangióforos à medida que a membrana esporangial se dissolve (RIBES *et al.*, 2000; BOTHA & BOTES, 2014).

As colônias de *P. janthinellum*, espécie de *Penicillium* listada dentre as reconhecidas como potenciais agentes de biorremediação (LEITÃO, 2009), apresentam textura aveludada, sendo inicialmente brancas e tornando-se verde/cinza oliva com o tempo. O crescimento destas colônias é rápido e de forma amplamente espalhada. Na imagem microscópica (Figura 17, p. 66) observa-se a presença de hifas septadas, seguidas dos conidióforos, fiálides e conídios, que são liberados durante a esporulação, assim como mostrado no estudo de Houbraken e Samson (2011) para diversas espécies de *Penicillium*.

S. racemosum é uma espécie comumente encontrada no solo. É classificado com um fungo saprófito, ou seja, organismo que se alimenta de matéria orgânica em decomposição (RIBES *et al.*, 2000). A observação macroscópica das colônias de *S. racemosum* indica uma textura cotonosa, que no início do seu crescimento em meio de cultura apresenta coloração branca, passando de cinza escuro a preto com o tempo. Na imagem microscópica (Figura 17, p. 66) é possível observar vesículas esporangiais envoltas por merosporângios, estando estes em sua forma madura, e os esporangiósporos liberados da vesícula como unidades merosporangiais inteiras. Além disso, observam-se hifas cenocíticas, ou seja, que não apresentam septos, de acordo com o esperado para a espécie (RIBES *et al.*, 2000).

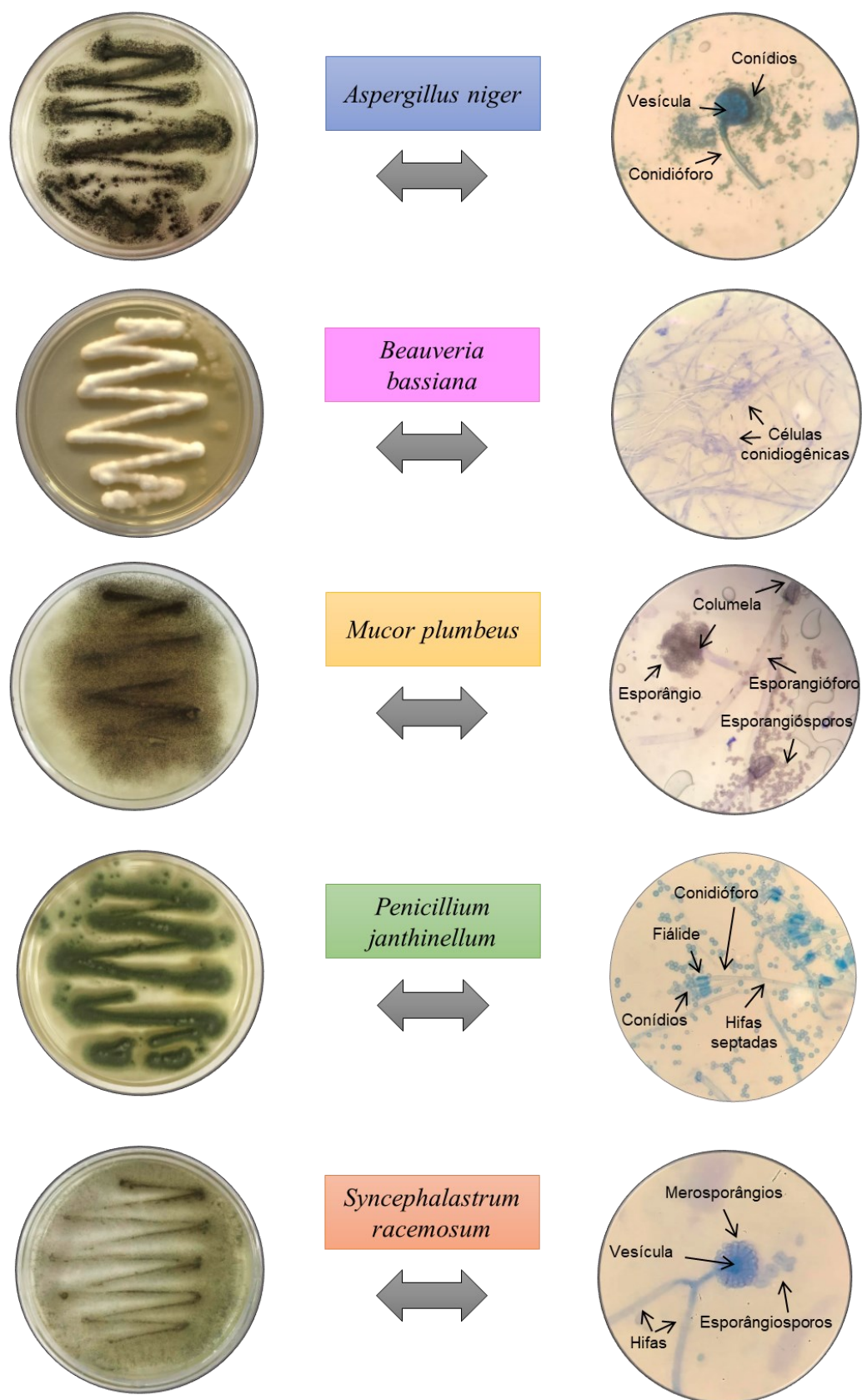


FIGURA 17 – Características morfológicas observadas macroscopicamente e em microscópio ótico para *A. niger*, *M. plumbeus*, *P. janthinellum*, *S. racemosum* (40x) e *B. bassiana* (100x).

Nenhum dos microrganismos apresentou produção de exsudato durante o crescimento, o que infere uma baixa produção de metabólitos secundários, sendo assim interessantes para processos de biorremediação e biotransformação. Este comportamento foi observado quando os fungos foram cultivados em meio PDA, uma vez que diferentes meios podem gerar diferentes características de crescimento, cor e produção de metabólitos secundários para colônias de um mesmo microrganismo (ZAIN *et al.*, 2009). Além disso, de modo geral possuem metabolismo acelerado, sendo de rápido crescimento em condições normais de temperatura e pressão.

Na Figura 18 pode ser observado o crescimento radial (frente e verso) destes microrganismos em meio PDA em um curto intervalo de tempo (4 dias), evidenciando um crescimento mais lento de *B. bassiana* em relação aos outros.

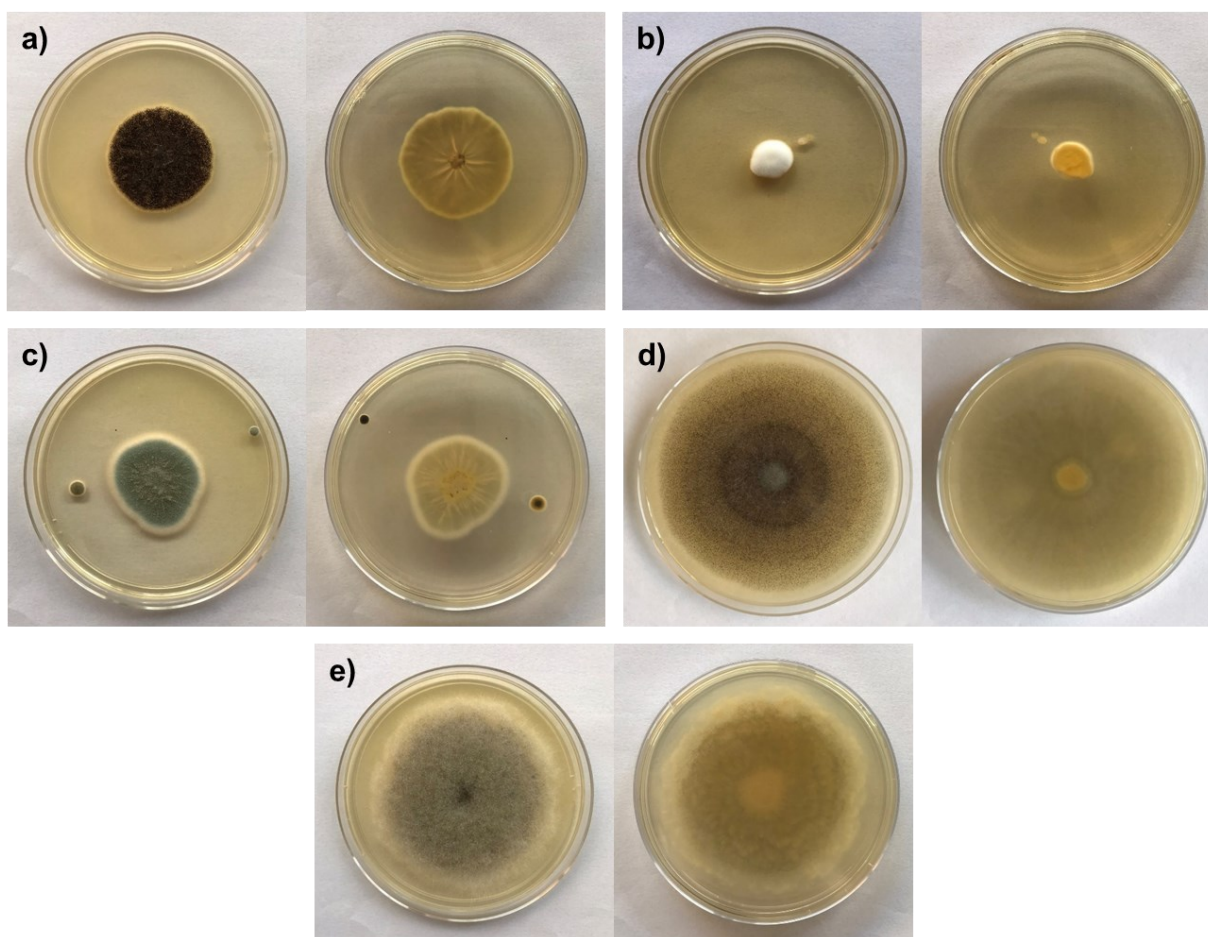


FIGURA 18 – Crescimento radial de fungos filamentosos em placas de Petri com ágar batata (PDA) após 4 dias do repique, frente e verso. (a) *A. niger*, (b) *B. bassiana*, (c) *P. janthinellum*, (d) *M. plumbeus*, (e) *S. racemosum*.

4.2 Biorremediação de íons metálicos

Para a execução dos experimentos de biorremediação de íons metálicos, as espécies fúngicas utilizadas foram *P. janthinellum* e *S. racemosum*. Optou-se pelo uso de *resting cells* (células em repouso), procedimento em que a biomassa produzida pelo fungo no meio de cultura (neste caso, em PDB) é separada por filtração e lavada com água destilada antes de ser utilizada (MARTINS *et al.*, 2016). Para a realização dos experimentos de biossorção, a biomassa em repouso (biomassa ER) foi adicionada a soluções aquosas contendo os íons de interesse. Experimentos com células em crescimento também podem exibir capacidade de remoção de íons metálicos, em mecanismo denominado bioacumulação. Entretanto, nestes casos as células se tornam mais susceptíveis a efeitos tóxicos dos metais, podendo haver interrupção das atividades metabólicas e do crescimento (RAMRAKHIANI *et al.*, 2016; KAPAHI & SACHDEVA, 2019), ou formação de metabólitos secundários não desejados, prejudicando a eficiência do processo (MAHMOUD *et al.*, 2017). A biossorção com biomassas mortas/inativas possui as vantagens de não carecer de nutrientes adicionais, o armazenamento poder ser feito por longos períodos em temperatura ambiente, a possibilidade de reuso do material após dessorção dos metais, além de sofrer menos efeitos frente aos aspectos ambientais em casos de uso aplicado (DE FREITAS *et al.*, 2019).

4.2.1 Biorremediação de íons Cu(II) (10-50 mg L⁻¹) por *P. janthinellum*

A capacidade de retenção de íons Cu(II) por biomassas ER de *P. janthinellum* presentes em soluções aquosas de sulfato de cobre anidro com diferentes concentrações de íons Cu(II) é apresentada da Tabela 3.

TABELA 3 – Remoção de cobre pela biomassa de *P. janthinellum* após 60 min de contato

Concentração de Cu(II) (mg L ⁻¹) em solução	Remoção de Cu(II) (%)	Remoção de Cu(II) (mg L ⁻¹)
10	52,72 ± 3,61 ^a	5,27
20	49,24 ± 2,45 ^{ab}	9,85
30	40,49 ± 4,49 ^{bc}	12,15
40	43,82 ± 1,94 ^{bc}	17,53
50	37,58 ± 4,24 ^c	18,79

^{a-c} significativamente diferentes (teste Tukey, P<0,05)

A faixa de concentração testada foi determinada com base em uma limitação relatada para os tratamentos convencionais de remoção de metais de soluções aquosas, que é a baixa eficiência e/ou elevado custo quando estes se encontram em baixas concentrações, 10-100 mg L⁻¹ (RAMRAKHIANI *et al.*, 2016). Além disso, tinha-se o intuito de evitar uma possível precipitação do metal em solução durante os experimentos.

Observou-se que após 60 min de contato entre as biomassas e as soluções houve remoção significativa de íons Cu(II), para todas as concentrações testadas. A concentração máxima testada (50 mg L⁻¹) apresentou menor porcentagem de remoção, entretanto, não foi observada diferença estatística dos resultados para as soluções contendo 30, 40 e 50 mg L⁻¹ de cobre. Apresentando a maior remoção em termos quantitativos, em mg L⁻¹, a concentração máxima testada foi a escolhida para os experimentos que se sucederam.

4.2.2 Biorremediação de íons Cu(II), Mn(II) e Fe(II) a 50 mg L⁻¹

Os experimentos descritos a seguir foram realizados utilizando-se as seguintes soluções aquosas, na concentração de 50 mg L⁻¹ do respectivo íon metálico: CuSO₄ (pH 5,99), MnSO₄·H₂O (pH 7,19) e FeSO₄·7H₂O (pH 5,95). Não foram feitos ajustes nos valores de pH considerando que os mesmos estão na faixa considerada a ideal para uma remoção mais efetiva de íons metálicos por diversos estudos (pH entre 4 e 7) (ASSIS, 2016; MAHMOUD *et al.*, 2017).

Em pH mais elevado ocorre aumento da desprotonação dos grupos funcionais presentes na superfície da biomassa fúngica e, conseqüentemente, um aumento nos sítios ativos negativos, favorecendo a ocorrência de um maior número de interações com os íons metálicos (MAHMOUD *et al.*, 2017). Entretanto, acima do pH 8 pode ocorrer precipitação destes íons, interferindo na análise quantitativa do alcance da biorremediação (ASSIS, 2016).

4.2.2.1 Biorremediação por *P. janthinellum*

Os resultados obtidos para a remoção de íons Cu(II), Fe(II) e Mn(II), das respectivas soluções aquosas, por biomassas ER de *P. janthinellum*, em diferentes tempos de contato, são apresentados graficamente na Figura 19 (p. 70).

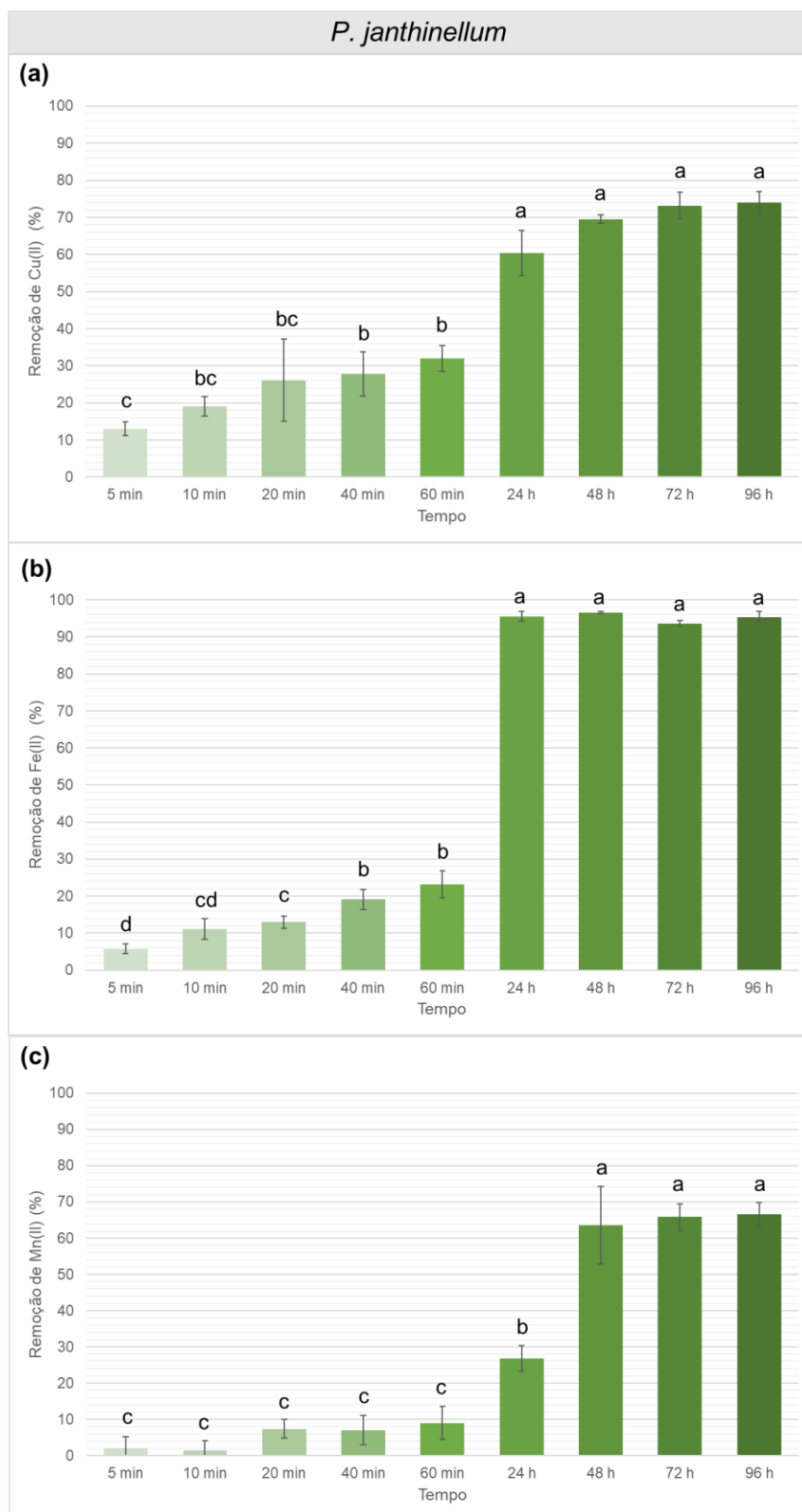


FIGURA 19 – Porcentagens médias de remoção de (a) Cu, (b) Fe e (c) Mn de suas respectivas soluções a 50 mg L⁻¹ pela biomassa de *P. janthinellum*, em diferentes tempos de biorremediação – médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste Tukey, P < 0,05).

Observando os gráficos de barras obtidos, percebe-se uma tendência de remoção semelhante para cobre (Figura 19.a, p. 70) e ferro (Figura 19.b, p. 70) pela biomassa de *P. janthinellum* durante a primeira hora dos experimentos. Para os íons manganês (Figura 19.c, p. 70) foram registradas baixas porcentagens de remoção na primeira hora, não havendo diferença estatística entre as amostras entre 5 a 60 min.

As porcentagens de remoção de íons cobre e ferro por *P. janthinellum* apresentaram crescimento significativo estatisticamente até as primeiras 24 h de cada experimento ($60,42 \pm 6,07\%$ e $95,54 \pm 1,27\%$, respectivamente), e valores absolutos máximos em 96 h para Cu(II) ($73,93 \pm 3,04\%$) e em 48 h para Fe(II) ($96,63 \pm 0,25\%$). Para o manganês, a porcentagem de remoção apresentou acréscimo considerável estatisticamente até as 48 h do experimento ($63,55 \pm 10,65\%$), e valor absoluto máximo com 96 h ($66,63 \pm 3,17\%$).

Observou-se um início de desintegração das biomassas de *P. janthinellum* em contato com as soluções de manganês após as primeiras 24 h do experimento. Esta observação sugere uma interação do metal com a parede celular do fungo. Alguns estudos mostraram a ação do manganês como fungicida, auxiliando na supressão de doenças em plantas quando aplicado em plantações, como por exemplo, o aumento da resistência do pepino à *Podosphaera fuliginea* (ESKANDARIA & SHARIFNABI, 2020) e de tomate à *Pseudocercospora fuligena* (HEINE *et al.*, 2011). Entretanto, alguns fungos podem ser extremamente resistentes ao metal, como observado por Cao *et al.* (2011) para uma cepa de *Fusarium* sp.

Quanto ao *P. janthinellum*, o fungo tem tolerância detectada para várias íons metálicos, como Ni(II), Li(I), Pb(II) ($> 500 \text{ mg L}^{-1}$), Co(II) (350 mg L^{-1}), Cd(II) (150 mg L^{-1}) (MARTINS *et al.*, 2016) e Cu(II) (500 mg L^{-1}) (ISKANDAR *et al.*, 2011) em experimentos utilizando esporos em crescimento. A resistência desta espécie frente a íons Cr(VI) também vem sendo investigada em estudos genômicos (CHI *et al.*, 2021) e transcriptômicos (BAO *et al.*, 2022). Em termos práticos, Rout *et al.* (2013) evidenciaram o uso de *P. janthinellum* como biossorvente em efluente industrial de galvanoplastia, exibindo eficiência de remoção de íons Cu(II) de 35%.

4.2.2.2 Biorremediação por *S. racemosum*

Os resultados obtidos para a remoção de íons Cu(II), Fe(II) e Mn(II), de suas respectivas soluções aquosas, por biomassas ER de *S. racemosum*, em diferentes tempos de contato, são apresentados graficamente na Figura 20 (p. 72).

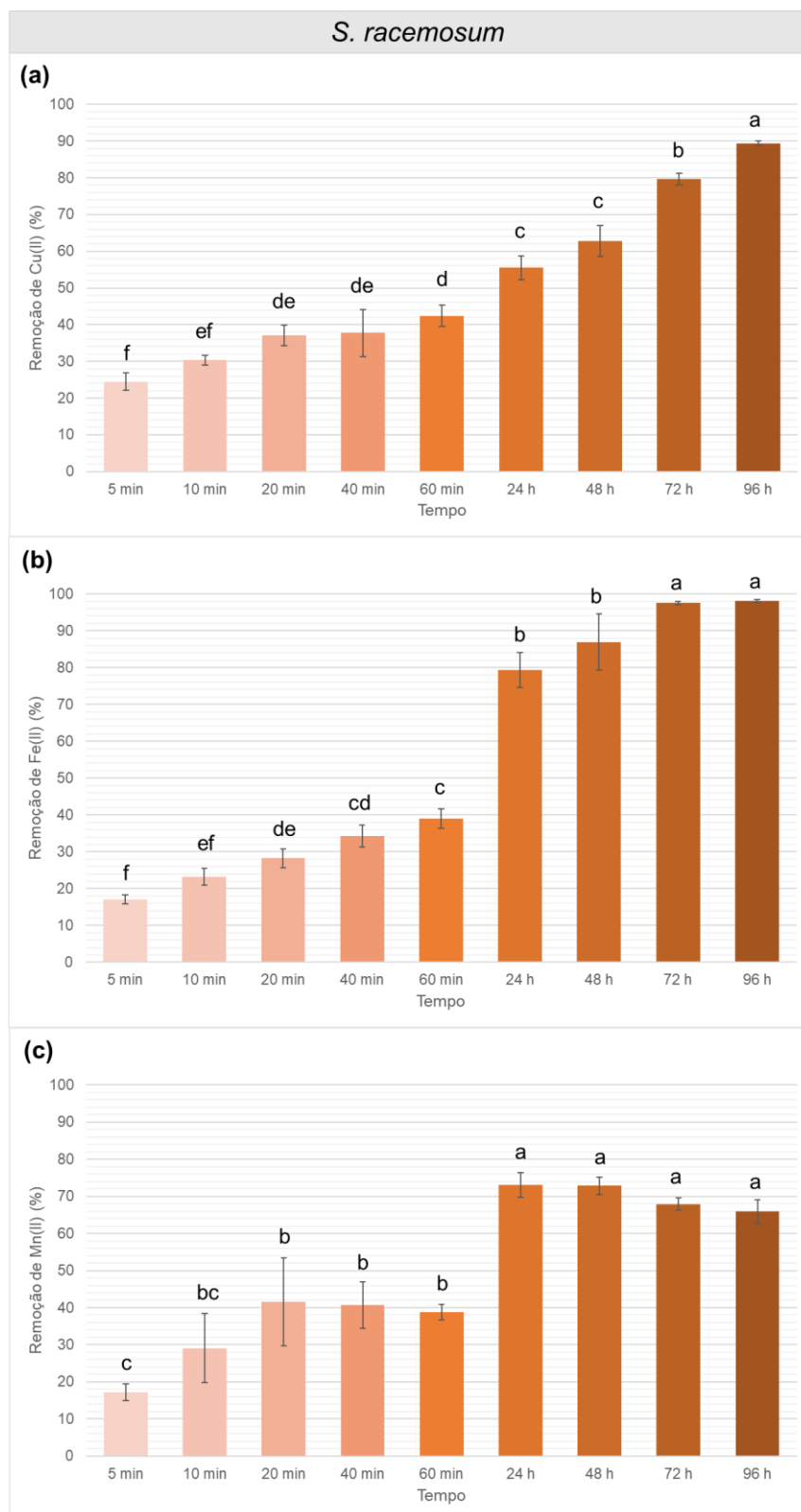


FIGURA 20 – Porcentagens médias de remoção de (a) Cu, (b) Fe e (c) Mn de suas respectivas soluções a 50 mg L⁻¹ pela biomassa de *S. racemosum*, em diferentes tempos de biorremediação – médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste Tukey, P < 0,05).

Observou-se uma tendência de remoção semelhante para todos os íons metálicos por *S. racemosum* durante a primeira hora dos experimentos. Foram registrados valores próximos a 20% de remoção nos primeiros 5 min de contato e cerca de 40% na primeira hora. Com 24 h de cada experimento, mais de 50% de remoção foi alcançada para todos os metais.

A remoção de cobre (Figura 20.a, p. 72) por *S. racemosum* apresentou crescimento significativo em termos estatísticos até a última coleta, 96 h de experimento ($89,39 \pm 0,58\%$). Para o ferro (Figura 20.b, p. 72), embora uma alta remoção tenha sido registrada a partir das primeiras 24 h ($79,33 \pm 4,71\%$), estatisticamente houve aumento até 72 h ($97,56 \pm 0,44\%$) e, em termos quantitativos, a remoção de íons ferro em solução se mostrou quase completa ao final do experimento ($98,08 \pm 0,35\%$ em 96 h). Já para o manganês (Figura 20.c, p. 72), a porcentagem máxima foi observada com 24 h de biorremediação ($73,11 \pm 3,33\%$), não havendo diferença estatística nas amostras subsequentes (48, 72 e 96 h).

Embora saiba-se que fungos da ordem Mucorales apresentam quitina, quitosana e glucana em sua parede celular e por esta razão são eficientes bioabsorventes de íons metálicos e exibem considerável resistência a eles (SINGH *et al.*, 2016), não são encontrados muitos estudos que investiguem essa ação para *S. racemosum*. Desta forma, estes resultados abrem perspectivas para outros estudos.

4.2.2.3 Teste t pareado - comparação entre métodos

A comparação das médias de remoção de cada metal pelas duas espécies fúngicas foi realizada por meio de teste F seguido de teste t no intuito de avaliar a eficiência da biorremediação. O teste t pareado é um teste de significância utilizado para comparar médias entre diferentes métodos e avaliar se existe diferença estatística entre eles. O teste F consiste em uma análise de variância que compara os desvios padrões das amostras em estudo para definir a região de aceitação de desvios no teste t (MILLER & MILLER, 2005).

Para cada um dos metais analisados obteve-se **|t calculado| < t tabelado** no intervalo de confiança de 95% – análise apresentada no Apêndice I (p. 167). Desta forma, infere-se que não houve diferença estatística entre a ação de *P. janthinellum* e *S. racemosum* na remoção de cada metal, e que ambos podem ser utilizados como materiais bioabsorventes considerando-se a eficiência total do processo.

4.2.2.4 Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) consiste na reunião de informações multivariadas em gráficos bidimensionais, separando assim informações relevantes em novas variáveis, os componentes principais (PC). O intuito é facilitar o reconhecimento de padrões, identificar as relações entre amostras e variáveis e, assim, possibilitar a visualização de comportamentos diferenciados entre grupos de amostras. Na análise gráfica, amostras em situações opostas na PCA, distante do zero no eixo analisado, indicam comportamentos opostos (FERREIRA, 2015).

Ao realizar a análise PCA com os percentuais de remoção (em triplicata) da biorremediação de Cu(II), Fe(II) e Mn(II) por *P. janthinellum* (PJ) e *S. racemusom* (SR), três componentes principais PC 1, PC 2 e PC 3 foram destacados por explicarem 95,9% da variância total dos dados. Para estes componentes foram gerados os gráficos escore (Figuras 21 e 22, p. 75) para obtenção das informações relativas as amostras e os gráficos *loadings* (Figuras 23-25, p. 76) para se obter informações relativas a variáveis, que no caso foi o tempo.

No gráfico escore de **PC 1 x PC 2** (Figura 21, p. 75) observou-se o agrupamento das amostras referente a Mn-PJ separado dos demais no lado negativo de PC 1, e de Fe-PJ no lado positivo de PC 2. A variação destes dois agrupamentos, cada um em um componente, em relação aos demais pontos se deu em relação ao tempo como observados nos gráficos *loadings* da PC 1 (Figura 23, p. 76) e PC 2 (Figura 24, p. 76). A maior separação se deu no tempo acima de 24 h para ambos os casos. Sendo assim, 24 h é considerado um ponto crítico para estas amostras. Esta informação se alia a observação da tendência apresentada nos gráficos de porcentagens médias dos metais em função do tempo apresentados nas páginas 70 e 72. Comportamentos diferentes são observados para estas duas amostras na primeira hora em relação a 24 h. Para Mn-PJ (Figura 19.c, p. 70) a primeira hora tem valores muito baixos e iguais estatisticamente, e após as 24h os valores de adsorção também são menores que das demais amostras. Para Fe-PJ (Figura 19.b, p. 70) a remoção tem um crescimento contínuo na primeira hora e um salto muito grande de 60 min para 24 h (uma diferença de 72,4%), com este crescimento se mantendo estável até o final dos experimentos (96 h).

A informação nova explicada por meio do componente PC 3 foi o comportamento diferenciado das amostras Mn-SR, separadas das demais amostras com SR no lado positivo de PC 3 no gráfico escore **PC 2 x PC 3** (Figura 22, p. 75). Esta separação também se justifica pelo tempo acima de 24 h como observado no mapa *loadings* da PC 3 (Figura 25, p. 76). Observando o gráfico da Figura 20.c (p. 72), nota-se o comportamento atípico após atingir o valor máximo em 24 h, havendo queda nos valores absolutos de adsorção nos três dias subsequentes, indicando que o metal poderia estar sendo devolvido ao meio.

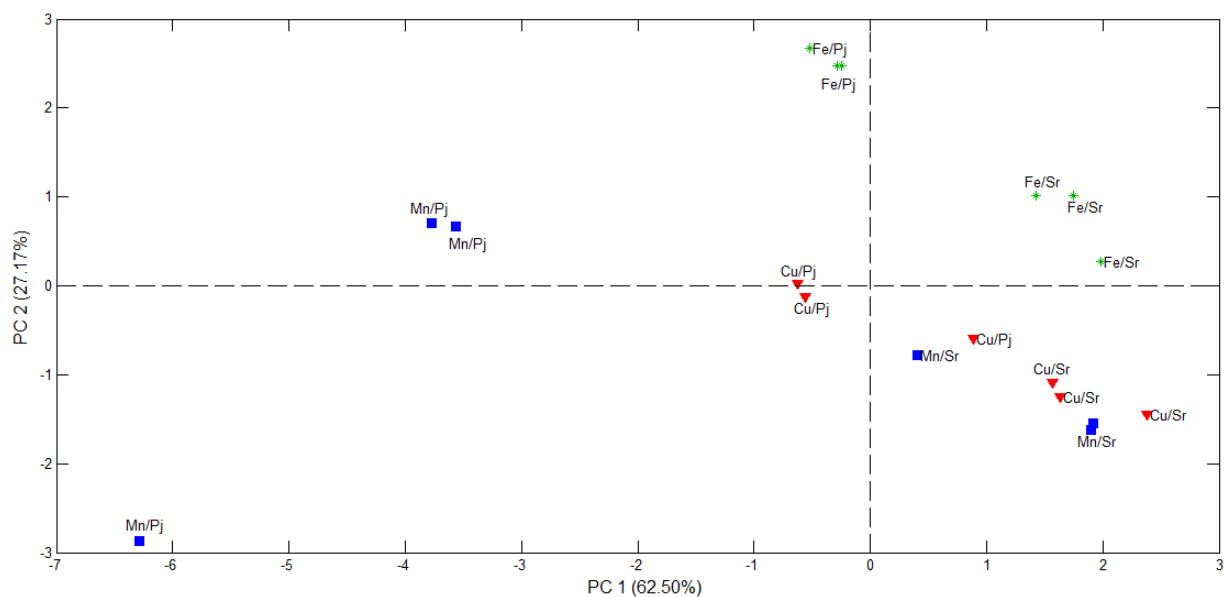


FIGURA 21 – Análise de componentes principais - gráfico escore PC 1 x PC 2 obtido com os percentuais de remoção de metais no processo de biorremediação em triplicata.

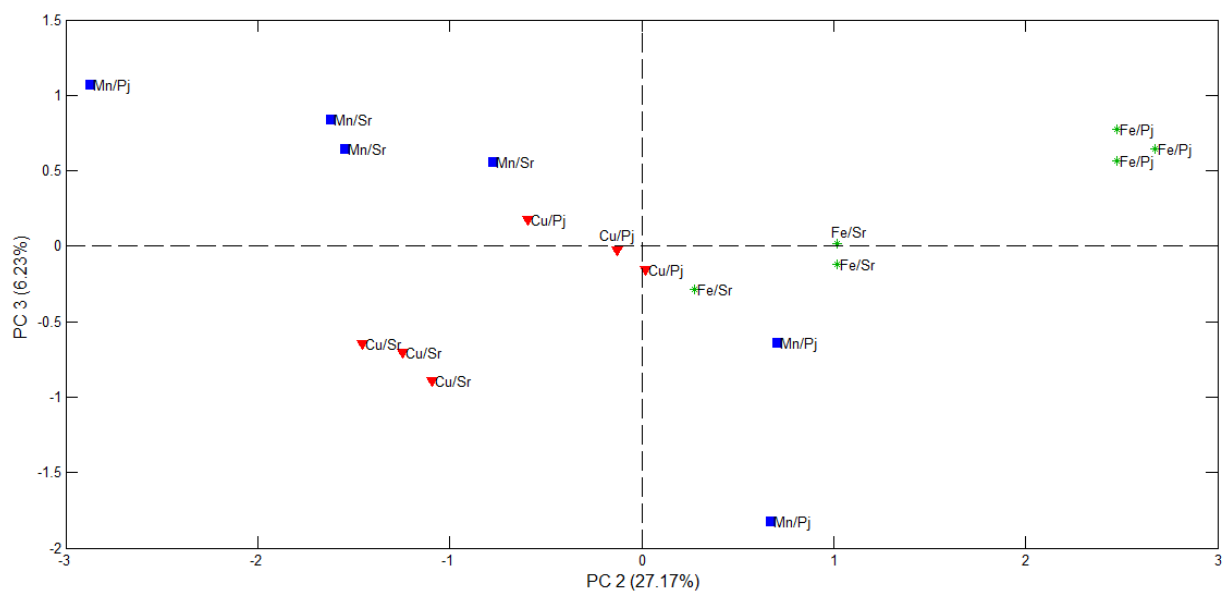


FIGURA 22 – Análise de componentes principais - gráfico escore PC 2 x PC 3 obtido com os percentuais de remoção de metais no processo de biorremediação em triplicata.

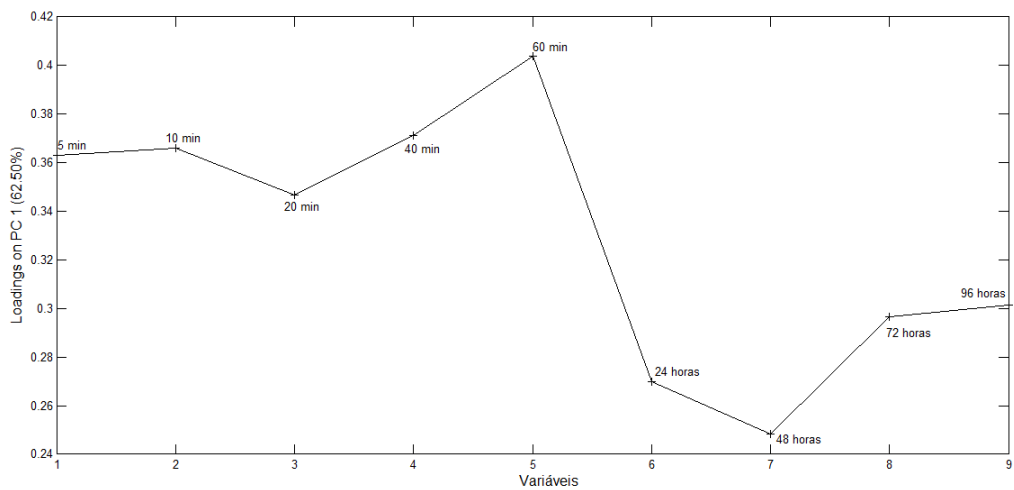


FIGURA 23 – Gráfico loadings em PC 1.

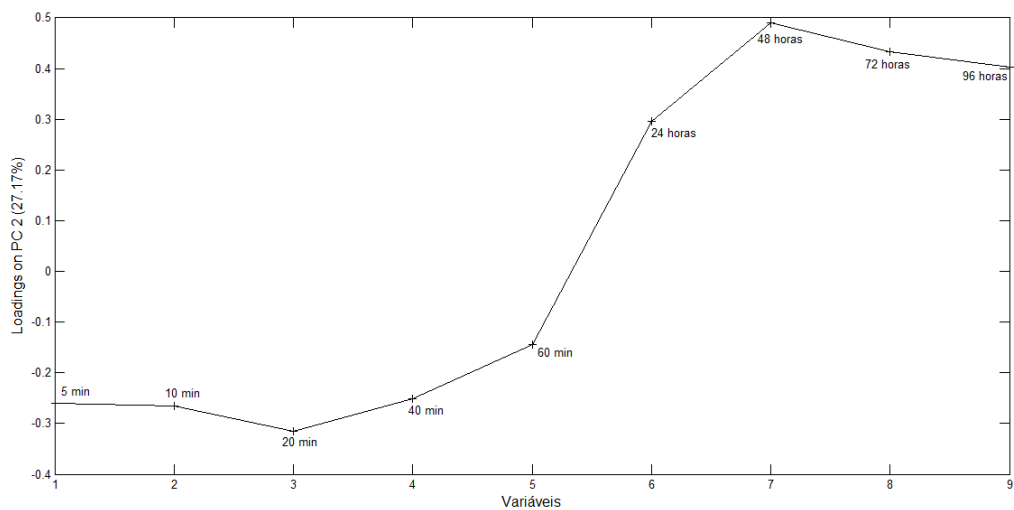


FIGURA 24 – Gráfico loadings em PC 2.

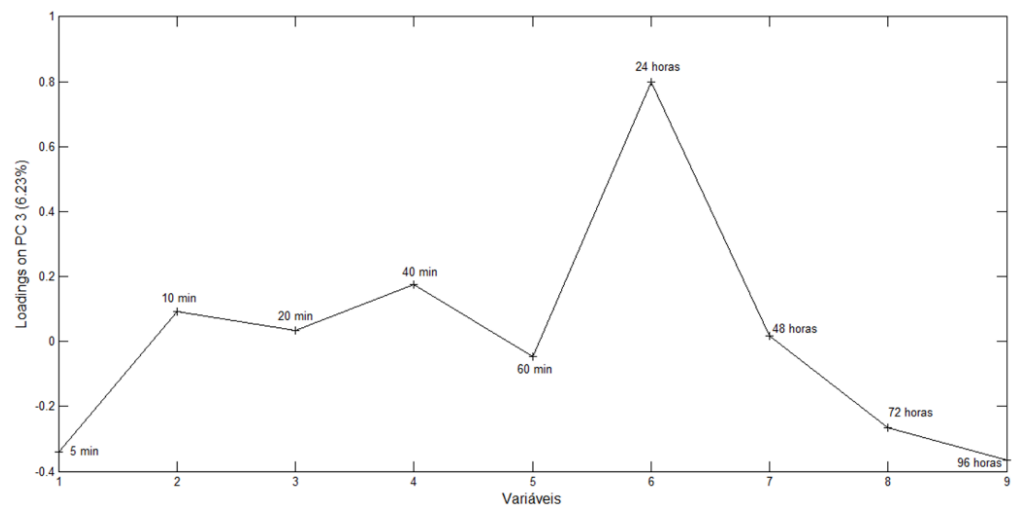


FIGURA 25 – Gráfico loadings em PC 3.

4.2.3 Biorremediação de íons Fe(II) a 50 mg L⁻¹ por *P. janthinellum* e *S. racemosum* variando o tratamento das biomassas

4.2.3.1 Biomassas frescas e secas

Os experimentos de remoção de íons Fe(II) em solução a 50 mg L⁻¹ discutidos no item 3.3.2.4 (p. 47-48) com biomassas ER frescas de ambas as espécies fúngicas, foram realizados paralelamente a outros dois experimentos. Um se refere à utilização das biomassas secas e pulverizadas e, o outro, realizando-se a troca da biomassa fúngica fresca à cada 24 h por uma nova. Como pode ser observado na Figura 26, o perfil das biomassas de ambas as espécies é bastante distinto. Quando pulverizada, a biomassa de *P. janthinellum* se apresenta compacta, enquanto a de *S. racemosum* é volumosa e de textura macia.

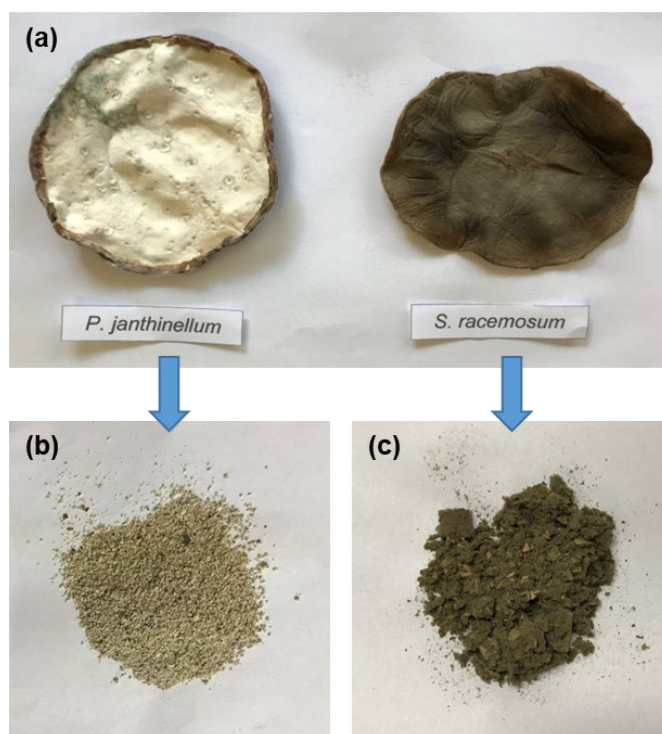


FIGURA 26 – Biomassas ER de *P. janthinellum* e *S. racemosum* (a) em sua forma fresca e (b-c) secas e pulverizadas.

Os resultados obtidos para o percentual de remoção de íons Fe(II) pelas biomassas fúngicas ER em sua forma fresca e após secagem e pulverização, em diferentes tempos de contato, são apresentados graficamente nas Figuras 27 e 28 (p. 78).

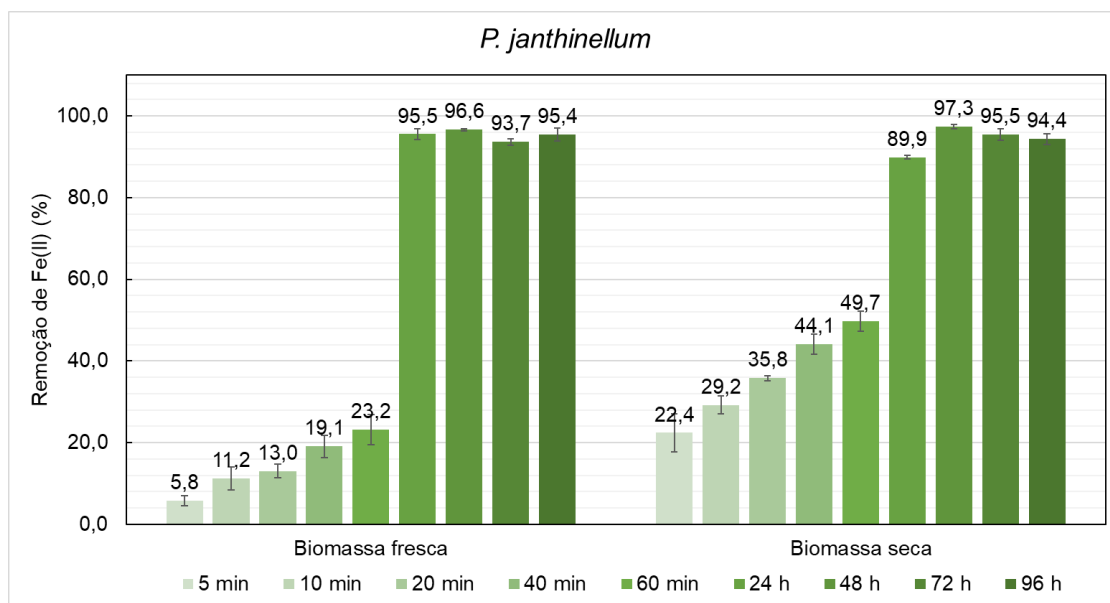


FIGURA 27 – Porcentagens médias de remoção de Fe(II) pelas biomassas ER frescas e após secagem de *P. janthinellum* em diferentes tempos de biorremediação.

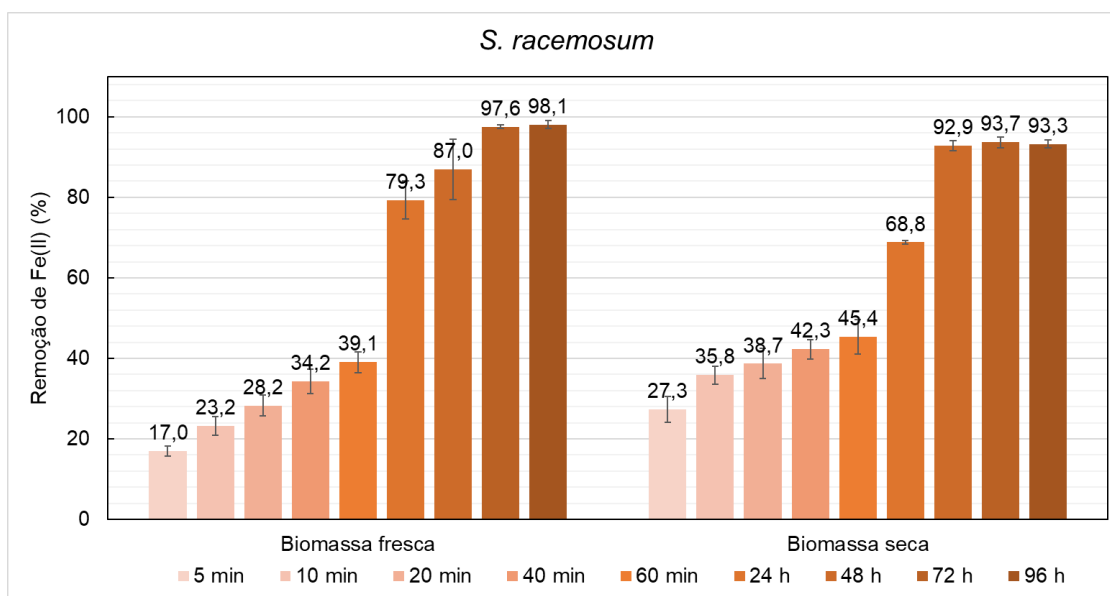


FIGURA 28 – Porcentagens médias de remoção de Fe(II) pelas biomassas ER frescas e após secagem de *S. racemosum* em diferentes tempos de biorremediação.

Durante a primeira hora dos experimentos foi possível observar uma tendência semelhante de aumento da remoção de ferro para ambas as espécies, e maior variabilidade dos resultados quando comparadas as formas de tratamento das biomassas, do que em relação às duas espécies.

Para *P. janthinellum* (Figura 27, p. 78) a biomassa seca apresentou percentuais de remoção maiores do que a biomassa fresca na primeira hora. Nestes 60 min de experimento, a biomassa seca removeu $49,73 \pm 2,43\%$ de ferro, o que consistiu em mais que o dobro do teor removido pela fresca ($23,17 \pm 3,69\%$). Entretanto, após as primeiras 24 h dos experimentos, a remoção apresentou-se semelhante, independentemente da forma de tratamento das biomassas, alcançando mais de 90% de remoção de íons Fe(II).

Para *S. racemosum* (Figura 28, p. 78) observou-se comportamento mais linear na primeira hora ao se comparar a forma de tratamento das biomassas. Além disso, em termos de valores absolutos, estes foram maiores do que para *P. janthinellum* neste período.

4.2.3.1.1 Teste t pareado - comparação entre métodos

Estas observações iniciais puderam ser confirmadas por meio da comparação estatística entre a eficiência dos dois métodos (biomassa fresca e seca) por meio de teste F seguido de teste t (IC = 95%). O teste foi realizado para cada fungo considerando as médias de remoção na primeira hora (5-60 min) e após 24 h e dias seguintes (24-96 h). Para *P. janthinellum* (Apêndice II, p. 168) houve diferença entre os métodos utilizados na primeira hora, **|t calculado| > t tabelado**, mas após 24 horas a eficiência foi equivalente para uso da biomassa seca ou fresca, **|t calculado| < t tabelado**. Para *S. racemosum* (Apêndice III, p. 169) não houve diferença entre as formas de uso da biomassa nem durante a primeira hora, nem após 24 h – **|t calculado| < t tabelado**. Desta forma, considerando-se a eficiência total do processo ambas as formas podem ser utilizadas. Entretanto, considerando uma remoção em curto período de tempo, para *P. janthinellum* a utilização da biomassa seca demonstrou ser mais eficiente.

De maneira geral, independentemente do estado da biomassa, fresca ou seca, foram obtidas porcentagens significativas de remoção de íons Fe(II) pelos microrganismos em estudo, indicando que estes materiais poderiam ser utilizados para a produção de filtros biodegradáveis. Visando futuras aplicações, o uso das biomassas em sua forma fresca parece mais promissor, devido ao menor tempo necessário para produção, gerando economia de custos de processamento. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, a biomassa em sua forma seca e pulverizada pode ser interessante em situações onde a adsorção é necessária rapidamente, como por exemplo, no pré-tratamento da água. Desse modo, pode-se inferir que em poucas horas um resultado satisfatório pode ser obtido na descontaminação de ambientes, dependendo do teor de Fe(II) a ser removido.

4.2.3.2 Uso contínuo e troca de biomassas

Um terceiro experimento foi realizado em paralelo para a remoção de íons Fe(II), consistindo na troca da biomassa fresca a cada 24 h durante quatro dias para avaliar uma possível saturação ao comparar com os resultados no uso contínuo de uma mesma biomassa durante todo o experimento. As porcentagens de remoção obtidas são apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 – Porcentagens médias de remoção de Fe(II) entre 24-96 h por biomassas frescas de *P. janthinellum* e *S. racemosum*, em uso contínuo e com troca de biomassa a cada 24 h

Horas	<i>P. janthinellum</i>		<i>S. racemosum</i>	
	Contínuo (%)	Troca (%)	Contínuo (%)	Troca (%)
24	95,5	89,5	79,3	71,1
48	96,6	97,3	87,0	97,9
72	93,7	97,0	97,6	99,1
96	95,4	97,5	98,1	99,0

4.2.3.2.1 Teste *t* pareado - comparação entre métodos

Como foram alcançadas altas porcentagens de remoção desde as primeiras 24 horas de experimento, as eficiências de remoção entre 24-96 h utilizando as duas metodologias não foram diferentes estatisticamente considerando cada espécie fúngica, conforme observado na resposta obtida para o teste *t* (IC = 95%) **|*t* calculado| < *t* tabelado** (Apêndice IV, p. 170). Portanto, a saturação da biomassa não influenciou a remoção de íons ferro em solução nos parâmetros estudados.

4.2.4 Caracterização das biomassas após biorremediação

4.2.4.1 Espectroscopia no infravermelho

Amostras das biomassas frescas de *P. janthinellum* (PJ) e *S. racemosum* (SR) utilizadas nos processos de biorremediação de Fe(II), Cu(II) e Mn(II), assim como biomassas controle que não entraram em contato com os íons metálicos, foram analisadas por FTIR conforme descrito no item 3.3.2.6 (p. 50). Os espectros obtidos são apresentados nas Figuras 29 e 30 (p. 82).

A espectroscopia no infravermelho pode dar informações acerca dos grupos funcionais presentes na superfície das células fúngicas, assim como sobre a interação destes grupos com os metais, quando são observadas mudanças na posição das bandas, com aumento ou decréscimo das frequências de transmissão, em relação ao observado nas biomassas sem carregamento de metais (SHARMA *et al.*, 2020). Na Tabela 5 (p. 83) são apresentadas as frequências, em número de onda (cm^{-1}), das bandas observadas e os prováveis grupos funcionais correspondentes. Em negrito estão os valores que diferiram do observado no espectro da biomassa controle, indicando que houve uma interação que acarretou em vibração.

Dentre estes, destacam-se para ambos os fungos e metais: um deslocamento significativo das bandas correspondentes dos estiramentos das ligações N-H e O-H (controle: 3376 cm^{-1} PJ e 3392 cm^{-1} SR); vibrações das bandas em 1244 cm^{-1} , causada pela interação dos metais com o grupo ácido sulfônico; e das bandas em 1034 cm^{-1} (PJ) e 1048 cm^{-1} (SR), correspondentes ao estiramento da ligação C-N de quitina/quitosana, composto presente nas paredes celulares fúngicas. Estas mesmas alterações de vibrações foram observadas por Di e colaboradores (2022) na interação de Cd(II) e Sb(III) com o fungo *Curvularia coatesiae* XK8.

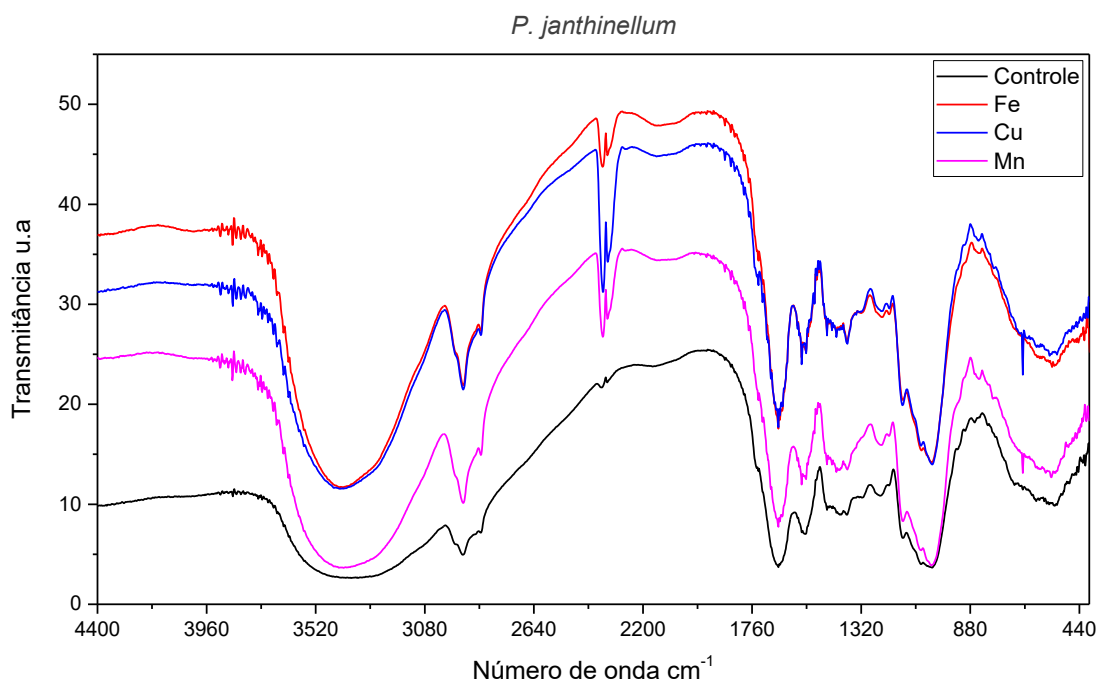


FIGURA 29 – Espectro no infravermelho das biomassas de *P. janthinellum* controle e após biorremediação de Fe(II), Cu(II) e Mn(II) – KBr, 400-4000 cm⁻¹.

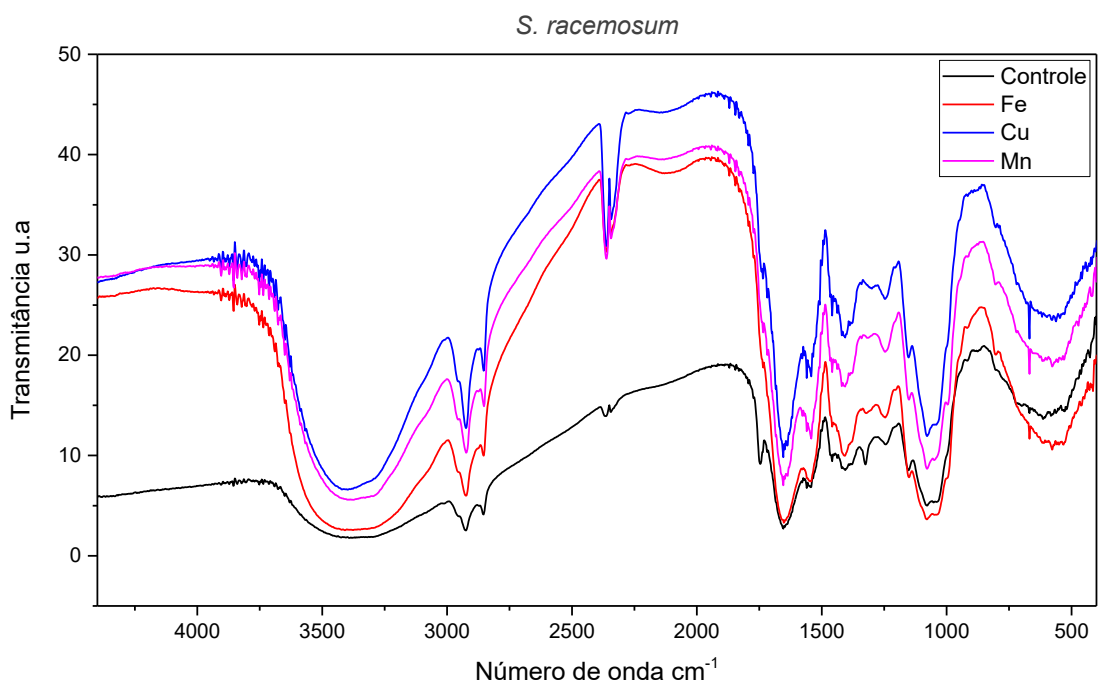


FIGURA 30 – Espectro no infravermelho das biomassas de *S. racemosum* controle e após biorremediação de Fe(II), Cu(II) e Mn(II) – KBr, 400-4000 cm⁻¹.

TABELA 5 – Frequências (cm^{-1}) e atribuições de bandas no infravermelho para biomassas de *P. janthinellum* e *S. racemosum* sem (controle) e com o tratamento com soluções aquosas de 50 mg L^{-1} de Fe(II), Cu(II) e Mn(II)

<i>P. janthinellum</i>				<i>S. racemosum</i>				Possíveis grupos funcionais associados
Controle	Fe(II)	Cu(II)	Mn(II)	Controle	Fe(II)	Cu(II)	Mn(II)	
3376	3410	3408	3408	3392	3408	3406	3406	vO-H e vN-H (3300-3400 cm^{-1} ^[1])
2928	2924	2926	2926	2924	2924	2924	2924	v _{as} C-H (2924 cm^{-1} ^[1])
2854	2854	2854	2854	2854	2854	2854	2852	v _s C-H (2854 cm^{-1} ^[1])
-	-	-	-	1746	1734	1736	1734	vC=O de ester (1746 ^[1] / 1750-1730 cm^{-1} ^[2])
1654	1654	1654	1654	1654	1652	1654	1654	vC=O de amida (1700-1640 cm^{-1} ^[2])
1560	1560	1560	1560	1560	-	1560	1560	δN-H (1640-1550 cm^{-1} ^[2])
1546	1542	1542	1542	1544	1544	1542	1542	
1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458	1458	vC-N de amida 3ária (1460 cm^{-1} ^[1])
1406	1420	1420	1420	1406	1408	1406	1406	vC-N de amida 1ária (1400 cm^{-1} ^[2])
1378	1376	1376	1376	-	-	-	-	COO ⁻ de amida 3ária (1378 cm^{-1} ^[1])
1244	1234	1234	1238	1244	1246	1246	1246	Grupos -SO ₃ (1246 cm^{-1} ^[1])
1152	1152	1154	1152	1152	1150	1152	1150	vC-O-C (1154 cm^{-1} ^[1])
1078	1076	1078	1078	1078	1078	1078	1078	vC-N grupos amino e fosfato (1079 cm^{-1} ^[1])
1034	1038	1036	1036	1040	1048	1050	1050	vC-N da quitina- quitosana (1034 cm^{-1} ^[1])

v = estiramento; δ = deformação angular ou dobramento

Referências: ^[1] DI *et al.*, 2022; ^[2] PAVIA *et al.*, 2020

Além disso, para *P. janthinellum*, destacam-se, a vibração das bandas em 2928 cm^{-1} (estiramento assimétrico de ligação C-H), em 1546 e 1406 cm^{-1} (bandas que representam vibrações de grupos relacionados com proteínas), e em 1378 cm^{-1} (COO^- de amida terciária). Evidencia-se, assim, o papel de grupos carboxilatos de *P. janthinellum* na bio sorção de Fe(II), Cu(II) e Mn(II) por atração eletrostática, assim como o envolvimento de proteínas e derivados, como observado para Kumar e Dwivedi (2021) para *Trichoderma lixii* CR700 na bio sorção de Cu(II). Para *S. racemosum*, todos os metais apresentaram um decréscimo significativo da posição da banda originalmente em 1746 cm^{-1} , que pode corresponder a uma carbonila de grupo éster. As bandas em 2366, 2344, 668 cm^{-1} para *P. janthinellum* e 2364, 2344, 668 cm^{-1} para *S. racemosum*, provavelmente correspondem ao CO_2 , que pode reagir com os compostos presentes na superfície durante o preparo da pastilha de KBr [estiramento 2350 cm^{-1} , deformação angular 666 cm^{-1}] (BARBOSA *et al.*, 2007).

4.2.4.2 Microscopia eletrônica (MEV-EDS)

A morfologia da superfície de *P. janthinellum* e *S. racemosum* foi estudada sem o contato com íons metálicos e também após o contato com soluções contendo Fe(II), Cu(II) e Mn(II). Para tanto obtiveram-se imagens por MEV que são apresentadas nas Figuras 31 (p. 85), 32 (p. 86) e 33 (p.87). Nas amostras controle de ambos os fungos são observadas cavidades nas superfícies que se tornam mais fechadas após o contato com os metais, o que indica a ligação destes íons com os grupos funcionais presentes nas células (SALEM *et al.*, 2021).

Na imagem da superfície de *S. racemosum* (Figura 32.a, p. 86) podem ser vistos com clareza suas hifas cilíndricas e ramificadas, assim como aglomerados de esporos. Estas estruturas foram completamente desintegradas após bio sorção de cada íon metálico (Figura 32.b-d, p. 86). Sharma e colaboradores (2020) sugerem que alterações deste tipo podem ser resultado de efeitos tóxicos dos metais sobre o fungo. Destaca-se que para registro destas imagens o equipamento foi direcionado para uma porção lisa das amostras, mas para as amostras resultantes do contato com Fe(II) e Mn(II) também foram notadas regiões rugosas e de rachadura, respectivamente, nas quais as ampliações mostraram nitidamente quebras na estrutura – Figura 33 (p. 87).

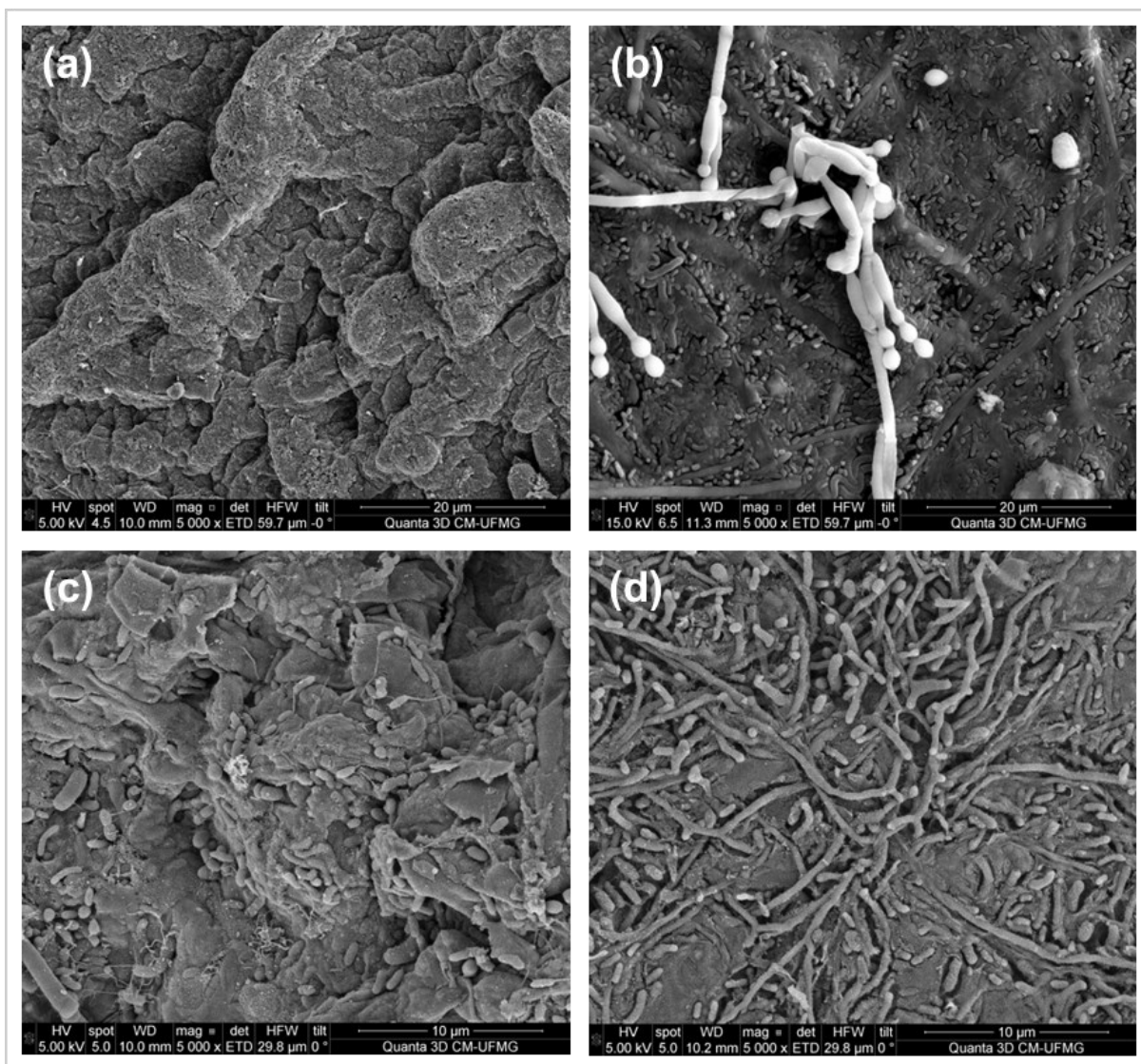


FIGURA 31 – Imagens de MEV da biomassa de *P. janthinellum*: (a) sem contato com metal; após contato com (b) Fe(II), (c) Cu(II) e (d) Mn(II) – aumento 5000x.

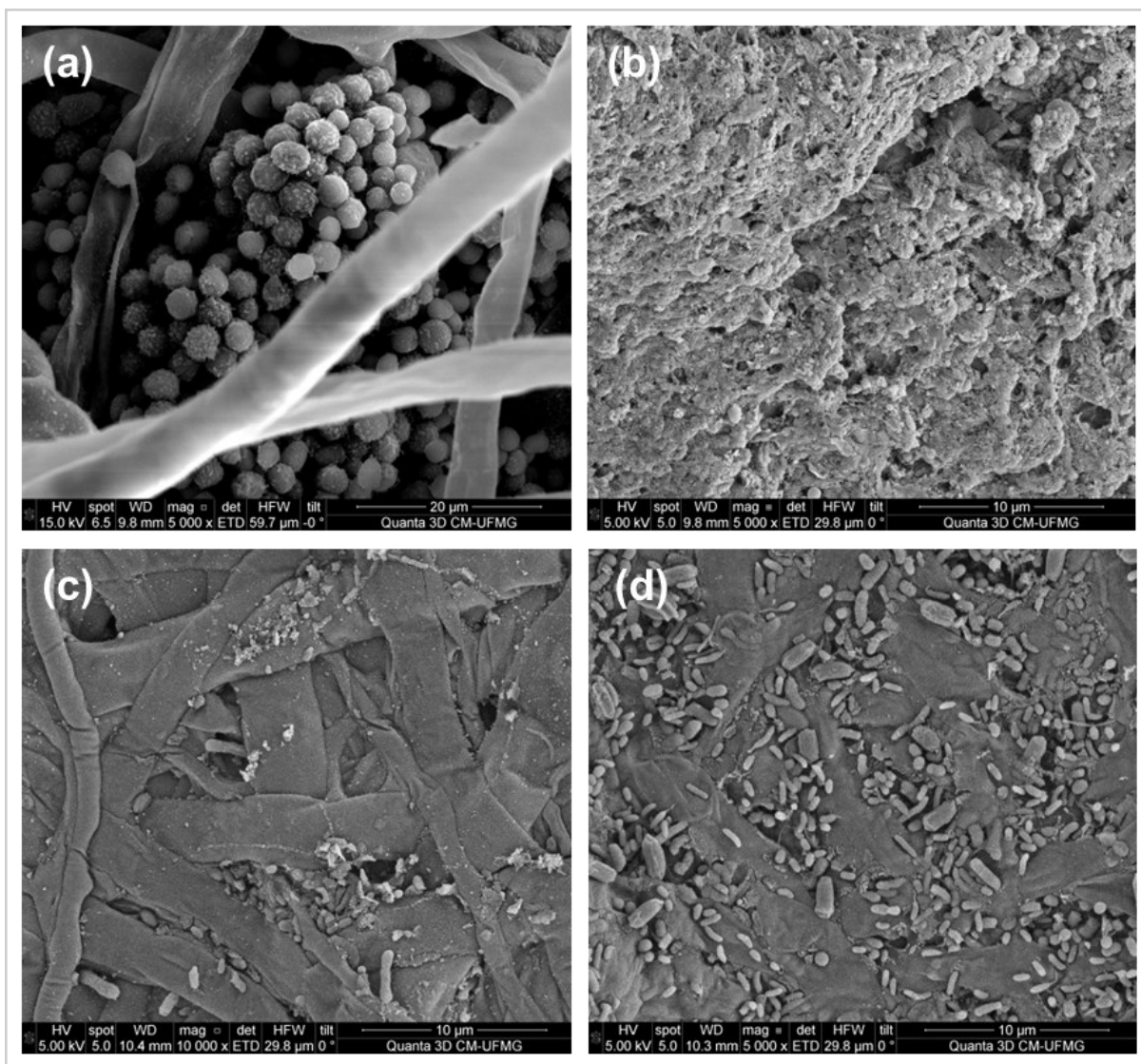


FIGURA 32 – Imagens de MEV da biomassa de *S. racemosum*: (a) sem contato com metal; após contato com (b) Fe(II), (c) Cu(II) e (d) Mn(II) – aumento 5000x (a, b e d) e 10000x (c).

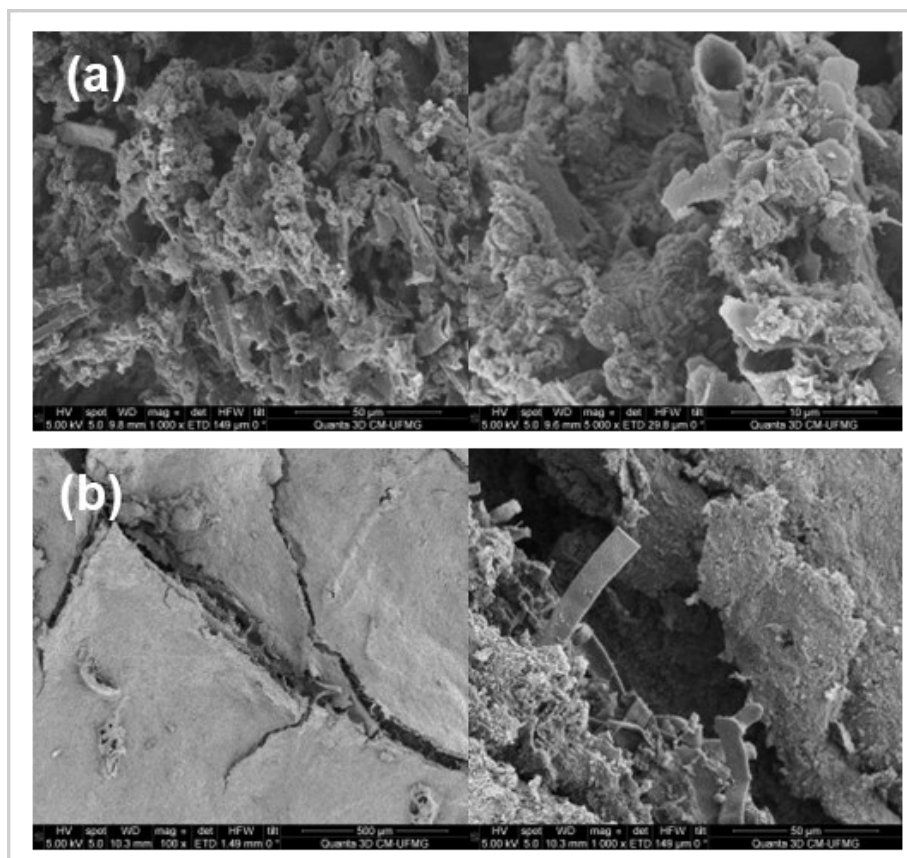


FIGURA 33 – Imagens de MEV da biomassa de *S. racemosum*: (a) após tratamento com Fe(II), região rugosa, aumento de 1000x e 5000x; (b) após tratamento com Mn(II), rachadura, aumento de 100x e 1000x.

A presença dos metais nas superfícies fúngicas foi confirmada por meio da análise em MEV-EDS. O mapa químico e espectro de impressão digital obtidos para cada biomassa por meio da combinação destas técnicas são apresentados nas Figuras 34-37 (p. 88-89) para *P. janthinellum* e nas Figuras 38-41 (p. 90-91) para *S. racemosum*.

No mapa químico de cada amostra verifica-se uma distribuição uniforme do metal alvo na superfície analisada. Estes metais também são indicados no espectro EDS. Alguns outros metais estão presentes nos espectros e são referentes a etapa de metalização para o preparo de amostras, por exemplo, Au e Pd. Para o Mn, o mapa químico foi realizado em uma área maior (menor ampliação do microscópio, 200x), para que fosse possível atingir o limite de detecção do equipamento (0,5% do metal na amostra). A menor detecção pode estar correlacionada ao fato que a adsorção de Mn(II) pelas espécies fúngicas foi menor em comparação aos outros íons metálicos em estudo e, além disso, apenas uma pequena porção da biomassa é levada para a análise.

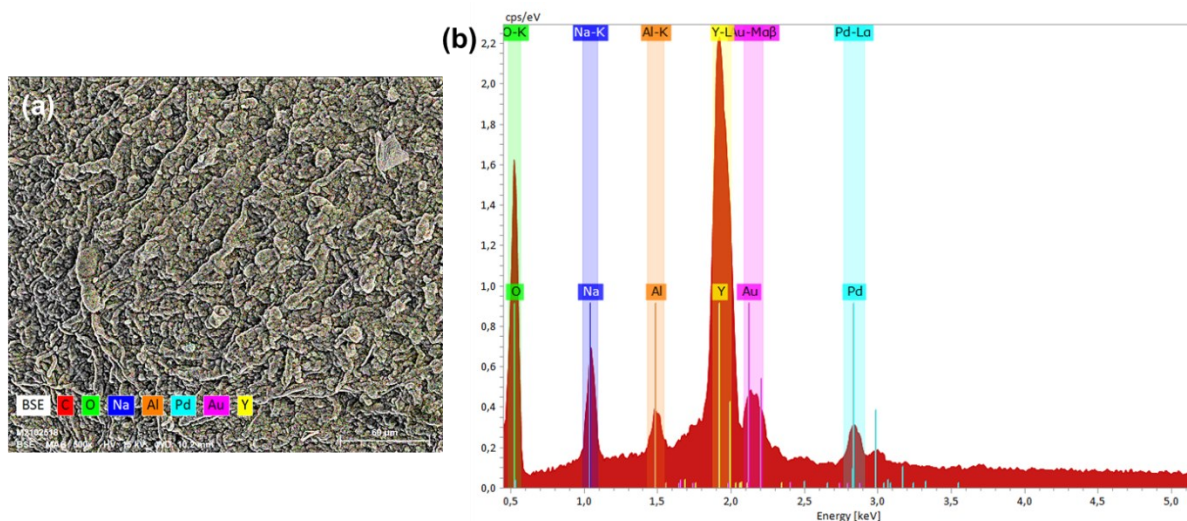


FIGURA 34 – Mapa químico (a) e espectro de impressão digital (b) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *P. janthinellum* na ausência de metal (500x, 15kV).

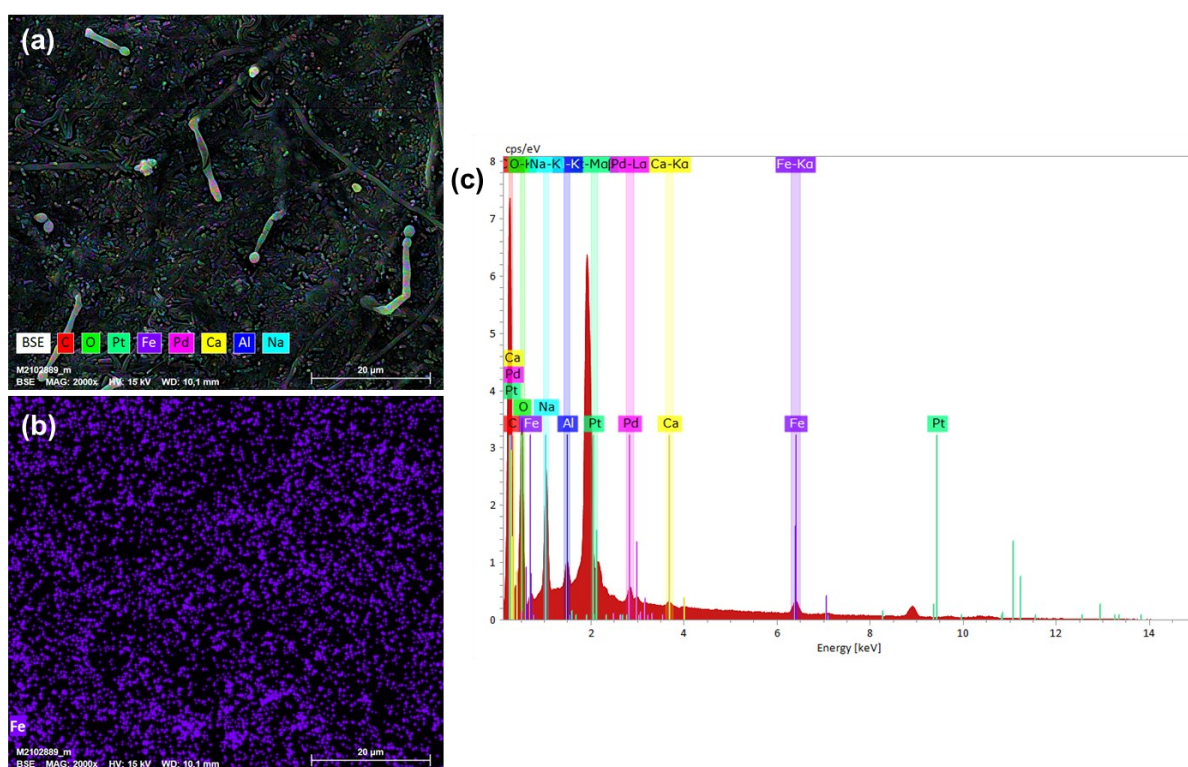


FIGURA 35 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *P. janthinellum* após bioacumulação de Fe(II) (2000x, 15kV).

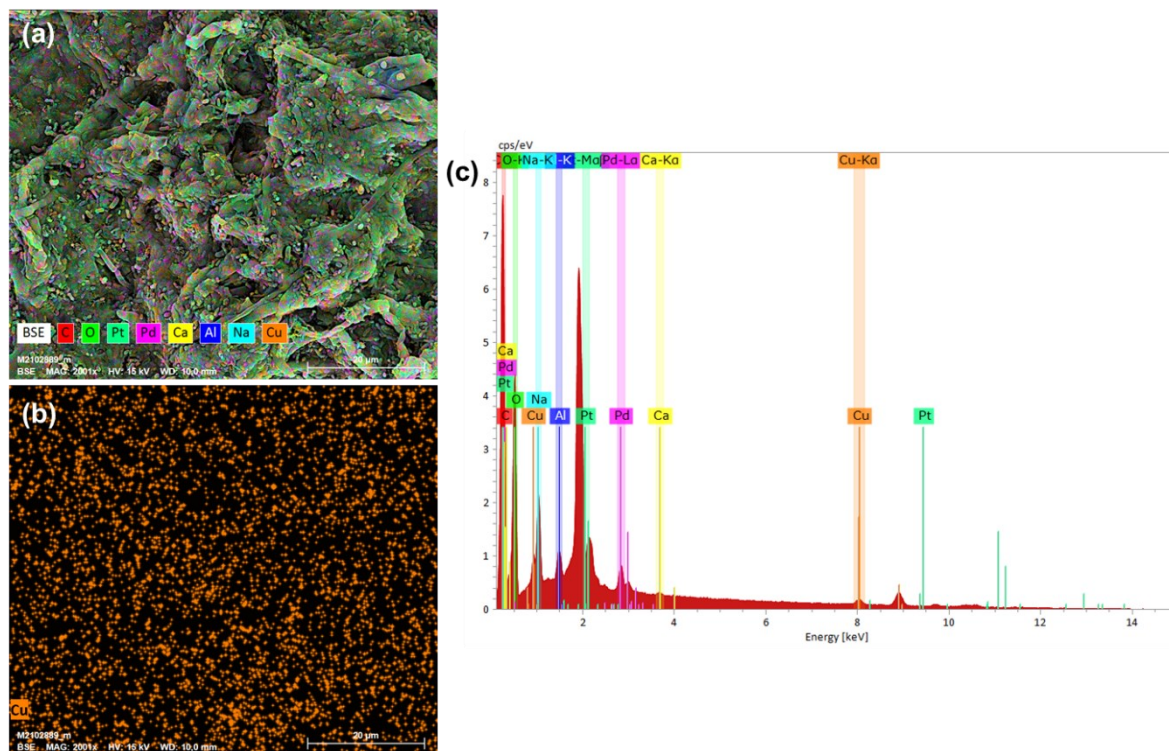


FIGURA 36 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *P. janthinellum* após bioacumulação de Cu(II) (2000x, 15kV).

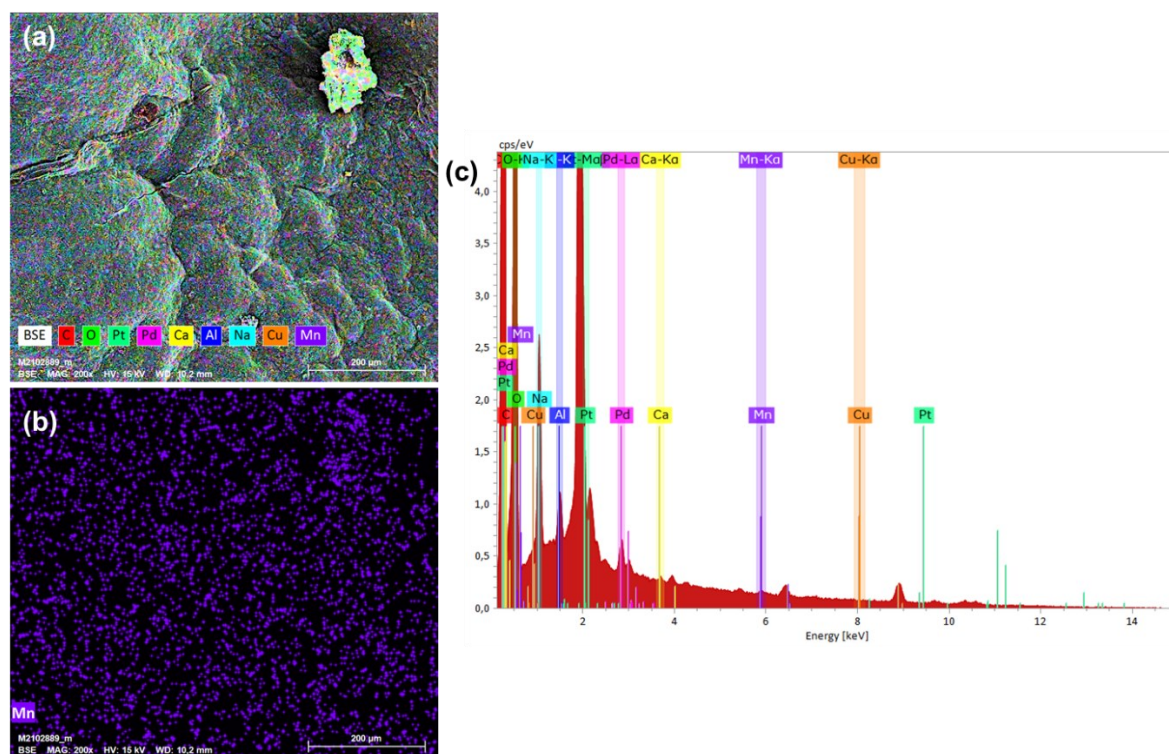


FIGURA 37 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *P. janthinellum* após bioacumulação de Mn(II) (200x, 15kV).

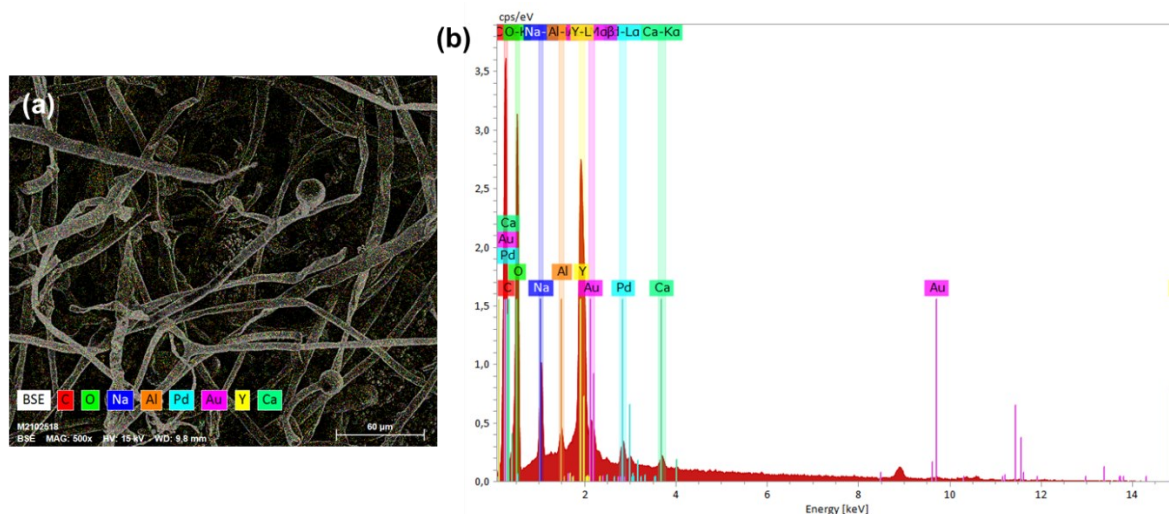


FIGURA 38 – Mapa químico (a) e espectro de impressão digital (b) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *S. racemosum* na ausência de metal (500x, 15kV).

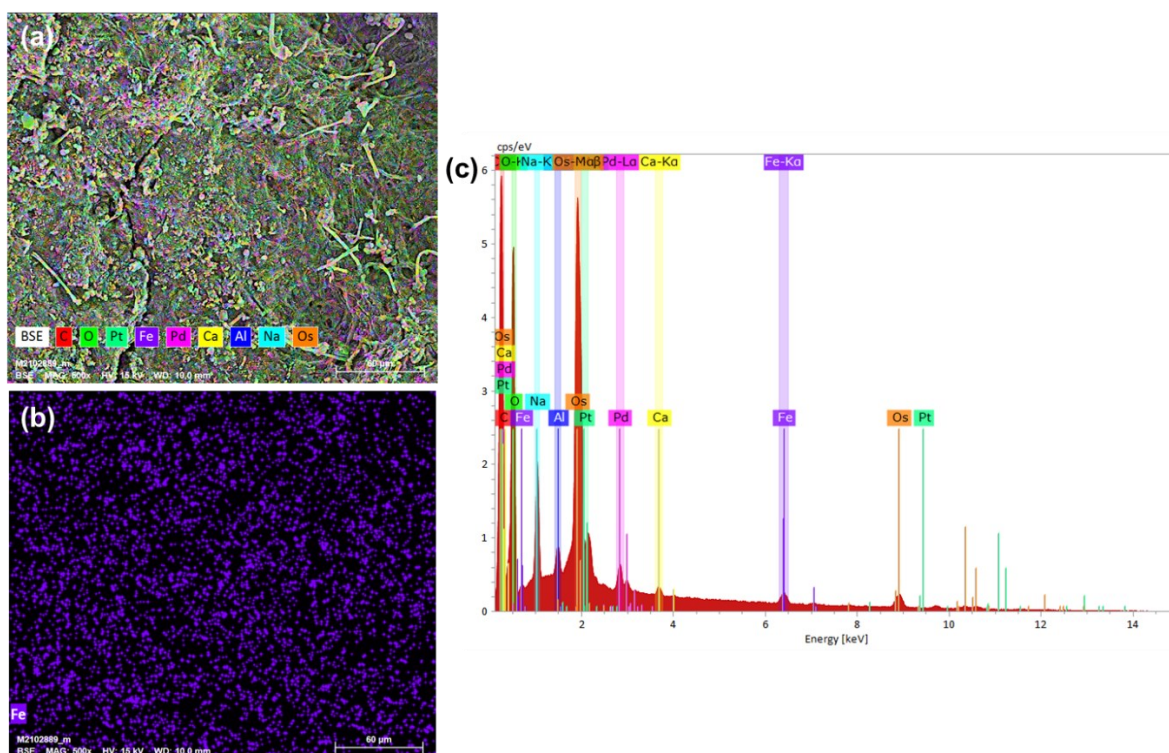


FIGURA 39 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *S. racemosum* após bioacumulação de Fe(II) (500x, 15kV).

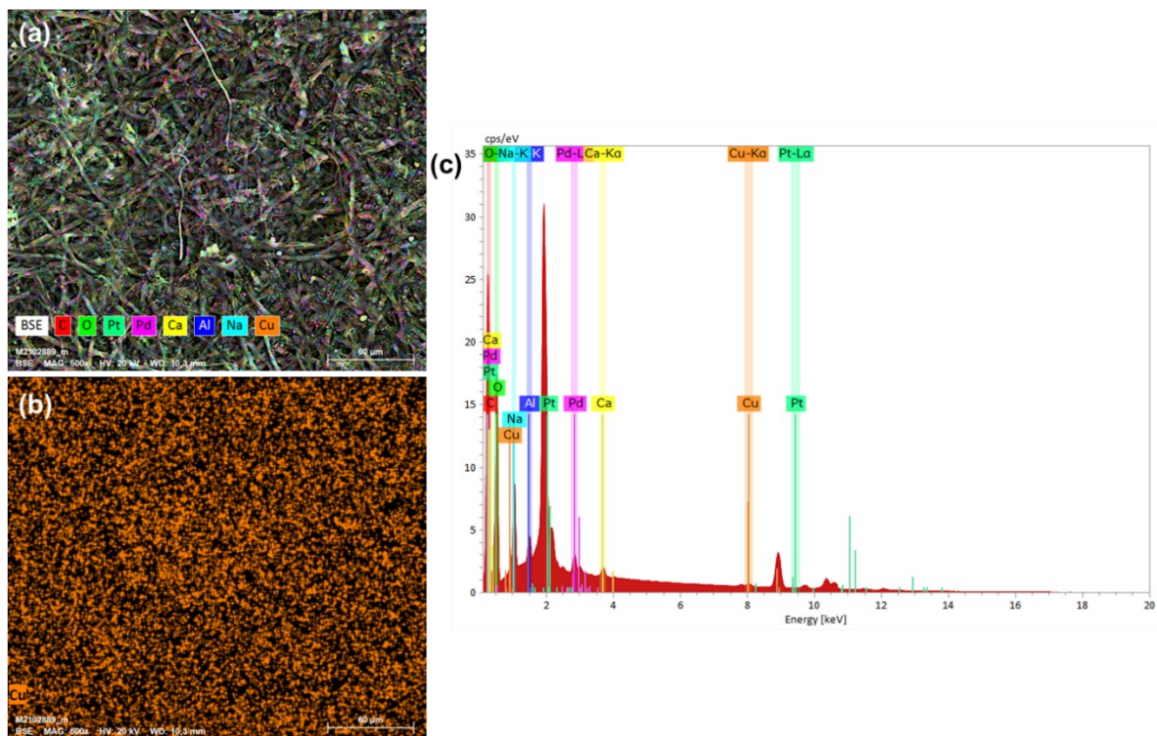


FIGURA 40 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *S. racemosum* após bioacumulação de Cu(II) (500x, 20kV).

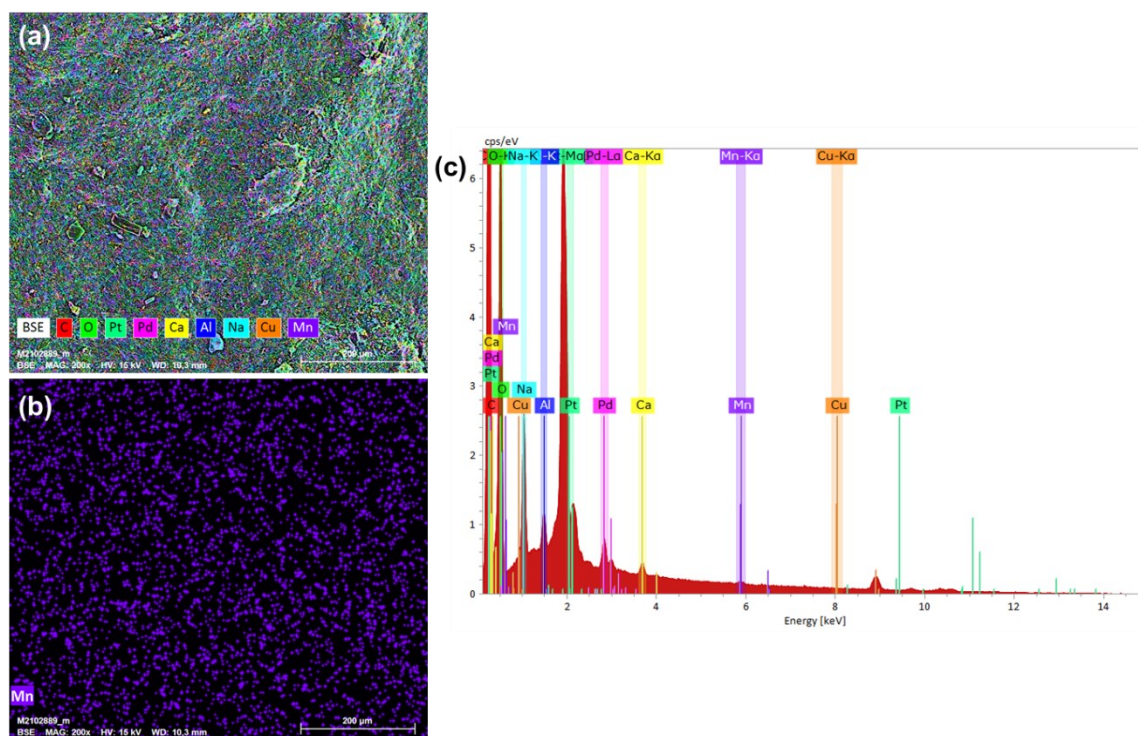


FIGURA 41 – Mapa químico (a-b) e espectro de impressão digital (c) obtidos por MEV-EDS para biomassa de *S. racemosum* após bioacumulação de Mn(II) (200x, 15kV).

4.3 Biotransformação de compostos orgânicos

4.3.1 Biotransformação do ibuprofeno

O composto (+/-)-ibuprofeno (**18**) (Figura 2, p. 32) [ácido 2-(4-isobutilfenil)propanoico, registro CAS 15687-27-1, fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$, massa molecular 206,28 u] foi utilizado como substrato de biotransformação por *A. niger* e *S. racemosum*, em experimentos aplicando-se variações no meio e no tempo de contato.

O ibuprofeno consiste em um sólido branco, de ponto de fusão determinado 67-69 °C (fabricante: 77-78 °C). O espectro de RMN de 1H da amostra solubilizada em $CDCl_3$ (Figura 42, p. 93) apresentou um duplete com integral correspondente a seis átomos de hidrogênio em δ_H 0,91 ppm, e um duplete com integral correspondente a três átomos de hidrogênio em δ_H 1,51 ppm, referentes aos grupos metílicos CH_3 -12/ CH_3 -13 e CH_3 -8, respectivamente. Observou-se um duplete com integral correspondente a dois átomos de hidrogênio em δ_H 2,46 ppm, referente a um grupo metilênico (CH_2 -10). Em relação aos sinais com integral correspondente a um átomo de hidrogênio, observaram-se um multiplete em δ_H 1,87 ppm (CH -11) e um quarteto em δ_H 3,72 ppm (CH -7). Na região do espectro correspondente a átomos de hidrogênio aromáticos, observaram-se dois dupletos em δ_H 7,11 e 7,23 ppm, referentes, respectivamente, aos átomos de hidrogênio quimicamente equivalentes, CH -3/ CH -5 e CH -2/ CH -6. Perfil semelhante foi observado a partir das análises feitas por Marco-Urrea e colaboradores (2009). Os dados obtidos experimentalmente e os da literatura são apresentados na Tabela 6 (p. 93).

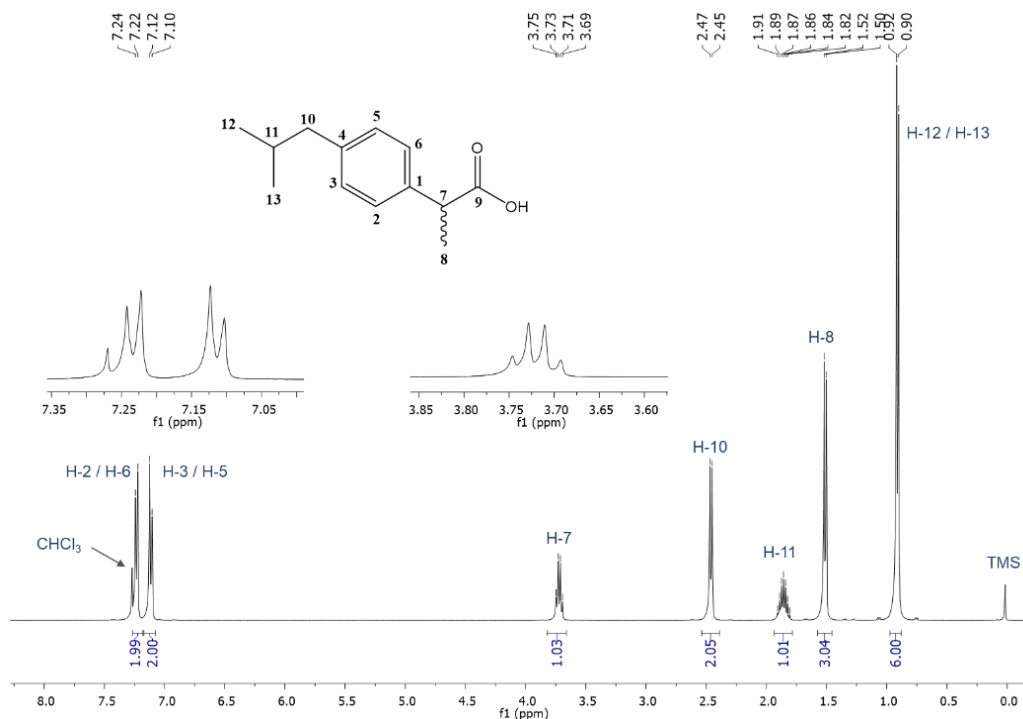
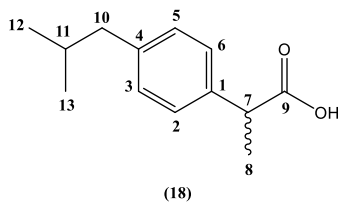


FIGURA 42 – Espectro de RMN de ^1H do ibuprofeno (400 MHz, CDCl_3).

Tabela 6 – Dados espectroscópicos de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) obtidos para o ibuprofeno, e deslocamentos químicos de hidrogênio (500 MHz, CD_3OD) e carbono (125 MHz, CD_3OD) apresentados por Marco-Urrea *et al.* (2009).

nº	Hidrogênio	δ ^1H ppm (int., mult., J)	δ ^1H ppm (literatura)	δ ^{13}C ppm (literatura)
1	-	-	-	139,5
2/6	Aromático	7,23 (2H, d, 8 Hz)	7,21	128,0
3/5	Aromático	7,11 (2H, d, 8 Hz)	7,10	129,8
4	-	-	-	141,6
7	Metínico	3,72 (1H, m)	3,67	45,7
8	Metílico	1,51 (3H, d, 8 Hz)	1,43	18,9
9	-	-	-	178,3
10	Metilênico	2,46 (2H, d, 8 Hz)	2,45	45,6
11	Metínico	1,87 (1H, m)	1,84	30,9
12/13	Metílico	0,91 (6H, d, 8 Hz)	0,89	22,4



4.3.1.1 Triagem inicial

Os extratos dos caldos em meio aquoso (EA) e dos micélios (EM), obtidos após 6 dias de contato entre as espécies fúngicas com ibuprofeno $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solução aquosa, conforme descrito no item 3.3.3.1 (p. 51-53), foram analisados por RMN de ^1H . Os espectros obtidos para os EA obtidos a partir dos experimentos com *A. niger*, *P. janthinellum* e *S. racemosum* são observados na Figura 43 (p. 95).

Foram observadas para o EA de *S. racemosum* (Figura 43.c, p. 95) modificações do perfil de RMN de ^1H em relação ao espectro do ibuprofeno (Figura 42, p. 93). Estas modificações consistiram em um novo sinal sobreposto em 3,73 ppm; alterações nos valores de deslocamento químico dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio aromático (quatro dupletos na região entre 7,10 e 7,28 ppm), átomos de hidrogênio metilênico em 2,76 ppm (2H, s) e átomos de hidrogênio metílico a 1,24 ppm (6H, s); e o aumento do valor da integral do duplete em δ_{H} 1,51 ppm, referente aos átomos de hidrogênio metílicos CH_3 -8, para seis átomos de hidrogênio. Estes sinais, de alta intensidade, indicam uma mistura de produtos, evidenciando *S. racemosum* como agente de transformação química promissor da molécula de ibuprofeno. Para o EA de *P. janthinellum* (Figura 43.b, p. 95), modificações do perfil de RMN de ^1H em relação ao ibuprofeno não foram observadas, mostrando que este fungo foi incapaz de metabolizar este substrato nas condições empregadas. O EA de *A. niger* (Figura 43.a, p. 95) indicou uma ação moderada do fungo, com base em alguns novos sinais de baixa intensidade observados no espectro. Desta forma, *S. racemosum* e *A. niger* foram selecionados para dar continuidade aos experimentos.

Os espectros obtidos para os EM apresentaram perfil semelhante, não havendo indícios da presença de produtos de biotransformação e nem do próprio substrato aderidos aos mesmos, conforme exemplificado no espectro EM de *S. racemosum* mostrado na Figura 44 (p. 96).

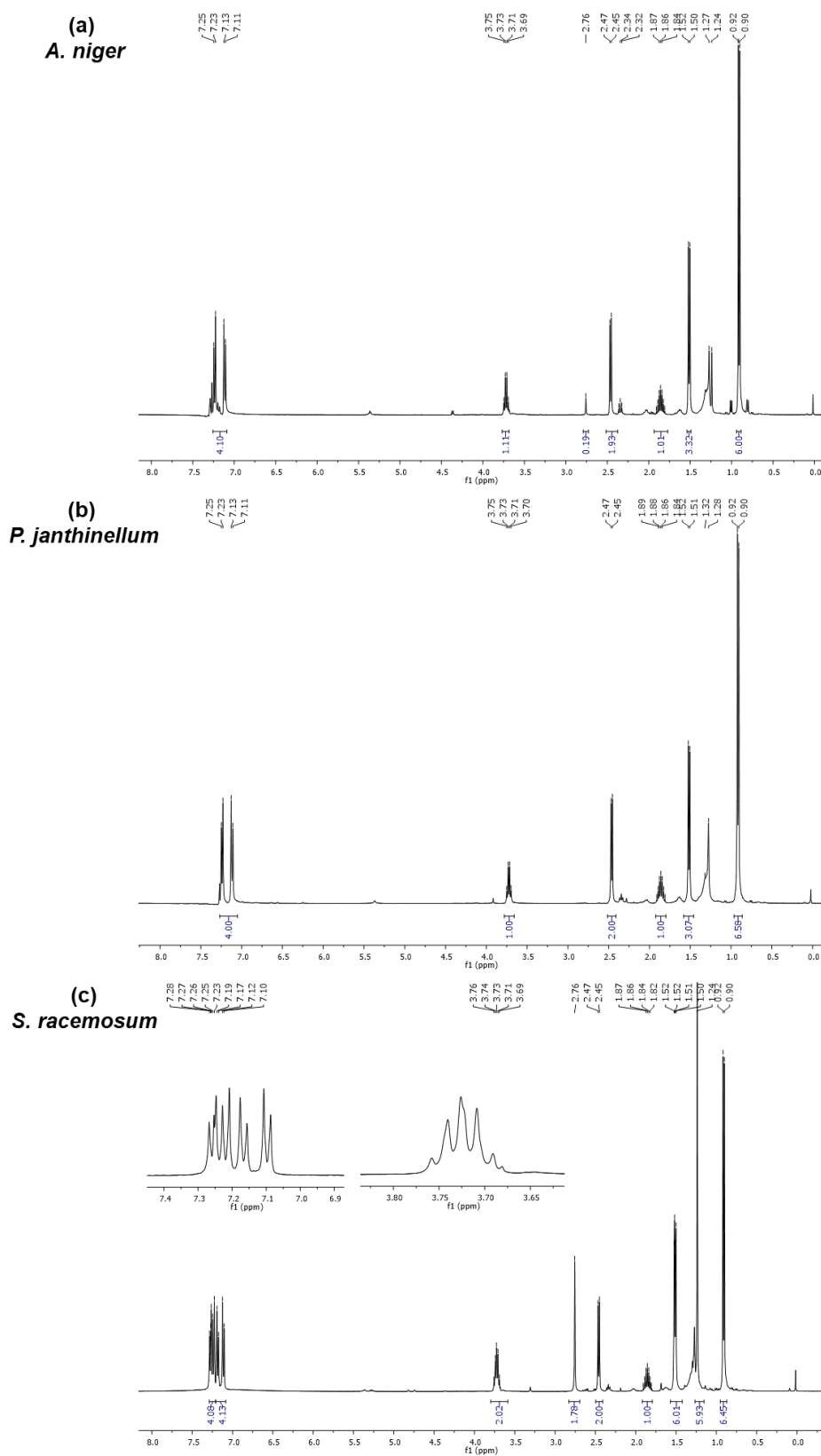


FIGURA 43 – Espectro de RMN de ^1H do extrato (EA) obtido após contato de (a) *A. niger*, (b) *P. janthinellum* e (c) *S. racemosum* com ibuprofeno por 6 dias em meio aquoso (400 MHz, CDCl_3).

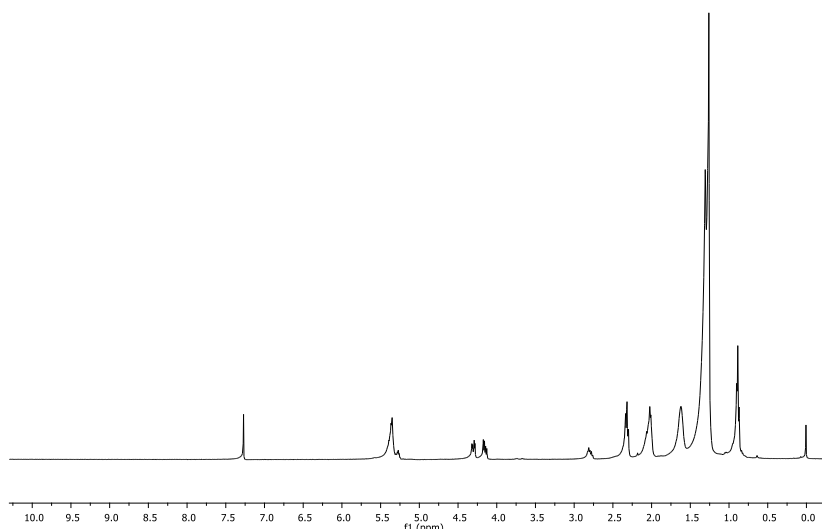


FIGURA 44 – Espectro de RMN de ^1H do extrato do micélio (EM) obtido após contato de *S. racemosum* com ibuprofeno por 6 dias em meio aquoso (400 MHz, CDCl_3) – perfil semelhante foi obtido para os micélios das outras espécies fúngicas utilizadas.

4.3.1.1.1 Avaliação da taxa de recuperação do ibuprofeno pós extração

Foi realizada uma extração com acetato de etila, semelhantemente à extração feita nos experimentos anteriores, com 200 mL de meio de cultura PDB puro (I) e 200 mL do meio de cultura com ibuprofeno (II), sem a presença dos fungos. A massa do extrato (I) foi de 45,23 mg enquanto o do extrato (II) foi de 56,49 mg, uma diferença de 11,26 mg. O espectro de RMN de ^1H do extrato indicou a presença do ibuprofeno e, considerando que a quantidade de ibuprofeno adicionada por frasco foi de 10 mg, tem-se um bom indício de que ele tenha sido completamente recuperado no processo de extração. Desta forma, novos experimentos foram propostos não apenas em meio aquoso, mas também em caldo batata (PDB), mantendo o acetato de etila como solvente extrator.

4.3.1.2 Biotransformação de ibuprofeno por *A. niger* e *S. racemosum*

A partir dos resultados obtidos na triagem inicial (item 4.3.1.1, p. 94-96) foram variadas condições nos experimentos, referentes ao tempo de contato biomassa-substrato, de 6 para 10 dias, e o meio de reação, meio aquoso e em caldo PDB. Após os experimentos, houve a separação dos micélios das soluções, por meio de filtração a vácuo, e extração de todos, uma vez que o ibuprofeno e seus produtos poderiam se encontrar tanto aderidos à

biomassa quanto solubilizados no meio. A eficiência de cada processo foi avaliada a partir da comparação dos espectros de RMN de ^1H para os diferentes extratos produzidos. Novamente, os espectros obtidos para os EM apresentaram perfis semelhantes, sem apresentar indícios da presença dos compostos de interesse. As evidências observadas a partir dos espectros obtidos para os extratos aquosos (EA) e dos caldos (EC) são apresentadas a seguir.

O espectro de RMN de ^1H dos extratos obtidos pelo contato *A. niger* - ibuprofeno por 10 dias são observados na Figura 45 (p. 98). No espectro referente ao EA (Figura 45.a, p. 98), foram observadas as mesmas modificações detectadas com 6 dias de experimento (Figura 43.a, p. 95) em relação ao ibuprofeno, mas com maior intensidade, indicando maior quantidade de um possível produto de biotransformação, mas ainda em uma mistura com ibuprofeno. No espectro referente ao EC (Figura 45.b p. 98), apesar de se apresentar mais poluído, devido a extração de outros componentes do meio de cultura, não são observados os sinais referentes apenas ao ibuprofeno, destacados na Figura 45.a (p. 98), indicando uma completa biotransformação deste substrato. Este extrato foi submetido a separação por coluna cromatográfica, conforme descrito no item 3.3.3.2.1 (p. 54-55), levando ao isolamento do composto denominado **ibu-01**.

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos pelo contato *S. racemosum*-ibuprofeno por 10 dias são apresentados na Figura 46 (p. 99). No espectro referente ao EA (Figura 46.a, p. 99), foram observadas as mesmas modificações detectadas com 6 dias de experimento (Figura 43.c, p. 95) em relação ao ibuprofeno. Entretanto, os novos sinais apresentaram-se com maior intensidade e, por meio das integrais de cada sinal, pode-se inferir que a mistura de compostos se apresentava na proporção produto de biotransformação-ibuprofeno [1:0,5]. No espectro referente ao EC (Figura 46.b, p. 99), os sinais referentes ao ibuprofeno, destacados na Figura 46.a (p. 99), não estão presentes, podendo-se deduzir a presença de um produto de biotransformação em quantidade considerável. A não observação do simpleto sobreposto ao quarteto em aproximadamente 3,73 ppm, presente nos espectros EA de *S. racemosum* e de EA e EC de *A. niger*, sugeriu a produção de um composto diferente de **ibu-01**. Desta forma, EC foi produzido em escala maior e, tendo sido observada reprodutibilidade, foi submetido à separação por coluna cromatográfica, conforme descrito no item 3.3.3.3.1 (p. 60), levando ao isolamento do composto denominado **ibu-02**.

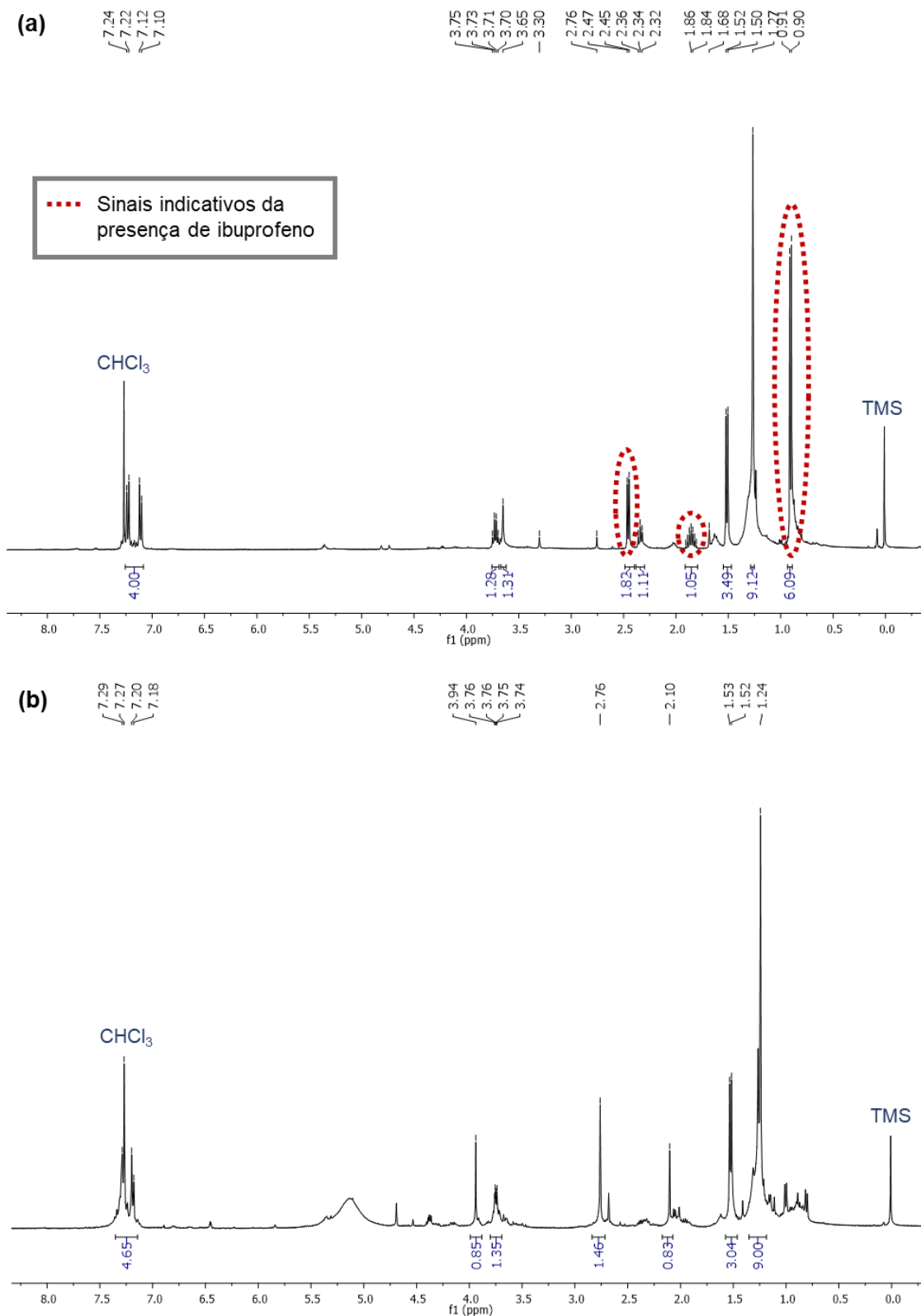


FIGURA 45 – Espectro de RMN de ¹H dos extratos obtidos após 10 dias de contato de *A. niger* com ibuprofeno (a) em meio aquoso (EA) e (b) em meio PDB (EC) (400 MHz, CDCl₃).

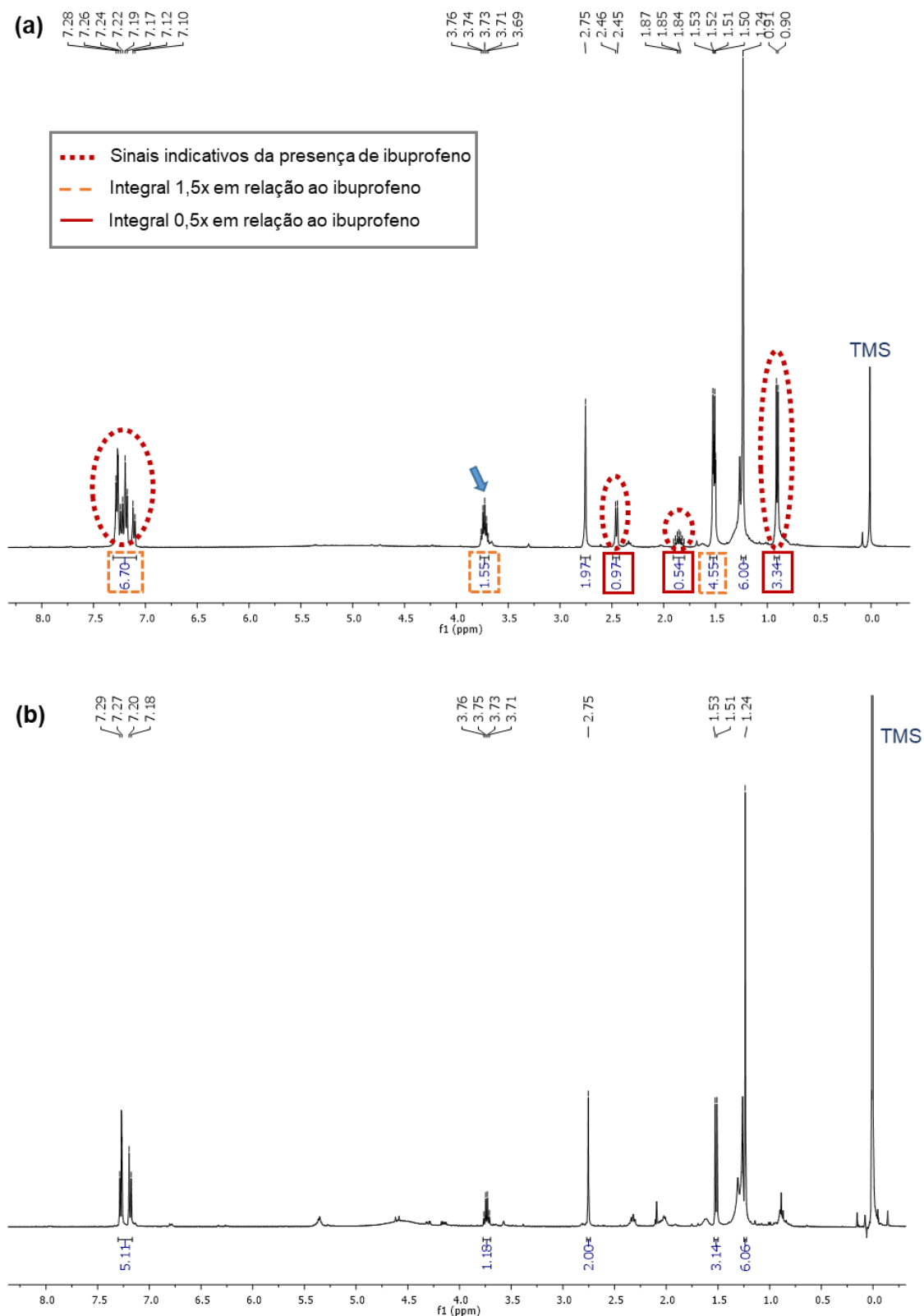


FIGURA 46 – Espectro de RMN de ^1H dos extratos obtidos após 10 dias de contato de *S. racemosum* com ibuprofeno (a) em meio aquoso (EA) e (b) em meio PDB (EC) (400 MHz, CDCl_3). A seta em (a) indica um simpleto não observado em (b).

Foram realizados experimentos utilizando o modulador epigenético cloridrato de hidralazina, em contato com *S. racemosum* e ibuprofeno por 10 dias em meio PDB, visando a expressão de novas rotas biossintéticas e elicitação de novos compostos. Os extratos obtidos com a adição do modulador, tanto na concentração de 100 μM quanto 500 μM (Apêndice V, p. 171), apresentaram perfil de RMN de ^1H semelhante ao apresentado pelo EC de *S. racemosum*. Desta forma, infere-se que sua presença não induziu a produção de outros compostos, como também não interferiu no processo.

4.3.1.3 Caracterização dos produtos de biotransformação do ibuprofeno

A identificação estrutural dos produtos de biotransformação isolados **ibu-01** e **ibu-02** foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT 135) e bidimensionais (HSQC e HMBC).

4.3.1.3.1 Caracterização do composto ibu-01

O composto **ibu-01**, um sólido branco obtido a partir da coluna cromatográfica do extrato resultante do contato de *A. niger* com ibuprofeno por 10 dias em agitação em meio PDB, mostrou-se solúvel em clorofórmio. Com base na análise dos dados obtidos por meio das técnicas espectroscópicas e espectrométrica utilizadas, sua estrutura química foi atribuída ao composto **(40)** (Figura 47).

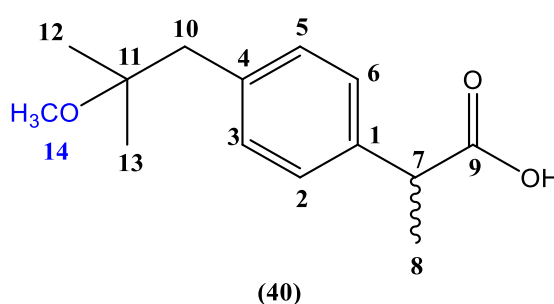


FIGURA 47 – Estrutura química proposta para ibu-01.

O espectro de RMN de ^1H para este composto (Figura 48.b, p. 102) apresentou mudanças em relação ao espectro do ibuprofeno (Figura 48.a, p. 102) que são relatadas a seguir. A não observação do multiplete em δ_{H} 1,87 ppm, assim como a mudança da multiplicidade dos sinais correspondente aos átomos de hidrogênio metilênicos CH_2 -10 e aos átomos metílicos CH_3 -12 e CH_3 -13, de dupletos para simpletos, indicaram a ausência do átomo de hidrogênio na posição 11 e a inserção de um novo grupo nesta posição. O maior deslocamento químico relativo observado para os sinais correspondentes a CH_2 -10 (δ_{H} 2,75 ppm), CH_3 -12 e CH_3 -13 (δ_{H} 1,24 ppm), e dos átomos de hidrogênio aromáticos CH -2/ CH -6 (δ_{H} 7,24 ppm) e CH -3/ CH -5 (δ_{H} 7,18 ppm), indicou a possível inserção de um grupo eletronegativo que gerou uma maior desblindagem destes átomos. Isto se confirmou devido à presença de um novo sinal em δ_{H} 3,67 ppm, com integral para três átomos de hidrogênio, em uma região mais desblindada do que o usual para grupos metila, inferindo a presença de um grupo metoxila (OCH_3 -14).

Os sinais referentes a átomos de carbono ligados à hidrogênio, observados no subspectro DEPT 135 (Figura 50, p. 103), tiveram seus respectivos átomos de hidrogênio atribuídos a partir do mapa de contornos heteronuclear HSQC (Figura 51, p. 104). O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 49, p. 103) sugeriu a presença de 14 átomos de carbono, um a mais do que na molécula do ibuprofeno. O sinal em δ_{C} 71,0 ppm, não encontrado no subspectro DEPT 135 (Figura 50, p. 103), se refere possivelmente a um átomo de carbono não ligado a átomos de hidrogênio e não aromático, ligado a um átomo de oxigênio (C-11).

Em relação aos outros átomos de carbono não ligados a átomos de hidrogênio, o sinal em δ_{C} 175,4 ppm se refere ao carbono carbonílico (C-9) e os demais sinais foram atribuídos a C-4 (δ_{C} 136,8 ppm) e C-1 (δ_{C} 139,0 ppm), confirmados por correlações do mapa de contornos HMBC (Figuras 52 e 53, p. 104-105) como C-1/H-3,H-5, C-1/H-8 e C-4/H-2,H-6 em 3J ; C-1/H-7 e C-4/H-10 em 2J . Correlações não esperadas foram observadas no HMBC (Figura 53, p. 105) para os átomos aromáticos C-3,C-5/H-3,H-5 e C-2,C-6/H-2,H-6. Estas são consideradas distorções do experimento, realizado nas condições padrões do equipamento, devido a constantes de acoplamento de longa distância. Estes sinais não correspondem a sítios modificados durante a biotransformação e não comprometem a caracterização estrutural do composto.

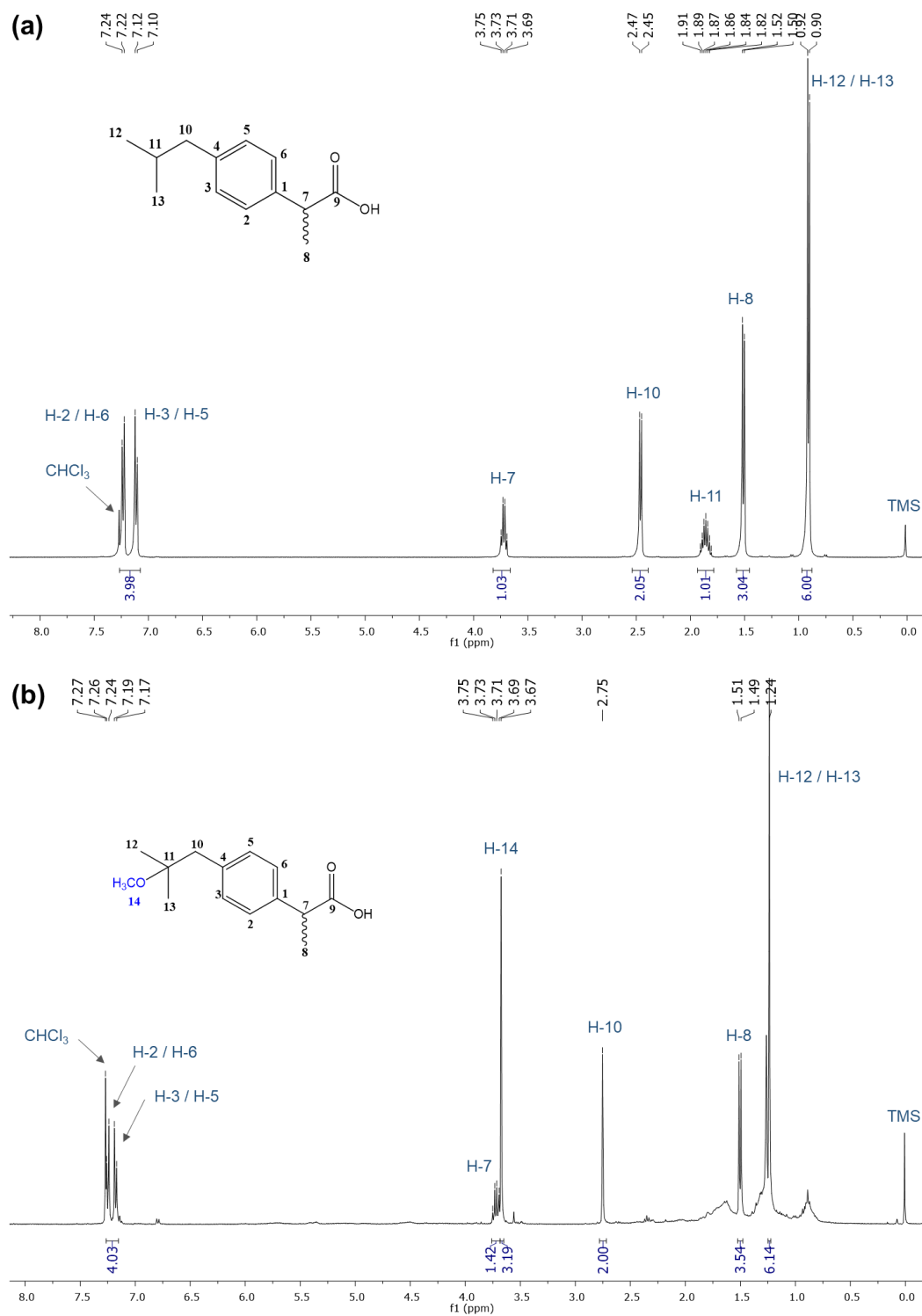


FIGURA 48 – Espectros de RMN de ¹H do (a) ibuprofeno e do (b) produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl₃).

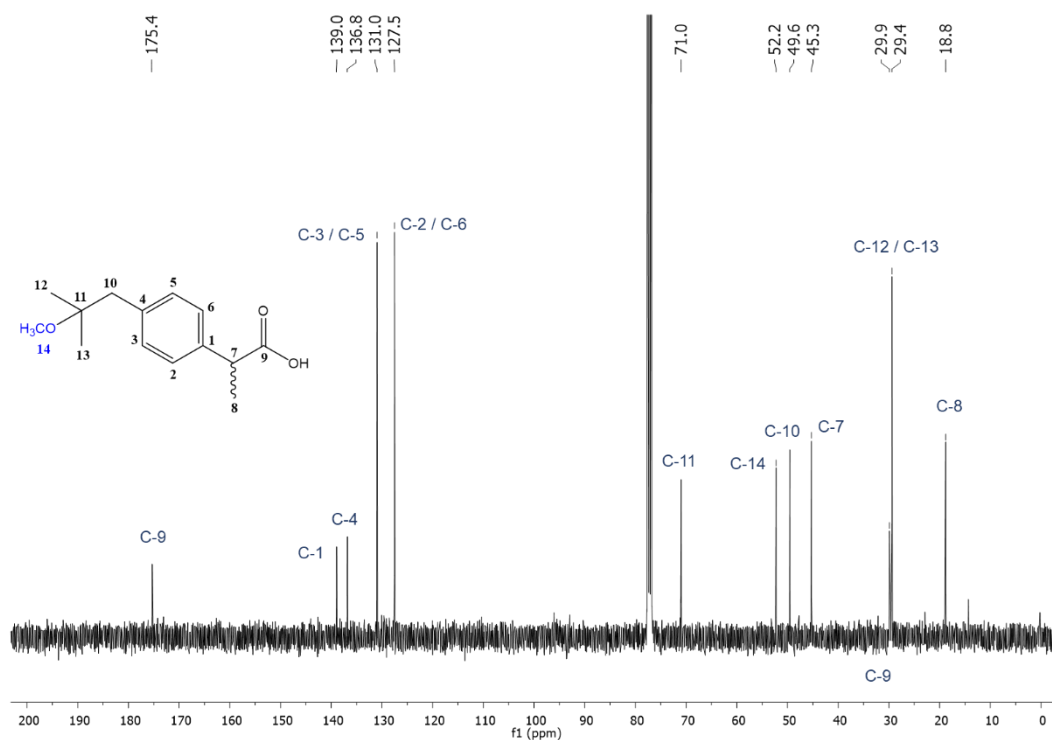


FIGURA 49 – Espectro de RMN de ¹³C do produto de biotransformação ibu-01 (100 MHz, CDCl₃).

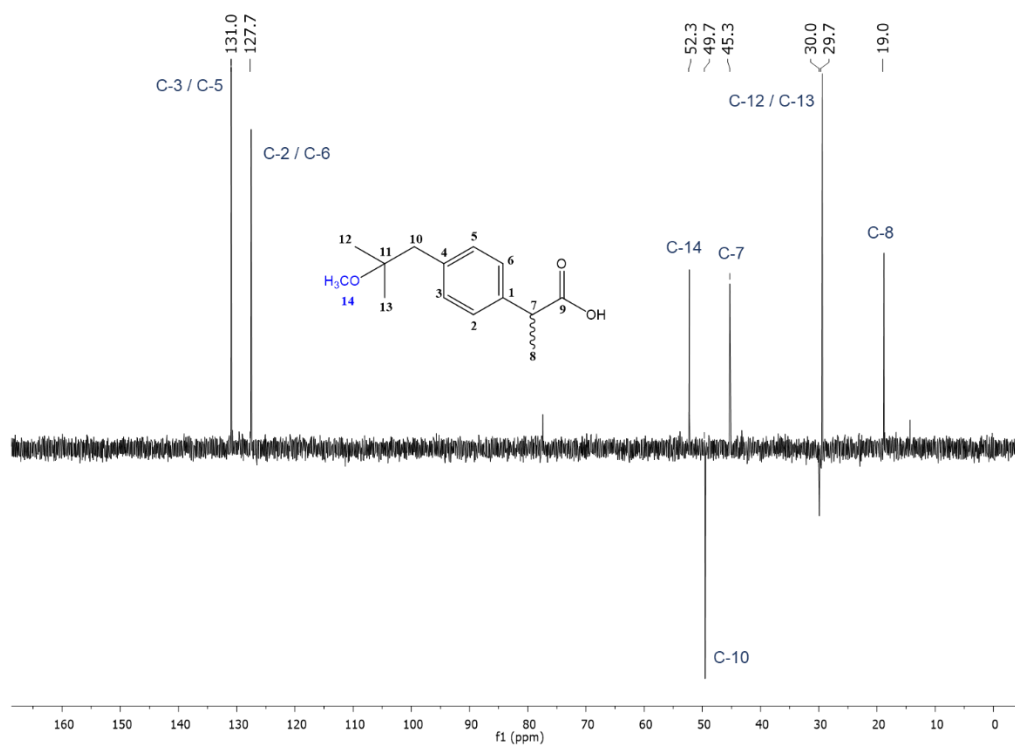


FIGURA 50 – Subespectro DEPT 135 do produto de biotransformação ibu-01 (100 MHz, CDCl₃).

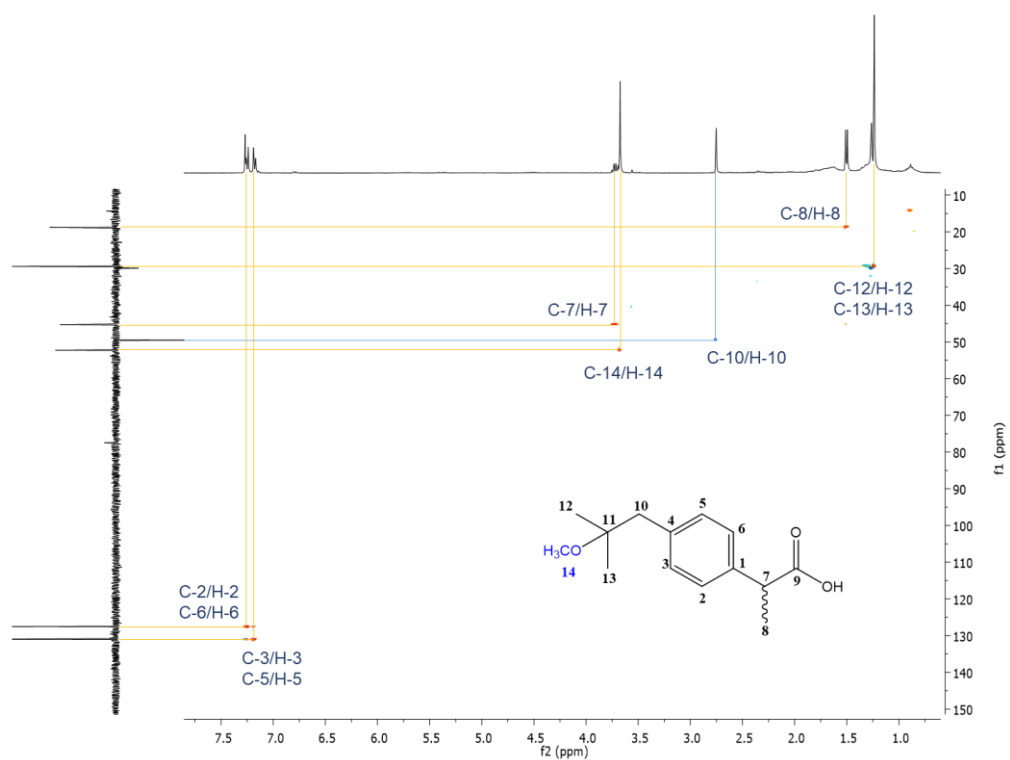


FIGURA 51 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl_3).

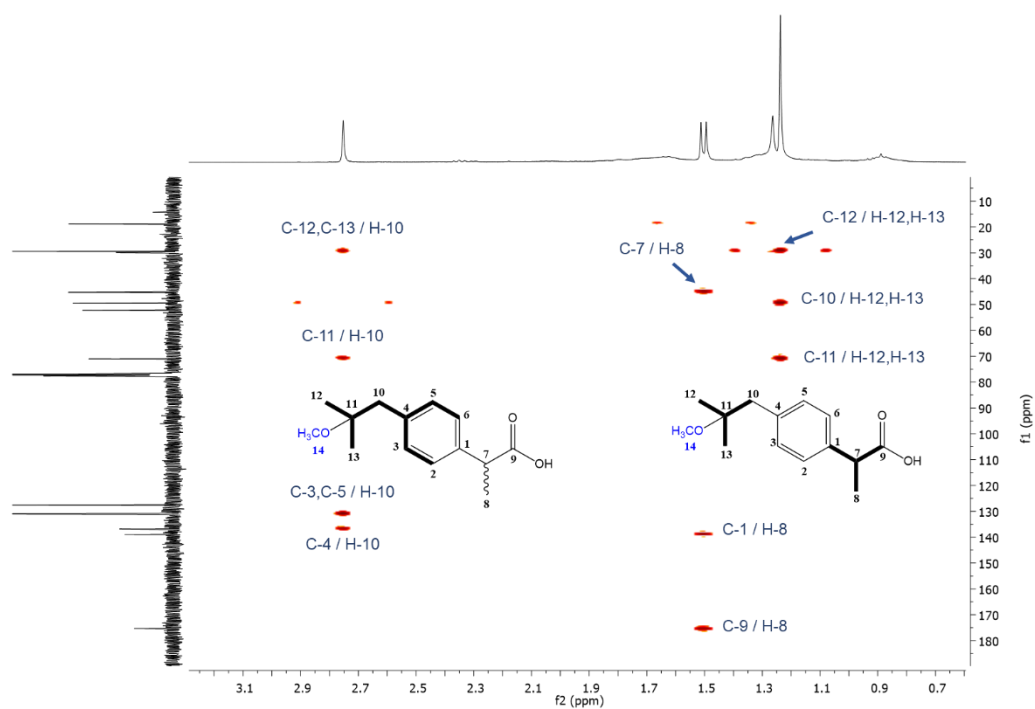


FIGURA 52 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl_3) – região de 0,7 a 3,1 ppm.

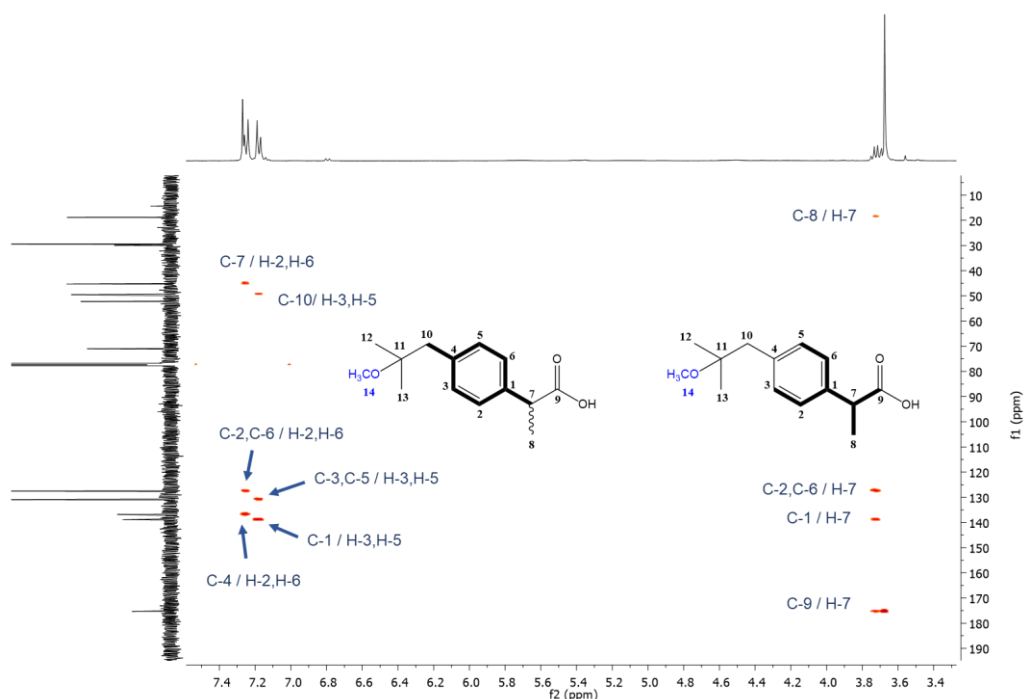


FIGURA 53 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação ibu-01 (400 MHz, CDCl₃) – região de 3,4 a 7,4 ppm.

O espectro de massas (ESI-IT-MS, modo positivo) apresentou pico do íon da espécie molecular, $[M+Na]^+$, em m/z 259,08 (Figura 54), permitindo a confirmação da fórmula molecular do composto como C₁₄H₂₀O₃, de massa exata 236,14 u (acrescido a 22,99 u (Na) = 259,13 u).

ibu 01 50a1000 (+)#2-24 RT: 0.02-0.37 AV: 23 NL: 8.27E3
T: ITMS + p NSI Full ms [50.00-1000.00]

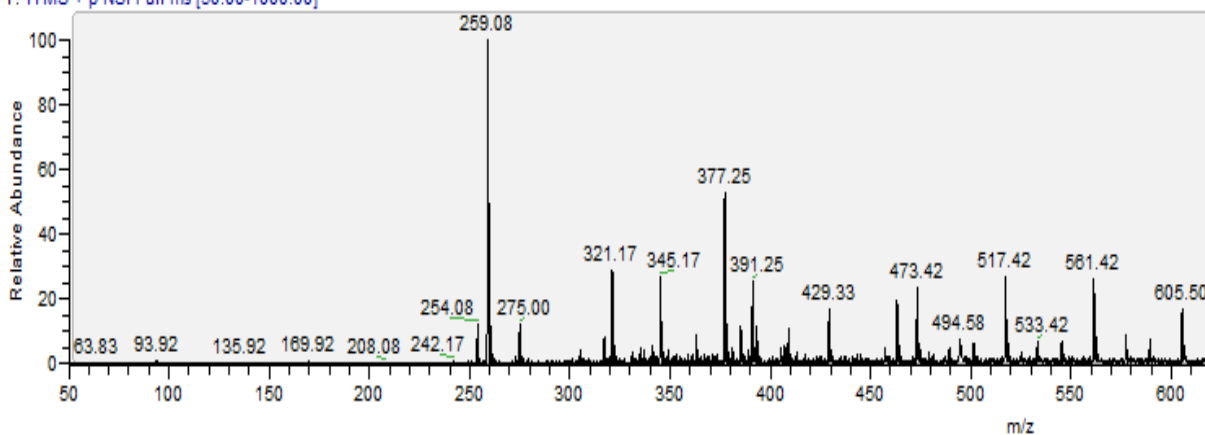


FIGURA 54 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo positivo, para o composto ibu-01.

Os dados obtidos nas análises dos espectros de RMN do produto de biotransformação isolado **ibu-01** são apresentados na Tabela 7. A partir destes dados pode-se inferir que o composto em questão se trata do ácido 4-(2-metoxi-2-metilpropil)- α -metilbenzenoacético, não sendo de conhecimento seu isolamento como produto de transformação do ibuprofeno – não foi encontrado em trabalhos nas bases de dados SciFinder e Scopus.

TABELA 7 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl₃) do produto de biotransformação ibu-01

n°	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ ppm (int., mult., J)	HMBC			$\delta^1\text{H}$ ppm (int., mult., J) ibuprofeno
				² J	³ J	⁴ J	
1	C	139,0	-	-	-	-	-
2/6	CH	127,5	7,25 (2H, d, 8 Hz)	-	C-4; C-7	-	7,23 (2H, d, 8 Hz)
3/5	CH	131,0	7,18 (2H, d, 8 Hz)	-	C-1; C-10	-	7,11 (2H, d, 8 Hz)
4	C	136,8	-	-	-	-	-
7	CH	45,3	3,72 (1H, m)	C-1; C-8; C-9	-	C-3/C-5	3,72 (1H, m)
8	CH ₃	18,8	1,50 (3H, d, 8 Hz)	C-7	C-1; C-9	-	1,51 (3H, d, 8 Hz)
9	COOH	175,4	-	-	-	-	-
10	CH ₂	49,6	2,75 (2H, s)	C-4, C-11	C-12/C-13	C-2/C-6	2,46 (2H, d, 8 Hz)
11	C	71,0	-	-	-	-	1,87 (1H, m)
12/ 13	CH ₃	29,4	1,24 (6H, s)	C-11	C-10; C-12; C-13	-	0,91 (6H, d, 8 Hz)
14	OCH ₃	52,2	3,67 (3H, s)	-	-	-	-

4.3.1.3.2 Caracterização do composto *ibu-02*

O composto **ibu-02**, um sólido branco de ponto de fusão 108-110 °C, obtido a partir da coluna cromatográfica do extrato resultante da reação de *S. racemosum* com ibuprofeno por 10 dias em agitação em meio PDB, mostrou-se parcialmente solúvel em clorofórmio e solúvel em metanol. Com base na análise dos dados obtidos por meio das técnicas espectroscópicas e espectrométrica utilizadas, sua estrutura química foi atribuída ao composto **(20)** (Figura 2, p. 32), novamente apresentada na Figura 55.

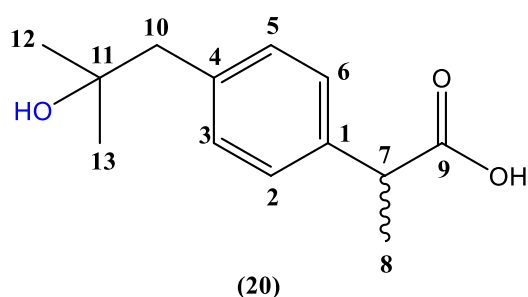


FIGURA 55 – Estrutura química proposta para *ibu-02*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 56.b, p. 108) apresentou mudanças em relação ao espectro do ibuprofeno (Figura 56.a, p. 108) semelhantes as relatadas para **ibu-01**, com exceção do simpleto referente ao grupo metoxila. Adicionalmente, um sinal alargado foi observado em δ_{H} 3,72 ppm, com integral para um átomo de hidrogênio. Este sinal não apresenta correlação com nenhum átomo de carbono no mapa de contornos heteronuclear HSQC (Figura 58, p. 109), o que sugere se tratar de um átomo de hidrogênio hidroxílico. A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57, p. 109) sugeriu a presença de 13 átomos de carbono, sendo que o sinal referente ao átomo de carbono metoxílico de **ibu-01** não foi observado. As correlações do mapa de contornos HMBC (Figura 59, p. 110) são iguais às apresentadas para **ibu-01** (Figuras 52 e 53, p. 104-105), assim como a multiplicidade dos sinais de RMN de ^1H , evidências da adição do grupo hidroxila em **ibu-02** na mesma posição da metoxila em **ibu-01**, ligado a C-11.

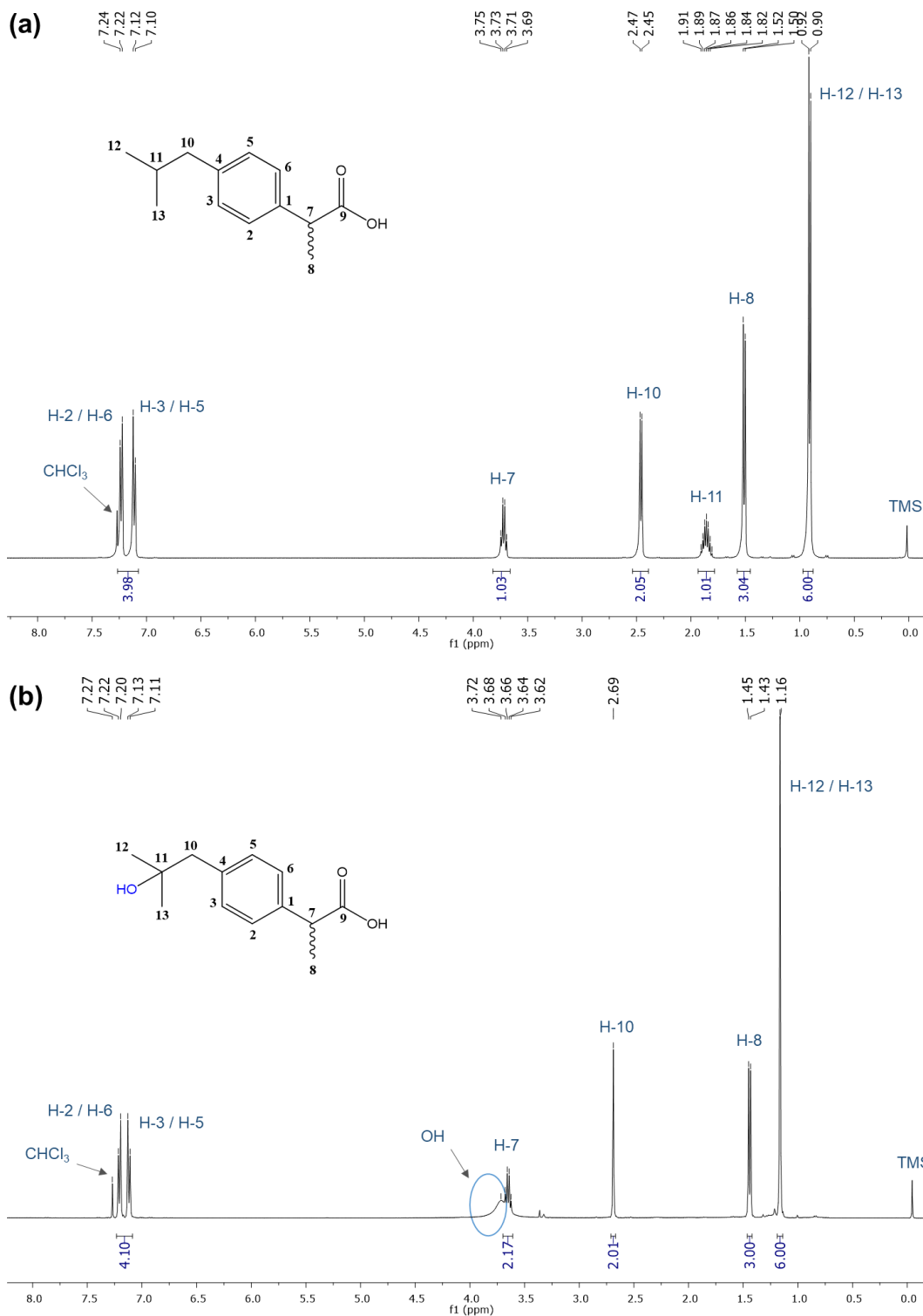


FIGURA 56 – Espectros de RMN de ¹H do (a) ibuprofeno (400 MHz, CDCl₃) e do (b) produto de biotransformação ibu-02 (400 MHz, CDCl₃ + gotas de CD₃OD).

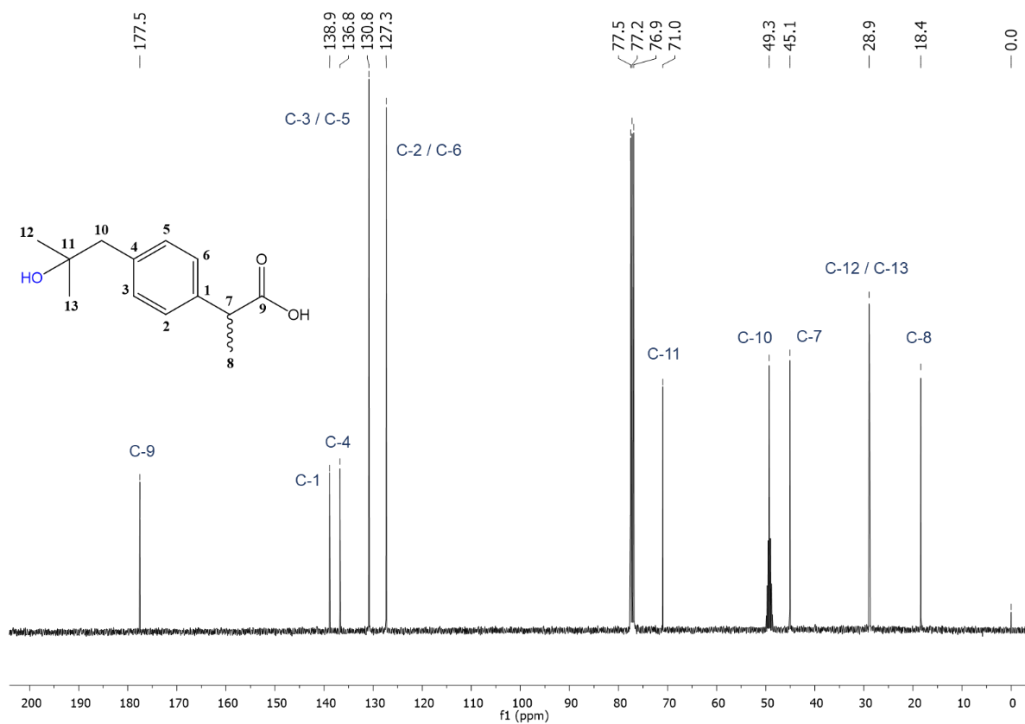


FIGURA 57 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação ibu-02 (100 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).

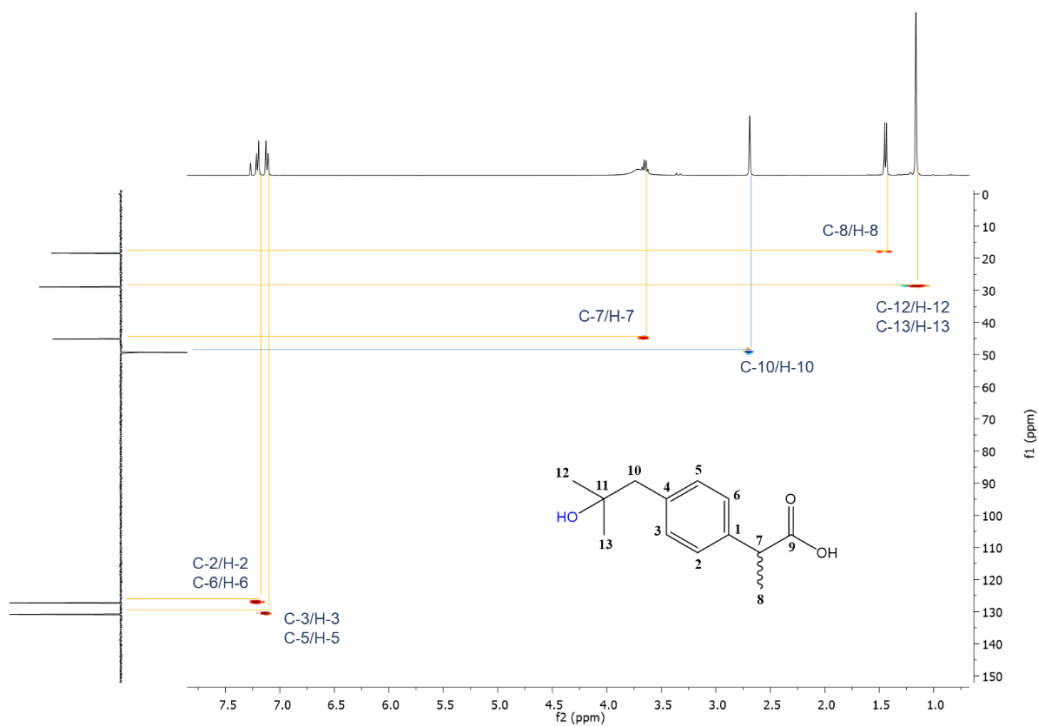


FIGURA 58 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação ibu-02 (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).

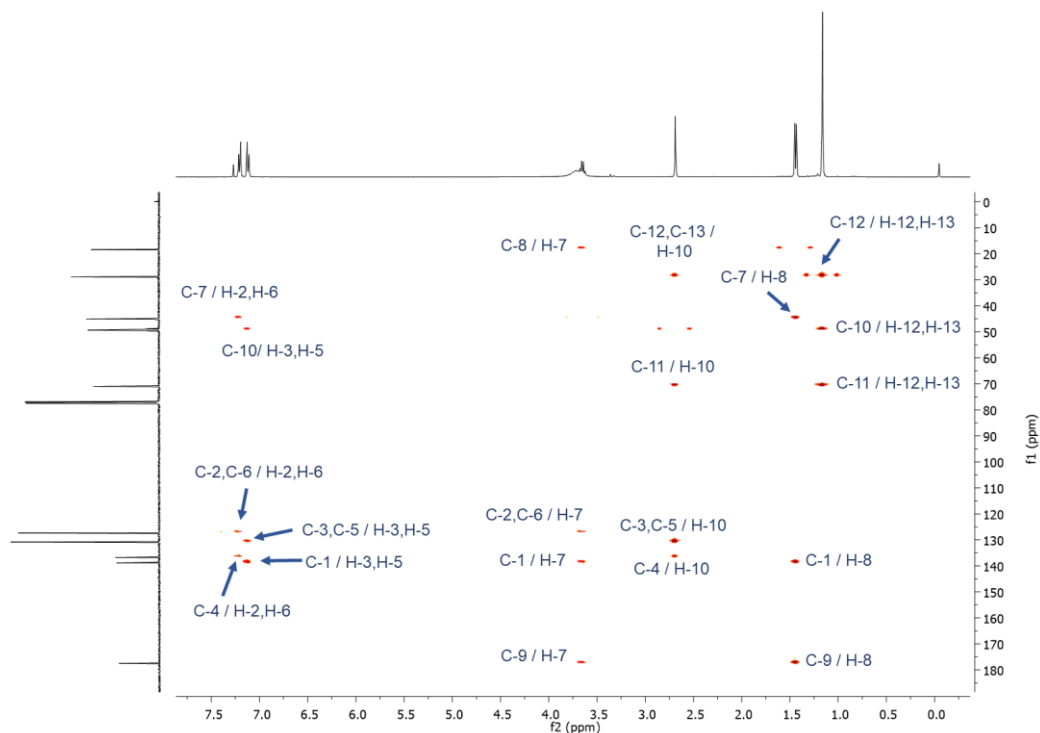


FIGURA 59 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação ibu-02 (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).

O espectro de massas (ESI-IT-MS, modo negativo) apresentou pico do íon da espécie molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 221,00 e $2[\text{M}-\text{H}]^-$ em m/z 442,92 (Figura 60), permitindo a confirmação da fórmula molecular do composto como $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$, de massa exata 222,13 u.

ibu 02 50a1000 (-) #1-25 RT: 0.00-0.33 AV: 25 NL: 1.61E4
T: ITMS - p NSI Full ms [50.00-1000.00]

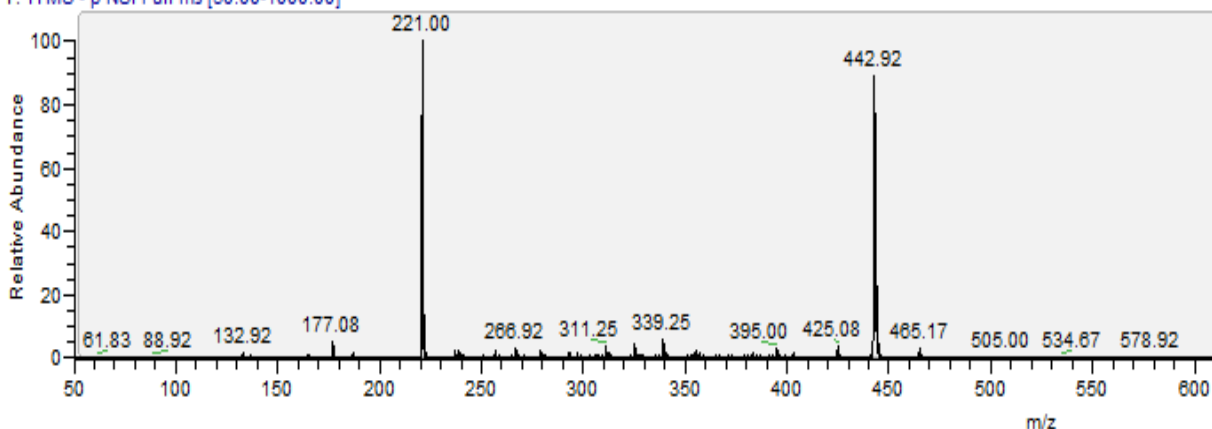


FIGURA 60 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto ibu-02.

Os dados de RMN do produto de biotransformação isolado **ibu-02**, obtidos experimentalmente e da literatura, são apresentados na Tabela 8. A partir destes dados pode-se inferir que o composto em questão se trata do ácido 4-(2-hidroxi-2-metilpropil)- α -metilbenzenoacético (registro CAS 51146-55-5), também conhecido como 2-hidroxi-ibuprofeno (2-OH-IBU).

TABELA 8 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl₃ + gotas de CD₃OD, 400MHz) do produto de biotransformação ibu-02

nº	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ ppm (int., mult., J)	HMBC			$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) *	$\delta^1\text{H}$ ppm (mult., J) *
				² J	³ J	⁴ J		
1	C	138,9	-	-	-	-	139,5	-
2/6	CH	127,3	7,21 (2H, d, 8 Hz)	-	C-4; C-7	-	128,0	7,23 (d, 8,2 Hz)
3/5	CH	130,8	7,12 (2H, d, 8 Hz)	-	C-1; C-10	-	131,8	7,18 (d, 8,2 Hz)
4	C	136,8	-	-	-	-	138,8	-
7	CH	45,1	3,65 (1H, m)	C-1; C-8; C-9	-	C-3/C-5	45,7	3,74 (q, 7,2 Hz)
8	CH ₃	18,4	1,44 (3H, d, 8 Hz)	C-7	C-1; C-9	-	18,9	1,44 (d, 7,2 Hz)
9	COOH	177,5	-	-	-	-	177,2	-
10	CH ₂	49,3	2,69 (2H, s)	C-4, C-11	C-12/C-13	C-2/C-6	50,0	2,73 (s)
11	C	71,0	-	-	-	-	71,3	-
12/ 13	CH ₃	28,9	1,16 (6H, s)	C-11	C-12; C-13	-	28,9	1,16 (s)
-	OH	-	3,72 (1H, sl)	-	-	-	-	-

* Referência: MARCO-URREA *et al.*, 2009. Experimento realizado em CD₃OD, 500MHz

Este composto é um metabólito do ibuprofeno frequentemente encontrado em águas residuais e outras matrizes aquosas, embora estudos tenham demonstrado que o carboxiibuprofeno (**21**) (Figura 2, p. 32) é o metabólito do ibuprofeno mais excretado pelos humanos (PAÍGA *et al.*, 2015). Malvar *et al.* (2019) detectaram 2-OH-IBU (**ibu-02**) em amostras de águas residuais brutas no sul da Espanha, níveis entre 2,68 e 4,92 $\mu\text{g L}^{-1}$. Também na Espanha, Ferrando-Climent *et al.* (2012) estudaram os metabólitos de ibuprofeno presentes em plantas de tratamento de águas residuais, detectando as concentrações

máximas de 2-OH-IBU (**ibu-02**) de 93,98, 5,87 e 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, entre amostras de afluentes, efluentes e rios, respectivamente. Ibuprofeno e 2-OH-IBU (**ibu-02**) foram detectados em amostras de águas do Oceano Atlântico coletadas em diferentes pontos da costa portuguesa (PAÍGA *et al.*, 2015). Na investigação de efluentes de águas residuais hospitalares no Canadá, concentrações de até 69,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2-OH-IBU (**ibu-02**) foram encontradas, nível maior do que o detectado para o próprio ibuprofeno (19,60 $\mu\text{g L}^{-1}$) (OUARDA *et al.*, 2019). Isto está de acordo com o que foi sugerido a partir do acompanhamento do caminho de degradação de ibuprofeno pela bactéria *Bacillus thuringiensis* B1, que indicou o 2-OH-IBU (**ibu-02**) como um intermediário chave na etapa determinante da velocidade do processo, uma vez que a concentração máxima deste composto foi detectada quando o substrato inicial não foi mais detectado (48 h) (MARCHLEWICZ *et al.*, 2017). Com relação a outros processos de biotransformação, o 2-OH-IBU (**ibu-02**) foi obtido com o rendimento de 90% a partir de oxifuncionalização de ibuprofeno (1 g L^{-1}) biocatalisada pelo fungo filamentosso *Mucor hiemalis* (KLENK *et al.*, 2019). *T. versicolor* apresentou uma ação quase imediata de degradação do ibuprofeno, com a conversão para o 2-OH-IBU (**ibu-02**) em 68% nos primeiros 60 minutos de reação e 84% após 150 minutos (MARCO-URREA *et al.*, 2009).

Estudos têm focado na determinação da concentração de ibuprofeno e 2-OH-IBU (**ibu-02**) nos tecidos e órgãos de espécies após exposições prolongadas induzidas, e avaliação de como estas substâncias podem acelerar o estresse oxidativo, como nos peixes *Danio rerio* (SÁNCHEZ-ACEVES *et al.*, 2021) e *Cyprinus carpio* (ISLAS-FLORES *et al.*, 2014). Métodos também são desenvolvidos para a determinação das concentrações destes compostos em produtos disponíveis nos mercados, como no caso do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (MALVAR *et al.*, 2022). Embora muita investigação ainda seja necessária para avaliar os efeitos dessas substâncias nos organismos, a avaliação da ecotoxicidade de 2-OH-IBU (**ibu-02**) sob organismos de ambientes aquáticos realizada por Grabarczyk *et al.* (2020) demonstrou que o mesmo é muito menos tóxico que seu composto parental, o ibuprofeno, que neste estudo foi classificado como um composto prejudicial a todos os organismos aquáticos testados ($\text{EC}_{50} = 10\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$). Na Tabela 9 (p. 113) são resumidos os principais resultados obtidos neste estudo, comparando os dois compostos (GRABARCZYK *et al.*, 2020). Entretanto, o 2-OH-IBU (**ibu-02**) consta na NORMAN list como um poluente emergente.

TABELA 9 – Respostas dos ensaios ecotoxicológicos para ibuprofeno e 2-hidroxi-ibuprofeno (2-OH-IBU) realizados por Grabarczyk *et al.* (2020)

Ensaio	Concentração compostos (mg L ⁻¹)	Resposta ibuprofeno (%)	Resposta 2-OH-IBU (%)
Inibição da luminescência de <i>Vibrio fischeri</i> (bactéria marinha)	10	42	4
Imobilização de <i>Daphnia magna</i> (crustáceo)	50	52	0
Inibição de <i>Lemna minor</i> (planta)	15	54	11
Inibição de <i>Raphidocelis subcapitata</i> (microalga)	100	52	16

4.3.1.4 Biotransformação de ibuprofeno por *A. niger* em diferentes tempos de contato

A produção do extrato de *A. niger* em contato com ibuprofeno por 10 dias em escala maior não foi reprodutível, e a separação por coluna cromatográfica não levou ao **ibu-01** como esperado, e sim **ibu-02**, o mesmo composto obtido a partir da ação de *S. racemosum*. Dessa forma, um novo experimento foi proposto para verificar se com a variação de dias (6, 8, 10, 12 e 14 dias) haveria diferenças entre a produção dos dois produtos de biotransformação, conforme descrito no item 3.3.3.4 (p. 60-63).

Os extratos obtidos foram primeiramente analisados por RMN de ¹H – Figura 61 (p. 114). De forma geral, os espectros não diferiram significativamente. Nota-se para o extrato de 10 dias a presença de alguns sinais não observados nos demais, e que com 12 e 14 dias alguns sinais não são mais observados. Os sinais indicativos da presença de ibuprofeno destacados nos espectros da Figura 45 (p. 98) não foram os observados, evidenciando a biotransformação. Entretanto, não foi possível inferir com clareza quais dos compostos isolados estariam presentes em cada extrato a partir desta análise.

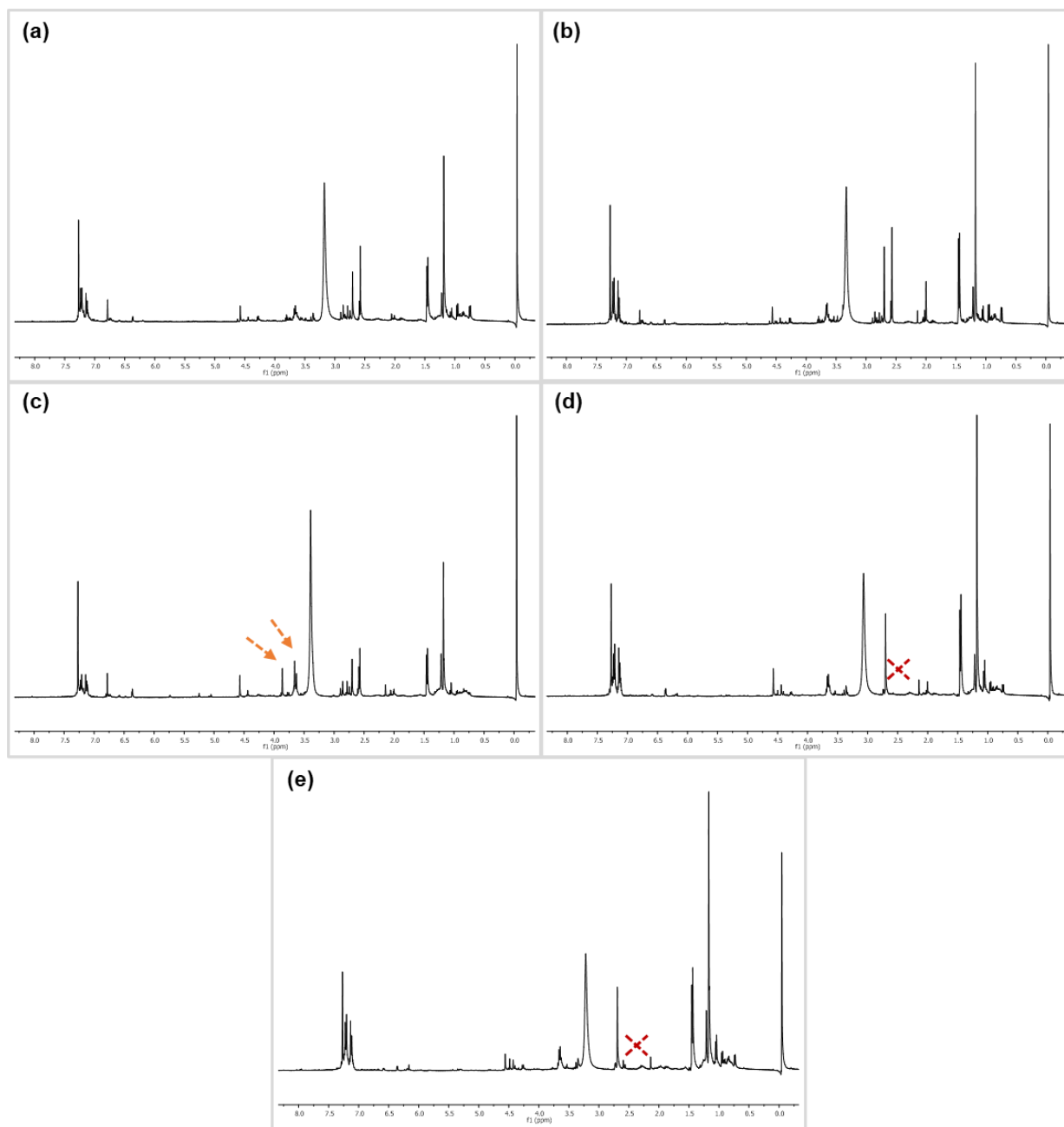


FIGURA 61 – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos extratos obtidos pelo contato de ibuprofeno com *A. niger* por (a) 6, (b) 8, (c) 10, (d) 12 e (e) 14 dias – as setas indicam sinais adicionais e o X indica regiões onde um sinal observado nos demais espectros não foi observado.

4.3.1.4.1 Análise por HPLC

Juntamente com o padrão de ibuprofeno e os compostos isolados, os extratos foram submetidos a análise por HPLC. O cromatograma obtido é mostrado na Figura 62 (p. 116). A partir da análise cromatográfica pode-se inferir que o ibuprofeno, tempo de retenção de 13,48 min, foi completamente degradado/transformado mesmo no menor período analisado, com seis dias de contato. Esta informação é coerente com o observado nos espectros de RMN de ^1H (Figura 61, p. 114).

O composto **ibu-01** foi detectado no tempo de retenção de 11,30 min. Este pico foi detectado nos extratos com 6, 8 e 12 dias de experimento em baixa intensidade. O mesmo foi observado em relação ao experimento de 10 dias utilizando metanol deuterado para solubilização do extrato. O extrato correspondente a 10 dias de experimento, em condição análoga a utilizada quando se deu seu isolamento (item 3.3.3.2.1, p. 54-55), foi o que apresentou o pico em maior intensidade relativa.

O composto **ibu-02** (isolado conforme o item 3.3.3.2.2, p. 55) aparentemente se trata de uma mistura entre **ibu-02** e **ibu-01**, o que pôde ser observado pelo limite de detecção desta técnica ser diferente da técnica de RMN. O pico correspondente ao mesmo apresentou tempo de retenção de 9,60 min, sendo detectado em grande intensidade em todos os extratos.

Os tempos de retenção nos quais ibuprofeno e demais compostos foram detectados estão coerentes com a polaridade relativa esperada em relação as suas estruturas químicas (**ibu-02** > **ibu-01** > **ibuprofeno**), uma vez que a coluna utilizada foi uma C18 de fase reversa, que tende a reter por mais tempo os compostos menos polares.

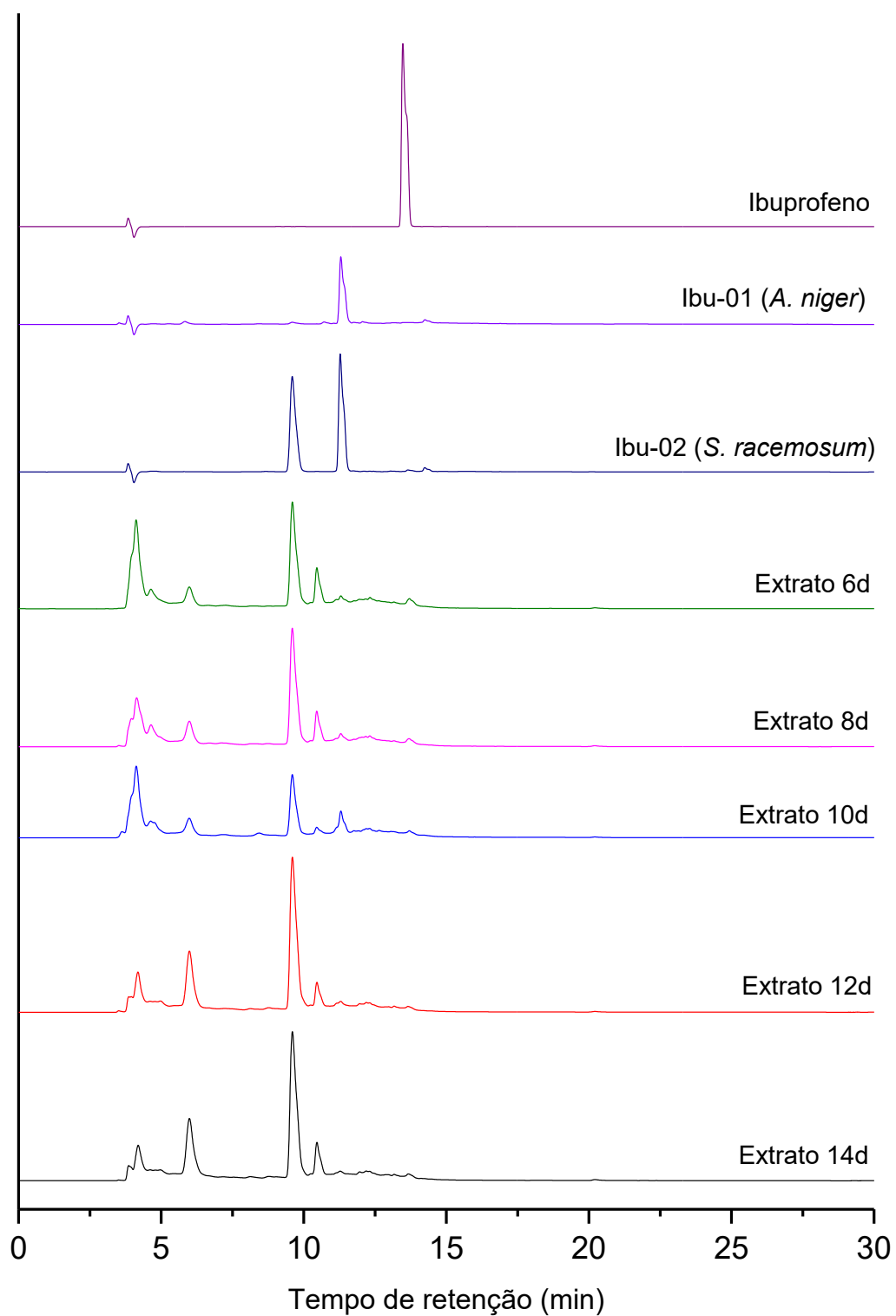


FIGURA 62 – Perfil cromatográfico do ibuprofeno, produtos de biotransformação e extratos obtidos com diferentes tempos de reação entre ibuprofeno e *A. niger* (detecção a 220 nm).

4.3.2 Biotransformação de estigmasterol

O composto estigmasterol (**22**) (Figura 3, p. 33) (3β -hidroxi-24-etil-5,22-colestadieno, registro CAS 83-48-7, fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$, massa molecular 412,69 u) foi utilizado como substrato de biotransformação por *M. plumbeus*, em experimentos com e sem a aplicação do modulador epigenético cloridrato de procaína (**41**) (Figura 64, p. 119) (cloridrato de 2-(dietilamino)etil 4-aminobenzoato, registro CAS 51-05-8, fórmula molecular $C_{13}H_{21}ClN_2O_2$, massa molecular 272,77 u).

Os espectros de RMN de 1H do estigmasterol, do controle do meio, e dos extratos dos caldos (EC) obtidos pelo contato de *M. plumbeus* e estigmasterol por 10 dias com e sem a presença do modulador epigenético cloridrato de procaína (500 μ L) são apresentados na Figura 63 (p. 118). Por meio da análise destes espectros não foram observados indícios da biotransformação do poluente emergente estigmasterol em quantidades detectáveis pela técnica. Entretanto, novos sinais intensos [assinalados com setas na Figura 63.d (p. 118)] se destacaram na análise do espectro referente ao experimento com a presença do modulador. Desta forma, este extrato foi submetido a coluna cromatográfica como descrito no item 3.3.3.3.1 (p. 60) e o composto denominado **CP-01**, um derivado da substância moduladora, foi isolado. A caracterização estrutural deste composto é descrita a seguir.

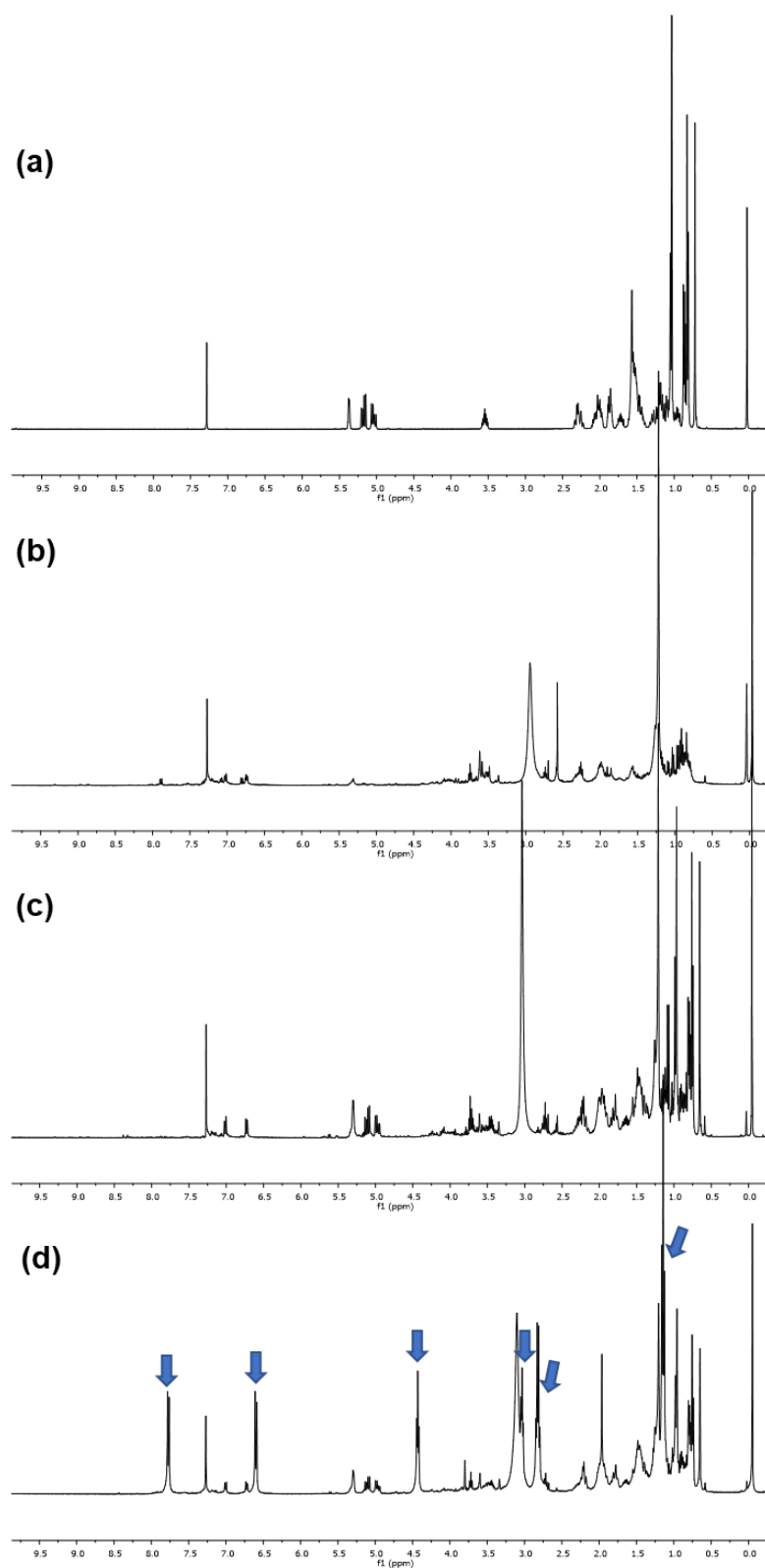


FIGURA 63 – Espectro de RMN de ^1H do (a) estigmasterol, (b) do controle do meio complexo, (c) do extrato do caldo de *M. plumbeus*-estigmasterol, e (d) do extrato do caldo de *M. plumbeus*-estigmasterol-cloridrato de procaína (400 MHz, CDCl_3) – as setas destacam sinais novos de interesse.

4.3.2.1 Caracterização do composto CP-01

O cloridrato de procaína (**41**) (Figura 64) consiste em um sólido branco, de ponto de fusão determinado 148-150 °C (fabricante: 155-156 °C). O espectro de RMN de ^1H do cloridrato de procaína (Figura 65.a, p. 120) apresentou um tripleto de alta intensidade, em δ_{H} 1,33 ppm com integral correspondente a seis átomos de hidrogênio, referentes aos grupos metílicos CH_3 -11 e CH_3 -13. Em relação aos átomos de hidrogênio metilênicos são observados em quarteto em δ_{H} 3,18 ppm (4H) correspondente a CH_2 -10 e CH_2 -12, um tripleto (2H) em δ_{H} 3,39 ppm correspondente a CH_2 -9 e em δ_{H} 4,62 ppm correspondente a CH_2 -8. Na região do espectro correspondente a átomos de hidrogênios aromáticos, observaram-se dois dupletos em δ_{H} 6,62 e 7,73 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio quimicamente equivalentes, CH_2/CH -6 e CH -3/ CH -5. O sinal alargado em 3,55 ppm refere-se aos átomos de hidrogênios da amina aromática.

O composto **CP-01** teve sua estrutura química atribuída ao composto (**42**) (Figura 64) (registro CAS 10446-04-5, fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, massa molecular 180,09 u). No espectro de RMN de ^1H (Figura 65.b, p. 120) não são observados os sinais referentes aos grupos metílicos CH_3 -11 e CH_3 -13 e grupos metilênicos CH_2 -10 e CH_2 -12 da procaína, o que também foi observado em relação aos sinais de ^{13}C apresentados no subespectros DEPT-135 apresentados na Figura 66 (p. 121). Um novo sinal alargado em δ_{H} 1,17 ppm (Figura 65.b, p. 120) sugere ainda a presença dos átomos de hidrogênio da amina alifática.

As atribuições dos sinais referentes aos átomos de carbono hidrogenados foram realizadas. Para a atribuição dos sinais dos átomos de carbono aromáticos foram utilizados cálculos de incrementos de substituintes, considerando a estrutura inicial do benzeno (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

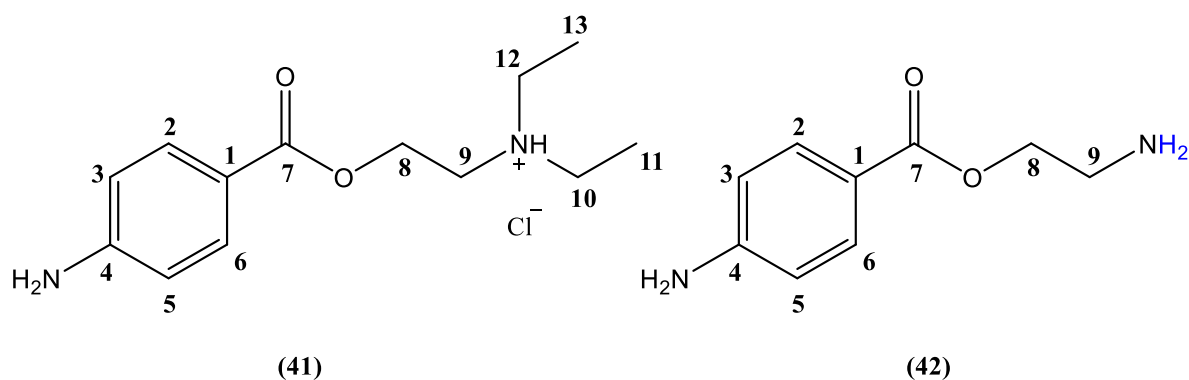
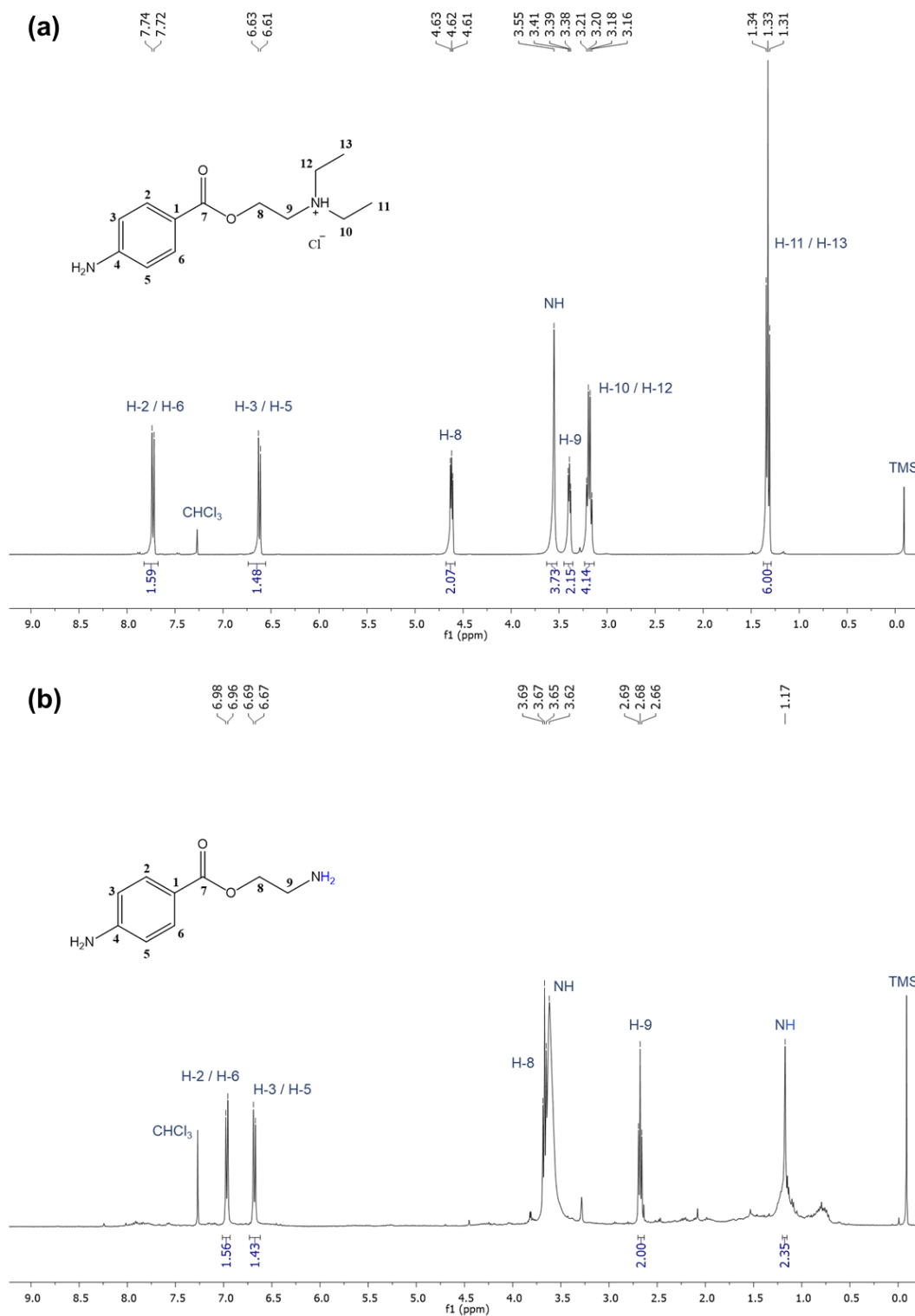


FIGURA 64 – Estrutura química do cloridrato de procaína (41) e estrutura proposta para o produto CP-01 (42).



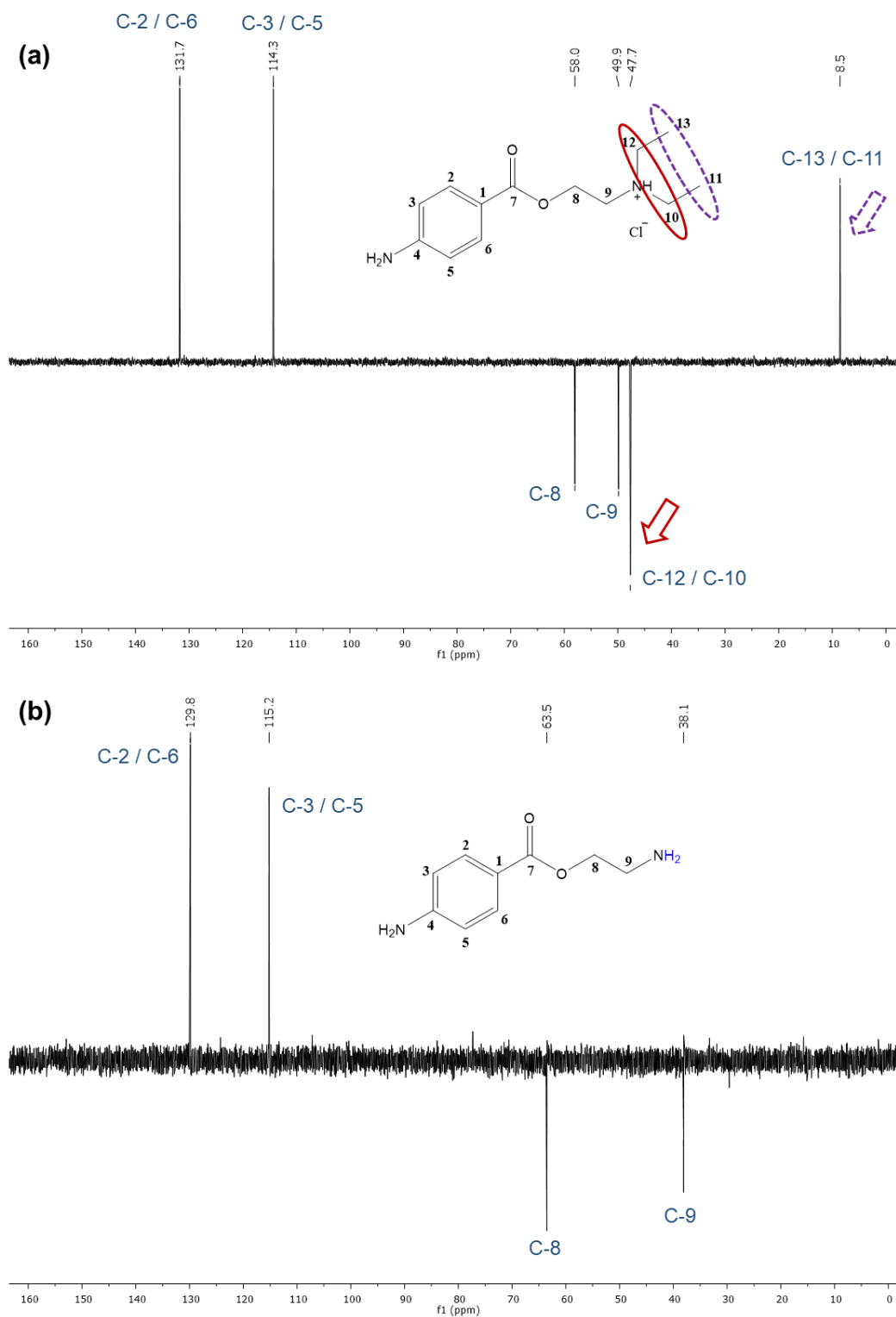


FIGURA 66 – Subspectros DEPT 135 do (a) modulador cloridrato de procaína e (b) seu derivado (CP-01) (100 MHz, CDCl_3).

4.3.3 Biotransformação de produtos naturais

O potencial de biotransformação de *A. niger*, *B. bassiana* e *S. racemosum* foi avaliado a partir de uma triagem com três produtos naturais da classe dos terpenoides: ácido traquilobânico (**32**), isosteviol (**43**) e (+)-longifoleno (**44**), cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 67.

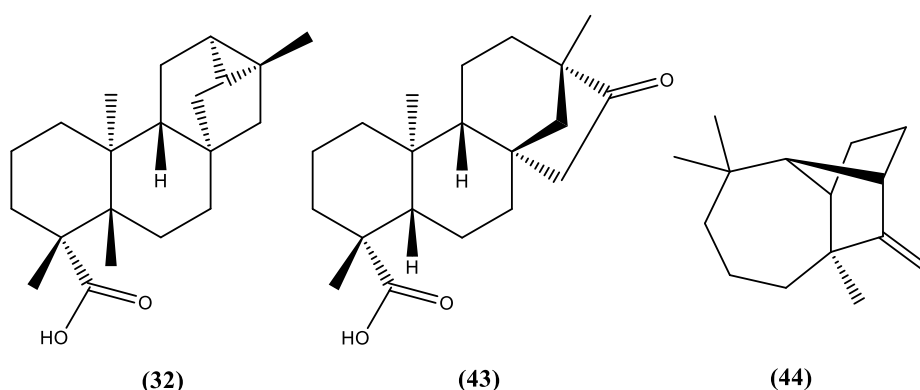


FIGURA 67 – Estruturas químicas dos produtos naturais utilizados em experimentos de biotransformação por *A. niger*, *B. bassiana* e *S. racemosum*: ácido traquilobânico (32), isosteviol (43) e (+)-longifoleno (44).

O ácido traquilobânico (**32**) (ácido traquilobano-19-óico, registro CAS 26263-39-8, fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$, massa molecular 302,5 u) consiste em um sólido branco de ponto de fusão determinado 142-144 °C [literatura: 129-130 °C (VIEIRA, 2010)]. Este diterpeno (C20) é encontrado em muitas plantas, principalmente as do gênero *Xylopi*a, como *X. aethiopica* (FETSE *et al.*, 2016), *X. nitida* (VIEIRA *et al.*, 2021) e *X. sericea* (TAKAHASHI *et al.*, 2001), e tem sido investigado juntamente com seus derivados como agentes anticolinesterásicos promissores (DOS SANTOS & TAKAHASHI, 2017; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

O isosteviol (**43**) (ácido *ent*-16-oxobeyeran-19-óico, registro CAS 27975-19-5, fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$, massa molecular 318,45 u) consiste em um sólido branco de ponto de fusão determinado 218-220 °C (comercial: 228-232 °C). É um diterpeno (C20) obtido a partir da catálise ácida do esteviosídeo, o diterpenóide glicosilado presente nas folhas de *Stevia rebaudiana* Berton. Possui propriedades adoçantes e também farmacológicas, como ações anti-inflamatórias, -hipertensivas e -microbianas (ULLAH *et al.*, 2019).

O (+)-longifoleno (**44**) (registro CAS 475-20-7, fórmula molecular $C_{15}H_{24}$, massa molecular 204,35 u), líquido a temperatura ambiente, consiste em um sesquiterpeno (C15) muito presente em espécies vegetais do gênero *Pinus*, os pinheiros (ZHANG *et al.*, 2019). Apresenta ação repelente a insetos e é investigado como um possível agente de defesa destas plantas (LIU *et al.*, 2020).

Estes produtos naturais foram incubados com as espécies fúngicas conforme metodologia descrita no item 3.3.3.4 (p. 60-63). Os extratos obtidos foram analisados por RMN de 1H (Apêndice VI, p. 172-180), tendo sido observados sinais indicativos de modificação estrutural do (+)-longifoleno por *S. racemosum*, e do ácido traquilobânico e do isosteviol por *A. niger*. Estes experimentos foram repetidos em escala aumentada e os extratos analisados por RMN de 1H . Os espectros obtidos, em comparação com aqueles dos substratos originais, são apresentados nas Figuras 68, 69 (p. 124) e 70 (p. 125).

O extrato obtido para o experimento com (+)-longifoleno e *S. racemosum* apresentou uma parte líquida, constituída por (+)-longifoleno residual, de acordo com os dados de RMN de 1H , e de uma parte sólida. A fração sólida (Figura 68.b, p. 124) foi fracionada por coluna cromatográfica, mas não foram isolados compostos. Os dados de RMN de 1H do extrato obtido para o experimento entre ácido traquilobânico e *A. niger* (Figura 69.b, p. 124) indicaram sinais novos de alta intensidade, inferindo ser promissor seu fracionamento na busca por possíveis produtos de biotransformação. Entretanto, esta etapa não foi concluída neste trabalho. Para a reação do isosteviol com *A. niger*, resultado igualmente promissor foi observado, com maior número de sinais na região de grupos metila (δ_H 0,7-1,3 ppm), que indicam mais de um composto com estrutura semelhante ao do isosteviol no extrato (Figura 70.b, p. 125). O extrato foi submetido a uma coluna cromatográfica, levando ao isolamento de três produtos de biotransformação, denominados **iso-01**, **iso-02** e **iso-03**, cujas caracterizações são descritas a seguir.

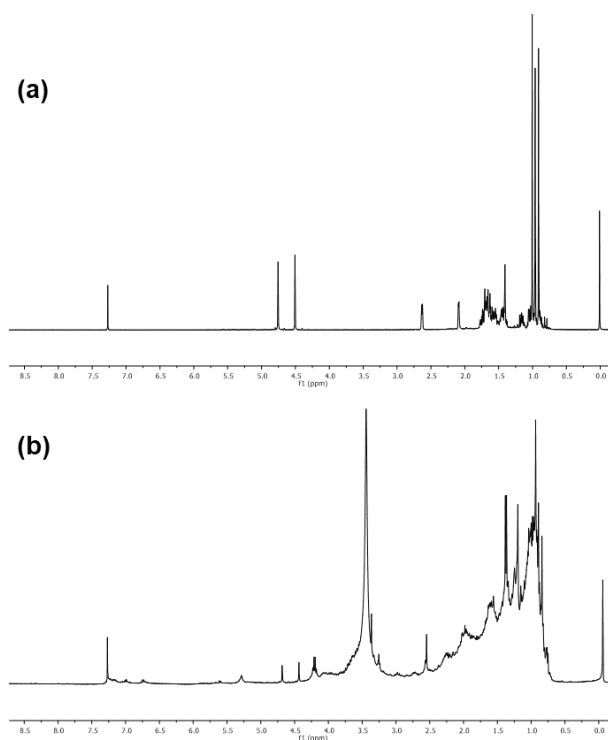


FIGURA 68 – Espectros de RMN de ^1H do (a) (+)-longifoleno (400 MHz, CDCl_3) e (b) fração sólida do extrato obtido após contato do substrato com *S. racemosum* por 10 dias em meio PDB (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).

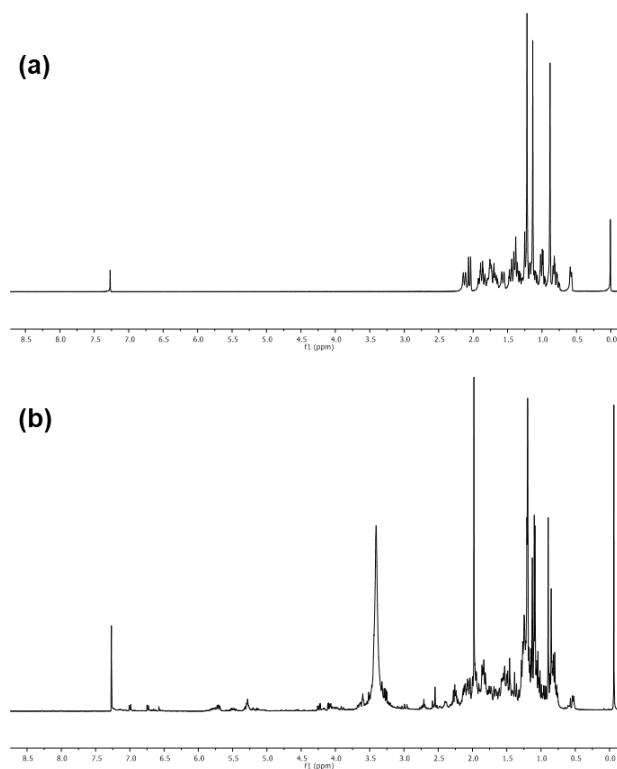


FIGURA 69 – Espectros de RMN de ^1H do (a) ácido traquilobânico (400 MHz, CDCl_3) e do (b) extrato EC obtido após contato do substrato com *A. niger* por 10 dias em meio PDB (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).

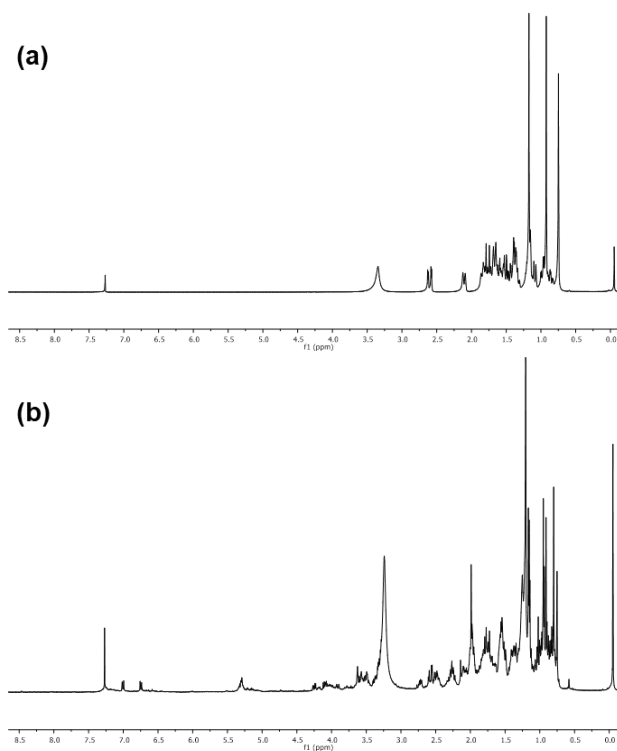


FIGURA 70 – Espectros de RMN de ^1H do (a) isosteviol (400 MHz, CDCl_3) e do (b) extrato EC obtido após contato do substrato com *A. niger* por 10 dias em meio PDB (400 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD).

4.3.3.1 Caracterização do isosteviol e seus produtos de biotransformação

O espectro de RMN de ^1H do isosteviol solubilizado em CDCl_3 é apresentado na Figura 71 (p. 126). Destacam-se os simpletos de alta intensidade com integral correspondente a três átomos de hidrogênio em δ_{H} 0,79, 0,98 e 1,25 ppm, relativos aos grupos metílicos CH_3 -20, CH_3 -17 e CH_3 -18 respectivamente, seguidos de uma região contendo muitos multipletos referentes aos átomos de hidrogênio dos nove grupos CH_2 e dois grupos CH presentes na molécula.

O subspectro DEPT 135 e espectro de RMN de ^{13}C para o isosteviol são apresentados nas Figuras 72 (p. 126) e 73 (p. 127), respectivamente. Devido à sobreposição de sinais no espectro de hidrogênio e a impossibilidade de definir as multiplicidades com exatidão, a comparação entre os sinais referentes aos átomos de carbono do substrato e dos produtos de biotransformação foram fundamentais para se iniciar a caracterização estrutural destes compostos. Os valores de deslocamento químico (δ_{C}), exibidos na Tabela 10 (p. 128), foram atribuídos para estes átomos de carbono de acordo com a literatura (HSU *et al.*, 2002)

e posteriormente confirmados a partir de análises de experimentos bidimensionais que serão apresentados a seguir para cada composto.

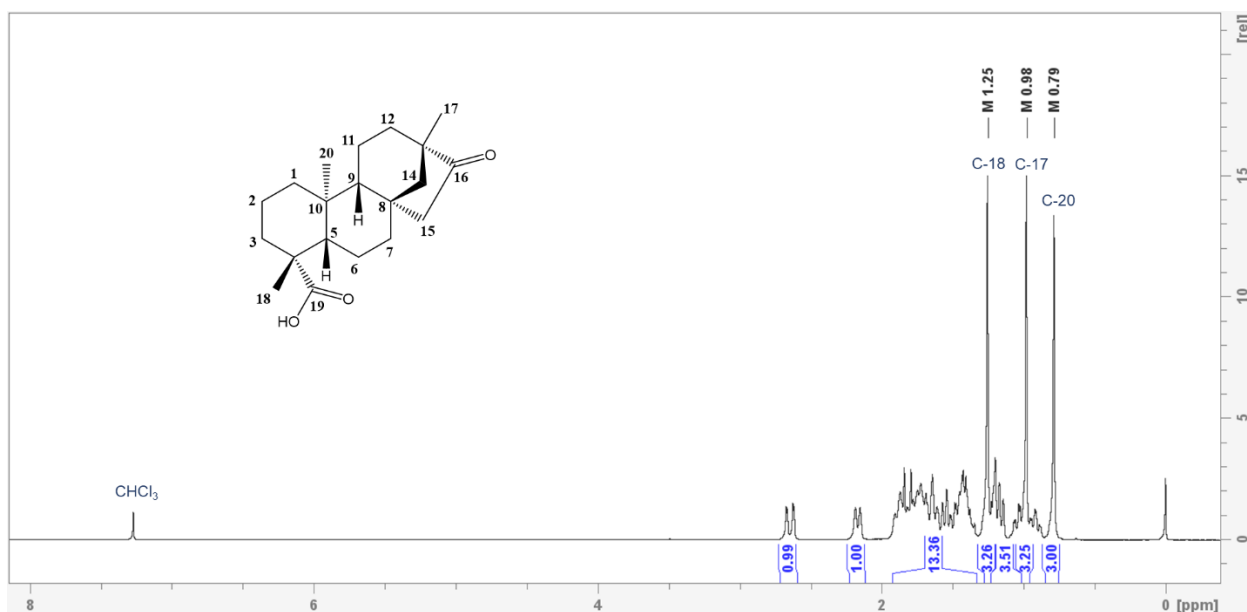


FIGURA 71 – Espectro de RMN de ^1H do isosteviol (400 MHz, CDCl_3).

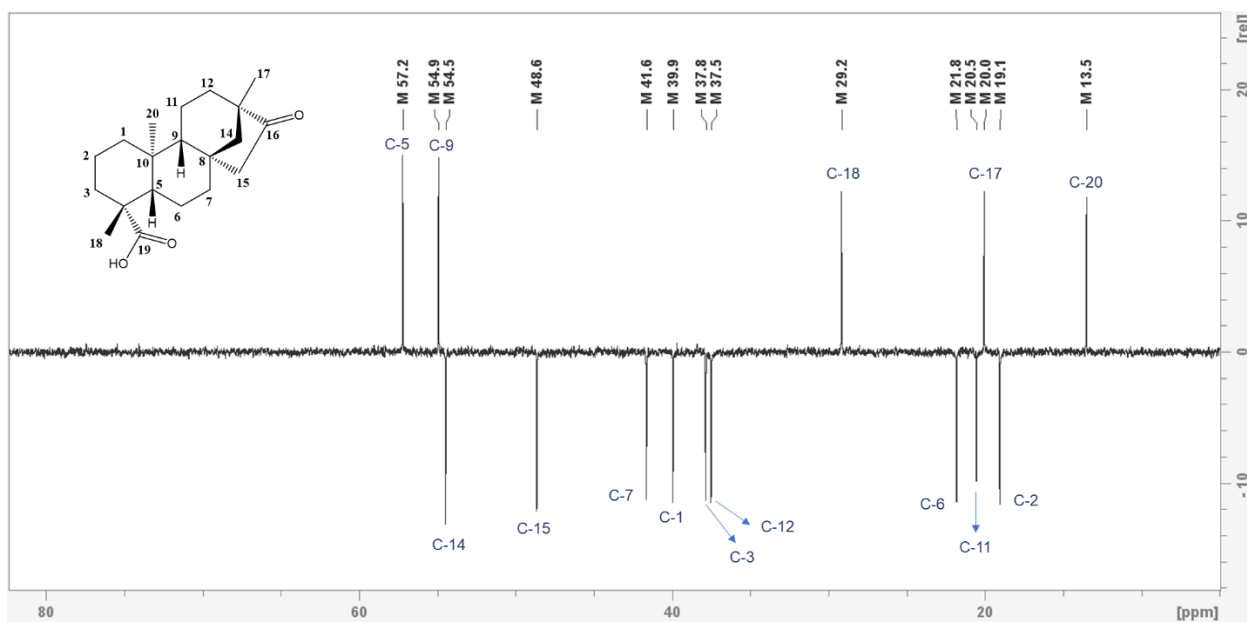


FIGURA 72 – Subspectro DEPT 135 do isosteviol (100 MHz, CDCl_3).

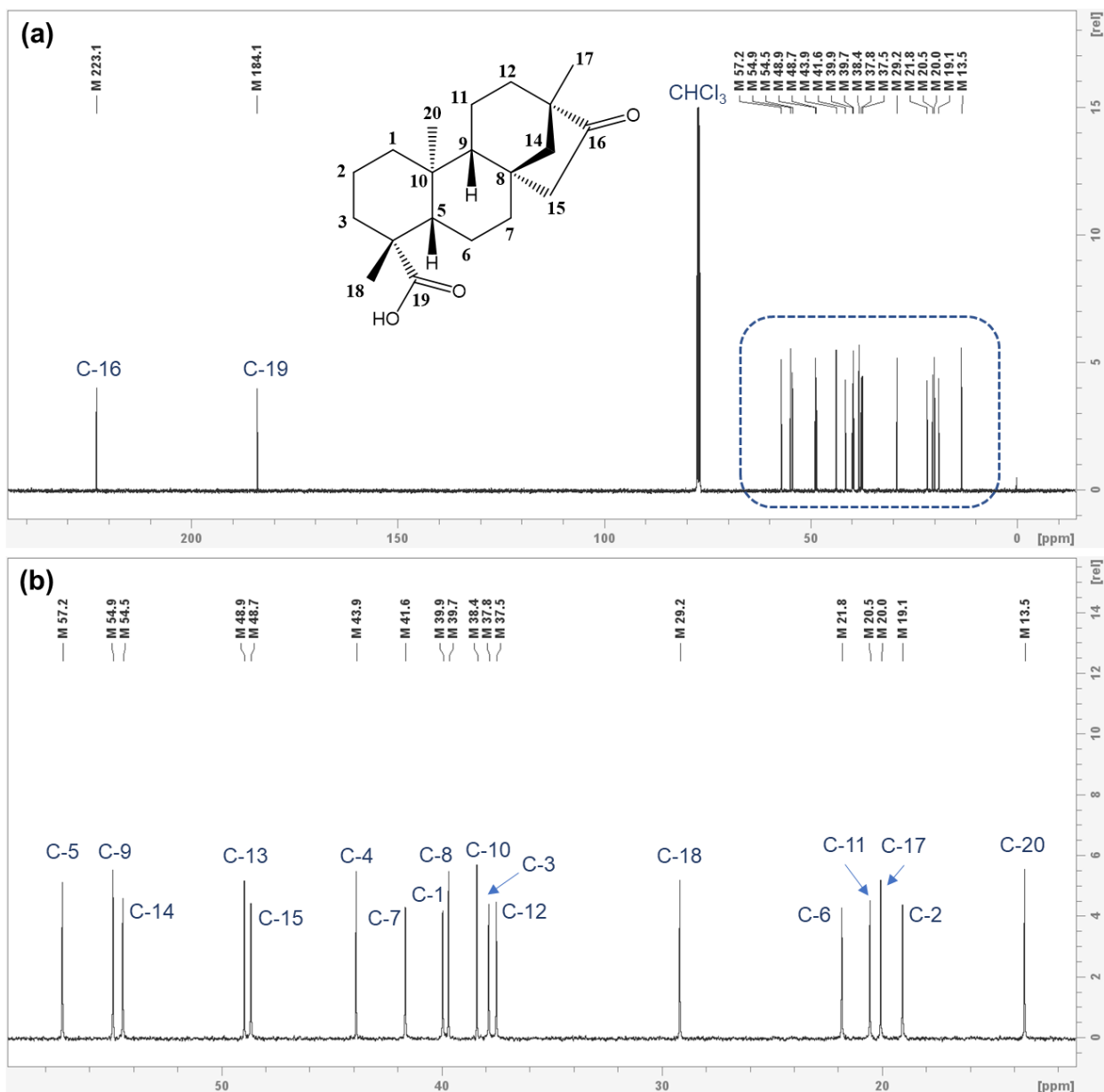


FIGURA 73 – Espectro de RMN de ^{13}C do isosteviol (a) completo e (b) ampliação da região de δ_c entre 10-60 ppm (100 MHz, CDCl_3).

TABELA 10 – Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (100 MHz) para o isosteviol e os produtos de biotransformação iso-01, iso-02 e iso-03

nº	Carbono (em relação ao isosteviol)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) iso-01 ^a	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) iso-02 ^b	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) iso-03 ^c	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) isosteviol ^b	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) isosteviol (HSU <i>et al.</i> , 2002) ^c
1	CH ₂	41,0	81,2 (C-OH)	81,1 (C-OH)	39,9	40,6
2	CH ₂	20,3	30,2	30,6	19,1	20,1
3	CH ₂	39,2	35,6	36,7	37,8	39,1
4	C	45,2	43,3	44,2	43,9	44,4
5	CH	48,6	55,9	46,0	57,2	57,5
6	CH ₂	30,7	21,8	30,5	21,8	22,9
7	CH ₂	76,9 (C-OH)	42,1	75,6 (C-OH)	41,6	42,2
8	C	44,4	40,3	44,6	39,7	40,1
9	CH	50,0	55,3	49,8	54,9	55,2
10	C	39,2	44,2	43,0	38,4	38,8
11	CH ₂	21,3	23,8	23,8	20,5	21,1
12	CH ₂	38,7	37,8	38,0	37,5	37,9
13	C	49,8	49,0	48,4	48,9	49,1
14	CH ₂	51,2	54,5	51,0	54,5	54,8
15	CH ₂	48,6	48,8	47,9	48,7	49,1
16	CO	224,6	223,2	221,0	223,1	221,5
17	CH ₃	20,5	19,9	20,2	20,0	20,8
18	CH ₃	29,5	28,9	29,0	29,2	29,9
19	COOH	181,9	182,4	180,2	184,1	180,5
20	CH ₃	13,9	9,1	9,4	13,5	14,1

^aCD₃OD, ^bCDCl₃, ^cC₅D₅N

Os espectros de massas (ESI-IT-MS) obtidos em modo negativo também foram utilizados como ponto de partida para a caracterização estrutural. Para **iso-01** (Figura 74, p. 129) e **iso-02** (Figura 75, p. 129) foram apresentados picos do íon da espécie molecular, [M-H]⁻, em *m/z* 333,42 para ambos, o que corrobora com uma hidroxilação na molécula. Considerando a massa exata do isosteviol (318,22 u) e a substituição de um átomo de hidrogênio por uma hidroxila, tem-se a fórmula molecular C₂₀H₃₀O₄ e massa exata 334,21 u. Os experimentos de RMN bidimensionais, que serão detalhados nos tópicos a seguir, se apresentaram como aliados para a confirmação das atribuições feitas para os átomos de carbono, e definição da posição e estereoquímica deste grupo hidroxila nestes isômeros constitucionais. Para **iso-03** (Figura 76, p. 129) o pico do íon da espécie molecular, [M-2H]²⁻,

em m/z 347,50, indica uma possível di-hidroilação – fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_5$, massa exata 350,21.

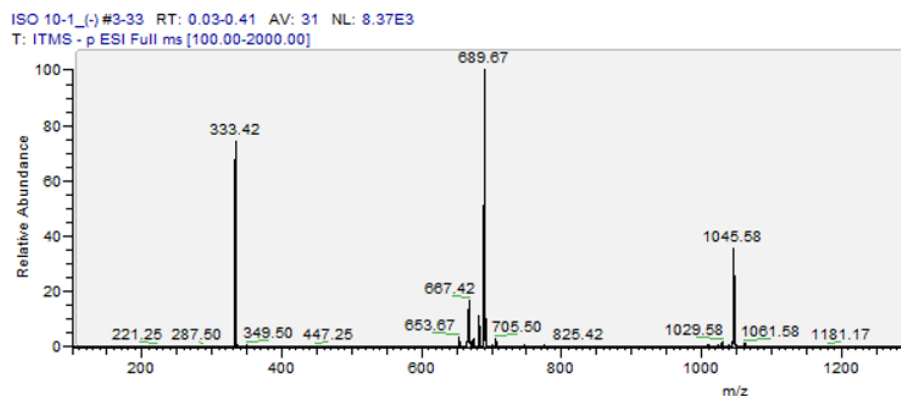


FIGURA 74 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto iso-01.

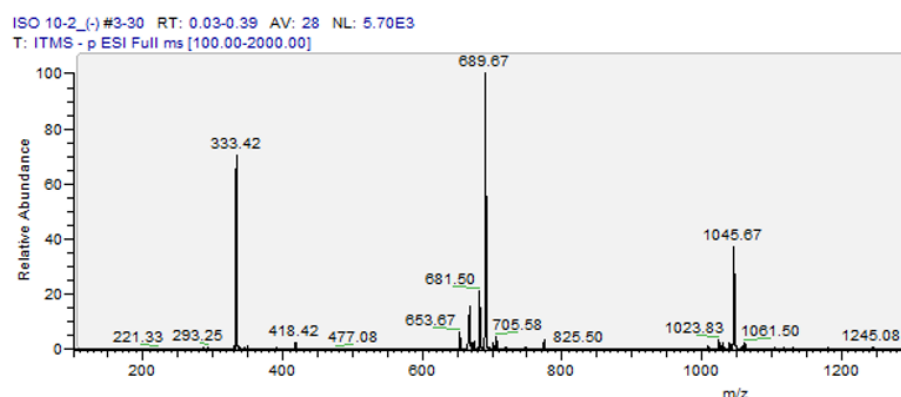


FIGURA 75 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto iso-02.

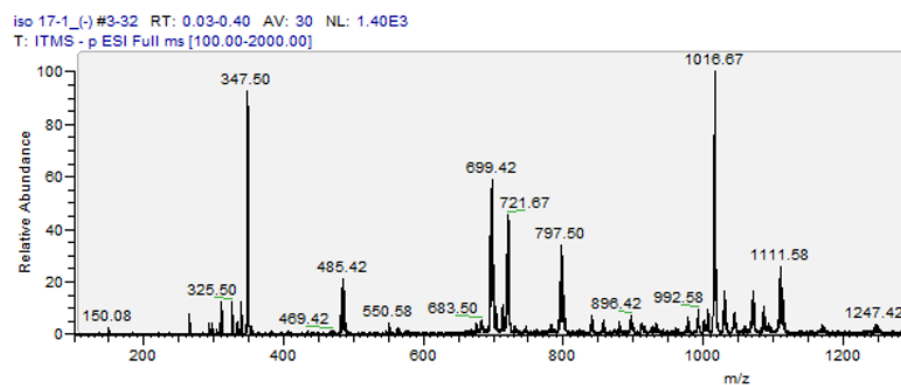


FIGURA 76 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-IT-MS, modo negativo, para o composto iso-03.

4.3.3.1.1 Caracterização do composto iso-01

O composto **iso-01**, um sólido branco insolúvel em clorofórmio e solúvel em metanol, foi obtido a partir da coluna cromatográfica do extrato resultante do contato de *A. niger* com o produto natural isosteviol por 10 dias em agitação em meio PDB. Como base na análise dos dados espectrométricos obtidos, sua estrutura química foi atribuída ao composto **(45)** (Figura 77).

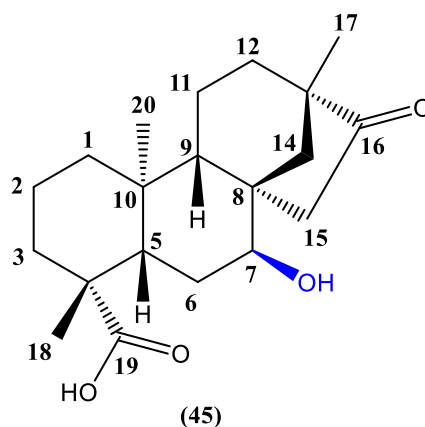


FIGURA 77 – Estrutura química proposta para iso-01.

O espectro de RMN de ^1H para **iso-01** é apresentado na Figura 78 (p. 131). Em relação ao espectro do isosteviol, destaca-se um tripleto com maior deslocamento químico relativo, em δ_{H} 3,67 ppm, com integral para um átomo de hidrogênio. Este sinal corroborou com a suspeita da inserção de um grupo hidroxila, devido ao átomo de oxigênio, eletronegativo, gerar uma maior desblindagem dos átomos. A comparação dos sinais observados no subspectro DEPT 135 para **iso-01** (Figura 79, p. 131) em relação ao registrado para o substrato isosteviol, evidenciou a ausência de um sinal de carbono metilênico e um novo sinal em δ_{C} 76,9 ppm. Considerando a região de deslocamento químico do sinal não observado (δ_{C} entre 39 e 42 ppm), este poderia ser C-1 ou C-7, indicando que um destes átomos de carbono teve um dos seus hidrogênios substituído pelo grupo hidroxila e agora se apresenta como um grupo CH mais desblindado (δ_{C} 76,9 ppm). Os sinais dos átomos de carbono hidrogenados tiveram seus respectivos átomos de hidrogênio atribuídos a partir do mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 80, p. 132). Observa-se para a maioria dos átomos de carbono metilênicos a atribuição de dois sinais de hidrogênio com diferentes deslocamentos químicos para cada. Isto ocorre uma vez que a molécula apresenta sete centros quirais e estes átomos de hidrogênio metilênicos são diastereotópicos.

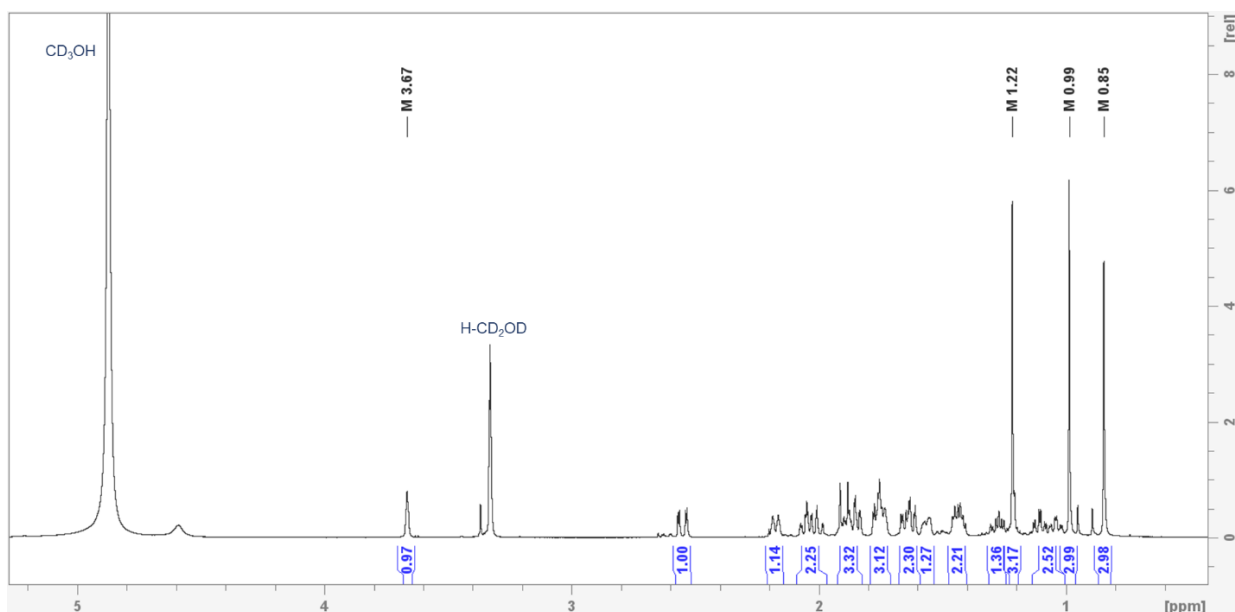


FIGURA 78 – Espectro de RMN de ^1H do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).

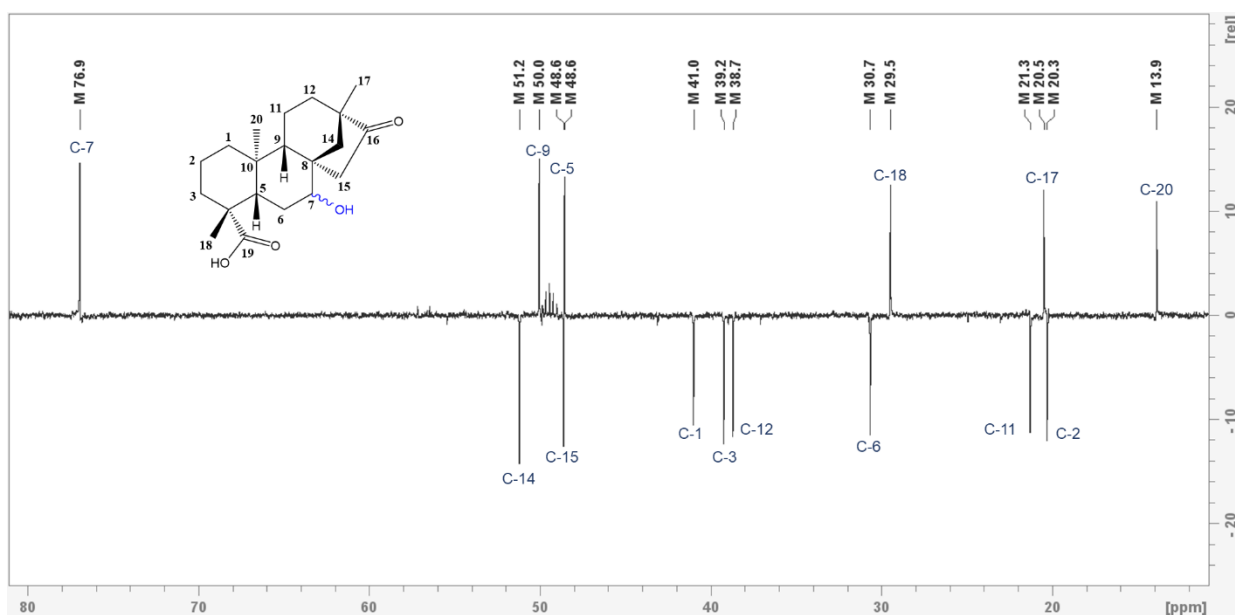


FIGURA 79 – Subspectro DEPT 135 do produto de biotransformação iso-01 (100 MHz, CD_3OD).

Em seguida, a análise do mapa de contornos HSQC-TOCSY (Figura 81, p. 132), que exibe correlações heteronucleares em um mesmo sistema de spin, ou seja, em uma mesma sequência de átomos de carbono hidrogenados, confirmou que a hidroxilação ocorreu na posição C-7. Como pode ser observado na ampliação desse mapa de contornos apresentada na Figura 82 (p. 133), o sinal correspondente à C-7 se correlaciona aos átomos de hidrogênio H-7, H-6 e H-5. Outro acoplamento destacado na ampliação do mapa de

contornos apresentada na Figura 83 (p. 133) é para os hidrogênios do mesmo sistema de spin H-9, H-11 e H-12. A análise dos espectros HSQC e HSQC-TOCSY também permitiram a confirmação do sinal correspondente ao átomo de C-6 em δ_c 30,7 ppm, mais desblindado em relação ao observado do espectro de RMN de ^{13}C do isosteviol (δ_c 21,8 ppm), o que é esperado para o átomo vizinho ao átomo onde foi inserido o novo grupo eletronegativo.

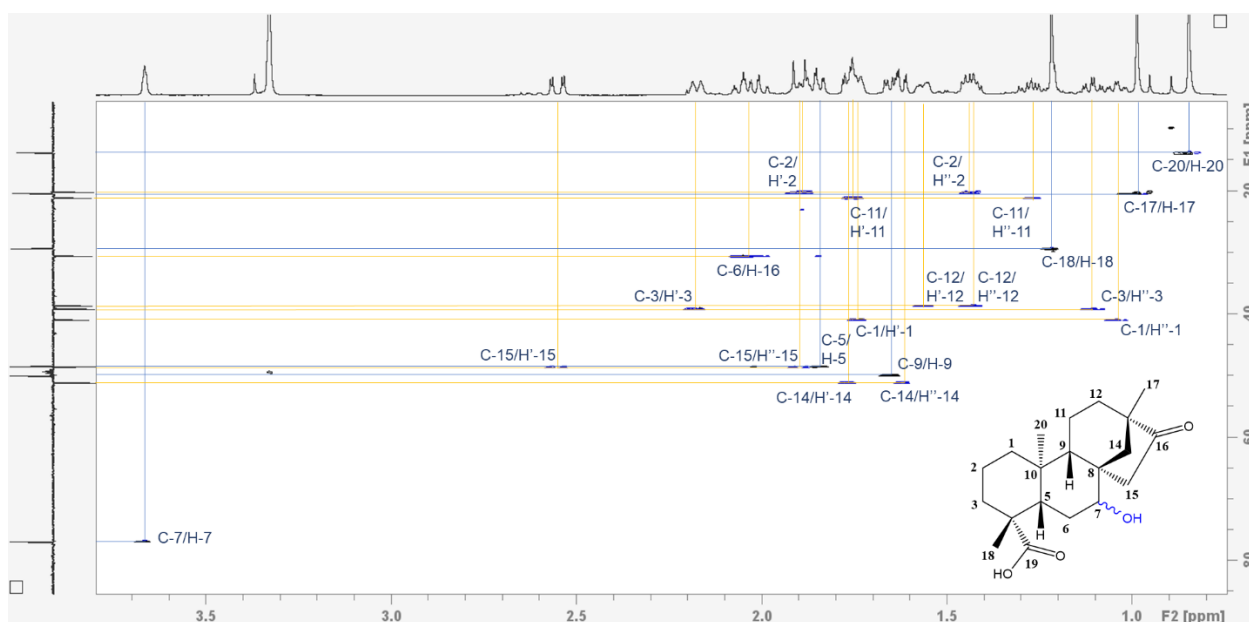


FIGURA 80 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD_3OD).

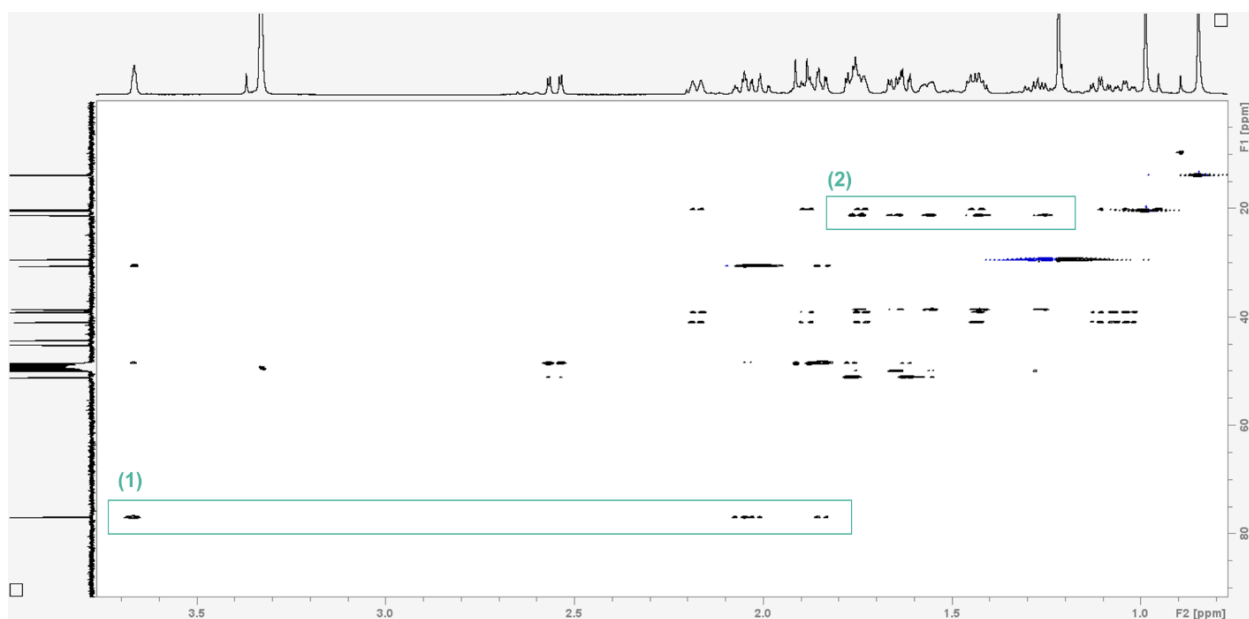


FIGURA 81 – Mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-01, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CD_3OD).

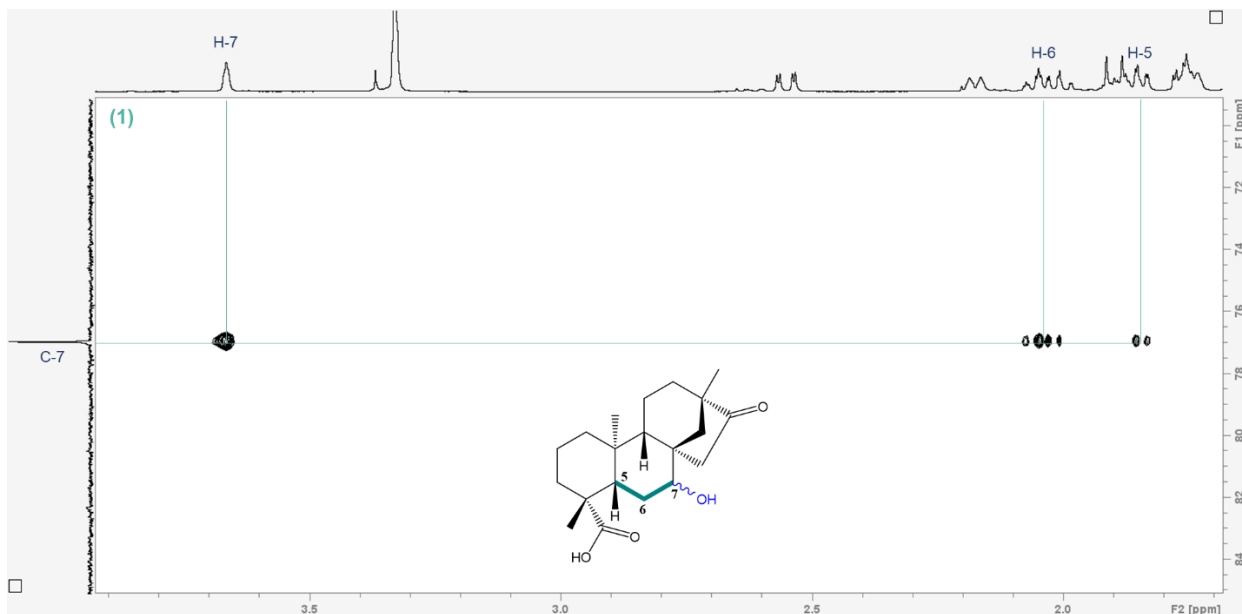


FIGURA 82 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

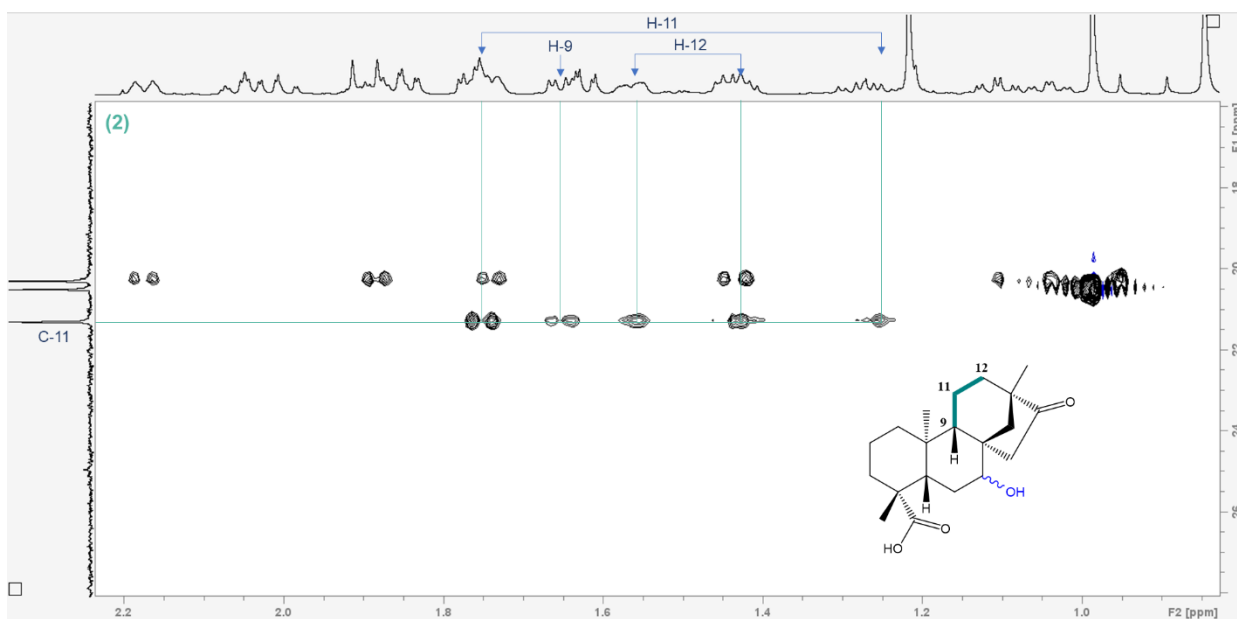


FIGURA 83 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 84, p. 134) foi analisado para a atribuição dos átomos de carbono não hydrogenados C-4 (δ_c 45,2 ppm), C-8 (δ_c 44,4 ppm), C-10 (δ_c 39,2 ppm) e C-13 (δ_c 49,8 ppm) e átomos de carbono carbonílico C-16 (δ_c 224,6 ppm) e carboxílico C-19 (δ_c 181,9 ppm). Os deslocamentos químicos destes sinais puderam ser confirmados por

meio de algumas das correlações heteronucleares observadas no mapa de contornos HMBC (Figuras 85), como C-10/H-20, C-13/H-17 (Figura 86, p. 135) e C-4/H-5 (Figura 87, p. 135) em 2J ; C-16/H-12 e C-19/H-5 em 3J (Figura 89, p. 136). Outras correlações importantes observadas foram C-7/H-5 (Figura 87, p. 135), C-15/H-7 e C-9/H-7 em 3J ; C-4/H-7 em 4J (Figura 88, p. 136).

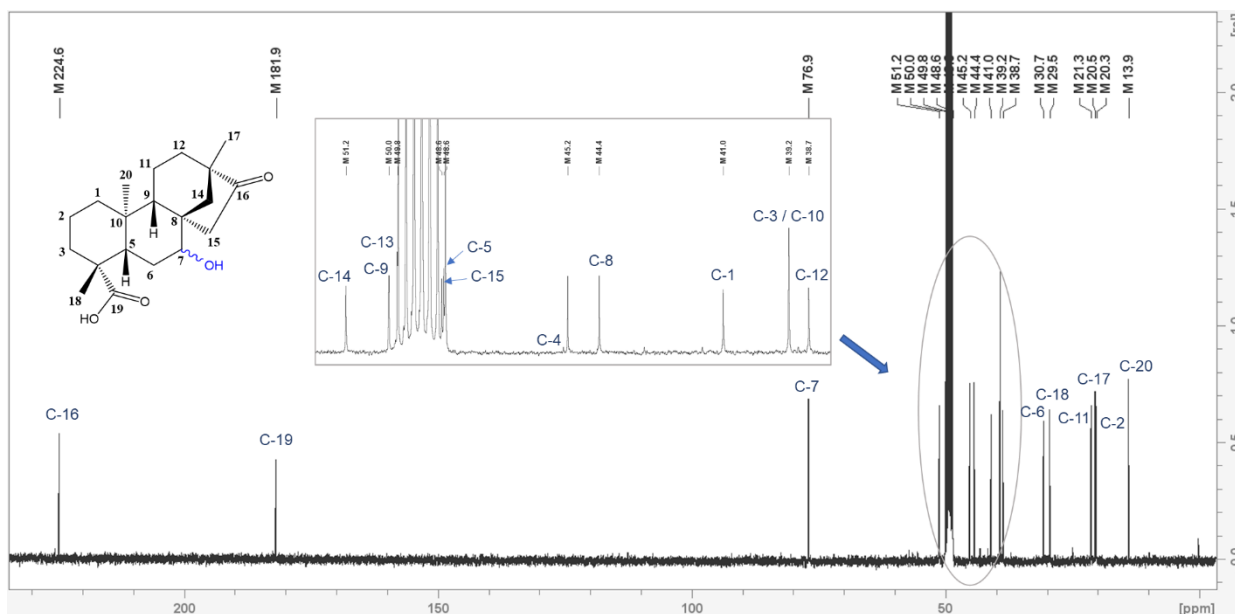


FIGURA 84 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação iso-01 (100 MHz, CD_3OD).

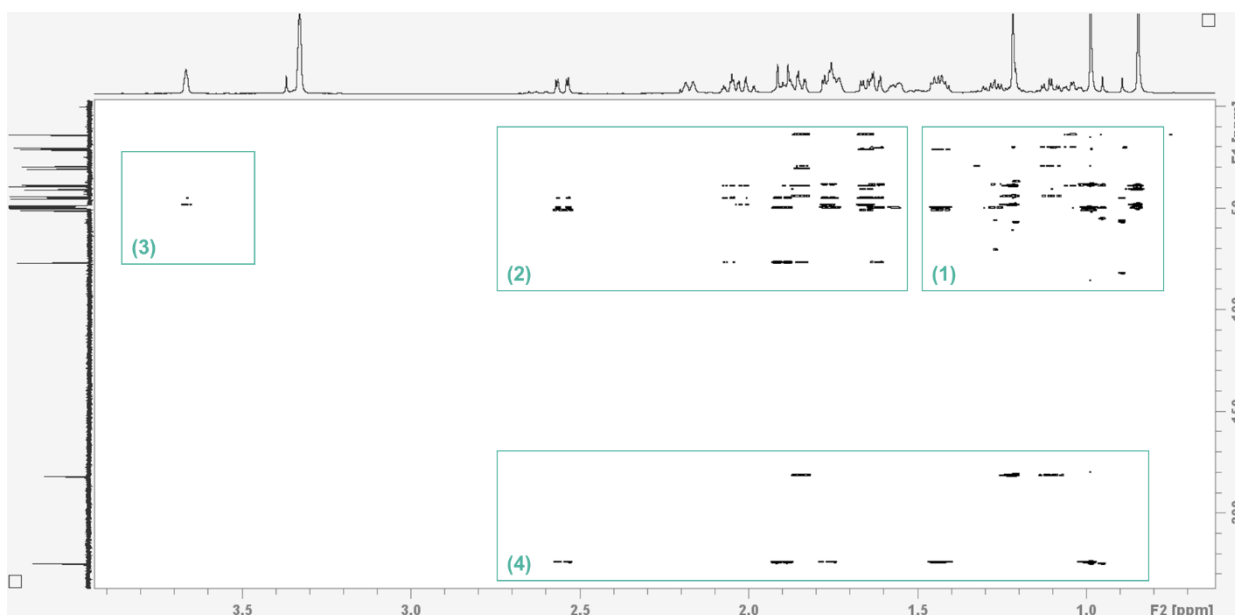


FIGURA 85 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CD_3OD).

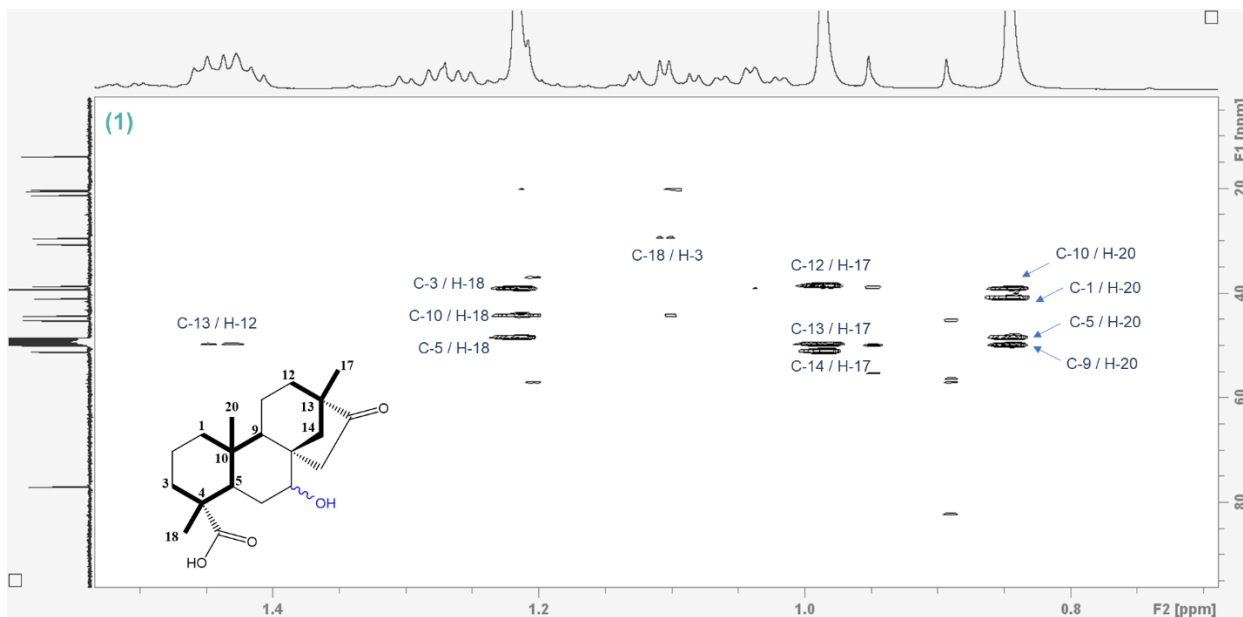


FIGURA 86 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

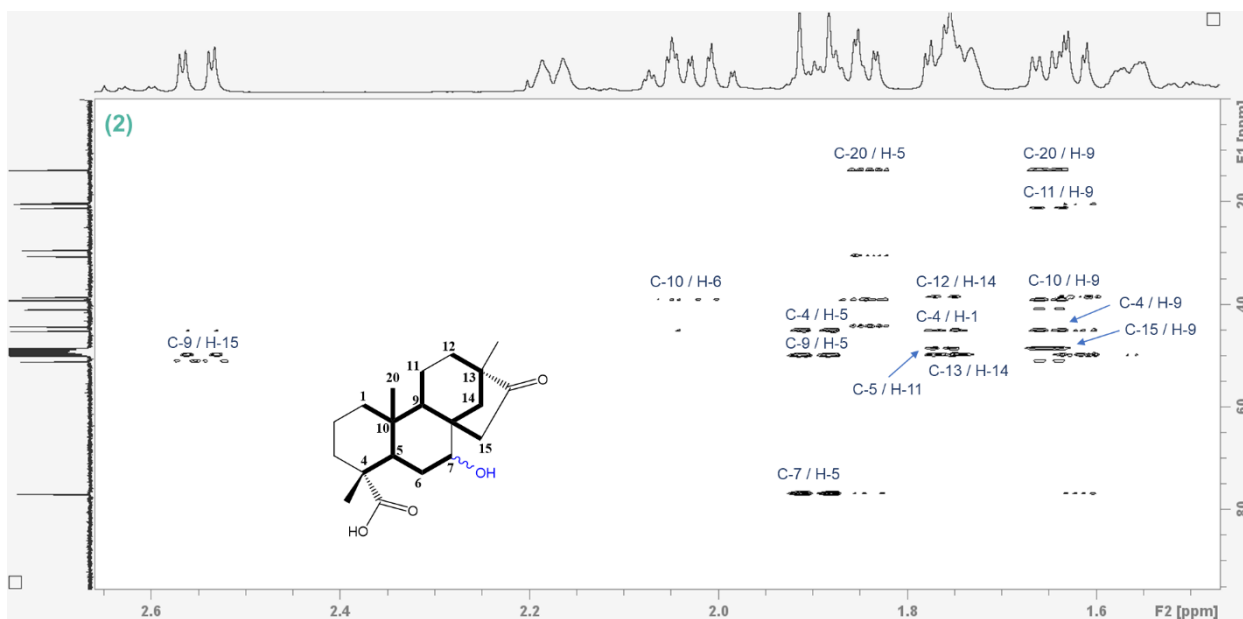


FIGURA 87 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

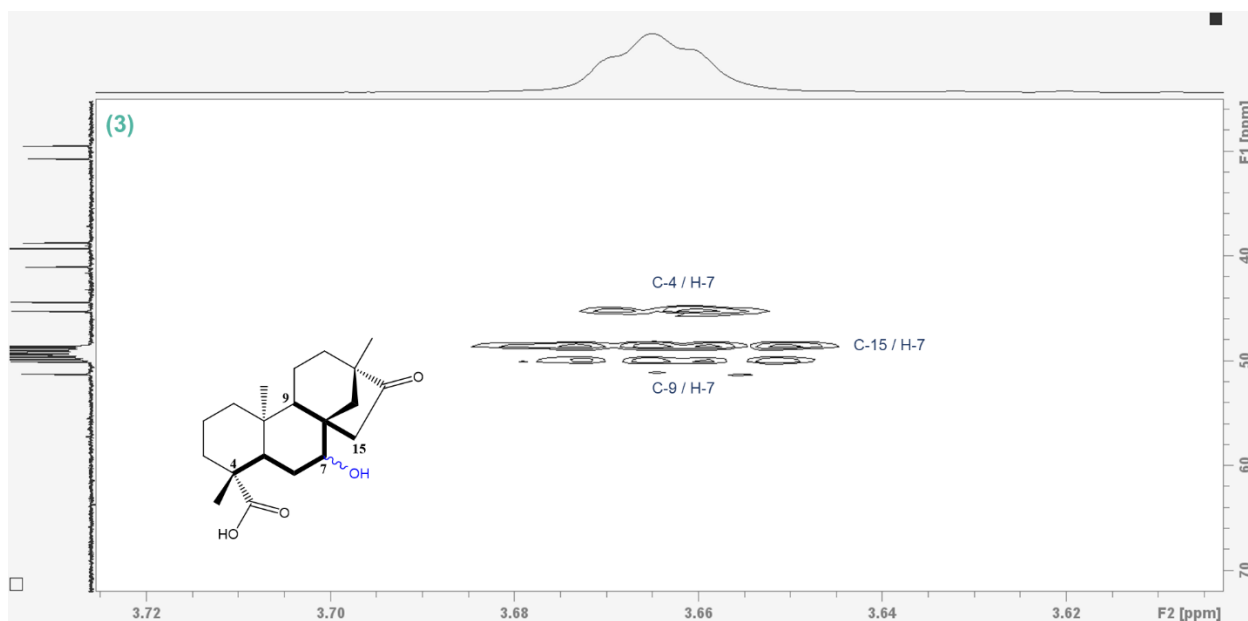


FIGURA 88 – Seção expandida (3) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

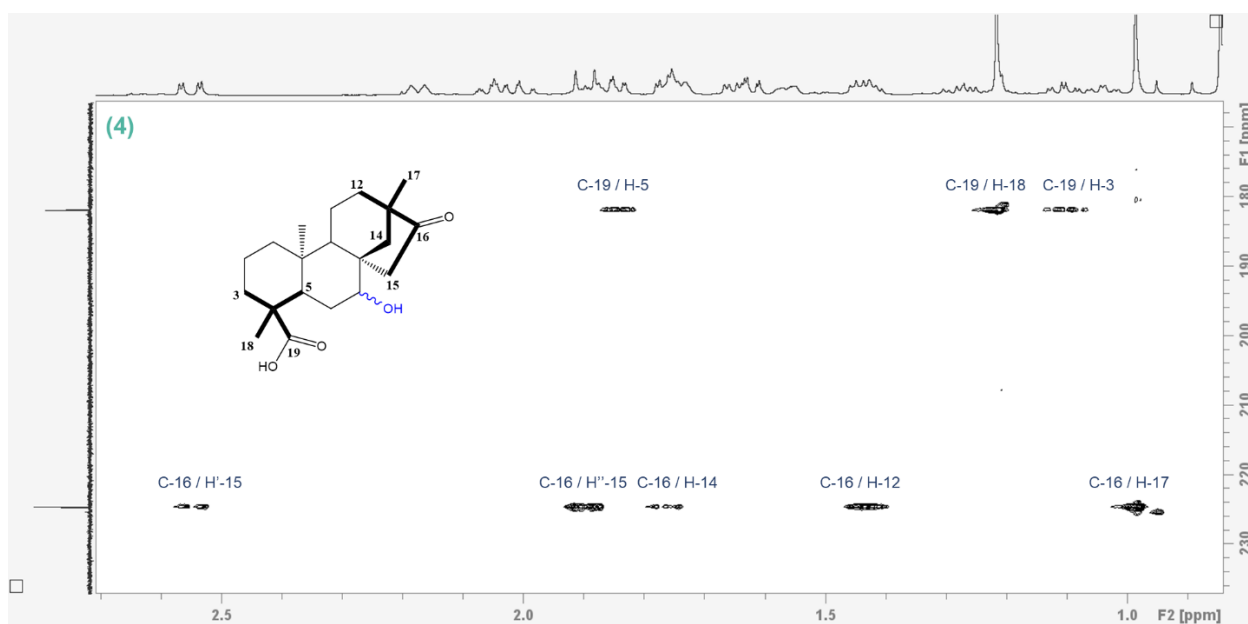


FIGURA 89 – Seção expandida (4) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

Foi obtido o mapa de contornos homonuclear NOESY (Figura 90) para observação de correlações entre átomos de hidrogênio espacialmente próximos, no intuito de verificar a estereoquímica do grupo hidroxila na molécula. Uma análise inicial indicou que o sinal do hidrogênio H-7, ligado ao mesmo átomo de carbono ao qual o grupo hidroxila está ligado (C-7), correlaciona-se no espaço com um dos átomos de hidrogênios metilênicos H-14, H-15 e H-6, que a princípio não teriam sua estereoquímica definida. Observou-se uma correlação entre H-5 e H-9, ambos de orientação β , no entanto, não foi observado a correlação de nenhum deles com o H-7, sugerindo sua orientação em α . Isso está de acordo com a correlação observada entre o H-7 com o H-15 β (definido em relação ao grupo CH₃-20, orientado em α), que só é possível quando H-7 está em α . Dessa forma, confirma-se a estrutura química (45) apresentada para o composto **iso-01** com orientação β para 7-OH, consistindo no ácido *ent-7 α* -hidroxi-16-oxobeyeran-19-óico. Este composto foi isolado anteriormente a partir da transformação microbiana do isosteviol por *Cunninghamella bainieri* (HSU *et al.*, 2002) e *Mucor recurvatus* MR 36 (CHANG *et al.*, 2008).

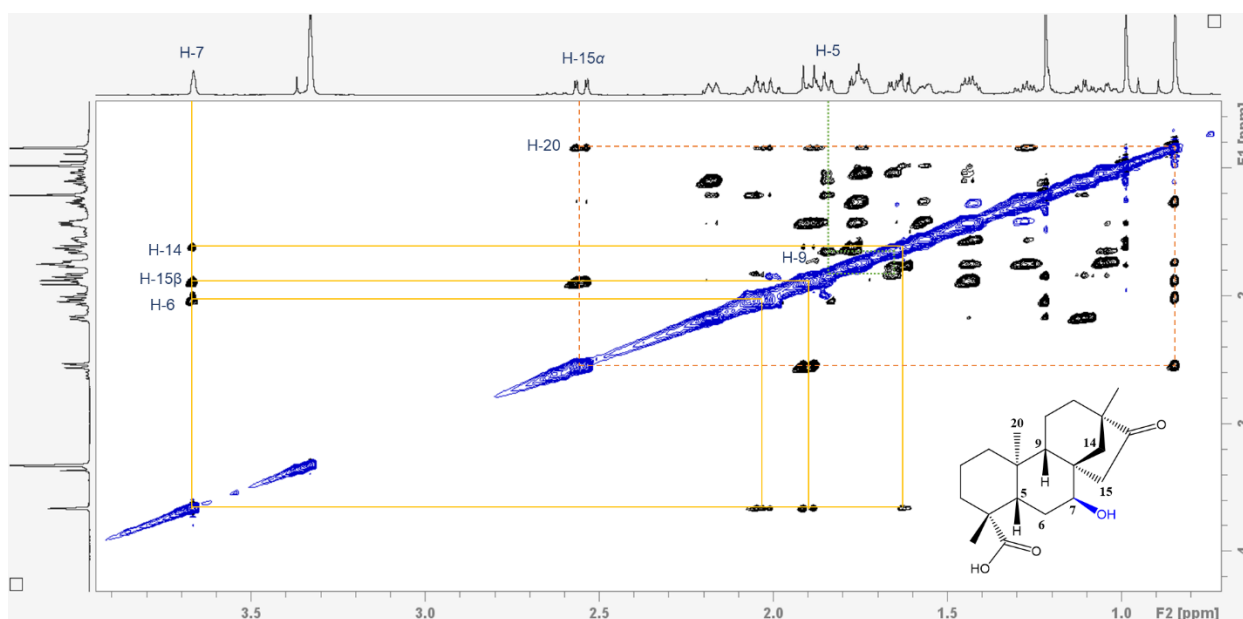


FIGURA 90 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-01 (600 MHz, CD₃OD).

4.3.3.1.2 Caracterização do composto iso-02

O composto **iso-02**, amarelo e solúvel em clorofórmio, foi obtido a partir da coluna cromatográfica do extrato resultante do contato de *A. niger* com o produto natural isosteviol por 10 dias em agitação em meio PDB. Como base na análise dos dados espectrométricos obtidos, sua estrutura química foi atribuída ao composto **(46)** (Figura 91).

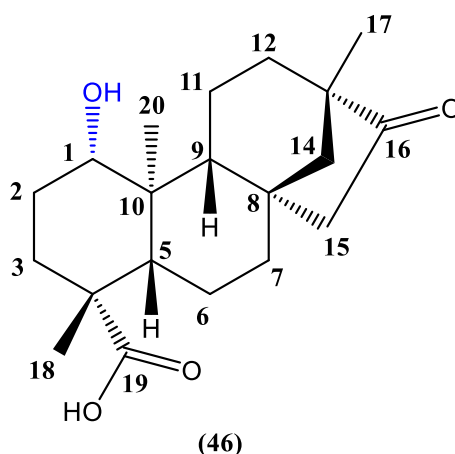


FIGURA 91 – Estrutura química proposta para iso-02.

O espectro de RMN de ^1H para **iso-02** é apresentado na Figura 92 (p. 139). Semelhantemente ao observado para **iso-01**, um sinal novo se destacou com maior deslocamento químico relativo, um duplete duplo em δ_{H} 3,40 ppm, com integral para um átomo de hidrogênio, indicativo da possível inserção de um grupo hidroxila. No subspectro DEPT 135 para **iso-02** (Figura 93, p. 139) também não se observou um dos sinais de carbono metilênico em relação ao registrado para o substrato isosteviol e foi evidenciado um novo sinal em δ_{C} 81,2 ppm, indicando que este átomo de carbono teve um dos seus hidrogênios substituído pelo grupo hidroxila. A atribuição dos átomos de hidrogênio aos sinais dos átomos de carbonos a partir do mapa de contornos heteronuclear HSQC (Figura 94, p. 140), seguido da análise do mapa de contornos HSQC-TOCSY (Figura 95, p. 140), confirmou a hidroxilação na posição C-1. Como pode ser observado na ampliação do HSQC-TOCSY apresentada na Figura 96 (p. 141) o sinal correspondente à C-1 se correlaciona aos átomos de hidrogênio H-1, H-2 e H-3. Outros acoplamentos destacados para hidrogênios do mesmo sistema de spin foram C-5 correlacionado com H-5, H-6, H-7 e C-9 correlacionado com H-9, H-11, H-12 (Figura 97, p. 141), essenciais para confirmar as atribuições carbono-hidrogênio. Também foi possível a confirmação do sinal correspondente ao átomo de carbono C-2 em δ_{C} 30,2 ppm, em maior

deslocamento químico em relação ao observado do espectro de RMN de ^{13}C do isosteviol (δ_{C} 19,1 ppm), devido ao grupo eletronegativo inserido no C-1.

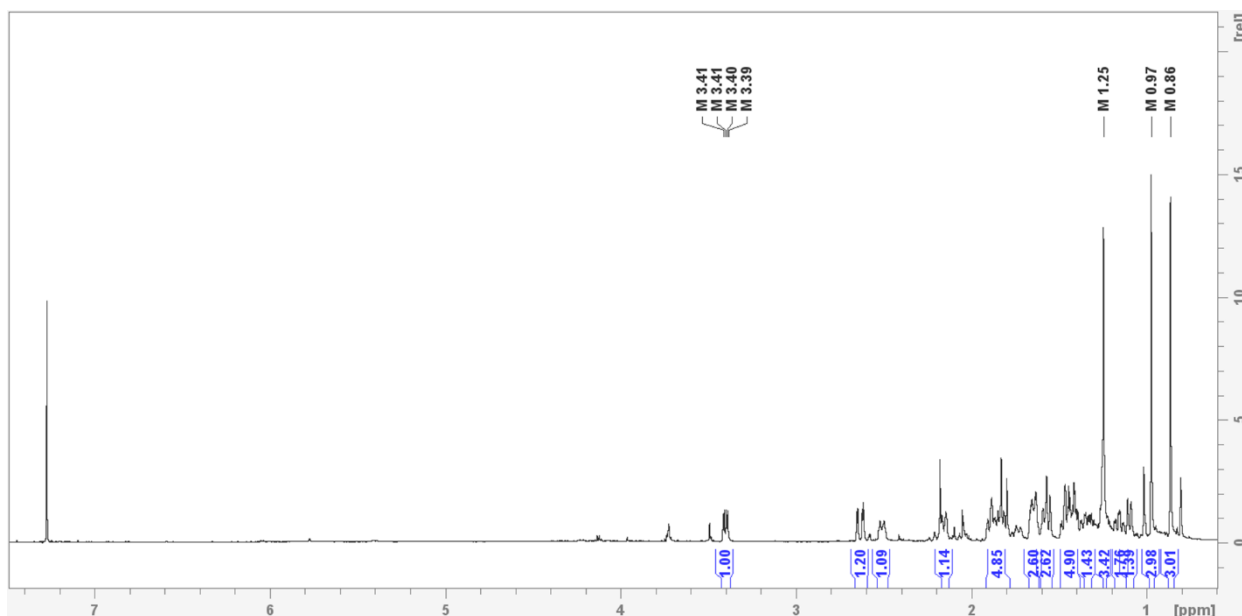


FIGURA 92 – Espectro de RMN de ^1H do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

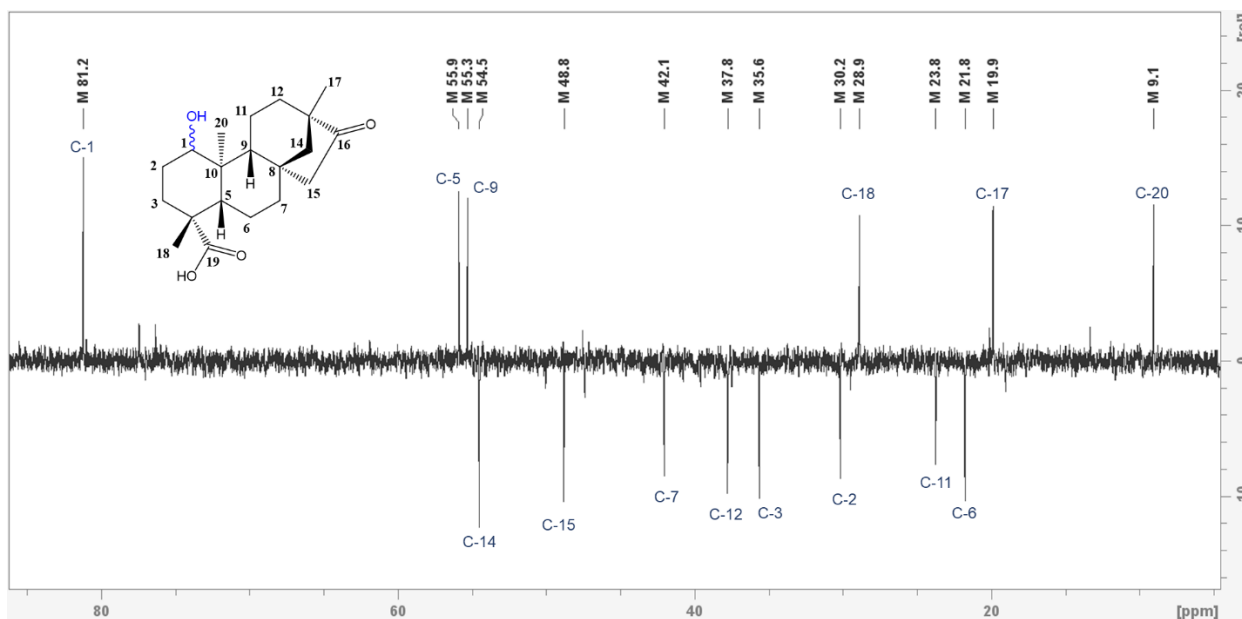


FIGURA 93 – Subspectro DEPT 135 do produto de biotransformação iso-02 (100 MHz, CDCl_3).

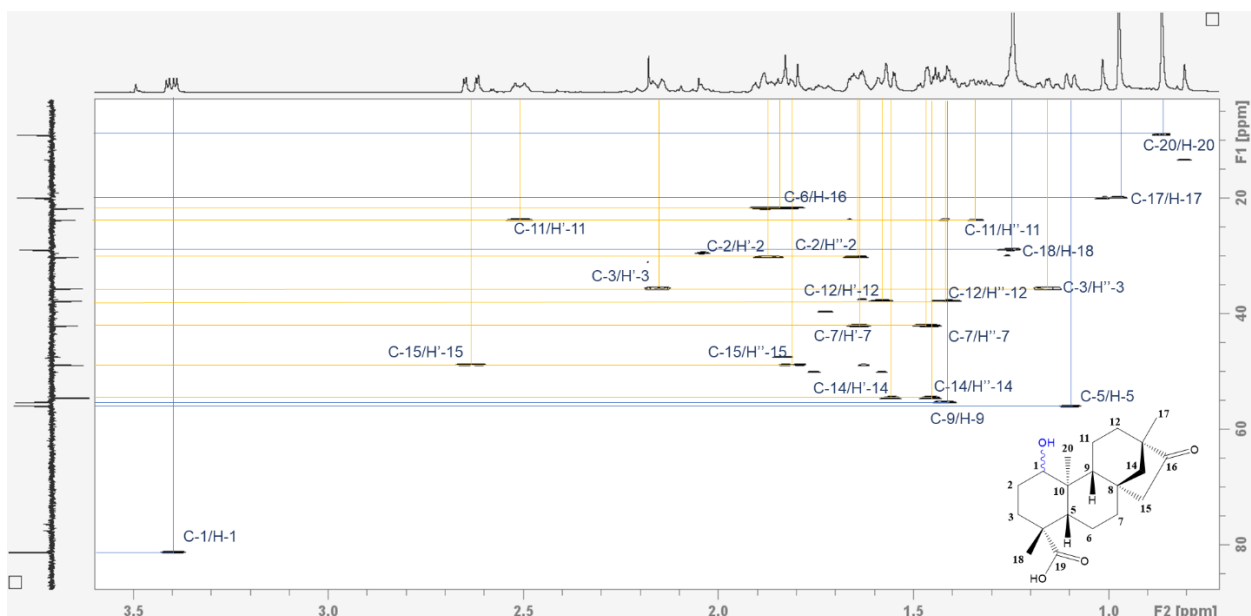


FIGURA 94 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

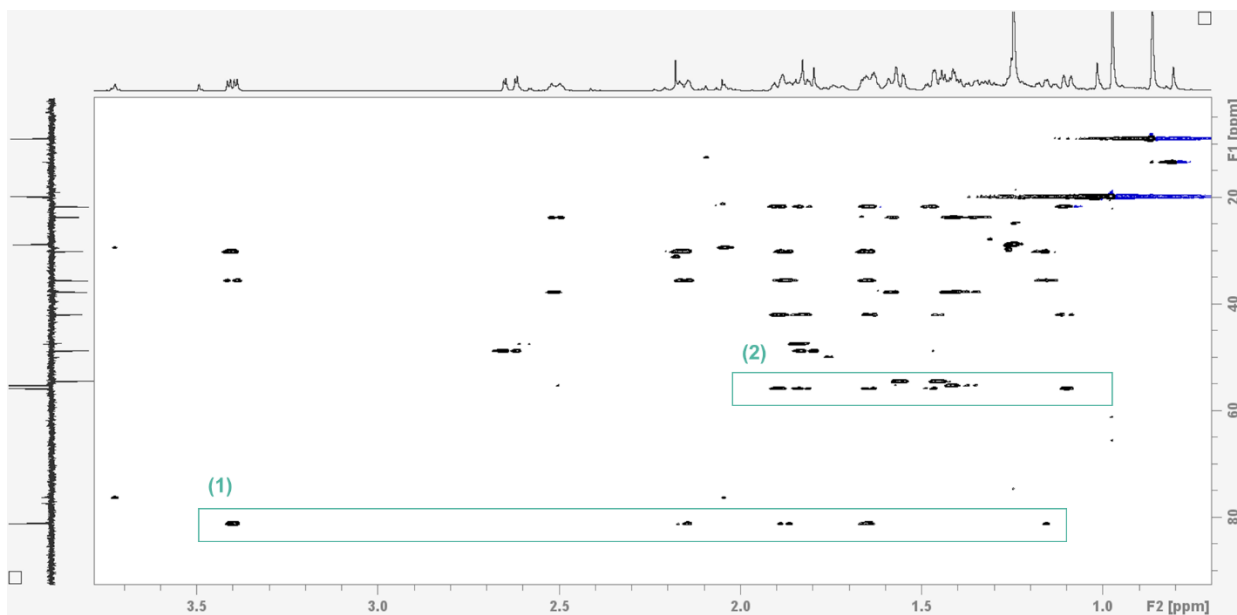


FIGURA 95 – Mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-02, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, CDCl_3).

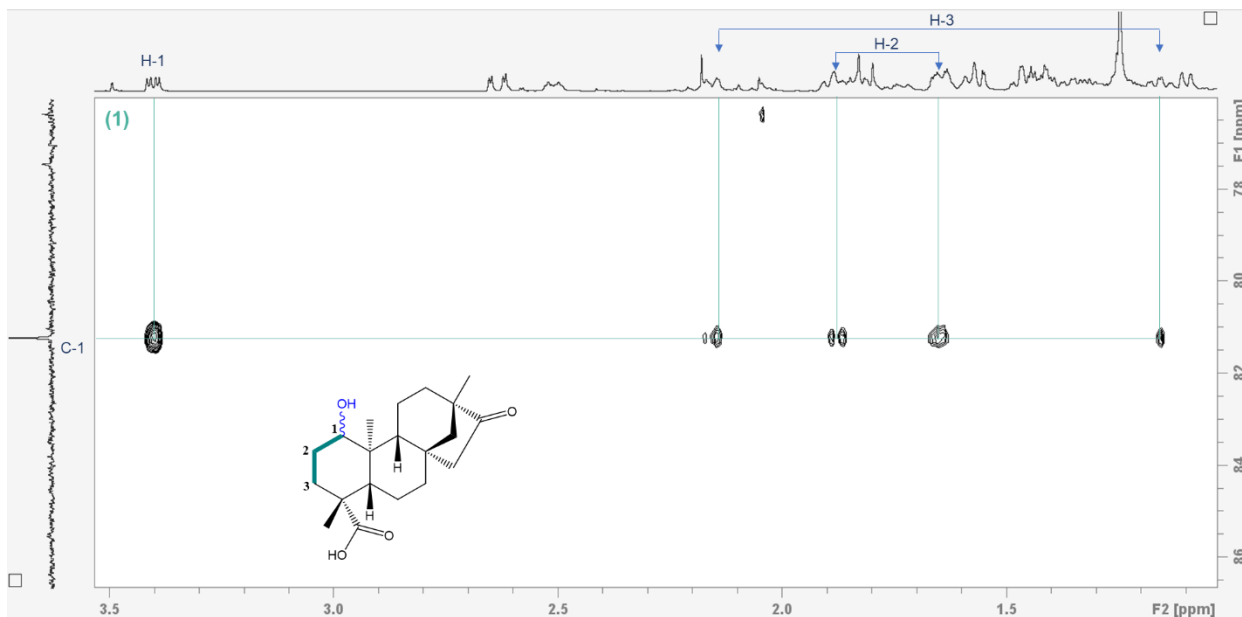


FIGURA 96 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

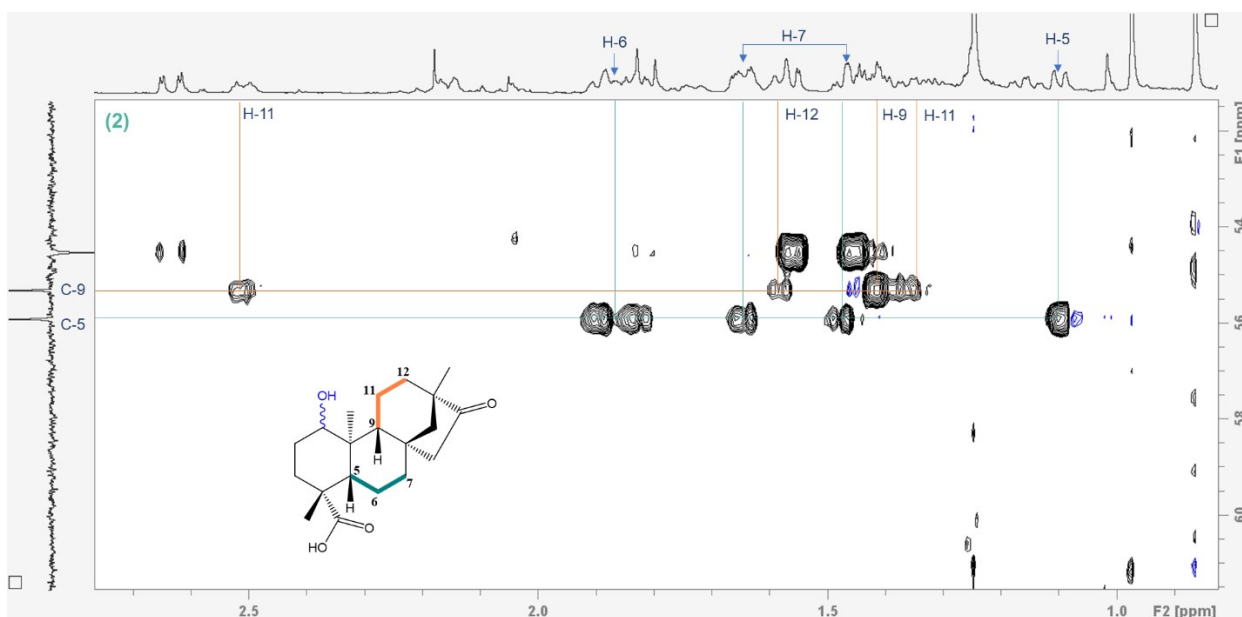


FIGURA 97 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HSQC-TOCSY do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

Os átomos de carbono não hidrogenados foram atribuídos por meio da análise conjunta do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 98, p. 142) e do mapa de contornos HMBC (Figura 99, p. 142): C-4 (δ_c 43,3 ppm), C-8 (δ_c 44,2 ppm), C-10 (δ_c 40,3 ppm) e C-13 (δ_c 49,0 ppm). Também foram identificados os sinais dos átomos de carbono carbonílico C-16 (δ_c

223,2 ppm) e carboxílico C-19 (δ_c 182,4 ppm). Estas correlações foram confirmadas por correlações como: C-4/H-18, C-4/H-5 (Figura 100, p. 143) e C-10/H-5 em 2J ; C-8/H-5 em 4J (Figura 101, p. 143); C-16/H-12 e C-19/H-18 em 3J (Figura 102, p. 144). Outras correlações importantes observadas foram C-20/H-1 e C-9/H-1 em 3J (Figura 101, p. 143).

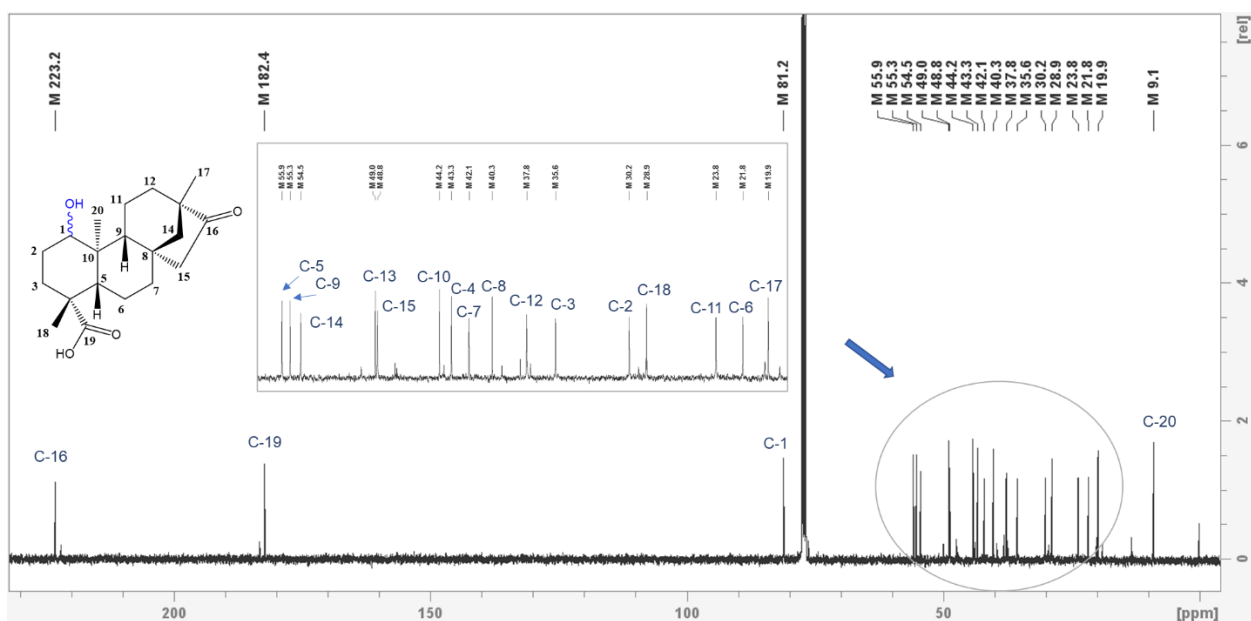


FIGURA 98 – Espectro de RMN de ^{13}C do produto de biotransformação iso-02 (100 MHz, $CDCl_3$).

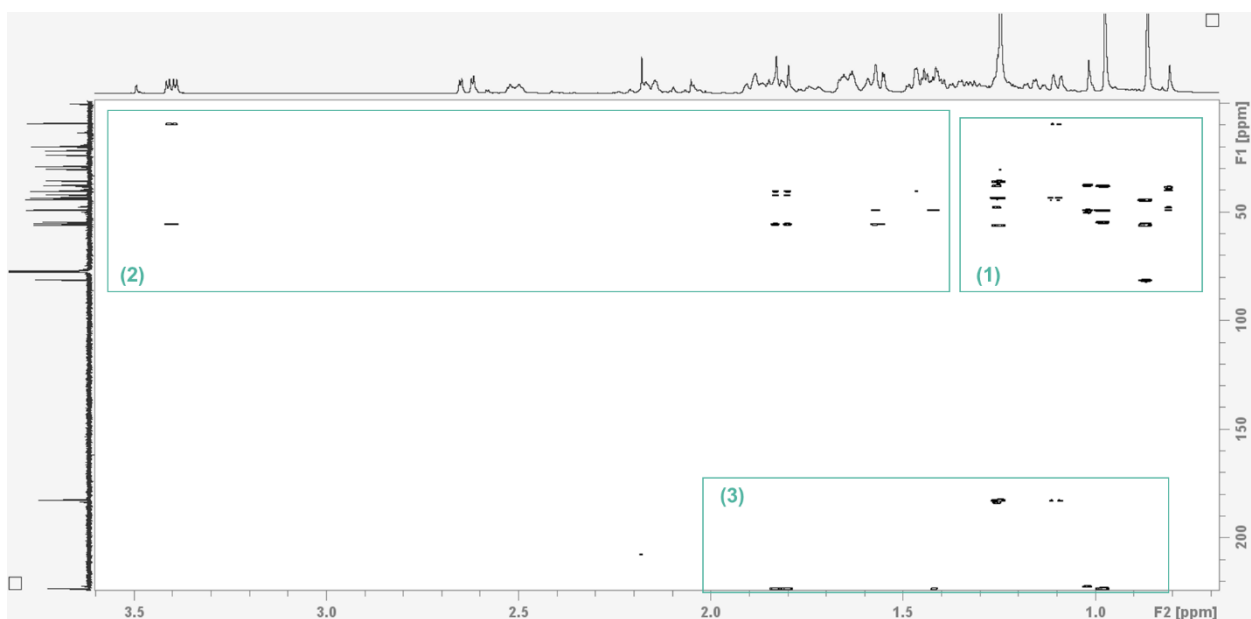


FIGURA 99 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, $CDCl_3$).

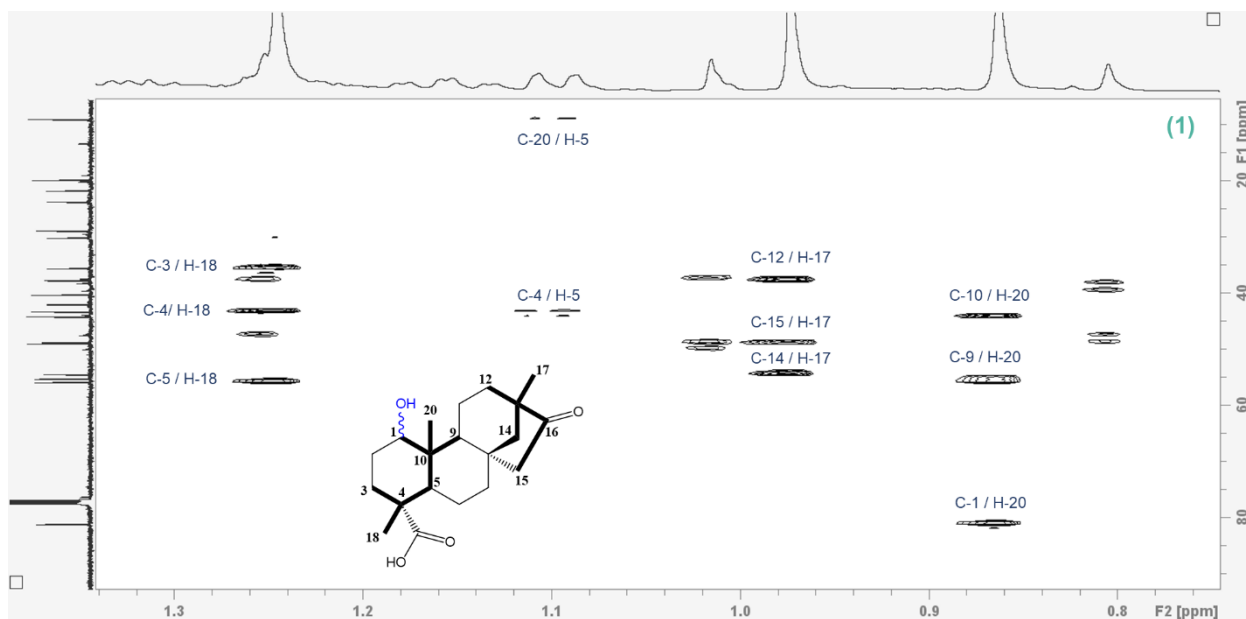


FIGURA 100 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

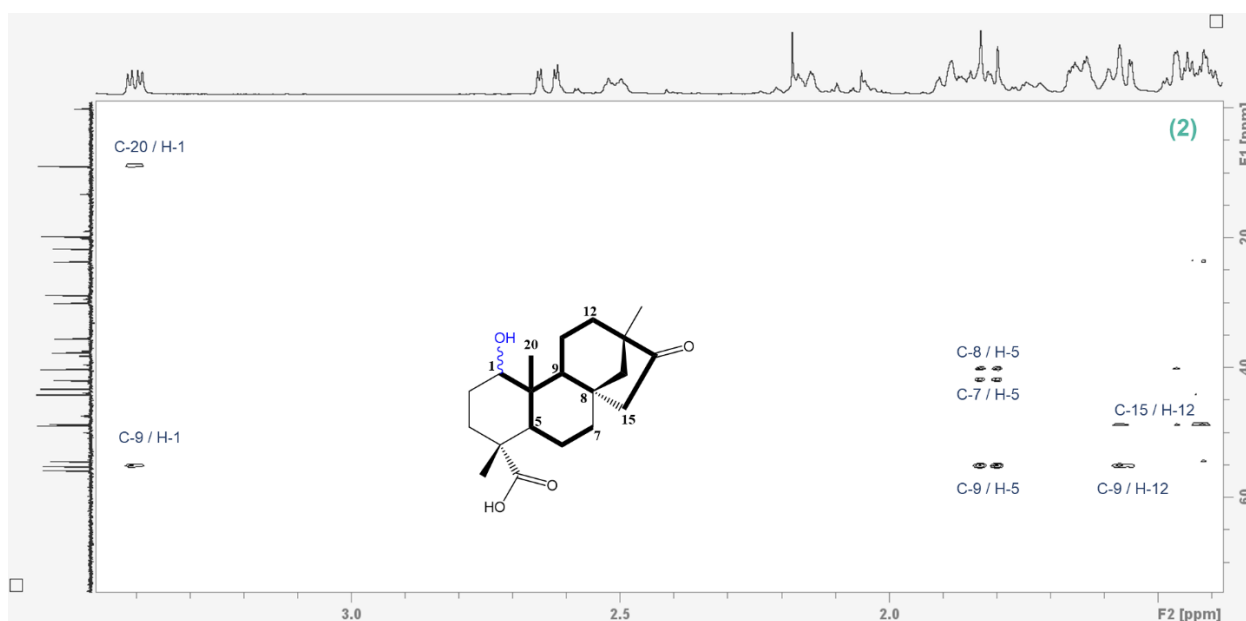


FIGURA 101 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

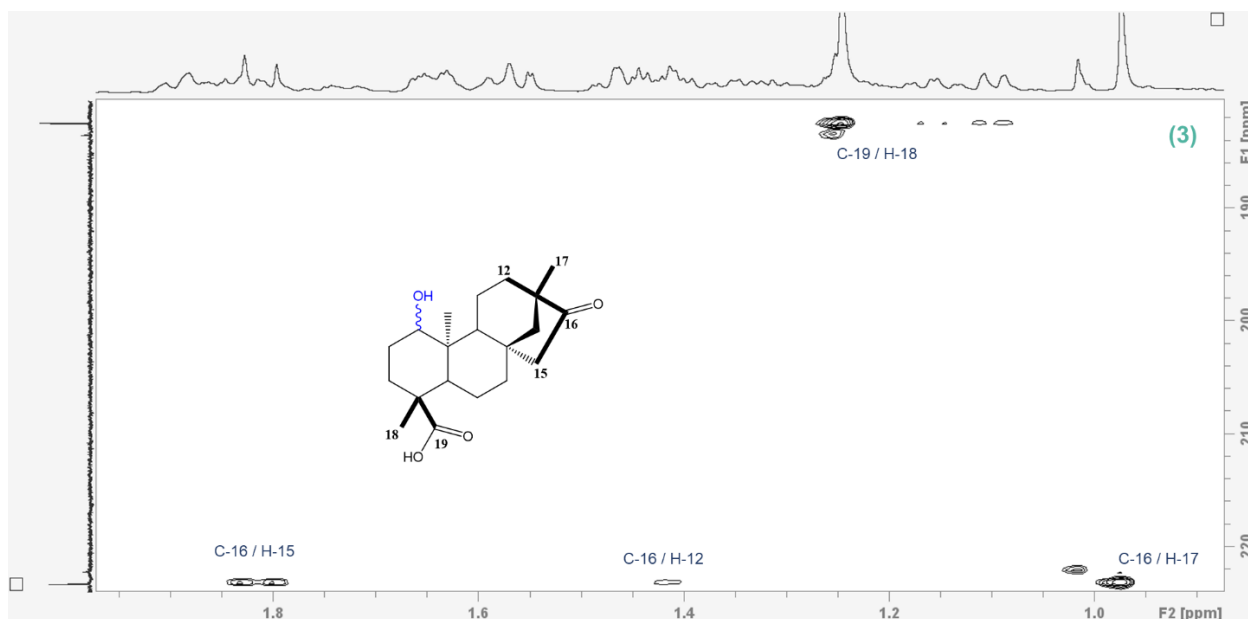


FIGURA 102 – Seção expandida (3) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

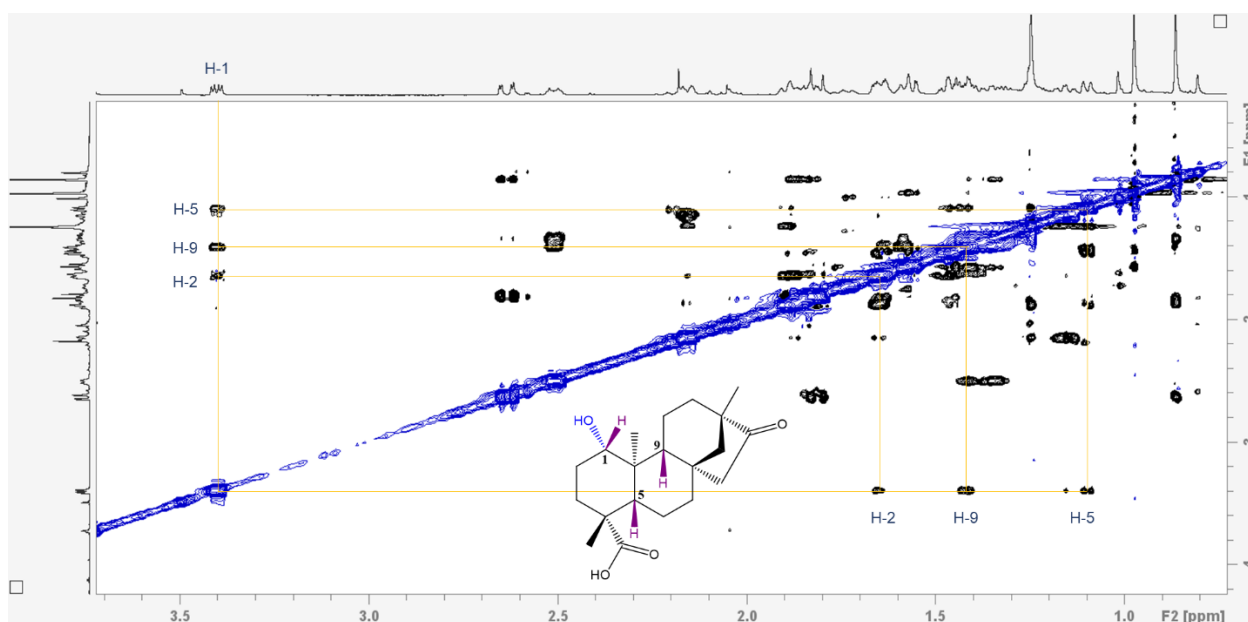


FIGURA 103 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-02 (600 MHz, CDCl_3).

A análise do mapa de contornos NOESY (Figura 103) indicou que o sinal do hidrogênio H-1, ligado ao mesmo átomo de carbono ao qual o grupo hidroxila está ligado (C-1), correlaciona-se no espaço com H-9 e H-5. Desta forma, confirma-se a estrutura química

(46) apresentada para o composto **iso-02** com orientação α para 1-OH, consistindo no ácido *ent*-1 β -hidroxi-16-oxobeyeran-19-óico. Este composto teve seu isolamento relatado pela primeira vez por Chang *et al.* (2008), tendo sido obtido a partir da fermentação em escala preparatória de isosteviol com *A. niger* BCRC 32720.

4.3.3.1.3 Caracterização do composto iso-03

O composto **iso-03**, um sólido branco solúvel em piridina, foi obtido a partir da coluna cromatográfica do extrato resultante do contato de *A. niger* com o produto natural isosteviol por 10 dias em agitação em meio PDB. Como base na análise dos dados espectrométricos obtidos, sua estrutura química foi atribuída ao composto (47) (Figura 104).

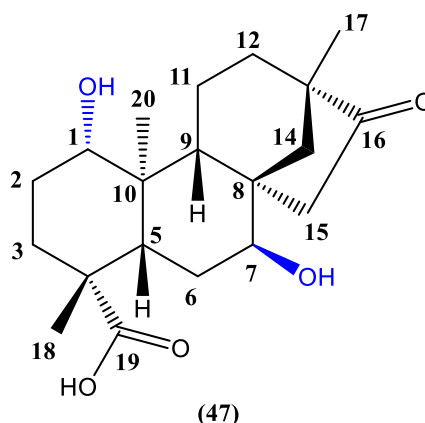


FIGURA 104 – Estrutura química proposta para iso-03.

O espectro de RMN de ^1H para **iso-03** é apresentado na Figura 105 (p. 146). Neste espectro observa-se a presença de dois sinais em maior deslocamento químico, ambos com integral para um átomo de hidrogênio, e que não estão presentes no espectro do substrato isosteviol. Estes sinais se assemelham aos observados para os compostos anteriores: um tripleto em δ_{H} 3,93 ppm, semelhante ao observado em **iso-01**, e um duplete duplo em δ_{H} 3,85 ppm, semelhante ao observado em **iso-02**. Esta observação, juntamente com os dados de espectrometria de massas, inferiu uma di-hidroxição, possivelmente nas duas posições relacionadas nos outros compostos. Como **iso-03** foi obtido em pouca quantidade (5 mg), não foi viável a aquisição de espectros unidimensionais de ^{13}C e DEPT 135. Para a atribuição dos átomos de hidrogênio aos átomos de carbono correspondentes foi utilizado o mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 106, p. 147), comparando os valores de deslocamento químico de carbono com os observados para os outros dois compostos. Em

seguida, as atribuições realizadas foram confirmadas por meio das correlações heteronucleares observadas no mapa de contornos HMBC (Figuras 107-111, p. 147-149), assim como a definição do deslocamento químico dos carbonos não hidrogenados. Os deslocamentos químicos (δ_c) são apresentados na Tabela 10 (p. 128), estes valores podem estar levemente deslocados devido a impossibilidade de realização da calibração do sinal referente ao solvente, uma vez que o espectro de RMN de ^{13}C não foi obtido. Confirmou-se a posição dos dois sinais destacados no espectro de RMN de ^1H em C-7 e C-1, respectivamente, apresentando as correlações C-7/H-6 em 2J (Figura 109, p. 148); C-5/H-7, C-9/H-7 C-20/H-1 e C-9/H-1 em 3J (Figura 110, p. 149). Além disso, também foi verificado um maior deslocamento químico em relação ao observado do espectro de RMN de ^{13}C do isosteviol para os átomos de carbono das posições C-6 (δ_c 30,6 ppm) e C-2 (δ_c 30,5 ppm), vizinhos aos átomos de carbono onde foram inseridos os grupos hidroxila.

A partir da análise do mapa de contornos NOESY (Figuras 112 e 113, p. 150) confirmou-se a estrutura química (**47**) apresentada para o composto **iso-03** com orientação α para 1-OH e β para 7-OH, uma vez que foram apresentadas as mesmas correlações discutidas previamente na análise deste experimento para os compostos **iso-01** (Figura 90, p. 137) e **iso-02** (Figura 103, p. 144). Desta forma, consiste no ácido *ent*-1 β ,7 α -di-hidroxi-16-oxobeyeran-19-óico (1 α ,7 β -di-hidroxi-isosteviol), cujo isolamento foi relatado por Chang *et al.* (2008) após transformação do isosteviol por *A. niger* BCRC 32720.

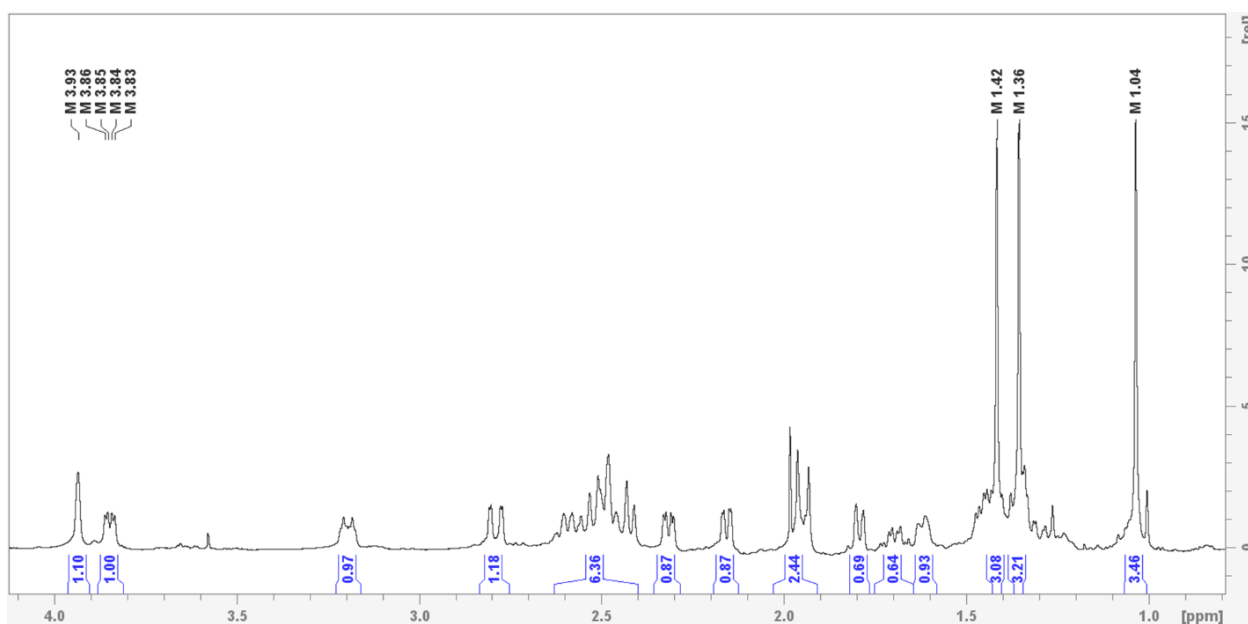


FIGURA 105 – Espectro de RMN de ^1H em janela reduzida do produto de biotransformação **iso-03** (600 MHz, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$).

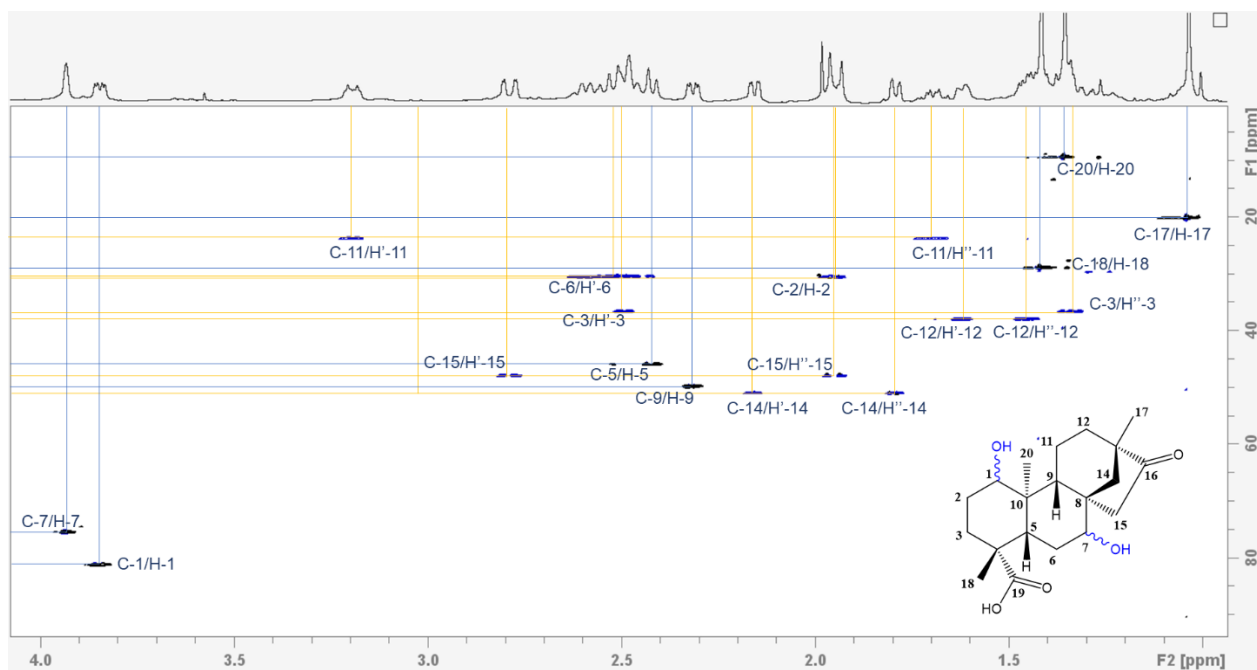


FIGURA 106 – Mapa de contornos HSQC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C_5H_5N).

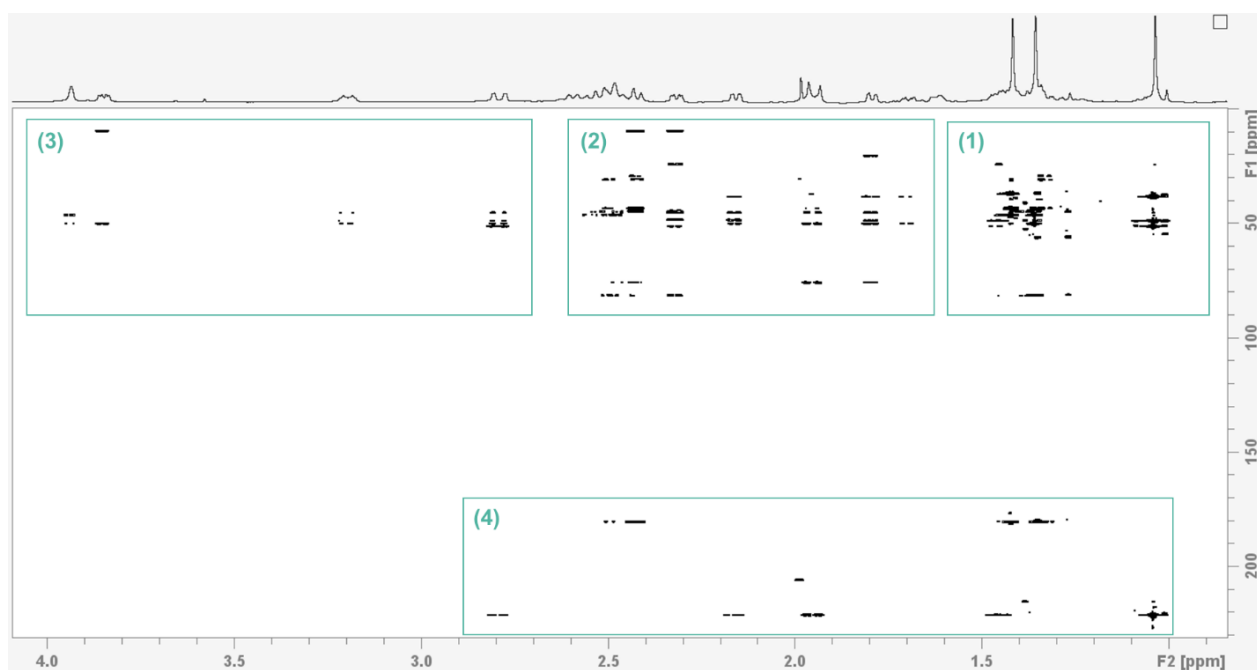


FIGURA 107 – Mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03, com regiões destacadas para ampliação (600 MHz, C_5H_5N).

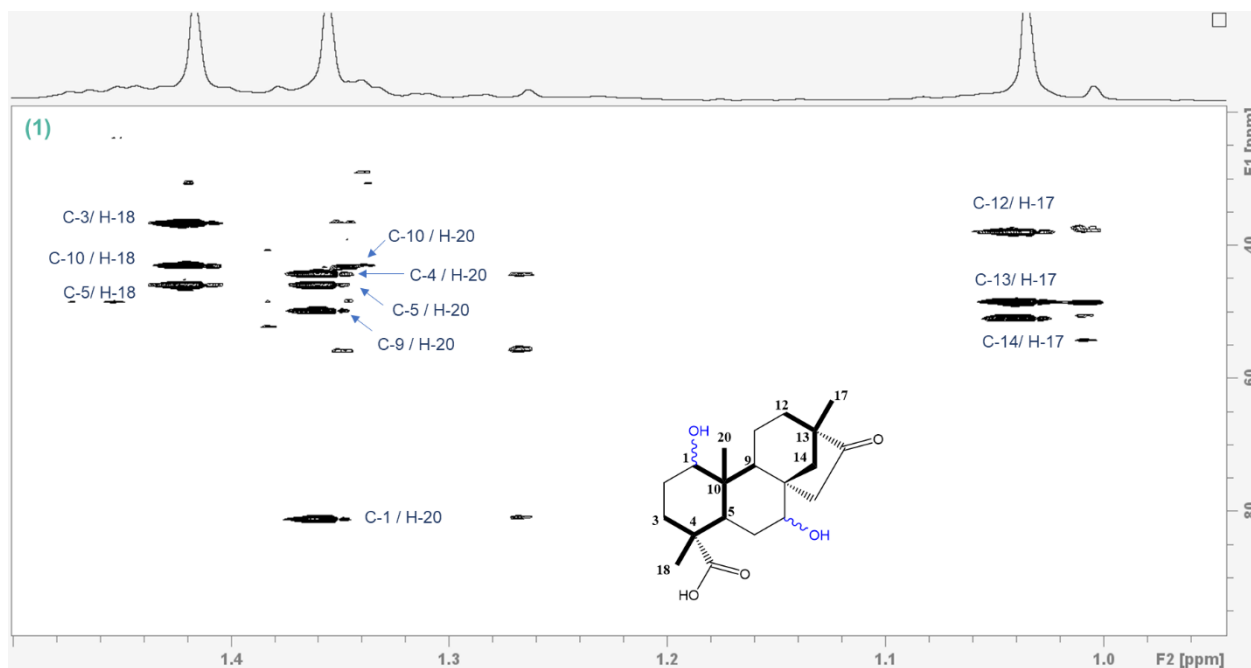


FIGURA 108 – Seção expandida (1) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C_5H_5N).

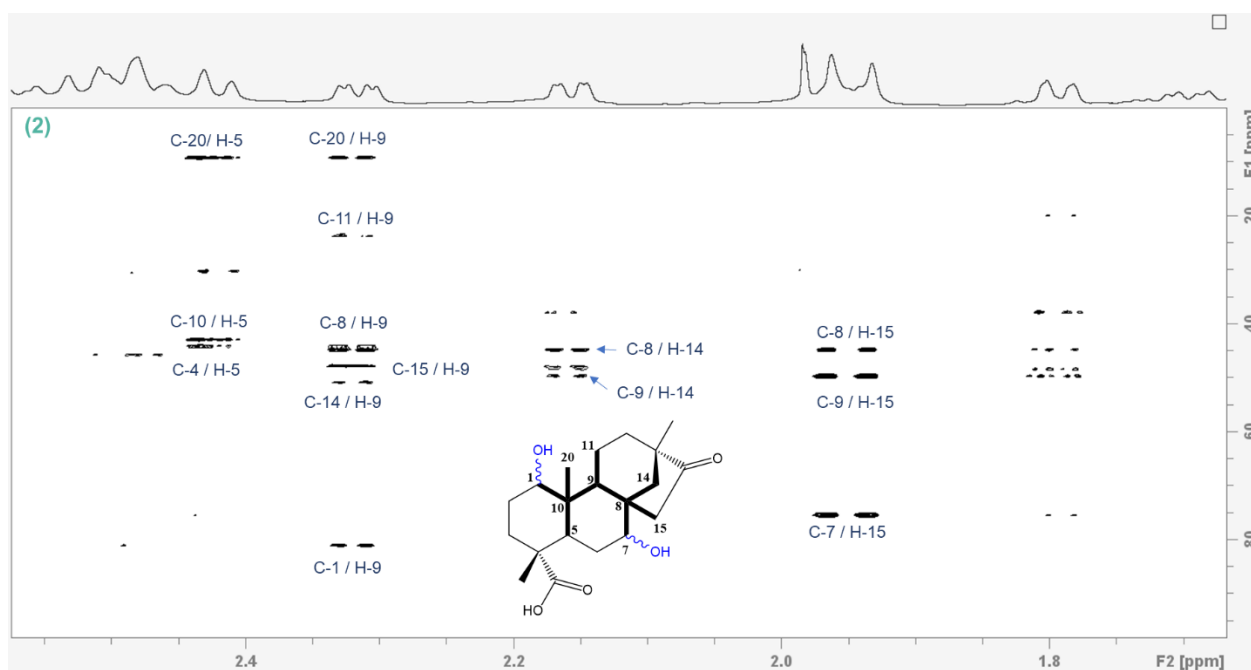


FIGURA 109 – Seção expandida (2) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C_5H_5N).

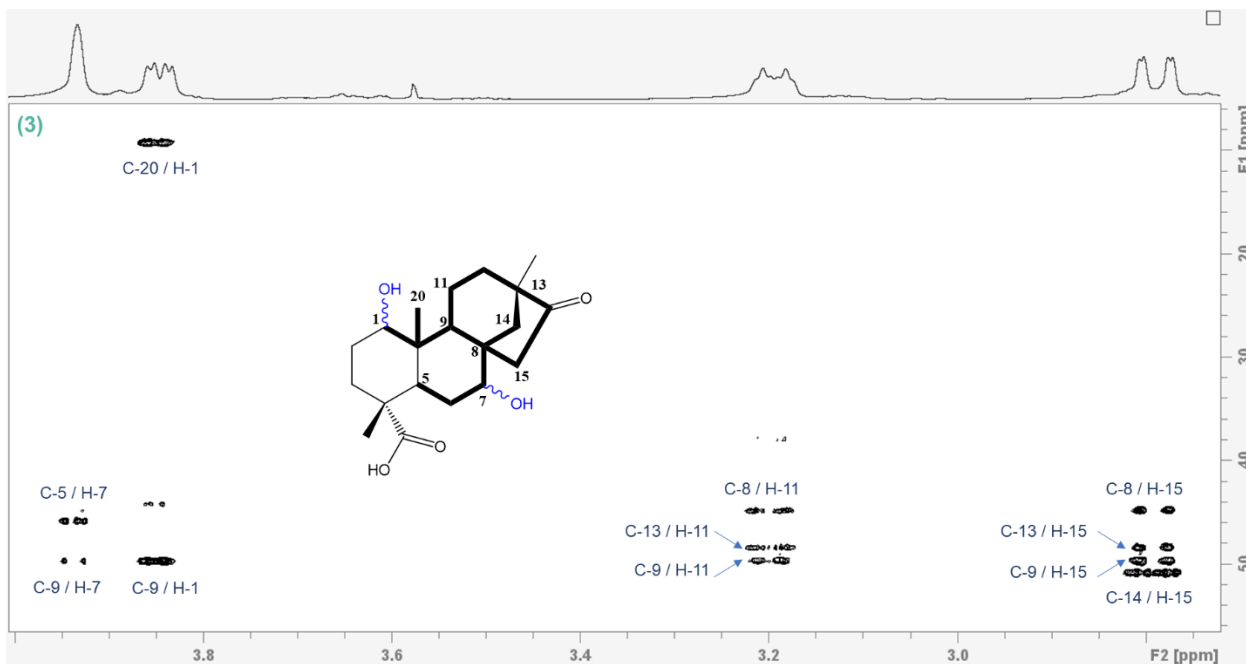


FIGURA 110 – Seção expandida (3) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C_5H_5N).

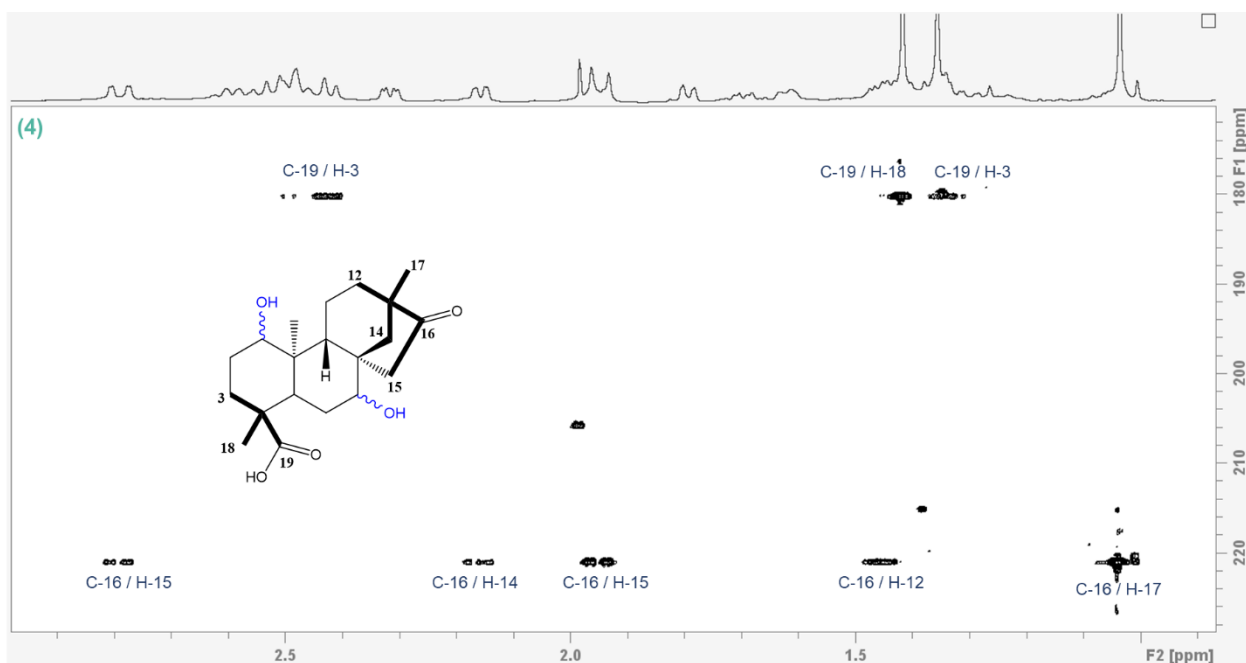


FIGURA 111 – Seção expandida (4) do mapa de contornos HMBC do produto de biotransformação iso-03 (600 MHz, C_5H_5N).

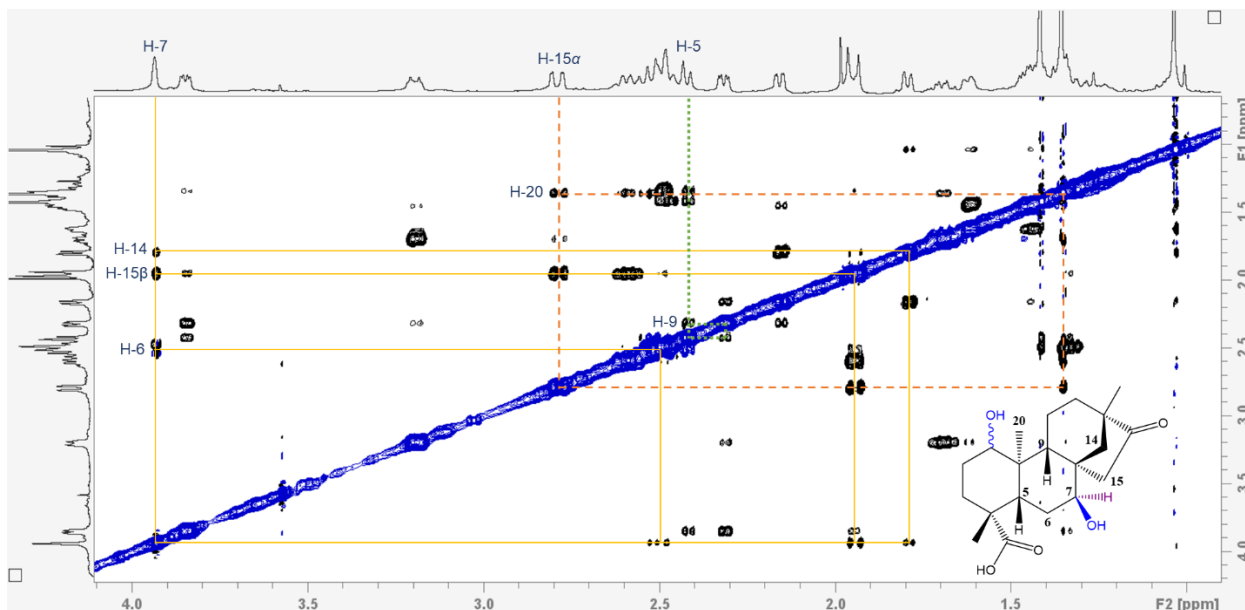


FIGURA 112 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-03, com as correlações que explicam OH-7 em posição β destacadas (600 MHz, C_5H_5N).

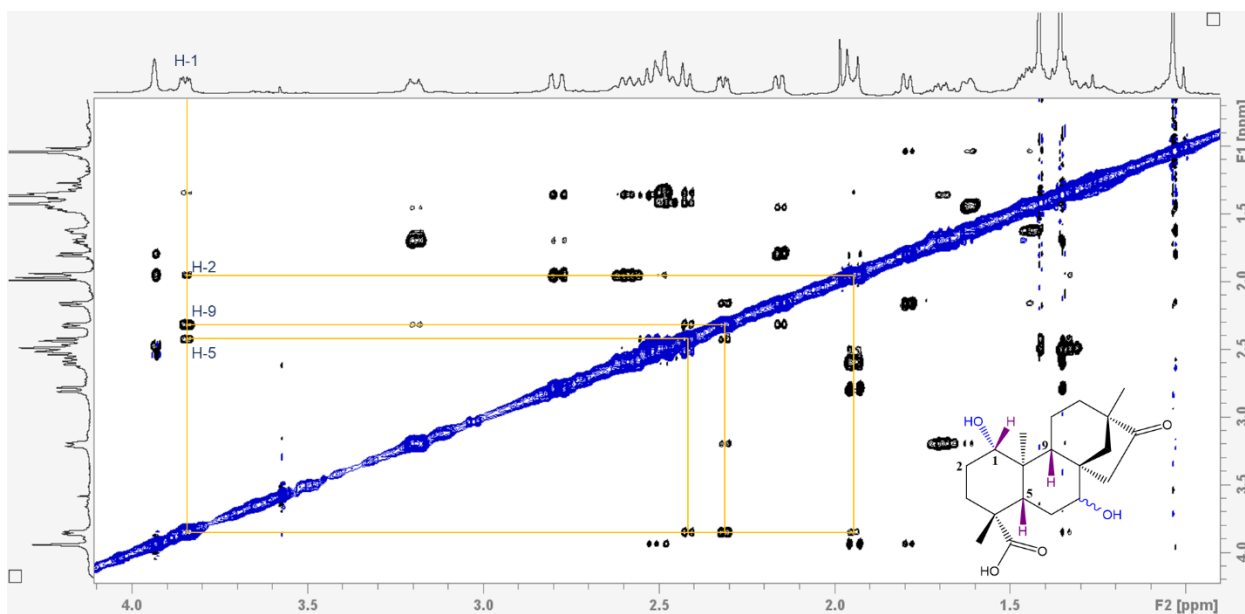


FIGURA 113 – Mapa de contornos NOESY do produto de biotransformação iso-03, com as correlações que explicam OH-1 em posição α destacadas (600 MHz, C_5H_5N).

5 CONCLUSÕES

O estudo da biorremediação de íons metálicos, por espécies de fungos filamentosos, com análise por FAAS de alíquotas coletadas em diferentes tempos, evidenciou a eficiência deste processo em todas as condições testadas. Íons Cu(II), Fe(II) e Mn(II) foram removidos de suas respectivas soluções aquosas pelas biomassas de *P. janthinellum* e *S. racemosum*, desde os primeiros minutos de contato, atingindo remoções significativas com 60 min (mínimo de 9,0% de remoção de Mn(II) por *P. janthinellum* e máximo de 42,4% de remoção de Cu(II) por *S. racemosum*) e altas remoções a partir das primeiras 24 h (mínimo de 26,8% de remoção de Mn(II) e máximo de 95,5% de remoção de Fe(II), ambos por *P. janthinellum*). A remoção de íons Fe(II) se destacou ao atingir os maiores valores relativos, independentemente da espécie e da forma de tratamento das biomassas, mais de 90% de remoção após 72 h de contato em todas as condições estudadas. Com a caracterização das biomassas após os processos, pôde-se associar a ação biossorvente destes materiais com grupos químicos presentes na superfície que sofreram mudanças em sua frequência de transmissão nas bandas de infravermelho. Estes grupos provavelmente estão distribuídos por toda a superfície, uma vez que imagens MEV-EDS mostraram uma captura uniforme dos íons metálicos. Desta forma, são geradas perspectivas para a criação de filtros para tratamento de águas residuais, visando a promoção de benefícios ecológicos e econômicos.

Neste trabalho, a avaliação dos perfis de RMN dos extratos produzidos em diferentes condições facilitou a escolha das condições mais propícias para processos de biotransformação eficientes e subsequente isolamento de produtos. Assim, foram definidas as melhores condições para a biotransformação do ibuprofeno por *A. niger* e *S. racemosum* dentre as variáveis analisadas (meio de reação aquoso ou orgânico; tempo de seis ou dez dias). Estas observações permitiram a identificação da degradação do substrato e formação dos dois produtos que foram isolados e caracterizados estruturalmente pela análise de espectros de RMN uni e bidimensionais e espectrometria de massas. O produto metoxilado **ibu-01**, até onde se tem conhecimento, se trata de um metabólito de degradação de ibuprofeno ainda não descrito, produzido a partir de *A. niger* em baixo rendimento. O composto **ibu-02** é um produto hidroxilado produzido e isolado neste trabalho a partir de *S. racemosum* e *A. niger*, que consiste em um metabólito frequentemente encontrado em águas residuais, no qual estudos de toxicidade inferem sua menor toxicidade em relação ao seu composto parental. Embora a aplicação de moduladores epigenéticos em experimentos com os poluentes emergentes ibuprofeno e estigmasterol não tenha evidenciado a elicitação de novas rotas biossintéticas capazes de formar novos produtos de biotransformação, a investigação do uso dos mesmos deve ser ampliada, pois ainda são poucos os relatos para este tipo de

abordagem. Também por meio da aplicação de RMN de ^1H foi possível uma análise rápida dos extratos obtidos em uma triagem realizada com três produtos naturais e três espécies fúngicas. Eliminando as condições substrato-fungo ineficientes, pôde-se explorar melhor a interação entre isosteviol e *A. niger* que acarretou no isolamento de três produtos de biotransformação modificados estruturalmente. Os compostos denominados **iso-01** e **iso-02** foram obtidos pela hidroxilação do isosteviol em diferentes posições, enquanto o composto **iso-03** apresentou estas duas hidroxilações simultaneamente. Para os dois compostos monohidroxilados, **iso-01** e **iso-02**, produzidos em maiores rendimentos, tem-se a perspectiva de realização de ensaios de avaliação de atividades biológicas.

Desta forma, este trabalho contribui para o avanço do uso de fungos filamentosos em aplicações ambientais e como agentes para funcionalização de compostos de interesse.

REFERÊNCIAS

- AASETH, J. O.; NURCHI, V. M. Chelation combination – a strategy to mitigate the neurotoxicity of manganese, iron, and copper? **Biomolecules**, v. 12, n. 11, p. 1713, 2022.
- ABBASS, K.; SONG, H.; MUSHTAQ, Z.; KHAN, F. Does technology innovation matter for environmental pollution? Testing the pollution halo/haven hypothesis for Asian countries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 89753-89771, 2022.
- ALMEIDA, Marília Oliveira de. **Avaliação do efeito de moduladores epigenéticos na biossíntese de produtos naturais em fungos**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- ANDRADES, R.; GUABIROBA, H. C.; HORA, M. S. C.; MARTINS, R. F.; RODRIGUES, V. L. A.; VILAR, C. C.; GIARRIZZO, T.; JOYEUX, J.-C. Early evidences of niche shifts in estuarine fishes following one of the world's largest mining dam disasters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 154, p. 111073, 2020.
- ANTONOPOULOU, M.; DORMOUSOGLU, M.; SPYROUA, A.; DIMITROULIA, A. A.; VLASTOS, D. An overall assessment of the effects of antidepressant paroxetine on aquatic organisms and human cells. **Science of the Total Environment**, v. 852, n. 158393, 2022.
- ANWAR, S. J.; BHAT, I. U. H.; KADIR, M. A.; YUSOFF, H. M.; RAZALIA, M. H.; ERNC, L. K. Drug contaminants in water and sustainable approach towards their degradation: a short review. **Desalination and Water Treatment**, v. 210, p. 231-239, 2021.
- ARRAIS, P. S. D.; FERNANDES, M. E. P.; DAL PIZZO, T. da S.; RAMOS, L. R.; MENGUE, S. S.; LUIZA, V. L.; TAVARES, N. U. L.; FARIAS, M. R.; OLIVEIRA, M. A.; BERTOLDI, A. D. Prevalência da automedicação no Brasil e fatores associados. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 2, p. 1s–11s, 2016.
- ARREGUI, L.; AYALA, M.; GÓMEZ-GIL, X.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; HERNÁNDEZ-LUNA, C. E.; DE LOS SANTOS, M. H.; LEVIN, L.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; ROMERO-MARTÍNEZ, D.; SAPARRAT, M. C. N.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 200, p. 1-33, 2019.
- ARSAND, J. B.; DALLEGRAVE, A.; JANK, L.; FEIJO, T.; PERIN, M.; HOFF, R. B.; ARENZON, A.; GOMES, A.; PIZZOLATO, T. M. Spatial-temporal occurrence of contaminants of emerging concern in urban rivers in southern Brazil. **Chemosphere**, v. 311, n. 136814, 2023.
- ASSIS, Fernanda Henrique Lyra de. **Aplicação de fungos marinhos na produção otimizada de produtos naturais bioativos e em testes de biorremediação**. 2016. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.
- BAKRIM, S.; BENKHAIRA, N.; BOURAIS, I.; BENALI, T.; LEE, L.-H.; EL OMARI, N.; SHEIKH, R. A.; GOH, K. W.; MING, L. C.; BOUYAHYA, A. Health benefits and pharmacological properties of stigmaterol. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, p. 1912, 2022.
- BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 189 p.

BAO, S.; MU, J.; YIN, P.; CHEN, H.; ZHOU, S. Exploration of anti-chromium mechanism of marine *Penicillium janthinellum* P1 through combinatorial transcriptomic analysis and WGCNA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 233, p. 113326, 2022.

BHAT, R. A.; BAKHSHALIZADEH, S.; GUERRERA, M. C.; KESBIÇ, O. S.; FAZIO, F. Toxic effect of heavy metals on ovarian deformities, apoptotic changes, oxidative stress, and steroid hormones in rainbow trout. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 75, p. 27106, 2023.

BICH, G. A.; CASTRILLO, M. L.; KRAMER, F. L.; VILLALBA, L. L.; ZAPATA, P. D. Morphological and molecular identification of entomopathogenic fungi from agricultural and forestry crops. **Floresta e Ambiente**, v. 28, n. 2, p. e20180086, 2021.

BIND, S.; BIND, S.; SHARMA, A. K.; CHATURVEDI, P. Epigenetic modification: a key tool for secondary metabolite production in microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 784109, p. 1-10, 2022.

BONECKER, A. C. T.; CASTRO, M. S. de; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A.; BONECKER, S. L. C. Larval fish assemblages of the coastal area affected by the tailings of the collapsed dam in southeast Brazil. **Regional Studies in Marine Science**, v. 32, p. 100848, 2019.

BONECKER, A. C. T.; MENEZES, B. S.; DIAS JUNIOR, C.; DA SILVA, C. A.; ANCONA, C. M.; DIAS, C. O.; LONGHINI, C. M.; COSTA, E. S.; SÁ, F.; LÁZARO, G. C. S.; MILL, G. N.; ROCHA, G. M.; LEMOS, K. N.; CONCEIÇÃO, L. R.; DEMONER, L. E.; FERNANDES, L. F. L.; DE CASTRO, M. S.; ALVES, M. M.; LAINO, P. S.; AUER, P. P. B.; CAGNIN, R. C.; GHISOLFI, R. D.; RODRIGUES NETO, R.; BONECKER, S. L. C. An integrated study of the plankton community after four years of Fundão dam disaster. **Science of The Total Environment**, v. 806(part 4), p. 150613, 2022.

BOTHA, A.; BOTES, A. *Mucor*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. Elsevier, 2014. p. 834-840.

BP. Statistical Review of World Energy, 2021, 70th edition. Disponível em: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2021-full-report.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2022.

CAO, J.-B.; LI, X.-M.; OUYANG, Y.-Z.; ZHENG, W.; WANG, D.-B. Treatment of wastewater using vivo *Fusarium* sp. - a highly manganese-resistant fungus. **Jishou Daxue Xuebao Bianjibu**, v. 32, n. 3, p. 96-99, 2011.

CHANDNANI, G.; GANDHI, P.; KANPARIYA, D.; PARIKH, D.; SHAH, M. A comprehensive analysis of contaminated groundwater: special emphasis on nature-ecosystem and socio-economic impacts. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 19, p. 100813, 2022.

CHANG, S.-F.; YANG, L.-M.; LO, C.-H.; LIAW, J.-H.; WANG, L.-H.; LIN, S.-J. Microbial transformation of isosteviol and bioactivities against the glucocorticoid/androgen. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 87-92, 2008.

CHANKHAMJON, P.; TSUNEMATSU, Y.; ISHIDA-ITO, M.; SASA, Y.; MEYER, F.; BOETTGER-SCHMIDT, D.; URBANSKY, B.; MENZEL, K.-D.; SCHERLACH, K.; WATANABE, K.; HERTWECK, C. Regioselective dichlorination of a non-activated aliphatic carbon atom and phenolic bismethylation by a multifunctional fungal flavoenzyme. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 39, p. 11955-11959, 2016.

- CHEN, S. H.; CHEOW, Y. L.; NG, S. L.; TING, A. S. Y. Mechanisms for metal removal established via electron microscopy and spectroscopy: a case study on metal tolerant fungi *Penicillium simplicissimum*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 362, p. 394-402, 2019.
- CHI, B.-B.; LU, Y.-N.; YIN, P.-C.; LIU, H.-Y.; CHEN, H.-Y.; SHAN, Y. Sequencing and comparative genomic analysis of a highly metal-tolerant *Penicillium janthinellum* P1 provide insights into its metal tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 663217, p. 1-12, 2021.
- COPETTI, M. V. Fungi as industrial producers of food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, p. 52-56, 2019.
- CORDEIRO, M. C.; GARCIA, G. D.; ROCHA, A. M.; TSCHOEKE, D. A.; CAMPEÃO, M. E.; APPOLINARIO, L. R.; SOARES, A. C.; LEOMIL, L.; FROES, A.; BAHIANSE, L.; REZENDE, C. E.; DE ALMEIDA, M. G.; RANGEL, T. P.; DE OLIVEIRA, B. C. V.; DE ALMEIDA, D. Q. R.; THOMPSON, M. C.; THOMPSON, C. C.; THOMPSON, F. L. Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 1209-1217, 2019.
- DE CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.
- DE FREITAS, G. R.; DA SILVA, M. G. C.; VIEIRA, M. G. A. Biosorption technology for removal of toxic metals: a review of commercial biosorbents and patents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 19097-19118, 2019.
- DI, Z.; CHAOYANG, L.; MENGXI, Z.; YUNLIN, Z.; ZHENGANG, X.; GUIYAN, Y. *Curvularia coatesiae* XK8, a potential bioadsorbent material for adsorbing Cd(II) and Sb(III) compound pollution: characteristics and effects. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 816312, 2022.
- DOS SANTOS, G. F.; LIMA, G. S.; OLIVEIRA, G. P.; SOUZA FILHO, J. D.; AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E.; TAKAHASHI, J. A. New AChE inhibitors from microbial transformation of trachyloban-19-oic acid by *Syncephalastrum racemosum*. **Bioorganic Chemistry**, v. 79, p. 60-63, 2018.
- DOS SANTOS, G. F.; TAKAHASHI, J. A. A new acetylcholinesterase inhibitor from green glycosylation of trachyloban-19-oic acid by *Mucor plumbeus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1961-1969, 2017.
- DOUMAS, P.; MUNOZ, M.; BANNI, M.; BECERRA, S.; BRUNEEL, O.; CASIOT, C.; CLEYET-MAREL, J.-C.; GARDON, J.; NOACK, Y.; SAPPIN-DIDIER, V. Polymetallic pollution from abandoned mines in Mediterranean regions: a multidisciplinary approach to environmental risks. **Regional Environmental Change**, v. 18, p. 677-692, 2018.
- EBELE, A. J.; ABDALLAH, M. A.-E.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, p. 1-16, 2017.
- ESKANDARIA, S.; SHARIFNABI, B. Foliar spray time affects the efficacy of applied manganese on enhancing cucumber resistance to *Podospaera fuliginea*. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108780, 2020.
- FERRANDO-CLIMENT, L.; COLLADO, N.; BUTTIGLIERI, G.; GROS, M.; RODRIGUEZ-RODA, I.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D. Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 404-413, 2012.

FERREIRA, Márcia Miguel Castro. **Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

FETSE, J. P.; KOFIE, W.; ADOSRAKU, R. K. Ethnopharmacological importance of *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) - a review. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2016.

FONSECA, F. V.; LINHARES, A. M. F.; SILVA, J. R. P.; SILVA, L. L. S.; BASSIN, I. D.; BASSIN, J. P.; KRONEMBERGER, F. A.; HABERT, A. C.; BORGES, C. P. Assessing water quality of Paraopeba River (Minas Gerais, Brazil) after the rupture of tailings dam. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2022.

FREITAS, C. M. de; BARCELLOS, C.; ASMUS, C. I. R. F.; SILVA, M. A. da; XAVIER, D. R. From Samarco in Mariana to Vale in Brumadinho: mining dam disasters and public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 5, p. e00052519, 2019.

GAN, J. S.; BILAL, M.; LI, X. B.; SHAH, S. Z. H.; MOHAMED, B. A.; HADIBARATA, T.; CHENG, H. Peroxidases-based enticing biotechnological platforms for biodegradation and biotransformation of emerging contaminants. **Chemosphere**, v. 307, n. 136035, 2022.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147-156, 2015.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; PLOEG, M. van der; ZEE, S. E. A. T. M. van der; RITSEMA, C. J. Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57-65, 2015.

GRABARCZYK, Ł.; MULKIEWICZ, E.; STOLTE, S.; PUCKOWSKI, A.; PAZDA, M.; STEPNOWSKI, P.; BIAŁK-BIELIŃSKA, A. Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 26103-26114, 2020.

HANSON, James Ralph. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**. Oxford: W. H. Freeman Spektrum, 1995. 92p.

HEINE, G.; MAX, J. F. J.; FÜHRS, H.; MORAN-PUENTE, D. W.; HEINTZ, D.; HORST, W. J. Effect of manganese on the resistance of tomato to *Pseudocercospora fuligena*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, n. 5, p. 827-836, 2011.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, n. 1, p. 1-51, 2011.

HSU, F.-L.; HOU, C.-C.; YANG, L.-M.; CHENG, J.-T.; CHI, T.-C.; LIU, P.-C.; LIN, S.-J. Microbial transformations of isosteviol. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 3, 2002.

HUSSAIN, A.; PRIYADARSHI, M.; QURESHI, F.; AHMED, S. Risk assessment on human health with effect of heavy metals. **Applied Water Science**, v. 1, p. 401-419, 2021.

IMF – International Monetary Fund, 2022. Disponível em: <https://www.imf.org/external/datamapper/NGDPD@WEO/OEMDC/ADVEC/WEOWORLD/CH> N. Acesso em: 6 dez. 2022.

- ISKANDAR, N. L.; ZAINUDIN, N. A. I. M.; TAN, S. G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 5, p. 824-830, 2011.
- ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-MEDINA, S.; NERI-CRUZ, N.; DUBLÁN-GARCÍA, O. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 5157-5166, 2014.
- JIA, Y.; YIN, L.; KHANAL, S. K.; ZHANG, H.; OBEROI, A. S.; LU, H. Biotransformation of ibuprofen in biological sludge systems: Investigation of performance and mechanisms. **Water Research**, v. 170, n. 115303, 2020.
- JIAO, J.; GAI, Q.-Y.; WANG, W.; ZANG, Y.-P.; NIU, L.-L.; FU, Y.-J.; WANG, X. Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*. **Industrial Crops & Products**, v. 112, p. 252-261, 2018.
- KAPAH, M.; SACHDEVA, S. Bioremediation options for heavy metal pollution. **Journal of Health & Pollution**, v. 9, n. 24, p. 1-20, 2019.
- KASONGA, T. K.; COETZEE, M. A. A.; KAMIKA, I.; NGOLE-JEME, V. M.; MOMBA, M. N. B. Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 277, n. 111485, 2021.
- KLENK, J. M.; KONTRY, L. H.; ESCOBEDO-HINOJOSA, W.; NEBEL, B. A.; HAUER, B. Oxyfunctionalization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by filamentous-fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 724-738, 2019.
- KRISHNAN, R. Y.; MANIKANDAN, S.; SUBBAIYA, R.; BIRUNTHA, M.; BALACHANDAR, R.; KARMEGAM, N. Origin, transport and ecological risk assessment of illicit drugs in the environment – a review. **Chemosphere**, v. 311, n. 137091, 2023.
- KUMAR, A.; YADAV, A. N.; MONDAL, R.; KOUR, D.; SUBRAHMANYAM, G.; SHABNAM, A. A.; KHAN, S. A.; YADAV, K. K.; SHARMA, G. K.; CABRAL-PINTO, M.; FAGODIYA, R. K.; GUPTA, D. K.; HOTA, S.; MALYAN, S. K. Myco-remediation: a mechanistic understanding of contaminants alleviation from natural environment and future prospect. **Chemosphere**, v. 284, n. 131325, 2021.
- KUMAR, M.; SRIDHARAN, S.; SAWARKAR, A. D.; SHAKEEL, A.; ANERAO, P.; MANNINA, G.; SHARMA, P.; PANDEY, A. Current research trends on emerging contaminants pharmaceutical and personal care products (PPCPs): a comprehensive review. **Science of the Total Environment**, v. 859, n. 160031, 2023.
- KUMAR, V.; DWIVEDI, S. K. Bioremediation mechanism and potential of copper by actively growing fungus *Trichoderma lixii* CR700 isolated from electroplating wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 277, p. 111370, 2021.
- KÜMMERER, K.; CLARK, J. Green and Sustainable Chemistry. *In*: HEINRICHS, H.; MARTENS, P.; MICHELSEN, G.; WIEK, A. (ed.). **Sustainability Science - An Introduction**. Netherlands: Springer, 2016.
- LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 4, p. 1393-1417, 2009.

LI, C.-Y.; CHUNG, Y.-M.; WU, Y.-C.; HUNYADI, A.; WANG, C. C. C.; CHANG, F.-R. Natural products development under epigenetic modulation in fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, p. 1323-1340, 2020.

LI, Y.; WANG, L.; ZHENG, M.; LIN, Y.; XU, H.; LIU, A.; HUA, Y.; JIANG, Y.; NING, K.; HU, S. Thin-layer chromatography coupled with HPLC-DAD/UHPLC-HRMS for target and non-target determination of emerging halogenated organic contaminants in animal-derived foods. **Food Chemistry**, v. 404, n. 134678, 2023.

LIAO, K.; PICKEL, T. C.; BOYARSKIKH, V.; BACSA, J.; MUSAEV, D. G.; DAVIES, H. M. L. Site-selective and stereoselective functionalization of non-activated tertiary C–H bonds. **Nature**, v. 551, p. 609-613, 2017.

LIMA, G. S.; ROCHA, A. M.; SANTOS, G. F.; SILVA, A. F.; MARRIEL, I. E.; TAKAHASHI, J. A. Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors. **Phytochemistry Letters**, v. 24, p. 39-45, 2018a.

LIMA, M. T. N. S.; DOS SANTOS, L. B.; BASTOS, R. W.; NICOLI, J. R.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 169-176, 2018b.

LIU, B.; LIU, Q.; ZHOU, Z.; YIN, H.; XIE, Y.; WEI, Y. Two terpene synthases in resistant *Pinus massoniana* contribute to defence against *Bursaphelenchus xylophilus*. **Plant, Cell & Environment**, v. 44, n. 1, p. 257-274, 2020.

LLORCA, M.; LUCAS, D.; FERRANDO-CLIMENT, L.; BADIA-FABREGAT, M.; CRUZ-MORATÓ, C.; BARCELÓ, D.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. Suspect screening of emerging pollutants and their major transformation products in wastewaters treated with fungi by liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1439, p. 124-136, 2016.

LÖFFLER, D.; RÖMBKE, J.; MELLER, M.; TERNES, T. A. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, p. 5209-5218, 2005.

MAHMOUD, M. E.; EL ZOKM, G. M.; FARAG, A. E. M.; ABDELWAHAB, M. S. Assessment of heat-inactivated marine *Aspergillus flavus* as a novel biosorbent for removal of Cd(II), Hg(II), and Pb(II) from water. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, n. 22, p. 18218-18228, 2017.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 100, p. 38-44, 2012.

MALI, H.; SHAH, C.; RAGHUNANDAN, B. H.; PRAJAPATI, A. S.; PATEL, D. H.; TRIVEDI, U.; SUBRAMANIAN, R. B. Organophosphate pesticides an emerging environmental contaminant: pollution, toxicity, bioremediation progress, and remaining challenges. **Journal of Environmental Sciences**, v. 127, p. 234-250, 2023.

MALVAR, J. L.; SANTOS, J. L.; MARTÍN, J.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Routine analytical method for monitoring the main metabolites for a recurrent group of parabens and pharmaceuticals in wastewater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, p. 6625-6635, 2019.

MALVAR, J. L.; SANTOS, J. L.; MARTÍN, J.; APARICIO, I.; FONSECA, T. G.; BEBIANNO, M. J.; ALONSO, E. Ultrasound-assisted extraction as an easy-to-perform analytical methodology for monitoring ibuprofen and its main metabolites in mussels. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, p. 5877-5886, 2022.

MANNINA, G.; GULHAN, H.; NI, B.-J. Water reuse from wastewater treatment: The transition towards circular economy in the water sector. **Bioresource Technology**, v. 363, p. 127951, 2022.

MARASCHI, A. C.; MARQUES, J. A.; COSTA, S. R.; VIEIRA, C. E. D.; GEIHS, M. A.; COSTA, P. G.; MARTINS, C. M. G.; SANDRINI, J. Z.; BIANCHINI, A.; SOUZA, M. M. Marine shrimps as biomonitors of the Fundão (Brazil) mine dam disaster: a multi-biomarker approach. **Environmental Pollution**, v. 305, p. 119245, 2022.

MARCHLEWICZ, A.; GUZIK, U.; SMUŁEK, W.; WOJCIESZYŃSKA, D. Exploring the degradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): the new pathway and factors affecting degradation. **Molecules**, v. 22, n. 1676, p. 1-17, 2017.

MARCO-URREA, E.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; VICENT, T.; CAMINAL, G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 74, p. 765-772, 2009.

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

MAZUR, Y. Functionalization of non-activated carbon atoms. **Pure and Applied Chemistry**, v. 41, n. 1-2, p. 145-166, 1975.

MILAGRE, H. M. S.; MARTINS, L. R.; TAKAHASHI, J. A. Novel agents for enzymatic and fungal hydrolysis of stevioside. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 367-372, 2009.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5. ed. Harlow: Pearson Education England, 2005.

MORI, K. C(sp³)-H Bond functionalization mediated by hydride a shift/cyclization system. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 95, n. 2, p. 296-305, 2022.

MORIN-SARDIN, S.; NODET, P.; COTON, E.; JANY, J.-L. *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, p. 12-32, 2017.

MOTA, P. J.; ALONZO, H. G. A.; ANDRÉ, L. C.; CÂMARA, V. M.; CAMPOLINA, D.; SANTOS, A. S. E.; FRÓES-ASMUS, C. I. R.; PEIXOTO, S. V. Prevalence of metal levels above the reference values in a municipality affected by the collapse of a mining tailings dam: Brumadinho Health Project. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 25, n. e220014, p. 1-8, 2022.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 75, n. 100906, 2020.

NGUYEN, L. H.; NGUYEN, B.-S.; LE, D.-T.; ALOMAR, T. S.; ALMASOUD, N.; GHOTEKAR, S.; OZA, R.; RAIZADA, P.; SINGH, P.; NGUYEN, V.-H. A concept for the biotechnological minimizing of emerging plastics, micro- and nano-plastics pollutants from the environment: a review. **Environmental Research**, v. 216(Part 1), n. 114342, 2023.

NORMAN, 2016. Disponível em: <https://www.norman-network.com/>. Acesso em: 30 abr. 2020.

OECD – Organisation for Economic Cooperation and Development. Health at a Glance 2019: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris, 2019.

OLICÓN-HERNÁNDEZ, D. R.; CAMACHO-MORALES, R. L.; POZO, C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; ARANDA, E. Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus *Penicillium oxalicum* at flask and bench bioreactor scales. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 607-614, 2019.

OLIVEIRA, G. C.; BROETTO, S. G.; PEREIRA, O. J.; PENHA, J. S.; LOPES, N. G. M.; SILVA, D. M. Effects of different levels of metal exposure and precipitation regimes on chlorophyll a fluorescence parameters in a coastal Brazilian restinga species. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 12, p. 100153, 2022a.

OLIVEIRA, G. P.; BARRETO, D. L. C.; SILVA, M. R.; AUGUSTI, R.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. P.; TAKAHASHI, J. A. Biotic stress caused by *in vitro* co-inoculation enhances the expression of acetylcholinesterase inhibitors by fungi. **Natural Product Research**, v. 36, n. 16, p. 4266-4270, 2022b.

ORLANDO, M. T. D'A.; GALVÃO, E. S.; CAVICHINI, A. S.; RANGEL, C. V. G. T.; ORLANDO, C. G. P.; GRILO, C. F.; SOARES, J.; OLIVEIRA, K. S. S.; SÁ, F.; COSTA JUNIOR, A.; BASTOS, A. C.; QUARESMA, V. S. Tracing iron ore tailings in the marine environment: an investigation of the Fundão dam failure. **Chemosphere**, v. 257, n. 127184, 2020.

ORTÚZAR, M.; ESTERHUIZEN, M.; OLICÓN-HERNÁNDEZ, D. R.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; ARANDA, E. Pharmaceutical pollution in aquatic environments: a concise review of environmental impacts and bioremediation systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 869332, 2022.

OSOBAJO, A. O.; OTITOJU, A.; OTITOJU, M. A.; OKE, A. The impact of energy consumption and economic growth on carbon dioxide emissions. **Sustainability**, v. 12, n. 19, p. 7965, 2020.

OUARDA, Y.; BOUCHARD, F.; AZAÏS, A.; VAUDREUIL, M.-A.; DROGUI, P.; TYAGI, R. D.; SAUVÉ, S.; BUELNA, G.; DUBÉ, R. Electrochemical treatment of real hospital wastewaters and monitoring of pharmaceutical residues by using surrogate models. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.7, n. 5, p. 103332, 2019.

PAÍGA, P.; LOLIĆ, A.; HELLEBUYCK, F.; SANTOS, L. H. M. L. M.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C. Development of a SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 61-70, 2015.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. Tradução de Pedro Barros e Roberto Torrejon. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2020. 733 p.

PEIXOTO, P. V. L.; DE ANDRADE, Í. B. L.; SALES, B. C. P.; PEREIRA, L. C. Rupture of Brumadinho dam (Minas Gerais, Brazil): embryotoxicity in zebrafish induced by metal mixture-contaminated water. **Journal of Environmental Science and Health, Part B - Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 57, n. 6, p. 479-488, 2022.

PENÃ-GUZMÁN, C.; ULLOA-SÁNCHEZ, S.; MORA, K.; HELENA-BUSTOS, R.; LOPEZ-BARRERA, E.; ALVAREZ, J.; RODRIGUEZ-PINZÓN, M. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: a review of the current literature. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 408-423, 2019.

PLATAFORMA AGENDA 2030, 2015. Disponível em: <http://www.agenda2030.com.br/>. Acesso em: 30 abr. 2020.

PONÇANO, V. M. L.; PLONSKI, G. A. Water quality network bridging regulation, technology and society in Brazil. **WIT Transactions on Ecology and the Environment**, v. 216, p. 221-228, 2017.

PORSANI, J. L.; JESUS, F. A. N. de; STANGARI, M. C. GPR Survey on an iron mining area after the collapse of the tailings Dam I at the Córrego do Feijão mine in Brumadinho-MG, Brazil. **Remote Sensing**, v. 11, n. 7, p. 860, 2019.

POUDEL, A.; GACHUMI, G.; PURVES, R.; BADEA, I.; EL-ANEED, A. Determination of phytosterol oxidation products in pharmaceutical liposomal formulations and plant vegetable oil extracts using novel fast liquid chromatography - Tandem mass spectrometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 1194, n. 339404, 2022.

QUADRA, G. R.; ROLAND, F.; BARROS, N.; MALM, O.; LINO, A. S.; AZEVEDO, G. M.; THOMAZ, J. R.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PRAÇA-FONTES, M. M.; ALMEIDA, R. M.; MENDONÇA, R. F.; CARDOSO, S. J.; GUIDA, Y. S.; CAMPOS, J. M. S. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2019.

QUEIROZ, H. M.; NÓBREGA, G. N.; FERREIRA, T. O.; ALMEIDA, L. S.; ROMERO, T. B.; SANTAELLA, S. T.; BERNARDINO, A. F.; OTERO, X. L. The Samarco mine tailing disaster: A possible time-bomb for heavy metals contamination? **Science of the Total Environment**, v. 637-638, p. 498-506, 2018.

QUEIROZ, H. M.; RUIZ, F.; DENG, Y.; SOUZA JÚNIOR, V. S.; FERREIRA, A. D.; OTERO, X. L.; CAMÉLO, D. L.; BERNARDINO, A. F.; FERREIRA, T. O. Mine tailings in a redox-active environment: Iron geochemistry and potential environmental consequences. **Science of the Total Environment**, v. 807, p. 151050, 2022.

RAINSFORD, K. D. Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 275-342, 2009.

RAMRAKHIANI, L.; GHOSH, L.; MAJUMDAR, S. Surface modification of naturally available biomass for enhancement of heavy metal removal efficiency, upscaling prospects, and management aspects of spent biosorbents: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 1, p. 41-78, 2016.

RASHEED, O. K.; SUN, B. Advances in development of C-H activation/functionalization using a catalytic directing group. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 21, p. 5689-5708, 2018.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.-H.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, p. 1055-1073, 2011.

REIS, A. C.; KOLVENBACH, B. A.; NUNES, O. C.; CORVINI, P. F. X. Biodegradation of antibiotics: the new resistance determinants – part I. **New Biotechnology**, v. 54, p. 34-51, 2020.

REIS, D. A. dos; FONGARO, G.; LANNA, M. C. da S.; DIAS, L. C. P.; SANTIAGO, A. da F. The relationship between human adenovirus and metals and semimetals in the waters of the Rio Doce, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, n. 1, p. 144-153, 2019.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 236-301, 2000.

ROUSSAK, O. V.; GESSER, H. D. **Applied Chemistry: a Textbook for Engineers and Technologists**. 2. ed. Boston, MA: Springer, 2013.

ROUT, C.; NAIF, S. R.; BENIWAL, V. Sorption potential of *Penicillium janthinellum* for removal of Cu(II) from electroplating industrial effluent. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 847-858, 2013.

SALEM, D. M. S. A.; MOAWAD, M. N.; EL-SAYED, A. A. M. Comparative study for bioremediation of cobalt contaminated aqueous solutions by two types of marine macroalgae. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 47, p. 13-19, 2021.

SÁNCHEZ-ACEVES, L.; PÉREZ-ALVAREZ, I.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; ISLAS-FLORES, H.; BARCELÓ, D. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of ibuprofen and aluminum alters oxidative stress status on *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 248, n. 109071, 2021.

SARAVANAN, A.; KUMAR, P. S.; HEMAVATHYD, R. V.; JEEVANANTHAMD, S.; HARIKUMARD, P.; PRIYANKA, G.; DEVAKIRUBAI, D. R. A. comprehensive review on sources, analysis and toxicity of environmental pollutants and its removal methods from water environment. **Science of the Total Environment**, v. 812, p. 152456, 2022.

SCHETTINI, C. A. F.; HATJE, V. The suspended sediment and metals load from the Mariana's tailing dam failure to the coastal sea. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 16, p. 661-668, 2020.

SEGURA, F. R.; NUNES, E. A.; PANIZ, F. P.; PAULELLI, A. C. C.; RODRIGUES, G. B.; BRAGA, G. U. L.; PEDREIRA FILHO, W. R.; BARBOSA JR., F.; CERCHIARO, G.; SILVA, F. F.; BATISTA, B. L. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813-825, 2016.

SHARMA, P.; BANO, A.; SINGH, S. P.; SHARMA, S.; XIA, C.; NADDA, A. K.; LAM, S. S.; TONG, Y. W. Engineered microbes as effective tools for the remediation of polyaromatic aromatic hydrocarbons and heavy metals. **Chemosphere**, v. 306, n. 135538, 2022.

SHARMA, R.; TALUKDAR, D.; BHARDWAJ, S.; JAGLAN, S.; KUMAR, R.; KUMAR, R.; AKHTAR, M. S.; BENIWAL, V.; UMAR, A. Bioremediation potential of novel fungal species isolated from wastewater for the removal of lead from liquid medium. **Environmental Technology & Innovation**, v. 18, p. 100757, 2020.

SINGH, P.; KAPKOTI, D. S.; SINGH, N.; TEWARI, R.; SAIKIA, D.; ROUT, P. K.; PANDEY, R.; BHAKUNI, R. S. Biotransformation of artemisinic acid by the fungus *Trichothecium roseum* and anti-candidal activity of its metabolites. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 4, p. 304-309, 2019.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. John Wiley & Sons, 2005.

SÓDRE, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, p. 57-67, 2010.

SU, C.-L.; LAU, S. H.; YEH, H.-Y.; CHANG, Y.-T. Biological treatment of benzophenone-type UV filter wastewater in a sequencing batch reactor (SBR). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 177, n. 105534, 2023.

TALUKDAR, D.; JASROTIA, T.; SHARMA, R.; JAGLAN, S.; KUMAR, R.; VATS, R.; KUMAR, R.; MAHNASHI, M. H.; UMAR, A. Evaluation of novel indigenous fungal consortium for enhanced bioremediation of heavy metals from contaminated sites. **Environmental Technology & Innovation**, v. 20, p. 101050, 2020.

TAKAHASHI, J.; DOS SANTOS, L. G. S.; LYRA, F. H.; DA SILVA-HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAKAHASHI, J. A.; CONTIGLI, C.; MARTINS, B. A.; LIMA, M. T. N. S. Fungal Metabolites: Advances in Contemporary Industrial Scenario. *In*: DESHMUKH, S. K.; SRIDHAR, K. R.; BADALYAN, S. M. (ed.). **Fungal Biotechnology Prospects and Avenues**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2022. p. 87-129.

TAKAHASHI, J. A.; GOMES, D. C.; LYRA, F. H.; DOS SANTOS, G. F.; MARTINS, L. R. The remarkable structural diversity achieved in *ent*-kaurane diterpenes by fungal biotransformations. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1856-1886, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 616-618, 2001.

TORRES-MENDOZA, D.; ORTEGA, H. E.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 58, p. 1-25, 2020.

THOMPSON, F.; DE OLIVEIRA, B. C.; CORDEIRO, M. C.; MASI, B. P.; RANGEL, T. P.; PAZ, P.; FREITAS, T.; LOPES, G.; SILVA, B. S.; CABRAL, A. S.; SOARES, M.; LACERDA, D.; VERGILIO, C. dos S.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; THOMPSON, C.; de REZENDE, C. E. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of the Total Environment**, v. 705, 135914, 2020.

TILLE, P. M. Hyaline Molds, Mucorales, Entomophthorales, Dermatophytes, and Opportunistic and Systemic Mycoses. *In*: **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 14. ed. Mosby: Elsevier Health Sciences, 2016. p. 796.

ULLAH, A.; MUNIR, S.; MABKHOT, Y.; BADSHAH, S. L. Bioactivity profile of the diterpene isosteviol and its derivatives. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 678, 2019.

UNICEF - United Nations Children's Fund. Water, sanitation and hygiene. Annual Results Report 2017, 2018.

UNITED NATIONS, 2015. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/>. Acesso em: 30 abr. 2020.

VALENTI, V. E.; GARNER, D. M. Cardiovascular risks in subjects exposed to the Brumadinho dam collapse, Minas Gerais, Brazil. **Clinics**, v. 74, p. e1301, 2019.

VAN BAY, N. Influence of real GDP growth rate, industrialization, energy consumption on carbon dioxide emissions: an evidence from Vietnam. **American Journal of Environmental Protection**, v. 8, n. 1, p. 10-16, 2020.

VERGILIO, C. S.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V.; SARTORI, E.; CAMPOS, G. M.; PEREIRA, A. L. S.; AGUIAR, D. B.; SOUZA, T. S.; ALMEIDA, M. G.; THOMPSON, F.; REZENDE, C. E. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5936, 2020.

VIEIRA, Mariano George Sousa. **Estudo químico de *Xylopia nitida* Dunal (Annonaceae)**. 2010. Dissertação (Mestre em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

VIEIRA, M. G. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Chemical composition of *Xylopia nitida*: Diterpenes and alkaloids. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 95, n. 104229, 2021.

VORMITTAG, E.; SALDIVA, P.; ANASTACIO, A.; BARBOSA JR., F. High levels of metals/metalloids in blood and urine of residents living in the area affected by the dam failing in Barra Longa, District, Brazil: a preliminary human biomonitoring study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 83, p. 103566, 2021.

VOUMIK, L. C.; SULTANA, T. Impact of urbanization, industrialization, electrification and renewable energy on the environment in BRICS: fresh evidence from novel CS-ARDL model. **Heliyon**, v. 8, p. e11457, 2022.

WANG, Y.; XIANG, L.; HUANG, Y.; YI, X.; HE, X. Microbial transformation of laxogenin by the fungus *Syncephalastrum racemosum*. **Tetrahedron**, v. 75, p. 1440-1449, 2019.

XU, J.; CHEN, G.-L.; SUN, X.-Z.; FAN, X.-W.; YOU-ZHI, L. Paths and determinants for *Penicillium janthinellum* to resist low and high copper. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10590, 2015.

YAMAGUCHI, J.; YAMAGUCHI, A. D.; ITAMI, K. C-H bond functionalization: emerging synthetic tools for natural products and pharmaceuticals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 36, p. 8960-9009, 2012.

YANG, Y.; LI, Z. Evolving P450_{pyr} monooxygenase for regio- and stereoselective hydroxylations. **Chimia**, v. 69, n. 3, p. 136-141, 2015.

YOSHINO, T. Enantioselective C–H functionalization using high-valent group 9 metal catalysts. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 95, n. 8, p. 1280-1288, 2022.

ZAHMATKESH, S.; BOKHARI, A.; KARIMIAN, M.; ZAHRA, M. M. A.; SILLANPÄÄ, M.; PANCHAL, H.; ALRUBAIE, A. J.; REZAKHANI, Y. A comprehensive review of various approaches for treatment of tertiary wastewater with emerging contaminants: What do we know? **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 884, p. 1-15, 2022.

ZAIN, M. E.; RAZAK, A. A.; EL-SHEIKH, H. H.; SOLIMAN, H. G.; KHALIL, A. M. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 280-286, 2009.

ZEBRAL, Y. D.; COSTA, P. G.; DE SOUZA, M. M.; BIANCHINI, A. Avian blood and feathers as biological tools to track impacts from trace-metals: Bioaccumulation data from the biggest environmental disaster in Brazilian history. **Science of the Total Environment**, v. 807, p. 151077, 2022.

ZHANG, W.; LI, Y.; PAN, L.; WANG, X.; FENG, Y.; ZHANG, X. Pine chemical volatiles promote dauer recovery of a pine parasitic nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 1-8, 2019.

ZNAD, H.; AWUAL, MD. R.; MARTINI, S. The utilization of algae and seaweed biomass for bioremediation of heavy metal-contaminated wastewater. **Molecules**, v. 27, n. 1275, p. 1-21, 2022.

APÊNDICES

Apêndice I – Teste F e teste t para remoção de Cu(II), Fe(II) e Mn(II) por *P. janthinellum* (PJ) e *S. racemosum* (SR). cal = calculado; tab = tabelado. IC = 95%

Cobre				
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes	
	PJ	SR		
Média	43,909131	51,028056	Média	43,9091 51,02806
Variância	621,29478	503,64294	Variância	621,295 503,6429
Observações	9	9	Observações	9 9
gl	8	8	Variância agrupada	562,469
F	1,2336017	F cal	Hipótese da diferença de média	0
P(F<=f) uni-caudal	0,386853		gl	16
F crítico uni-caudal	3,4381012	F tab	Stat t	-0,6368 t cal
			P(T<=t) uni-caudal	0,26665
			t crítico uni-caudal	1,74588
			P(T<=t) bi-caudal	0,53329
			t crítico bi-caudal	2,11991 t tab

Ferro				
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes	
	PJ	SR		
Média	55,963661	60,827337	Média	50,3867 55,95928
Variância	1782,7384	1060,5107	Variância	1839,82 1141,228
Observações	8	8	Observações	9 9
gl	7	7	Variância agrupada	1490,52
F	1,6810187	F cal	Hipótese da diferença de média	0
P(F<=f) uni-caudal	0,2547739		gl	16
F crítico uni-caudal	3,7870435	F tab	Stat t	-0,3062 t cal
			P(T<=t) uni-caudal	0,3817
			t crítico uni-caudal	1,74588
			P(T<=t) bi-caudal	0,76341
			t crítico bi-caudal	2,11991 t tab

Manganês				
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes	
	PJ	SR		
Média	30,966502	53,718898	Média	49,6565 55,95928
Variância	863,79173	319,68394	Variância	428,254 1141,228
Observações	8	8	Observações	9 9
gl	7	7	Variância agrupada	784,741
F	2,7020179	F cal	Hipótese da diferença de média	0
P(F<=f) uni-caudal	0,1065428		gl	16
F crítico uni-caudal	3,7870435	F tab	Stat t	-0,4773 t cal
			P(T<=t) uni-caudal	0,31981
			t crítico uni-caudal	1,74588
			P(T<=t) bi-caudal	0,63961
			t crítico bi-caudal	2,11991 t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| < F tab = aceita hipótese nula

Variâncias dos dados são iguais.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências dos fungos em remover os metais são estatisticamente iguais.

|t cal| < t tab = aceita hipótese nula

Eficiências dos fungos são iguais.

Apêndice II – Teste F e teste t para remoção de Fe(II) por biomassas frescas e secas de *P. janthinellum* na 1ª hora e após 24 h de experimento. cal = calculado; tab = tabelado. IC = 95%

<i>P. janthinellum</i>				
5 – 60 min				
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes	
	B. fresca	B. seca		
Média	14,45055522	36,24348818		
Variância	46,42078243	121,1045814		
Observações	5	5		
gl	4	4		
F	0,38331153	F cal		
P(F<=f) uni-caudal	0,187795752			
F crítico uni-caudal	0,156537812	F tab		
			Média	
			Variância	
			Observações	
			Hipótese da diferença de média	
			gl	
			Stat t	-3,764960291
			P(T<=t) uni-caudal	0,003514555
			t crítico uni-caudal	1,894578605
			P(T<=t) bi-caudal	0,007029109
			t crítico bi-caudal	2,364624252
				t cal
				t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| > F tab = rejeita hipótese nula

Variâncias dos dados são diferentes.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa na remoção de Fe(II) são estatisticamente iguais na 1ª hora.

|t cal| > t tab = rejeita hipótese nula

Eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa são diferentes na 1ª hora.

24 – 96 h				
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes	
	B. fresca	B. seca		
Média	95,30686237	94,2569647		
Variância	1,518563863	9,967552958		
Observações	4	4		
gl	3	3		
F	0,152350719	F cal		
P(F<=f) uni-caudal	0,07829164			
F crítico uni-caudal	0,107797789	F tab		
			Média	
			Variância	
			Observações	
			Hipótese da diferença de média	
			gl	
			Stat t	0,619569956
			P(T<=t) uni-caudal	0,284544227
			t crítico uni-caudal	2,131846786
			P(T<=t) bi-caudal	0,569088454
			t crítico bi-caudal	2,776445105
				t cal
				t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| > F tab = rejeita hipótese nula

Variâncias dos dados são diferentes.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa na remoção de Fe(II) são estatisticamente iguais após 24 h.

|t cal| < t tab = aceita hipótese nula

Eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa são iguais após 24 h.

Apêndice III – Teste F e teste t para remoção de Fe(II) por biomassas frescas e secas de *S. racemosum* na 1ª hora e após 24 h de experimento. cal = calculado; tab = tabelado. IC = 95%

<i>S. racemosum</i>					
5 – 60 min					
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	B. fresca	B. seca		B. fresca	B. seca
Média	28,34122	37,875001	Média	28,34121693	37,87500061
Variância	76,05	48,177008	Variância	76,05000027	48,17700763
Observações	5	5	Observações	5	5
gl	4	4	Variância agrupada	62,11350395	
F	1,578554	F cal	Hipótese da diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,334545		gl	8	
F crítico uni-caudal	6,388233	F tab	Stat t	-1,912679854	t cal
			P(T<=t) uni-caudal	0,046074883	
			t crítico uni-caudal	1,859548038	
			P(T<=t) bi-caudal	0,092149767	
			t crítico bi-caudal	2,306004135	t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| < F tab = aceita hipótese nula
Variâncias dos dados são iguais.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa na remoção de Fe(II) são estatisticamente iguais na 1ª hora.

|t cal| < t tab = aceita hipótese nula
Eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa são iguais na 1ª hora.

24 – 96 h					
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	B. fresca	B. seca		B. fresca	B. seca
Média	90,48187	87,159583	Média	90,48186937	87,15958285
Variância	81,53416	149,22957	Variância	81,53416499	149,2295692
Observações	4	4	Observações	4	4
gl	3	3	Hipótese da diferença de média	0	
F	0,546367	F cal	gl	6	
P(F<=f) uni-caudal	0,315959		Stat t	0,437404554	t cal
F crítico uni-caudal	0,107798	F tab	P(T<=t) uni-caudal	0,338561499	
			t crítico uni-caudal	1,943180281	
			P(T<=t) bi-caudal	0,677122999	
			t crítico bi-caudal	2,446911851	t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| > F tab = rejeita hipótese nula
Variâncias dos dados são diferentes.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa na remoção de Fe(II) são estatisticamente iguais após 24 h.

|t cal| < t tab = aceita hipótese nula
Eficiências dos diferentes tratamentos de biomassa são iguais após 24 h.

Apêndice IV – Teste F e teste t para remoção de Fe(II) por biomassas de *P. janthinellum* e *S. racemosum* em uso contínuo após 24 h ou com troca de biomassa a cada 24 h de experimento.

cal = calculado; tab = tabelado. IC = 95%

<i>P. janthinellum</i>					
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Contínuo	Troca		Contínuo	Troca
Média	95,306862	95,340141	Média	95,30686237	95,340141
Variância	1,5185639	15,201848	Variância	1,518563863	15,201848
Observações	4	4	Observações	4	4
gl	3	3	Variância agrupada	8,360205736	
F	0,0998934	F cal	Hipótese da diferença de média	0	
P(F<=f) uni-caudal	0,0451779		gl	6	
F crítico uni-caudal	0,1077978	F tab	Stat t	-0,016276823	t cal
			P(T<=t) uni-caudal	0,493770647	
			t crítico uni-caudal	1,943180281	
			P(T<=t) bi-caudal	0,987541294	
			t crítico bi-caudal	2,446911851	t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| < F tab = aceita hipótese nula

Variâncias dos dados são iguais.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências do uso contínuo e da troca de biomassas na remoção de Fe(II) após as primeiras 24 h são estatisticamente iguais.

|t cal| < t tab = aceita hipótese nula

Eficiências das diferentes formas de uso de biomassas são iguais.

<i>S. racemosum</i>					
Teste-F: duas amostras para variâncias			Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	Contínuo	Troca		Contínuo	Troca
Média	90,48187	91,7821	Média	90,4818694	91,7821
Variância	81,53416	190,9288	Variância	81,534165	190,92876
Observações	4	4	Observações	4	4
gl	3	3	Hipótese da diferença de média	0	
F	0,42704	F cal	gl	5	
P(F<=f) uni-caudal	0,251439		Stat t	-0,1575421	t cal
F crítico uni-caudal	0,107798	F tab	P(T<=t) uni-caudal	0,44049107	
			t crítico uni-caudal	2,01504837	
			P(T<=t) bi-caudal	0,88098214	
			t crítico bi-caudal	2,57058184	t tab

Teste F - Hipótese nula (H0) = variâncias dos dados são estatisticamente iguais.

|F cal| > F tab = rejeita hipótese nula

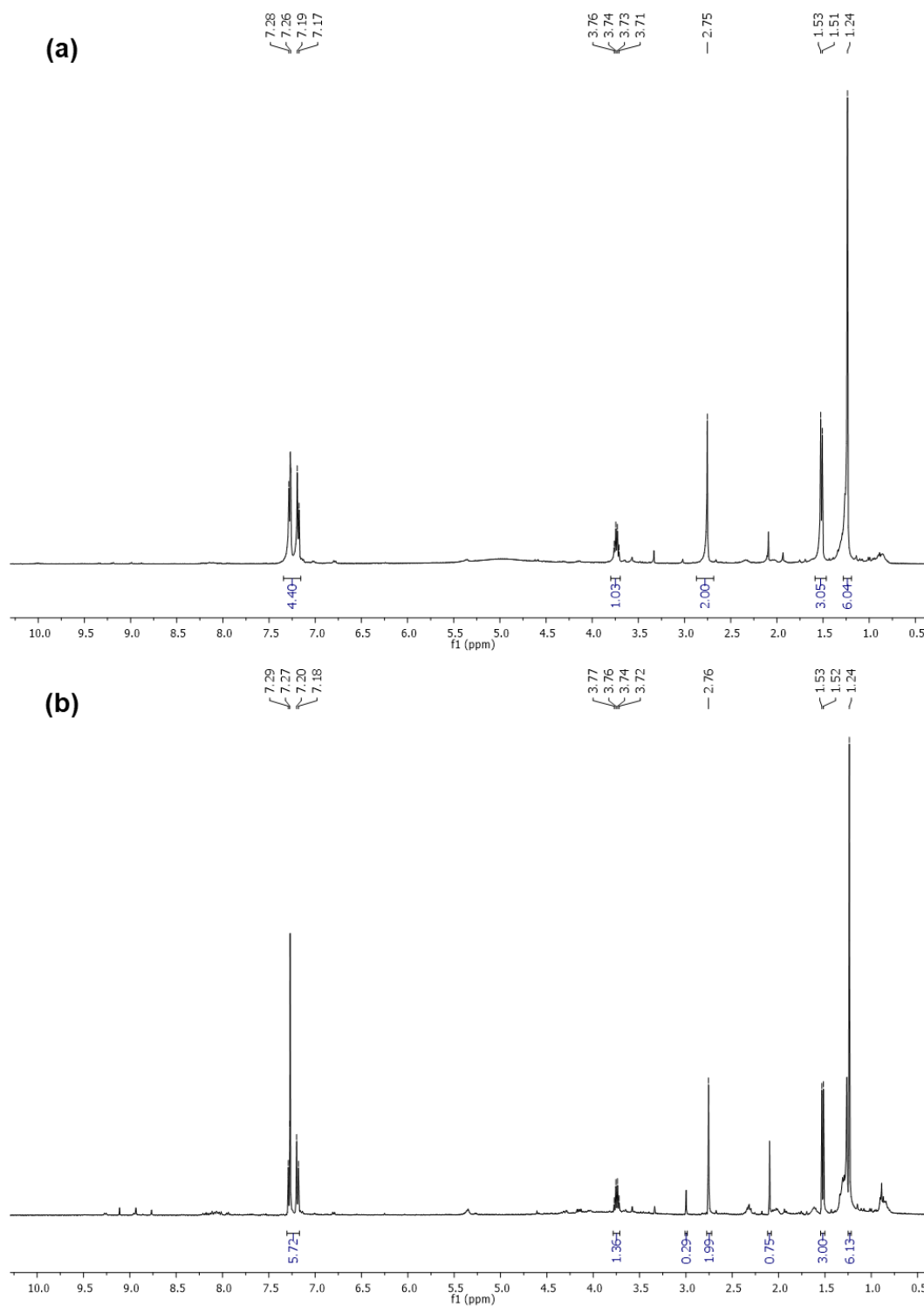
Variâncias dos dados são diferentes.

Teste t - Hipótese nula (H0) = eficiências do uso contínuo e da troca de biomassas na remoção de Fe(II) após as primeiras 24 h são estatisticamente iguais.

|t cal| < t tab = aceita hipótese nula

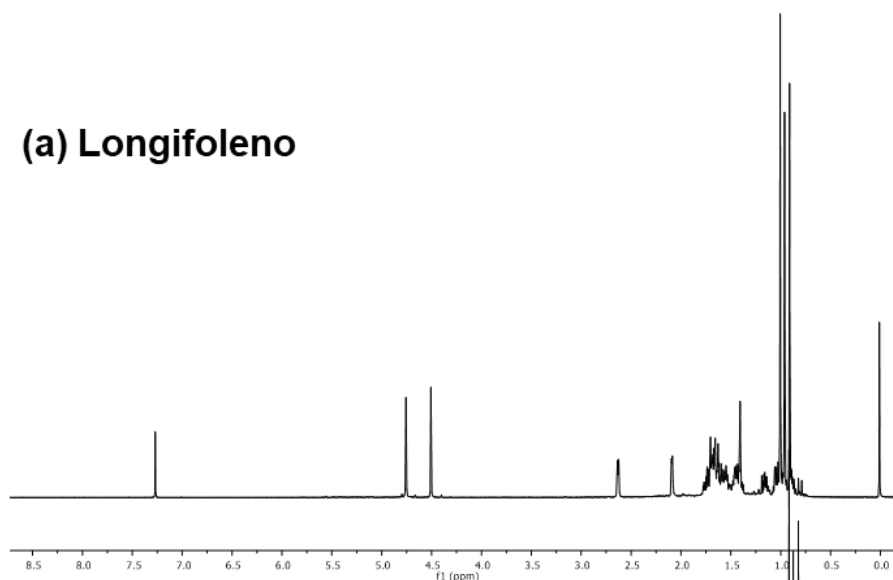
Eficiências das diferentes formas de uso de biomassas são iguais.

Apêndice V – Espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos após 10 dias de contato de *S. racemosum* com ibuprofeno e cloridrato de hidralazina, nas concentrações de (a) 100 e (b) 500 μM , em meio PDB (400 MHz, CDCl_3).

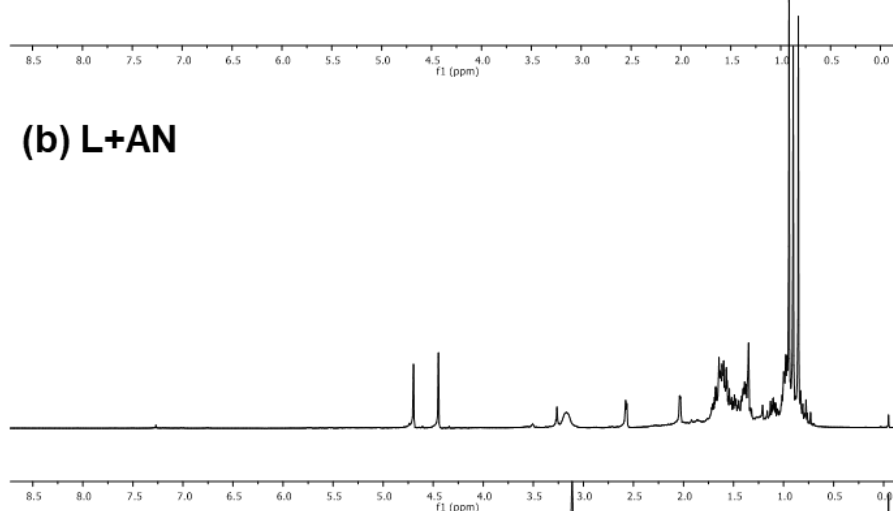


Apêndice VI – Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) dos extratos obtidos na triagem inicial do contato de ácido traquilobânico, isosteviol e (+)-longifoleno com *A. niger* (AN), *B. bassiana* (BB) e *S. racemosum* (SR). Círculos pontilhados/setas indicam regiões/sinais que inferem a presença de produtos de biotransformação.

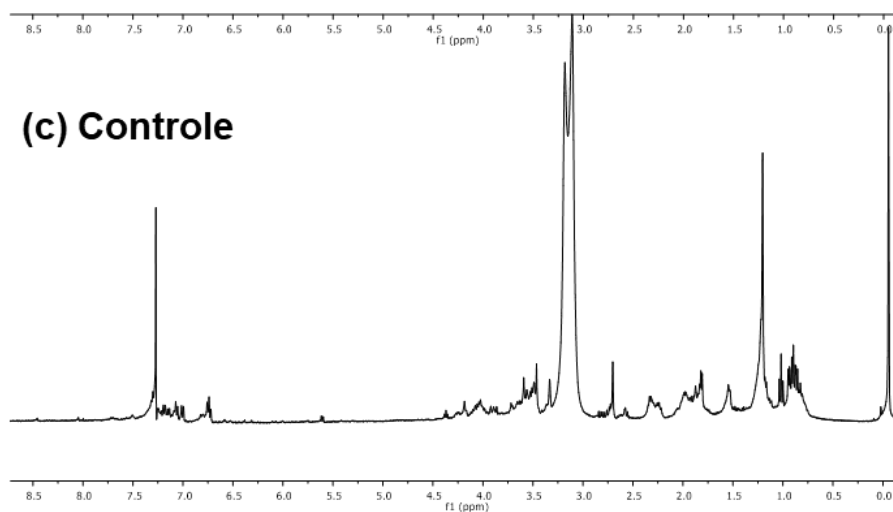
(a) Longifoleno

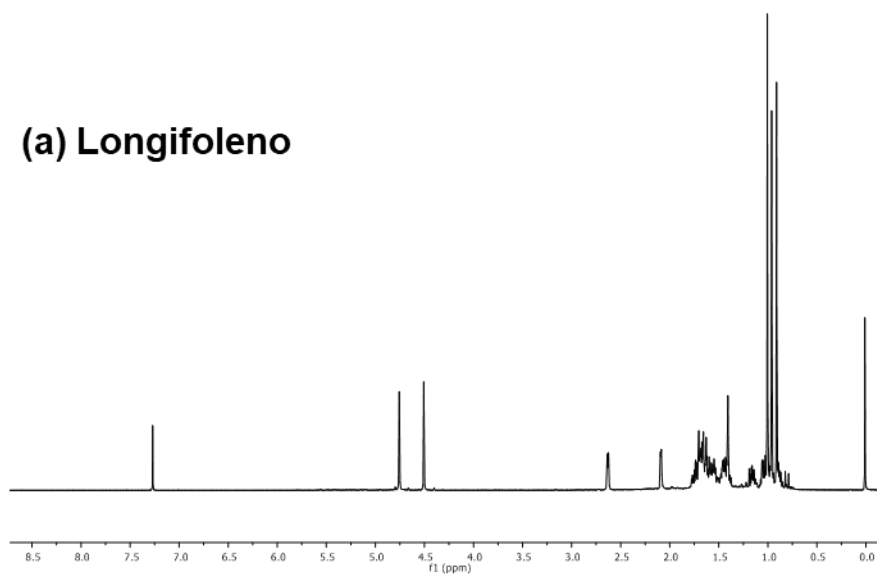
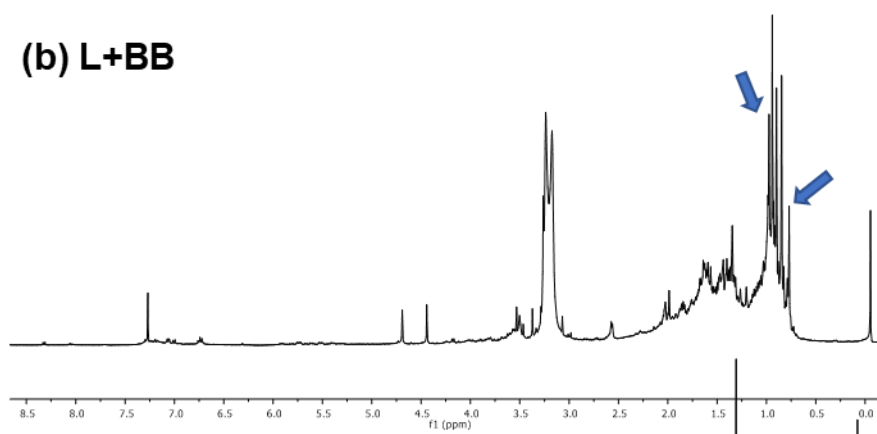
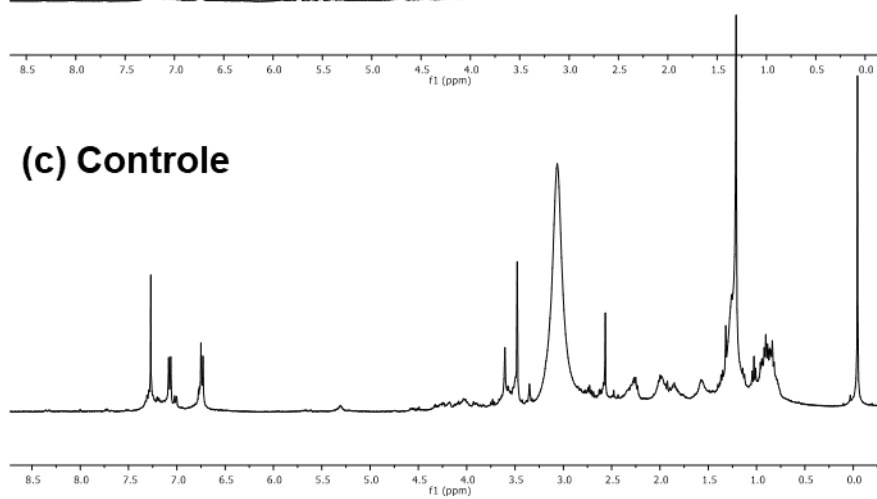


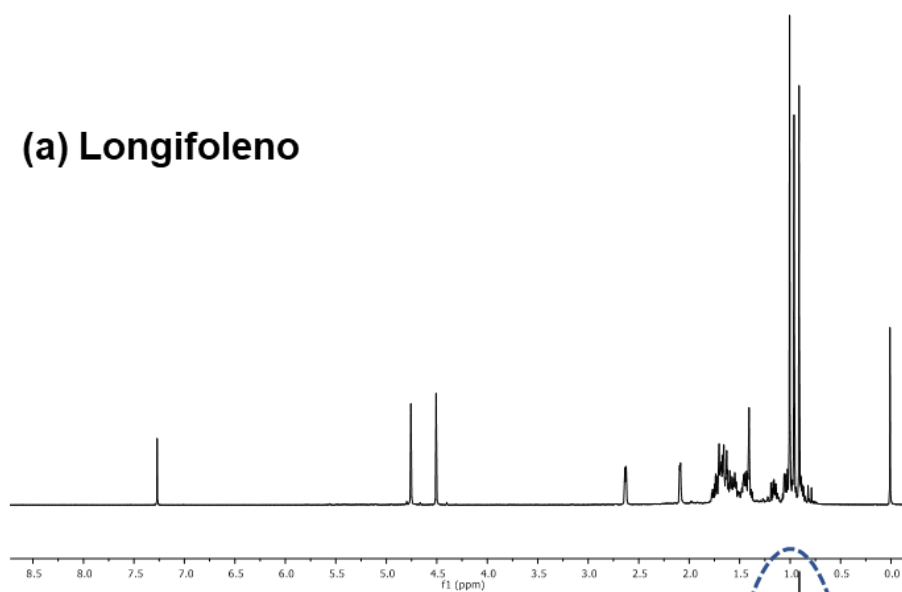
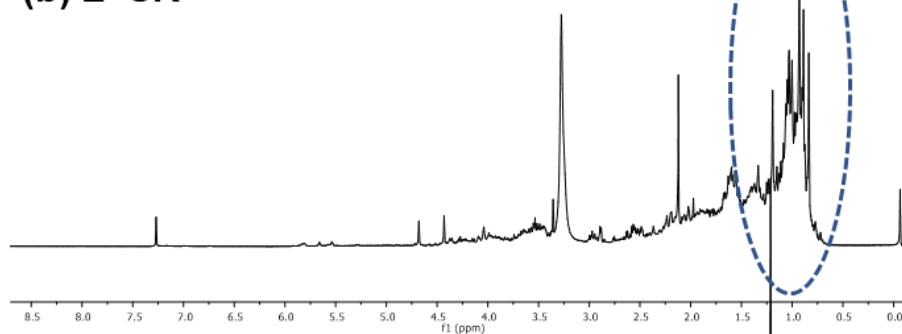
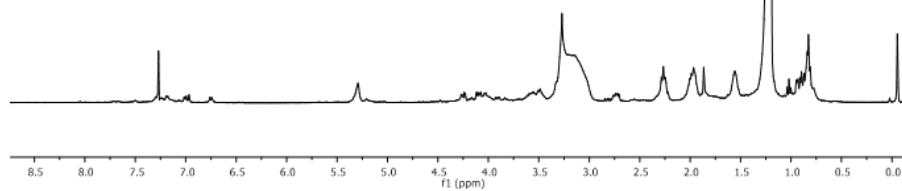
(b) L+AN

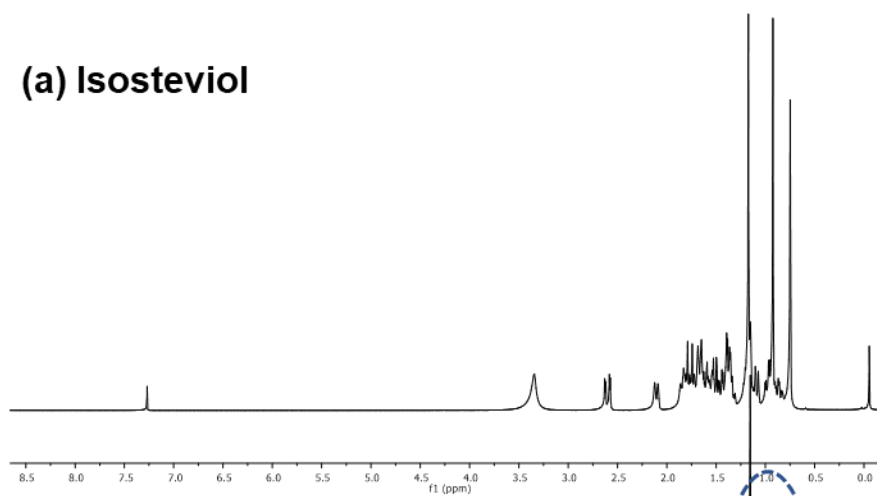
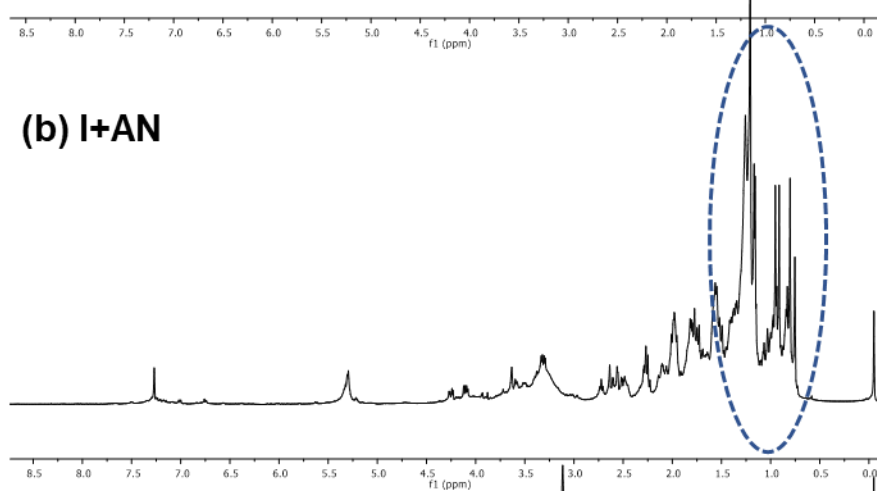
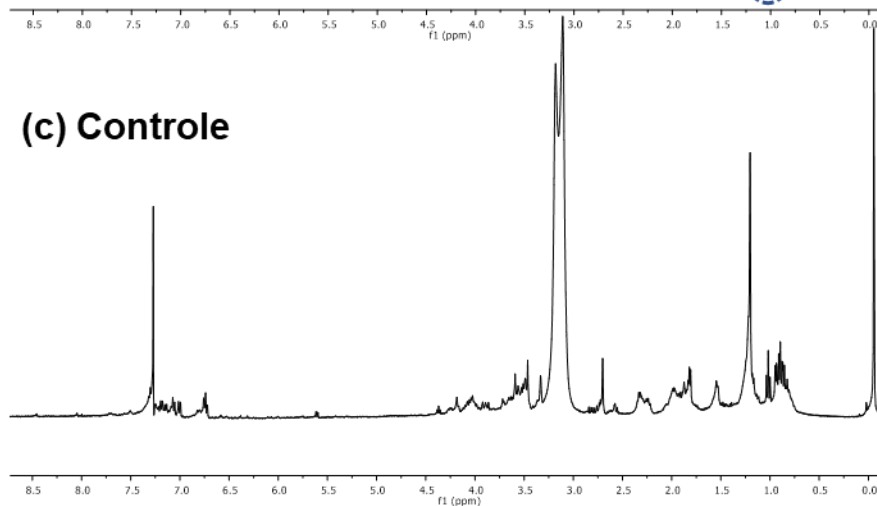


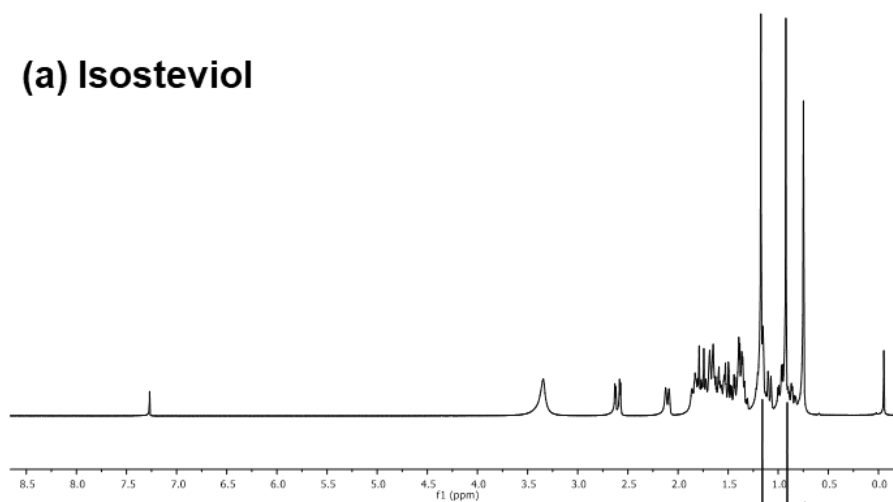
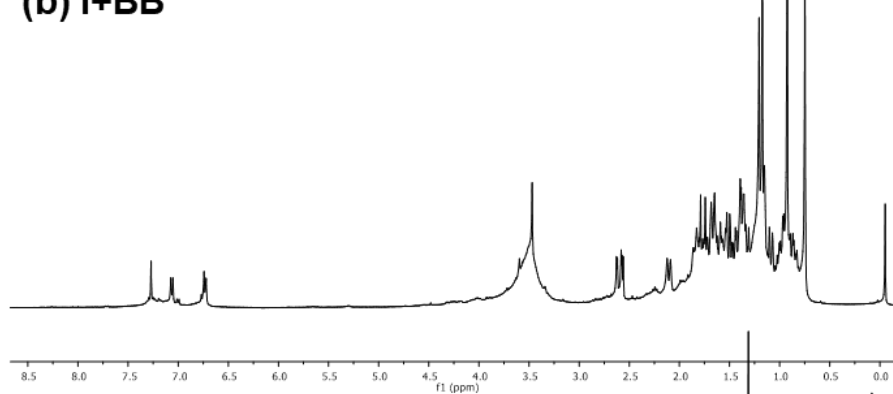
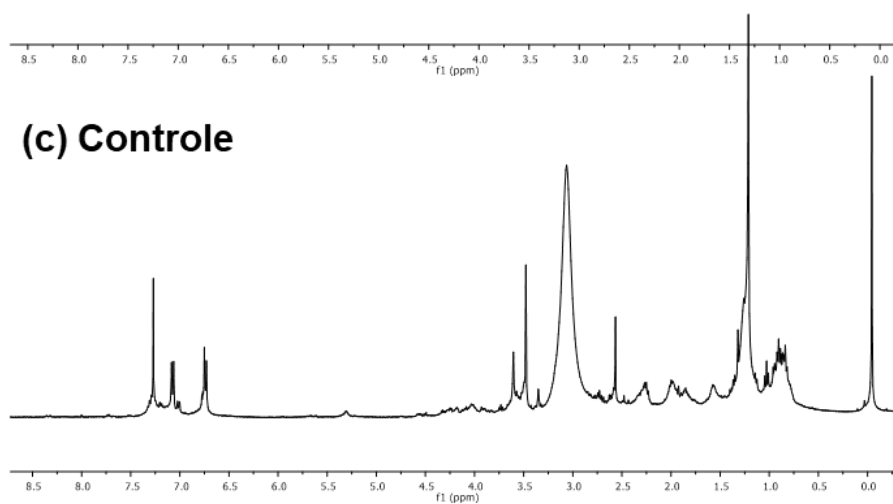
(c) Controle

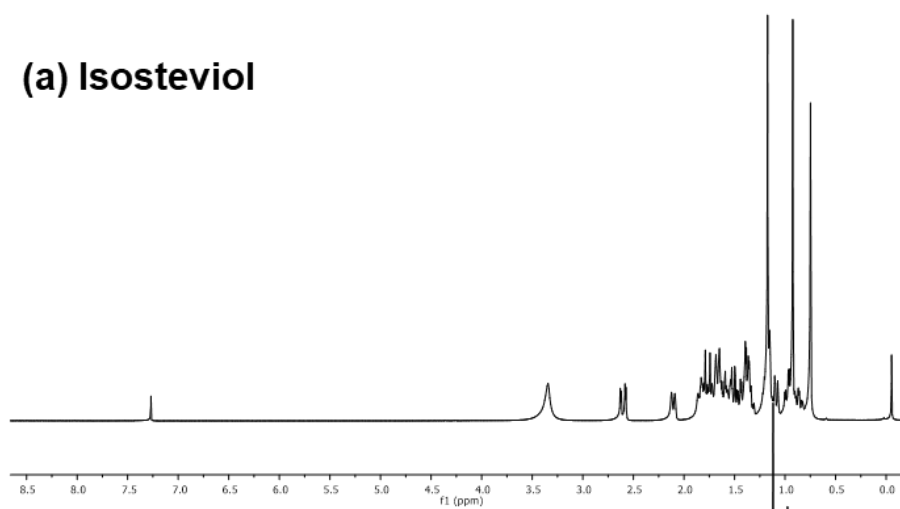
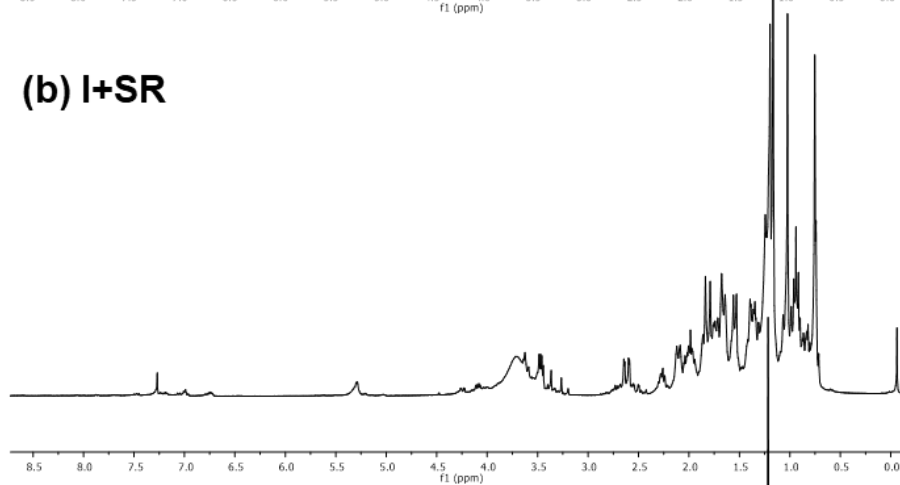
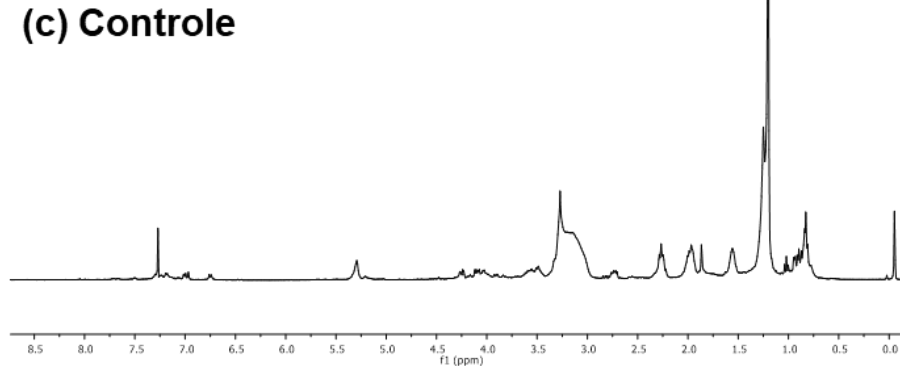


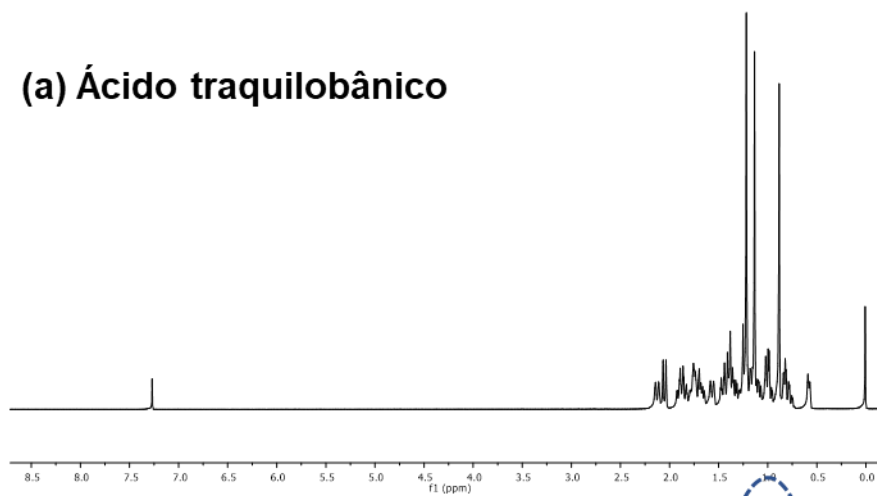
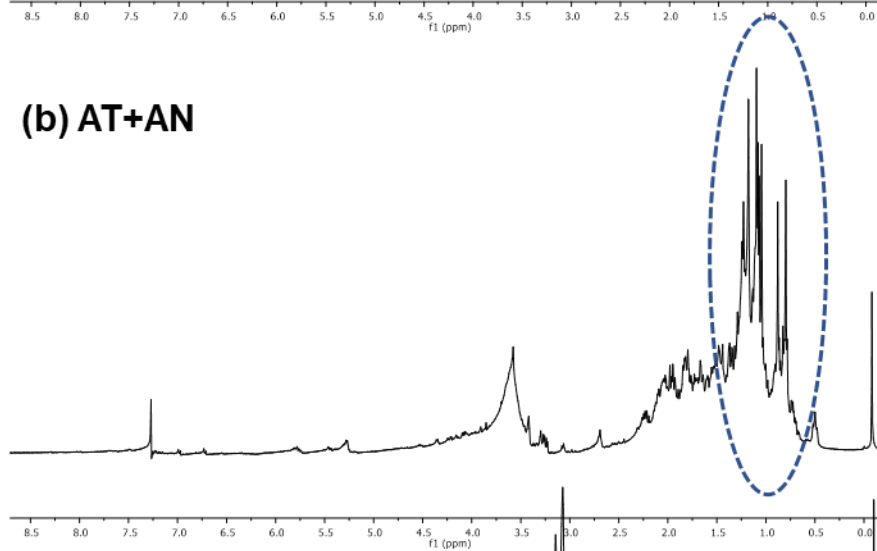
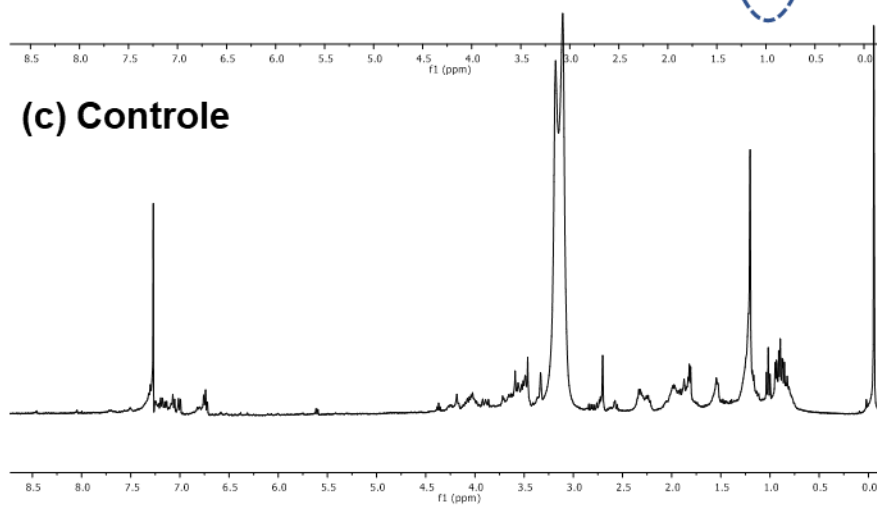
(a) Longifoleno**(b) L+BB****(c) Controle**

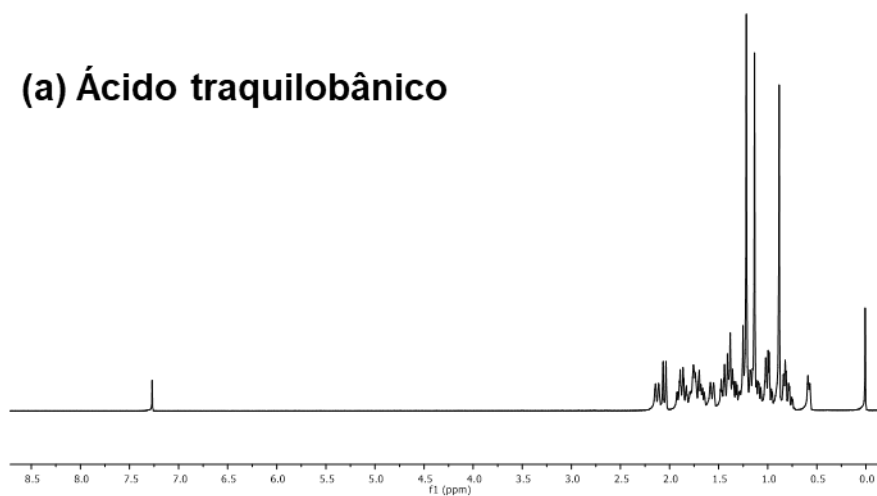
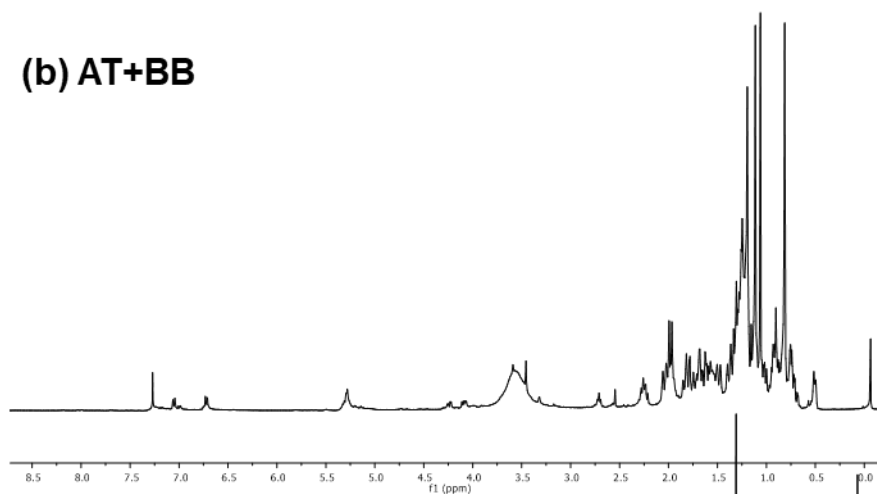
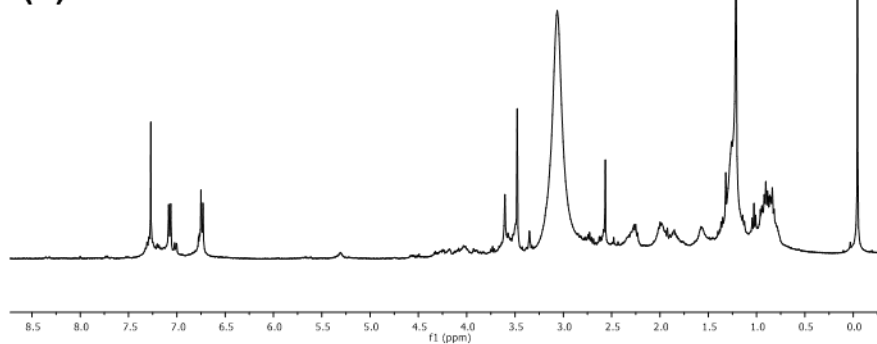
(a) Longifoleno**(b) L+SR****(c) Controle**

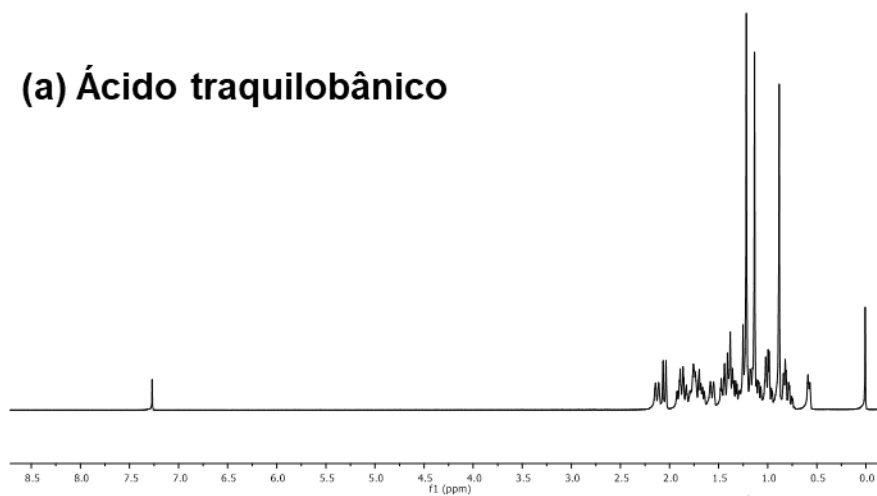
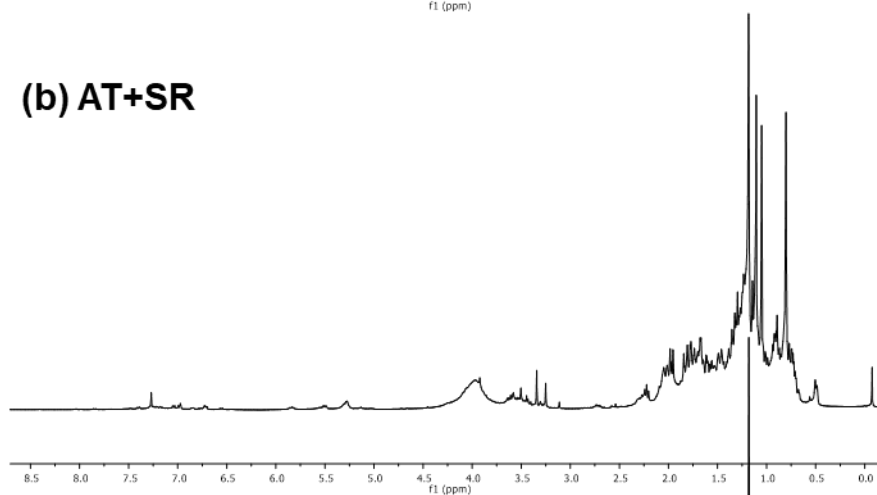
(a) Isosteviol**(b) I+AN****(c) Controle**

(a) Isosteviol**(b) I+BB****(c) Controle**

(a) Isosteviol**(b) I+SR****(c) Controle**

(a) Ácido traquilobânico**(b) AT+AN****(c) Controle**

(a) Ácido traquilobânico**(b) AT+BB****(c) Controle**

(a) Ácido traquilobânico**(b) AT+SR****(c) Controle**