



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS ERECHIM**  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

**THAMARYS SCAPINI**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS RESISTENTES NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO  
DE CROMO HEXAVALENTE EM EFLUENTE DE CURTUME**

**ERECHIM**

**2018**

**THAMARYS SCAPINI**

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS RESISTENTES NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO  
DE CROMO HEXAVALENTE EM EFLUENTE DE CURTUME**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul como requisito para obtenção do título de bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Professora Dra. Helen Treichel

ERECHIM

2018

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Veroni e Lourdes, pelo incentivo nos estudos e por todo amor e carinho. Tudo que sou hoje devo a vocês. Obrigada por terem sido compreensivos com minha ausência em vários momentos, por terem sempre exigido que eu desse o melhor de mim em tudo que eu fizesse, por terem me dado carinho e amor. Vocês, que tanto fizeram e ainda fazem por mim, merecem todo meu reconhecimento e amor. Uma vida é pouco para agradecer. Eu amo vocês!

Aos meus irmãos, Daiane e Nathan, pelo companheirismo, carinho e por serem tão presentes na minha vida. Vocês são meus maiores espelhos e eu sou eternamente grata por ter vocês na minha vida. Aos meus sobrinhos, João Lucas e Miguel Antônio, que com toda a inocência desse mundo, por muitas vezes tornaram meus dias divertidos e repletos de amor. Vocês são meus maiores incentivos para querer fazer do mundo um lugar melhor. Eu amo todos vocês!

Ao meu grande aliado, Rodrigo, por ser companheiro, amigo, namorado, confidente e conselheiro. Muito obrigada por sempre estar ao meu lado, segurando minha mão, me ajudando a ver as coisas de uma maneira diferente. Obrigada por cada abraço, por ter sido compreensivo quando me ausentei, pelas inúmeras caronas e finais de semana no laboratório e principalmente, por nunca medir esforços para estarmos juntos. Eu amo você.

À minha grande amiga e orientadora, Helen Treichel, por ser meu grande espelho profissional, por seu caráter inigualável e por ser tão determinada. À ti, minha grande mestre, só tenho a agradecer por ter confiado em mim, por ter me permitido voar e me guiado tão bem nos desafios propostos. Mas acima de tudo, obrigada pela amizade que construímos, por sua dedicação e por ter transmitido tantos conhecimentos. Você é meu maior espelho profissional!

Meu agradecimento especial às minhas grandes amigas, colegas de IC e parceiras de vida: Aline, Eduarda e Tatiani. Obrigada por terem feito os meus dias mais leves, pelas risadas, pelos finais de semana de estudo e pesquisa, pelos conselhos, pelos abraços, pelas muitas vidrarias lavadas e pelos conhecimentos compartilhados. Obrigada por nunca desistirem de mim mesmo sabendo que eu sempre estava atrasada. Vocês são muito importantes para mim e me ensinaram que é nas diferenças que encontramos nossos melhores amigos, obrigada por tudo! Espero ter a amizade de vocês pelo resto da vida.

Meu agradecimento especial para as melhores voluntárias do universo, Caroline e Simone. Vocês foram essenciais na elaboração deste trabalho. Sou imensamente grata pelo apoio que deram, pela responsabilidade que assumiram ao meu lado, pelos finais de semana e

dias inteiros fazendo testes e repiques, pelas vidrarias lavadas e principalmente, por nunca me permitirem desistir. Vocês são fantásticas e merecem todo reconhecimento do universo. Eu tenho muito orgulho das pesquisadoras que estão se tornando.

Aos amigos e colegas do LAMIBI, obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar, pelo companheirismo e brincadeiras. Minha eterna gratidão por nossa amizade. Também, não menos importante, o meu agradecimento aos colegas e amigos que já foram trilhar seus caminhos em outros lugares, mas que me ensinaram muito e fizeram com que eu me apaixonasse pela pesquisa, Bruno Venturin e Jéssica Mulinari, vocês foram muito importantes na minha vida acadêmica e eu sou eternamente grata por todo conhecimento transmitido.

À minha grande amiga, pesquisadora e professora, Gislaine, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos, pela ajuda, pelas brincadeiras e por ter tornado mais leves meus dias de trabalho intenso. É incrível como algumas pessoas surgem na nossa vida e trazem consigo uma paz gigante. E foi assim que me senti ao teu lado. Obrigada minha grande amiga, espero que seja o início de uma amizade para toda vida.

A todos os professores do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da UFFS *campus* Erechim, pelos momentos e conhecimentos compartilhados, vocês cultivaram em mim o amor pela profissão e espero poder transmitir esse sentido nos lugares por onde eu andar.

Enfim, meu agradecimento a todos que fizeram parte dessa etapa da graduação. E, como tão bem expôs Isaac Newton: “*Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro de gigantes*”. Gratidão a todos!

*“Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância”.*

(Simone de Beauvoir)

## RESUMO

Os metais pesados são alguns dos contaminantes ambientais antropogênicos mais persistentes e potentes, representando elevado risco ecológico e para a saúde humana, devido a seus efeitos tóxicos e a capacidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar. Com avanço da industrialização, a quantidade de cromo nos ecossistemas aquáticos e terrestres aumentou, tornando-se uma preocupação global, devido aos diversos efeitos tóxicos, mesmo em baixas concentrações. Devido a isso, a remoção deste metal pesado de águas residuárias é de extrema importância para proteção da saúde e do meio ambiente. Neste sentido, buscando uma alternativa a tratamentos físico-químicos para remoção de cromo hexavalente de efluente de curtume, propõe-se a biorremediação usando cepas dos fungos *Penicillium commune*, *Fusarium equiseti* e *Paecilomyces lilacinus*. As estirpes fúngicas foram submetidas a ensaios de tolerância ao Cr (VI) através da exposição a  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ , posteriormente foram feitas análises de microscopia ótica e identificadas possíveis alterações estruturais causadas pelo estresse em decorrência da presença de composto tóxico. Foi possível observar alterações, como inchaço da parede celular e formação de vacúolos. Ainda, as cepas fúngicas foram submetidas a diferentes concentrações de Cr (VI) visando avaliar o comportamento dos mecanismos de defesa das células fúngicas, que foram identificados como extracelular, por processo de biossorção, e intracelular, por formação de vacúolos, biotransformação, quelação por proteínas, entre outros. Tendo em vista os resultados obtidos, foram realizados testes para substituição da fonte de glicose do meio fermentativo por hidrolisado de cana-de-açúcar, buscando uma alternativa ao uso da glicose comercial. Os resultados foram satisfatórios, visto que mesmo na presença de interferentes, os fungos foram capazes de metabolizar a glicose do meio, aumentando a biomassa. Por fim, a biorremediação do efluente de curtume foi realizada por três experimentos, o primeiro na presença de glicose e sais, o segundo apenas o efluente, e um terceiro com hidrolisado. Apesar de ter ocorrido a redução da concentração de Cr (VI) no efluente, as concentrações que permaneceram ainda são tóxicas, sendo de  $3,40 \pm 0,61 \text{ mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$  para o fungo FE e  $3,14 \pm 0,31 \text{ mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$  para o fungo PL na presença de hidrolisado, e  $2,56 \pm 0,08 \text{ mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$  para o fungo PC na ausência de nutrientes, sendo tóxico para o meio ambiente e não se enquadrando no previsto pela legislação brasileira. Neste sentido, são propostos estudos de melhoramento do processo por meio de fluxo contínuo de nutrientes, visto que os mecanismos de defesa intracelulares, dependentes do metabolismo, são ativados no processo de redução da concentração de compostos tóxicos, e o aumento da biomassa fúngica faz com que ocorra com maior efetividade o biosequestro dos íons metálicos do meio.

Palavras-Chave: Biotransformação. Biosequestro. Hidrolisado. Biorremediação.

## ABSTRACT

Heavy metals are some of the most persistent and potent anthropogenic environmental contaminants, representing a high ecological and health risk, mainly leading to toxic effects and the ability to bioaccumulate along the food chain. As industrialization progresses, the amount of chromium in aquatic and terrestrial ecosystems has increased, becoming a global concern due to the various toxic effects even at low concentrations. Due to this, the removal of this heavy metal from wastewater is extremely important for the protection of health and the environment. In this sense, searching for an alternative to physical-chemical treatments for the removal of hexavalent chromium from tannery effluent, we propose in this study bioremediation using strains of the fungi *Penicillium commune*, *Fusarium equiseti* and *Paecilomyces lilacinus*. The fungal strains were submitted to tests of tolerance to  $\text{Cr}^{6+}$  through exposure to  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ , later optical microscopy analysis and possible structural alterations caused by the presence of the toxic compound were identified, where it was possible to observe some changes as swelling of the cell wall and formation of vacuoles. In addition, fungal strains were submitted to different concentrations of Cr (VI) in order to evaluate the behavior of fungal cell defense mechanisms, which were identified as extracellular, by biosorption and intracellular processes, by formation of vacuoles, biotransformation, chelation by proteins, among others. Considering the results obtained, tests were carried out to substitute the glucose source of the fermentation medium for sugarcane hydrolysate, seeking an alternative to the use of commercial glucose. The results were satisfactory, since even in the presence of interferences, the fungi were able to metabolize glucose from the medium, increasing the biomass. Finally, the bioremediation of the tannery effluent was carried out by three experiments, the first in the presence of glucose and salts, the second only the effluent, and a third with hydrolysate. Although the concentration of Cr (VI) in the effluent decreased, the concentrations that remained were still toxic, being  $3.40 \pm 0.61 \text{ mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$  for the fungus FE and  $3.14 \pm 0,31 \text{ mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$  for the fungus PL in the presence of hydrolysate, and  $2.56 \pm 0.08 \text{ mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$  for the PC fungus in the absence of nutrients, being toxic to the environment and not provided for by Brazilian law. In this sense, process improvement studies are proposed through continuous flow of nutrients, since intracellular defense mechanisms, dependent on metabolism, are activated in the process of reducing the concentration of toxic compounds, and the increase of fungal biomass causes that the biosequestration of the metallic ions in the medium occurs more effectively.

Keywords: Biotransformation. Biosequestration. Hydrolysate. Bioremediation

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	8
2 OBJETIVOS .....	11
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
3 METODOLOGIA .....	12
3.1 MICRORGANISMOS .....	12
<b>3.1.1 Aquisição dos microrganismos</b> .....	12
<b>3.1.2 Meio de cultura</b> .....	13
<b>3.1.3 Meio fermentativo</b> .....	13
<b>3.1.4 Preparo da biomassa fúngica para processo fermentativo</b> .....	13
<b>3.1.5 Quantificação da biomassa</b> .....	14
3.2 EFLUENTE.....	15
<b>3.2.1 Obtenção e armazenamento do efluente</b> .....	15
<b>3.2.2 Caracterização físico-química do efluente</b> .....	15
3.3 METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE.....	15
3.4 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA E REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE PELOS MICRORGANISMOS.....	17
<b>3.4.1 Tolerância a presença de cromo hexavalente</b> .....	17
<b>3.4.2 Capacidade de redução da concentração de cromo hexavalente</b> .....	18
<b>3.4.3 Exposição dos fungos a diferentes concentrações do metal</b> .....	19
3.5 UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE GLICOSE .....	20
<b>3.5.1 Caracterização do hidrolisado</b> .....	20
<b>3.5.2 Avaliação do crescimento da biomassa fúngica na presença de hidrolisado</b> .....	21
<b>3.5.3 Capacidade de redução da concentração de íons metálicos na presença de hidrolisado         como fonte de glicose</b> .....	22
3.6 BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE CURTUME .....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
4.1 AVALIAÇÃO DAS ESTIRPES FÚNGICAS NA PRESENÇA DE Cr (VI).....	24
<b>4.1.1 Tolerância dos fungos a presença de Cr (VI)</b> .....	24
<b>4.1.3 Exposição das estirpes fúngicas a diferentes concentrações de Cr (VI)</b> .....	34
4.2 SUBSTITUIÇÃO DA FONTE DE GLICOSE POR HIDROLISADO .....	40
4.3 BIORREMEDIAÇÃO DO EFLUENTE DE CURTUME.....	44
<b>4.3.1 Caracterização do efluente de curtume</b> .....	44
<b>4.3.2 Avaliação da capacidade dos fungos de biorremediação de efluente de curtume</b> .....	44
5 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS .....	48
REFERÊNCIAS .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o crescente desenvolvimento da industrialização e intensa urbanização, a geração de efluentes industriais com alta concentração de metais pesados tornou-se um problema de poluição ambiental (KANG; SO, 2016; HUANG et al., 2017). Altas concentrações destas substâncias tóxicas são introduzidas no meio ambiente por meio de despejos de efluentes de indústrias de mineração, metalúrgica, fundição de metais, curtimento, etc. (KANG; SO, 2016). Este fato tornou-se uma questão crítica em estudos ambientais, visto que pequenas concentrações destas substâncias possuem grande capacidade de bioacumulação no ambiente (TAHERI et al., 2017).

Os metais pesados estão entre as substâncias tóxicas que mais causam problemas ambientais. O acúmulo nos solos e cursos hídricos é uma grande preocupação visto que não são substâncias biodegradáveis e quando excedem valores limites de concentração no meio causam efeitos extremamente tóxicos a organismos vivos (REHMAN et al., 2017; KRISHNA; MOHAN, 2016).

Como um dos íons de metais pesados mais utilizados em processos industriais, o Cromo Hexavalente (Cr (VI)) é uma substância de alta toxicidade mesmo em baixas concentrações (LUO et al., 2017). As características de alta solubilidade, não-biodegradação e biomagnificação fazem com que este metal seja considerado um potente agente carcinogênico que por meio da modificação do processo de transcrição do DNA gera aberrações cromossômicas (DAI et al., 2015; LUO et al., 2017).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos relacionou 17 substâncias químicas que representam as maiores ameaças a saúde humana, dentre as quais o cromo e seus compostos são citados. Esta toxicidade é função de seus estados de oxidação, sendo que os compostos (+VI) são aproximadamente 500-1000 vezes mais tóxicos do que em estado de oxidação (III) (MALAVIYA; SINGH, 2011). Ainda assim, a legislação é rigorosa para eliminação de resíduos contendo Cromo Trivalente (Cr (III)), isso porque a alteração no estado de oxidação pode ocorrer por meio de mudanças discretas no meio, resultando na presença provável de espécie hexavalente. Além disso, Cr (VI) é encontrado em muitas substâncias comerciais com potenciais efeitos adversos de ação imediata em organismos vivos, afetando a fisiologia humana e animal, além da capacidade inerente deste metal em acumular-se na cadeia alimentar (MALAVIYA; SINGH, 2011).

O cromo é utilizado em diferentes aplicações industriais, incluindo as indústrias de curtimento de couro, tingimento de tecidos, galvanoplastia e acabamento de metais,

resultando em um efluente com carga tóxica pesada, necessitando de tratamento rigoroso antes da descarga no ambiente (AGRAWAL; KUMAR; PANDEY, 2006). Atualmente, para remoção de metais pesados de efluentes, as indústrias geralmente utilizam métodos convencionais químicos e físicos, como precipitação química, oxidação ou redução química, troca iônica, filtração, tratamento eletroquímico, osmose reversa, tecnologias de membranas, recuperação de evaporação, etc (AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

Apesar de consolidados, os métodos convencionais de tratamento químicos visam a mudança no estado de oxidação da substância convertendo de Cr (VI) para a forma menos tóxica e móvel, geralmente o Cr (III) (KIM et al., 2017), tornando estes tratamentos não suficientes para a remoção total da carga de poluição podendo ainda serem descarregados no ambiente efluentes com alta carga tóxica (LUO et al., 2017). Além disso, são utilizadas altas doses de produtos químicos e gastos elevados de energia no processo de tratamento, associado ao alto custo econômico e produção elevada de resíduos sólidos com alta concentração de metais pesados (NOVAK et al., 2017). Como resultado, as indústrias buscam constantemente tecnologias viáveis e acessíveis que possam oferecer a melhor solução em termos de eficiência e economia, incentivando o desenvolvimento de soluções e técnicas alternativas, economicamente viáveis e ambientalmente seguras (AHMAD; HAYDAR, 2016; HOSSEINI et al., 2016).

Recentemente, o tratamento biológico de efluentes industriais contaminados com metais pesados foi destacado como uma alternativa ao uso de produtos químicos (KIM et al., 2017). Com alto poder de desintoxicação, a biorremediação de efluentes industriais contaminados com metais pesados utilizando microrganismos tolerantes a estas substâncias tóxicas está sendo alvo de estudos, como de Sharma e Malaviya (2016) que realizaram um estudo com aplicação de quatro cepas fúngicas resistente ao Cr (VI) para biorremediação de efluente da indústria de curtume.

A tolerância de alguns microrganismos ao cromo e a capacidade de biorremediação pode ser explicada a partir de diferentes mecanismos como a acumulação celular, redução extracelular, adsorção, redução intracelular seguida de liberação de sal, enzima, entre outros (JOUTEY et al., 2013). Os fungos, em específico, possuem propriedades excelentes de ligação de metais ao material da parede celular que os permitem tolerar altas concentrações de substâncias tóxicas (PRADHAN et al., 2017). Além disso, a atividade mediada por enzimas de fungos fornece metabólitos suficientes para tratar efluentes, estas são produzidas durante todas as fases do ciclo fúngico como uma resposta ao meio que o microrganismo é exposto e podem estar presentes mesmo em baixas concentrações de poluentes (SHARMA;

MALAVIYA, 2016). Alguns fungos apresentam maior tolerância e capacidade de desenvolvimento em condições adversas, como baixo pH e altas temperaturas, neste contexto destacam-se os fungos filamentosos (BLUMER, 2002; SHARMA; MALAVIYA, 2016).

Neste sentido, os processos de tratamento biológicos surgem como uma alternativa a tratamentos convencionais apresentando vantagens como baixo custo de operação, possibilidade de recuperação de metais, regeneração de biomassa e minimização do volume de lodo químico gerado (NOVAK et al., 2017). Ainda, diferente de tratamentos químicos, os sistemas biológicos não são capazes, sob mudanças de condições do meio, de re-oxidar o Cr (III) em Cr (VI), além de ser uma estratégia industrial que promove os benefícios para o meio ambiente por meio da redução de agentes químicos e tóxicos para a saúde dos seres humanos (JOUTEY et al., 2013; SCARAZZATO et al., 2017).

Portanto, buscando uma alternativa ao uso de produtos químicos no tratamento de efluentes industriais, esse estudo propôs a utilização de cepas dos fungos *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium commune* para aplicação no tratamento biológico de efluentes gerados na indústria de curtimento.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

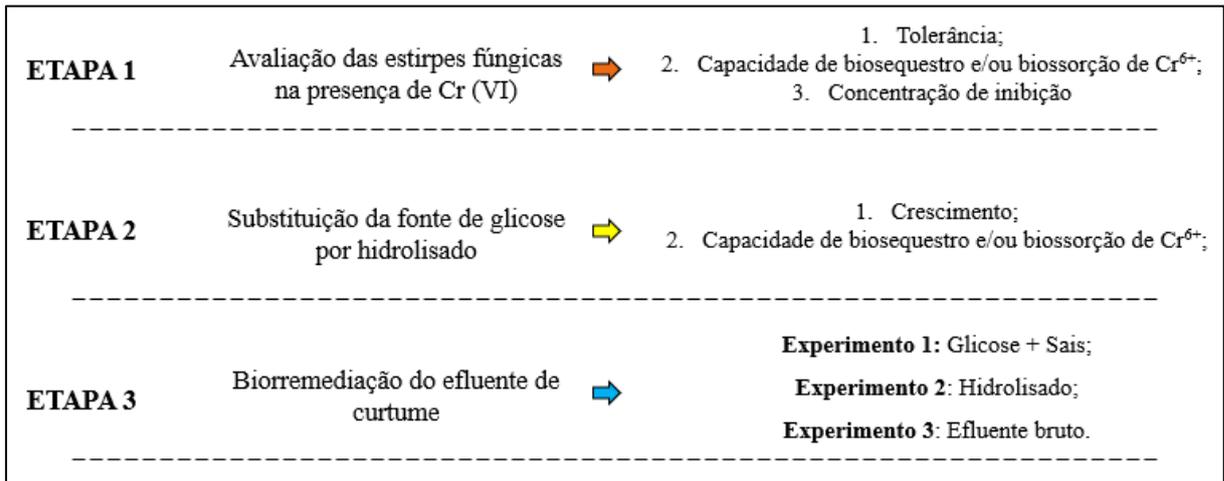
Avaliar o emprego de microrganismos na remediação de efluente da indústria de curtume, visando à redução da concentração de cromo hexavalente por meio de tratamento biológico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o comportamento das estirpes fúngicas na presença de Cr (VI), dando ênfase aos mecanismos de defesa dos fungos na presença dos íons metálicos;
- Determinar a capacidade de biorremediação do efluente de curtume por meio dos fungos estudados;
- Investigar a capacidade de assimilação dos fungos frente a fonte de glicose alternativa visando a substituição por subproduto da indústria de cana-de-açúcar.

### 3 METODOLOGIA

Neste item serão abordadas as metodologias utilizadas para a realização deste trabalho. Visando facilitar o entendimento do processo, um fluxograma foi construído (Figura 1) onde o estudo foi subdividido em 3 etapas que buscam compreender os objetivos propostos no trabalho.



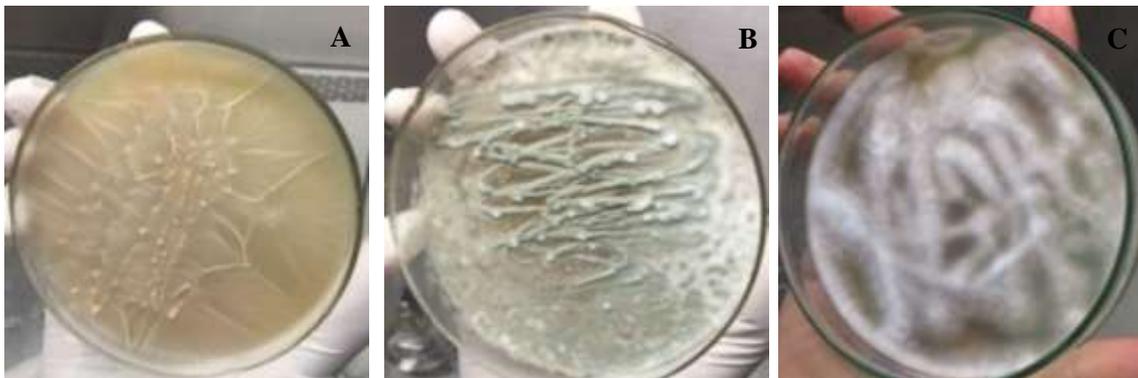
**Figura 1.** Fluxograma dos processos realizados neste estudo subdividido em etapas de acordo com os objetivos propostos

Fonte: Autora.

### 3.1 MICRORGANISMOS

#### 3.1.1 Aquisição dos microrganismos

Os microrganismos utilizados neste estudo foram *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium commune* (Figura 2), isolados por Sharma e Malaviya (2016) e identificados como eficientes na biorremediação de efluente de curtume, com alto potencial na redução da concentração de Cr (VI). As cepas fúngicas foram obtidas do banco de microrganismos Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropicais.



**Figura 2.** Cepas fúngicas utilizadas no estudo sendo: (A) *Fusarium equiseti*; (B) *Penicillium commune*; (C) *Paecilomyces lilacinus*

Fonte: Autora

### 3.1.2 Meio de cultura

Os fungos foram mantidos em meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MEA), com pH ajustado em 5,6. O meio MEA é constituído por ( $\text{g}_{\text{meio}} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ): 20 de extrato de malte, 1,0 de peptona, 20 de glicose, 20 de ágar.

### 3.1.3 Meio fermentativo

O meio fermentativo utilizado nos experimentos foi composto por ( $\text{m}_{\text{meio}}/\text{v}_{\text{H}_2\text{O}}$ ): 0,25% fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,20% sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), 0,20% sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 0,50% cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), 0,25% glicose, com pH ajustado em 5,6 (CÁRDENAS-GONZÁLES; RODRIGUEZ, 2010). O ajuste de pH foi feito com adição de  $\text{NaOH}$  3 M e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72%, dependendo do pH inicial da solução. O meio foi então autoclavado a 120 °C, durante 20 minutos a 1 atm.

### 3.1.4 Preparo da biomassa fúngica para processo fermentativo

O meio fermentativo foi inoculado com biomassa seca. Para tanto, os fungos foram repicados em meio MEA e mantidos incubados a 28 °C por 7 dias. Posteriormente, com auxílio de um bisturi, as cepas fúngicas foram raspadas das placas (Figura 3) e transferidas para tubos Falcon 15 mL, previamente esterilizados e identificado.



**Figura 3.** Processo de raspagem do fungo *Fusarium equiseti* com auxílio de um bisturi, realizado em câmara de fluxo

Fonte: Autora

Após processo de raspagem, os fungos foram mantidos em condições para congelamento durante 24 horas. Após o congelamento, as cepas foram liofilizadas num Liofilizador (Terroni) (Figura 4). O processo de liofilização foi finalizado quando as amostras estavam com aspecto de pó de coloração esbranquiçada, o que foi alcançado aproximadamente em 24 horas de processo. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4°C até utilização.



**Figura 4.** Biomassa fúngica durante o processo de liofilização  
Fonte: Autora

### 3.1.5 Quantificação da biomassa

O crescimento da biomassa fúngica foi avaliado pelo método de massa do micélio seco por mL de meio fermentativo (GERN, 2005). Para isso, a massa de células foi separada da parte líquida por processo de filtração e mantida na estufa para secagem a 35 °C até peso constante.

Após este período, as amostras foram pesadas e a biomassa quantificada por meio da Equação (1).

$$\text{Biomassa} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Peso}_{\text{seco}} - \text{Peso}_{\text{filtro+placa}} \text{ (g)}}{\text{Volume de meio fermentativo (L)}}$$

Equação (1)

Onde,  $\text{peso}_{\text{seco}}$  é a massa do papel filtro + placa + biomassa após período de secagem e o  $\text{peso}_{\text{filtro+placa}}$  são as massas da placa de petri e do papel filtro antes do processo de filtração das amostras.

## 3.2 EFLUENTE

### 3.2.1 Obtenção e armazenamento do efluente

O efluente de curtume foi coletado de uma indústria local na seção de descarga de efluentes nos tanques de tratamento. A coleta e armazenamento foi realizada em frascos de polietileno e refrigerado a 4 °C até a utilização.

### 3.2.2 Caracterização físico-química do efluente

O efluente de curtume foi analisado quanto a Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Biológica de Oxigênio (DBO<sub>5</sub>), Óleos e graxas, Sólidos Totais, Cloretos, Condutividade Elétrica (CE), Oxigênio Dissolvido (OD), pH e Cromo (VI).

A metodologia utilizada nas análises está descrita no *Standard Methods* (APHA, 2001).

## 3.3 METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE

A concentração de Cr (VI) no meio fermentativo foi quantificada por meio de método colorimétrico descrito no *Standard Methods* utilizando 1,5 difenilcarbazida P.A. (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O).

Este processo de determinação consiste na reação da difenilcarbazida com o Cr (VI) em meio ácido, resultando em uma coloração rosa/violeta, sendo esta uma das técnicas mais utilizadas para quantificação de Cr (VI) no meio (ALVES, 2010). A reação entre os reagentes é rápida e seletiva, e a difenilcarbazida, sob condições ácidas, possui pouca afinidade com outros metais, e ainda quando complexa outros elementos a coloração apresentada é diferente, isso faz com que os riscos de interferência sejam minimizados pela determinação colorimétrica (CONCEIÇÃO, 2006).

Para as medidas de concentração de Cr (VI) 10 mL de amostra, previamente filtrada e diluída, eram acidificados com adição de ácido sulfúrico 72% até atingir pH  $1,0 \pm 0,3$ . Posteriormente, eram adicionados 2 mL de solução de difenilcarbazida P.A. e mantido sob agitação por aproximadamente 10 minutos até desenvolvimento completo da coloração rosa/violeta. Ao final, a medida de absorvância era realizada em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm. A amostra de referência (branco) foi tratada da mesma maneira que as amostras

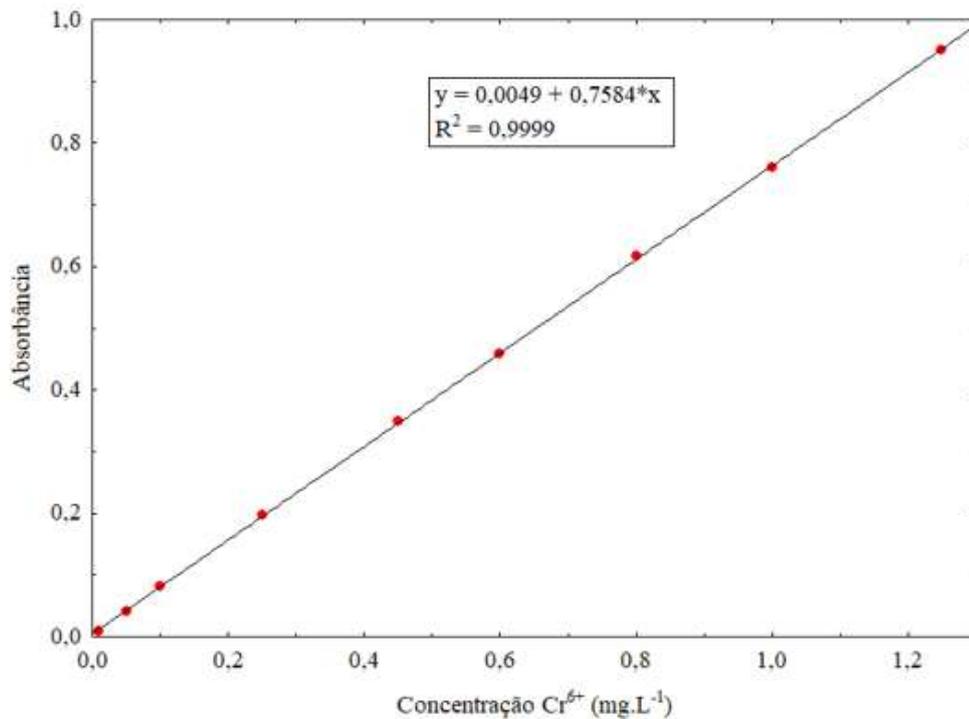
analisadas, com exceção da adição da solução de difenilcarbazida.

Os resultados foram avaliados em relação a uma curva de calibração, absorvância x  $\text{mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , que foi preparada na faixa de  $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  a  $1,25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 6). Para tanto, preparou-se uma solução padrão de Cr (VI) de concentração de  $10 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , sendo diluída em balões volumétricos de 25 mL, conforme concentração final necessária.



**Figura 5.** Sequência de concentrações utilizadas para construção da curva de calibração  
Fonte: Autora

Após realização do processo de acidificação descrito anteriormente e adição de difenilcarbazida em 10 mL de amostra para mudança de coloração para rosa/violeta (Figura 5), a medida de absorvância foi feita em 540 nm. Posteriormente, a curva de calibração, concentração de cromo *versus* absorvância, foi construída (Figura 6) e através da análise de regressão linear obteve-se a equação da reta e coeficiente de determinação ( $R^2$ ).



**Figura 6.** Curva de calibração utilizada no estudo como padrão para quantificação de Cr (VI) pelo método utilizando 1,5 difenilcarbazida P.A. ( $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$ )  
Fonte: Autora

Foram necessárias diluições das amostras para a quantificação do Cr (VI) no meio fermentativo e no efluente, considerando que o limite de detecção da curva de calibração foi de 1,25 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA E REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CROMO HEXAVALENTE PELOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram avaliados quanto a tolerância a presença do metal no meio, bem como a capacidade de redução da concentração em meio fermentativo contendo Cr (VI) adicionado na forma de solução de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

#### 3.4.1 Tolerância a presença de cromo hexavalente

A capacidade de um organismo tolerar a presença de metais é definida como a habilidade de sobreviver à toxicidade do composto utilizando mecanismo de defesa, seja extra ou intracelular, em resposta ao composto estressante (MOHAMMADIAN et al., 2017). Neste sentido, visando avaliar a capacidade de tolerância das cepas fúngicas frente a presença de Cr (VI) no meio, testes de tolerância foram realizados.

Os fungos foram inoculados em erlenmeyers contendo 150 mL de meio fermentativo, preparado conforme item 3.1.3 e suplementado com concentração de 150 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>. O meio foi mantido sob agitação em um agitador orbital (New Brunswick™ Innova®) sob condições de 150 rpm, 28 °C por 72 horas (SHARMA; MALAVIYA, 2016). Posteriormente, uma alíquota do meio fermentativo foi gotejada sob placas de petri contendo MEA (Figura 7) e o crescimento fúngico foi avaliado com base na observação do crescimento da cepa em intervalos de 24 horas por 7 dias (SHUGABA et al., 2010).



**Figura 7.** Procedimento de retirada de uma alíquota do meio fermentativo para transferir para uma placa contendo meio MEA e ser possível a avaliação da tolerância dos fungos

Fonte: Autora

Após retirada da alíquota, o meio fermentativo foi filtrado, mantido a 35°C em estufa durante 24 horas. Em seguida, as cepas eram raspadas para tubos Falcon 15 mL previamente esterilizados e identificados, e então eram armazenadas a 4°C até posterior utilização para análise microscópica.

Após o período de crescimento, constatada a tolerância a presença do metal, os fungos previamente secos na estufa e armazenados em tubos Falcon foram reidratados com água destilada durante 1 h (m/v). Após esse processo lâminas foram preparadas em triplicatas utilizando 0,1 mL da suspensão biológica. As lâminas foram visualizadas e analisadas em microscopia ótica (aumento de 400 X). Foram identificadas as hifas filamentosas e seus respectivos septos, bem como formação vacuolar, esporos e organização fúngica. Amostras de cepas fúngicas sem exposição foram utilizadas como controle das análises de microscopia ótica.

Os fungos *Penicillium commune*, *Paecilomyces lilacinus* e *Fusarium equiseti* foram testados isoladamente.

### 3.4.2 Capacidade de redução da concentração de cromo hexavalente

As cepas fúngicas foram avaliadas quanto a capacidade de redução da concentração do

Cr (VI) em meio fermentativo contendo 8 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados na presença e na ausência de nutrientes (sais e glicose).

Primeiramente, para os testes na presença de sais e glicose, foram preparados 150 mL de meio fermentativo, conforme item 4.1.3, e posteriormente 0,8 mL de uma solução de Cr (VI) de 1500 mg.L<sup>-1</sup> foram adicionados para obtenção de uma solução com 8 mgCr<sup>+6</sup>.L<sup>-1</sup>.

Para os ensaios onde não foram adicionados nutrientes, 150 mL de água foram autoclavados, e posteriormente foram adicionados 0,8 mL da solução de Cr (VI) de concentração de 1500 mg.L<sup>-1</sup>, obtendo-se a solução de 8 mg Cr<sup>+6</sup>.L<sup>-1</sup>.

Após a preparação dos meios fermentativos, 0,4 g.L<sup>-1</sup> de massa fúngica seca foram inoculados no meio, preparada conforme item 3.1.4 (SHARMA; ADHOLEYA, 2011). As amostras foram mantidas em agitador orbital (New Brunswick™ Innova®) a 150 rpm, 28°C por 6 dias (SHARMA; MALAVAYA, 2016, adaptado), sendo quantificada a concentração de cromo em intervalos de 24 horas, e ainda realizado o acompanhamento do pH das amostras.

A redução da concentração de Cr (VI) no meio foi avaliada com base na diferença das concentrações ao longo do período avaliado. Os testes foram realizados em duplicata e as cepas fúngicas foram testadas separadamente.

Ao final do período de incubação foi realizada a quantificação da biomassa fúngica, conforme descrito no item 3.1.5, visando avaliar se o estresse causado pela presença do metal no meio inibe o crescimento dos microrganismos.

O controle negativo foi feito expondo o meio sintético sem biomassa fúngica sob mesma condição de incubação das amostras.

### **3.4.3 Exposição dos fungos a diferentes concentrações do metal**

Com intuito de fortalecer as hipóteses dos mecanismos envolvidos no processo de sequestro dos íons metálicos no meio fermentativo, foram realizados ensaios com concentrações de 20, 50, 100 e 145 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>.

O preparo do meio fermentativo deu-se conforme item 3.1.3, e a solução de Cr (VI) foi adicionada a partir da diluição de uma solução de 1500 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>.

Após a preparação dos meios fermentativos, 0,4 g.L<sup>-1</sup> de massa fúngica seca foram inoculados no meio, preparada conforme item 3.1.4 (SHARMA; ADHOLEYA, 2011). As amostras foram incubadas em agitador orbital (New Brunswick™ Innova®) a 150 rpm, 28°C por 6 dias (SHARMA; MALAVAYA, 2016, adaptado), sendo quantificada a concentração de cromo em intervalos de 24 horas.

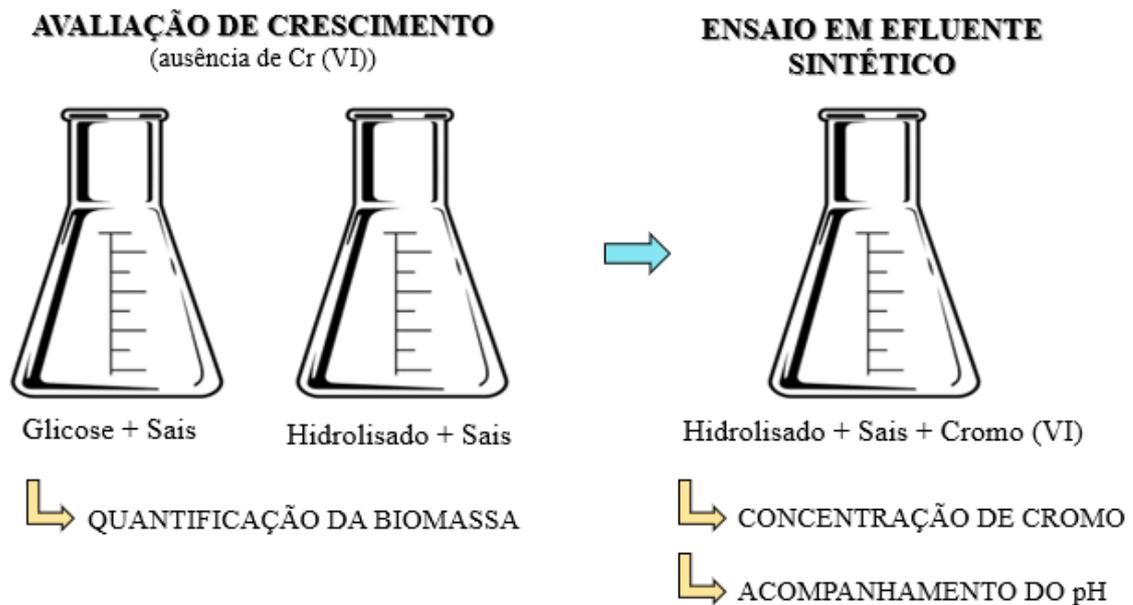
Ao final do período de incubação foi realizada a quantificação da biomassa fúngica,

conforme descrito no item 3.1.5.

O controle negativo foi feito expondo o meio sintético sem biomassa fúngica sob mesma condição de incubação das amostras. Os testes foram realizados em duplicata e as cepas fúngicas foram testadas separadamente.

### 3.5 UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE GLICOSE

Considerando a importância do metabolismo dos fungos para o processo de biosequestro dos íons metálicos, buscou-se viabilizar o processo de utilização do tratamento biológico do efluente de curtimento através da substituição da fonte de glicose comercial por uma fonte de glicose alternativa, neste caso o hidrolisado de cana de açúcar. A Figura 8 apresenta um esquema de realização deste processo, dividido nas etapas de avaliação do crescimento e redução da concentração de cromo no meio sintético.



**Figura 8.** Esquema representativo dos ensaios realizados para o processo de substituição da glicose pelo hidrolisado na biorremediação do efluente

Fonte: Autora

#### 3.5.1 Caracterização do hidrolisado

O hidrolisado celulósico, utilizado como substrato no processo de fermentação alcoólica, foi gentilmente doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado em São Paulo, Brasil. O caldo foi obtido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por meio de explosão a vapor, seguido de hidrólise enzimática pela enzima Cellic CTec3 (Novozymes).

As concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e etanol foram determinadas por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando um cromatógrafo (Shimadzu), equipado com detector RID-10 A, operado com coluna AMINEX® BIORAD HPX87H. Amostras de 20 µL, previamente filtradas com auxílio de filtros seringas, foram cromatografadas a 45 °C, com 0,005 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eluente e taxa de fluxo de 0,6 mL/min (BAZOTI et al., 2017).

A quantificação dos compostos furfural e HMF foi realizada por HPLC equipado com detector PDA, operado com coluna C18 utilizando como eluente acetonitrila/água 1:8 com 1 % de ácido acético a temperatura de 30 °C, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 0,8 mL/min (BAZOTI et al., 2017).

Antes das análises por HPLC, o eluente foi filtrado a vácuo com membrana de 0,45 µm Millipore® e desgaseificado em banho de ultrassom por 15 minutos, e as amostras foram pré-filtradas e diluídas apropriadamente. A concentração dos compostos foi determinada usando curvas de calibração para cada composto.

### **3.5.2 Avaliação do crescimento da biomassa fúngica na presença de hidrolisado**

O ensaio de avaliação do crescimento da biomassa fúngica foi realizado com intuito de avaliar se os fungos estudados seriam capazes de metabolizar a glicose presente no hidrolisado, pela maior complexidade com que a mesma poderia estar presente no meio, e, ainda, sobreviver a adversidade de ácidos e outros possíveis inibidores que o compõe.

Para tanto, dois meios fermentativos foram preparados, o primeiro com presença de glicose comercial, preparado conforme item 3.1.3. E o segundo meio preparado continha todos os nutrientes relacionados no item 3.1.3, com exceção da glicose, que foi adicionada na forma de hidrolisado, por meio da adição de 1,23 mL, correspondendo a 0,25% de glicose.

O pH das amostras foi ajustado para 5,6, com adição de NaOH 3 M (CÁRDENAS-GONZÁLES; RODRIGUEZ, 2010). Em seguida, 0,4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa fúngica foram adicionadas, preparada conforme item 3.1.4 (SHARMA; ADHOLEYA, 2011), e os ensaios foram incubados em agitador orbital (New Brunswick™ Innova®) a 28 °C, 150 rpm (SHARMA; MALAVAYA, 2016). A biomassa fúngica foi avaliada em 72 horas e 120 horas, conforme metodologia descrita no item 3.1.5.

Os fungos foram avaliados separadamente, e as amostras foram realizadas em duplicata.

### 3.5.3 Capacidade de redução da concentração de íons metálicos na presença de hidrolisado como fonte de glicose

Os ensaios para avaliar a capacidade de redução da concentração de Cr (VI) utilizando o hidrolisado como fonte de glicose foi realizada em concentração de 8 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>.

Para as amostras, 150 mL de meio fermentativo descrito no item 3.1.3 foram preparados. Posteriormente, 0,8 mL de uma solução de 1500 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup> foi transferido para o meio, compondo uma solução final de concentração de 8 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>. O procedimento seguiu o padrão dos demais ensaios, sendo inoculado com 0,4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa fúngica, preparada conforme item 3.1.4 (SHARMA; ADHOLEYA, 2011), e incubados em agitador orbital (New Brunswick™ Innova®) a 28 °C, 150 rpm durante 6 dias (SHARMA; MALAVAYA, 2016, adaptado). Foi realizada medida de concentração de cromo (conforme item 3.3) a cada 24 horas, e a quantificação de biomassa (conforme item 3.1.5) foi realizada no final do período de incubação.

Os fungos foram testados separadamente. O controle negativo foi realizado contendo apenas meio fermentativo e solução de Cr (VI), sem adição das cepas fúngicas.

### 3.6 BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE CURTUME

Os ensaios de biorremediação do efluente de curtimento foram realizados de três formas: sem adição de nutrientes, com adição de sais e glicose comercial, com adição de sais e hidrolisado.

Para as amostras sem adição de nutrientes, 150 mL de efluente bruto foram transferidos para um Erlenmeyers. O pH da amostra foi ajustado para 6,0 com adição de NaOH 3 M, posteriormente foram inoculados 0,4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa fúngica (SHARMA; ADHOLEYA, 2011).

Para as amostras com adição de sais e glicose comercial, 150 mL de efluente bruto foram transferidos para um Erlenmeyer, contendo sais e glicose nas proporções do meio fermentativo, conforme item 3.1.3. As amostras foram mantidas sob agitação, em agitador magnético, até diluição completa dos nutrientes. Posteriormente o pH foi ajustado para 6,0, com adição de NaOH 3 M e os fungos foram inoculados em proporção de 0,4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa (SHARMA; ADHOLEYA, 2011).

Para os ensaios de biorremediação do efluente de curtume com adição hidrolisado como fonte de glicose, foram transferidos 150 mL de efluente de curtume para Erlenmeyers, e 1,23 mL de hidrolisado foram adicionados, correspondendo a 0,25% de glicose. O pH do meio foi ajustado para 6,0 com adição de NaOH 3 M. Em seguida, 0,4 g.L<sup>-1</sup> de biomassa

fúngica foram adicionadas (SHARMA; ADHOLEYA, 2011).

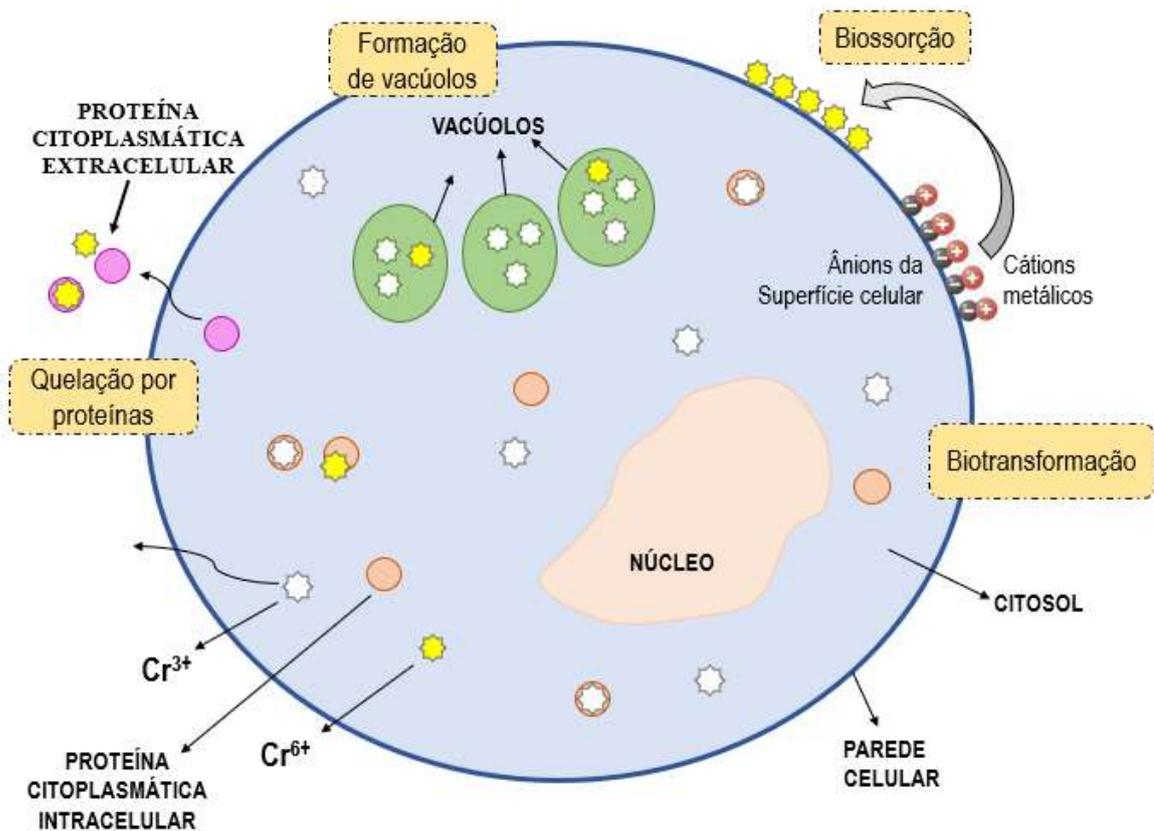
As amostras foram mantidas em agitador orbital (New Brunswick™ Innova®), 28°C, 150 rpm por um período de 6 dias (SHARMA; MALAVAYA, 2016, adaptado). Alíquotas para quantificação de cromo foram retiradas a cada 24 horas.

O controle negativo foi realizado, onde amostras preparadas da mesma maneira, apenas sem massa fúngica, foram avaliadas. Os fungos foram testados separadamente e os ensaios foram realizados em duplicatas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DAS ESTIRPES FÚNGICAS NA PRESENÇA DE Cr (VI)

Visando avaliar o comportamento dos fungos frente a presença dos íons de cromo, ensaios de tolerância e capacidade de redução da concentração de Cr (VI) foram realizados. A partir dos resultados foi possível elencar hipóteses acerca do mecanismo de defesa ativado para proteção das células fúngicas estudadas. Para tanto, na Figura 9 são ilustrados os mecanismos discutidos no decorrer da avaliação dos resultados obtidos.



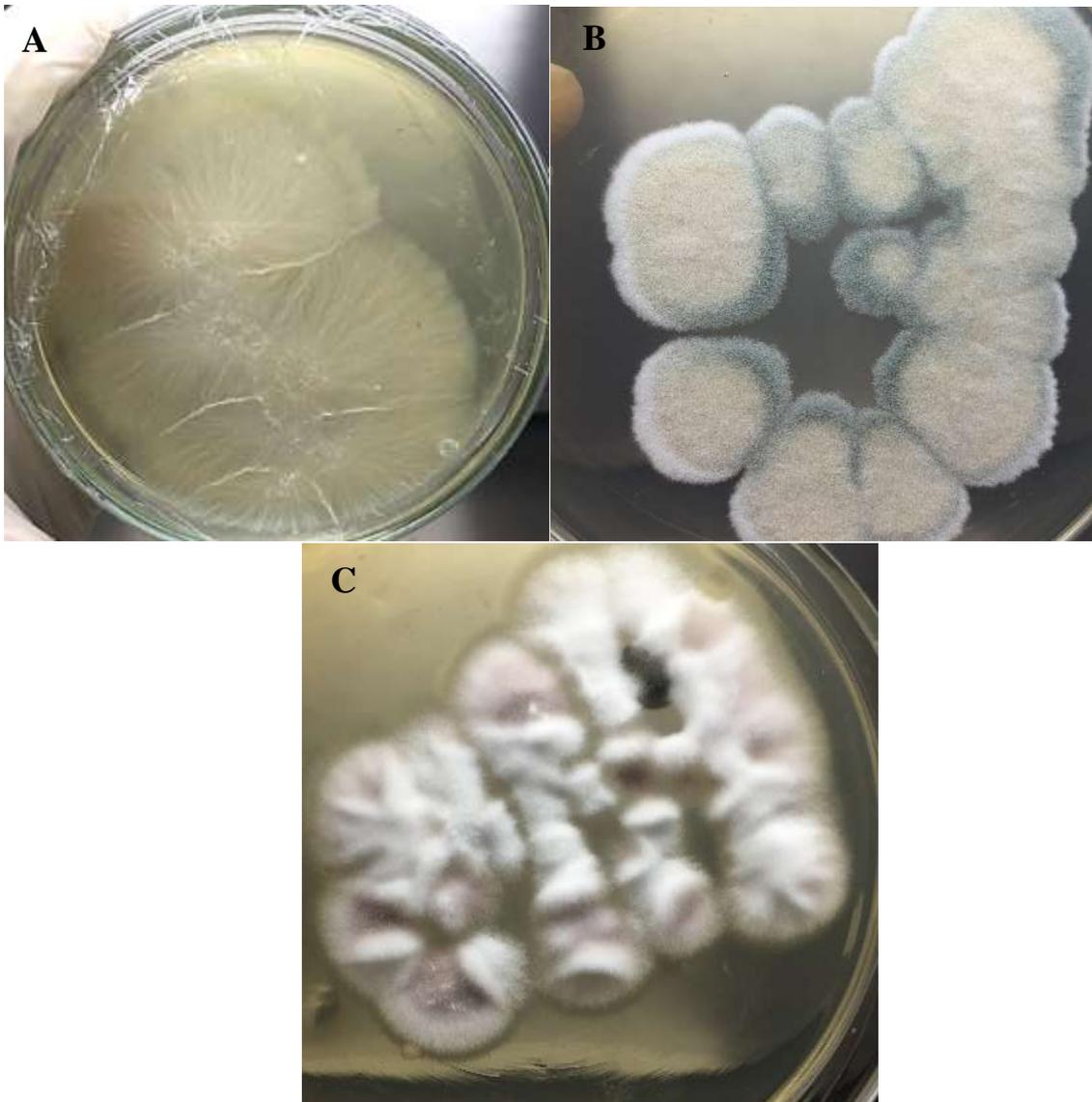
**Figura 9.** Esquema de uma célula fúngica simplificada ilustrando as hipóteses dos mecanismos envolvidos no processo de sequestro dos íons metálicos do meio fermentativo do estudo em questão  
Fonte: Autora

#### 4.1.1 Tolerância dos fungos a presença de Cr (VI)

A avaliação da tolerância dos microrganismos *Fusarium equiseti* (FE), *Penicillium commune* (PC) e *Paecilomyces lilacinus* (PL) foi avaliada por meio da exposição dos fungos em meio fermentativo contendo  $150 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , adicionado na forma de solução de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

Após 72 horas de exposição, sob agitação de 150 rpm e  $28^\circ\text{C}$ , uma alíquota do meio fermentativo foi disposta sobre uma placa contendo meio MEA e incubado por 7 dias a  $28^\circ\text{C}$ ,

visando observar o crescimento dos fungos. O restante do meio fermentativo foi filtrado, a biomassa foi seca a 35°C por 24 horas, e armazenada em tubos falcon esterilizados para posterior análise de microscopia ótica.

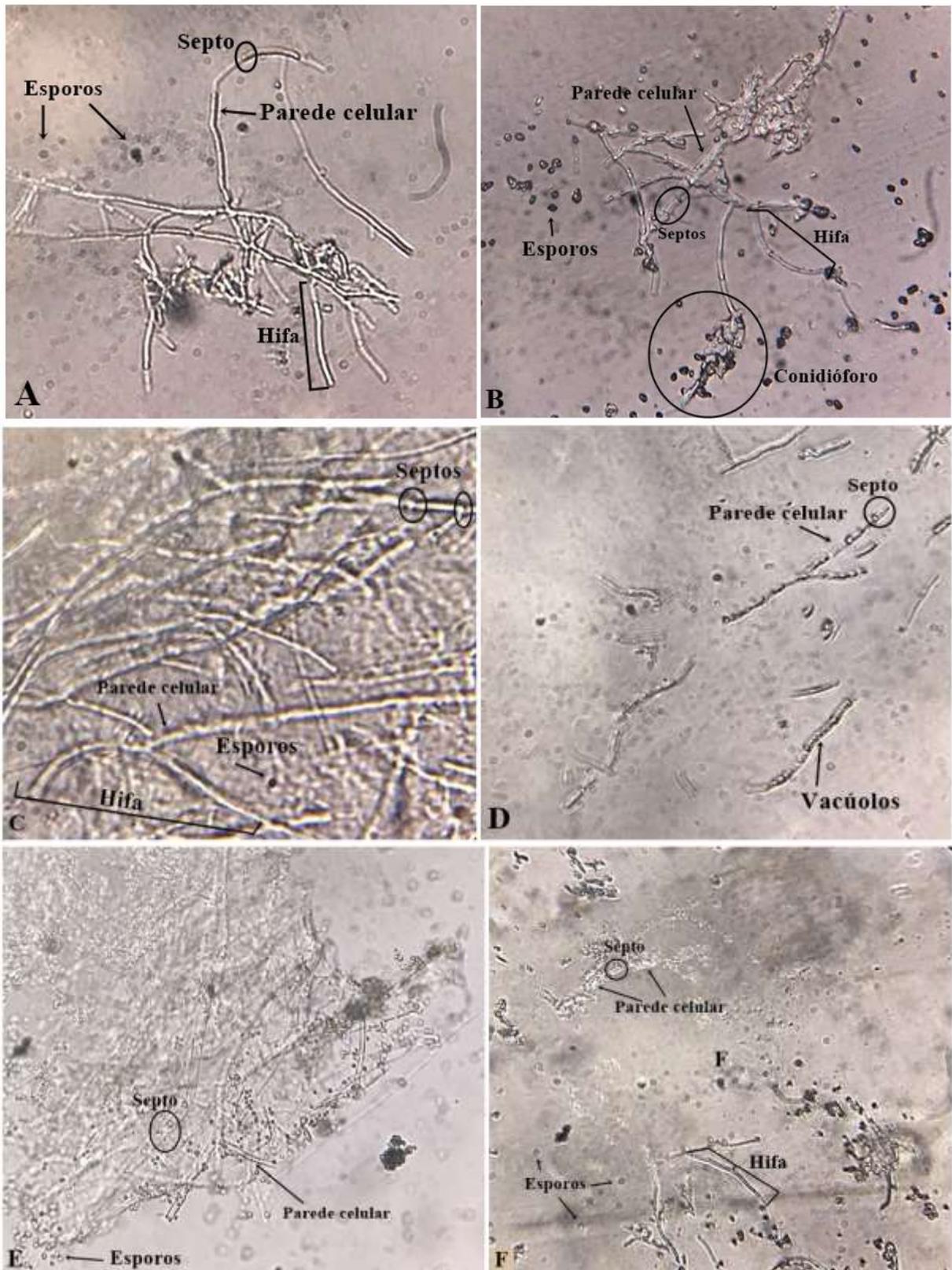


**Figura 10.** Desenvolvimento dos microrganismos após exposição em concentração de 150 mg Cr<sup>6+</sup> .L<sup>-1</sup>. Sendo: A – *Fusarium equiseti*; B – *Penicillium commune*; C – *Paecilomyces lilacinus*  
Fonte: Autora

Ao observar o desenvolvimento das cepas fúngicas (Figura 10) a principal constatação a ser feita é que o estresse pela presença do composto tóxico não matou as células dos fungos, sendo este um indicativo de tolerância ao Cr (VI) pelos microrganismos. Além disso, em análise visual do desenvolvimento dos fungos é possível observar que houve alterações no crescimento quando comparado a Figura 2, onde as cepas fúngicas não foram submetidas a quaisquer estresses por compostos tóxicos. O fungo *Paecilomyces lilacinus* (Figura 10 – C) apresentou maior rugosidade, assim como o fungo *Penicillium commune* (Figura 10 – B)

apresentou diferente coloração, além de menor quantidade de esporos, sugerindo que a presença do metal pode ter acarretado em mudanças no metabolismo destes fungos. Já o fungo *Fusarium equiseti* (Figura 10 – A) desenvolveu-se de maneira efetiva, apresentando poucas alterações conclusivas em relação ao estresse ao qual foi submetido, quando realizada apenas análise visual.

Através da observação das cepas pressupôs-se que mecanismos de defesa das células fúngicas poderiam ter sido ativadas durante o período de exposição da biomassa ao Cr (VI). Neste sentido, visando observar possíveis alterações nas células, como vacúolos, rompimento ou inchaço celular, foram preparadas lâminas e realizada análise de microscopia ótica, expostas na Figura 11.



**Figura 11.** Imagem de análise de microscopia ótica, A: *Paecilomyces lilacinus* sem exposição ao Cr (VI) (controle), B: *Paecilomyces lilacinus* após exposição do metal pesado, C: *Fusarium equiseti* sem exposição ao Cr (VI) (controle), D: *Fusarium equiseti* após exposição ao Cr (VI), E: *Penicillium commune* sem exposição ao Cr (VI) (controle), F: *Penicillium commune* após exposição ao Cr (VI). (Exposição: 150 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 72 horas)

Fonte: Autora.

A tolerância de um organismo à presença de metais está associada à capacidade de sobreviver à toxicidade do composto tóxico, utilizando um mecanismo, seja extra ou intracelular, em resposta ao composto estressante (MOHAMMADIAN et al., 2017). A análise de microscopia ótica sugere que após expostos a alta concentração de Cr (VI) as células fúngicas apresentaram inchaço significativo na parede celular e formação de vacúolos, podendo ser observado nas imagens B, D e F, na Figura 11. Isso ocorre porque, como outros organismos vivos, os fungos filamentosos possuem mecanismos de defesa naturais que visam eliminar o estresse oxidativo produzido pela presença de um composto tóxico, como um metal pesado (LI; HARVEY; MCNEIL, 2009; XU et al., 2017). Sendo que os mecanismos aos quais pressupõe-se a ocorrência neste estudo são ilustrados na Figura 9.

Considerado um mecanismo de defesa intracelular, a formação de vacúolos pode estar envolvida no processo de sequestro dos íons metálicos do meio, sendo resposta intracelular dos fungos filamentosos a presença de compostos tóxicos (XU et al., 2017). Os mecanismos de proteção intracelulares visam a proteção do citosol das células, geralmente envolvendo proteínas citoplasmáticas, como as fitoquelatinas, que realizam o transporte dos íons metálicos para o exterior da célula ou permitem a formação do compartimento vacuolar que desempenha um papel fundamental na degradação molecular e armazenamento de metabólitos, sendo extremamente importante no equilíbrio de íons no citosol e na desintoxicação da célula, conforme ilustrado na Figura 9 em “Quelação por proteínas” (JOHO et al., 1995; ANAHID; YAGHMAEI; GHOBADINEJAD, 2011; SIDDIQUEE et al., 2015).

Em pesquisa desenvolvida por Guria, Guha e Bhattacharya (2014) o fungo *Fusarium* sp. foi isolado de um solo contaminado por efluente da indústria de curtume e demonstrou em seus resultados eficiente potencial de redução do Cr (VI). Este mesmo estudo apresentou diferentes análises em imagens de microscopia eletrônica de varredura que revelaram aumento da rugosidade superficial, inchaço significativo e formação de estruturas irregulares na superfície celular possivelmente induzidas pelo estresse microbiano causado pela presença do Cr (VI).

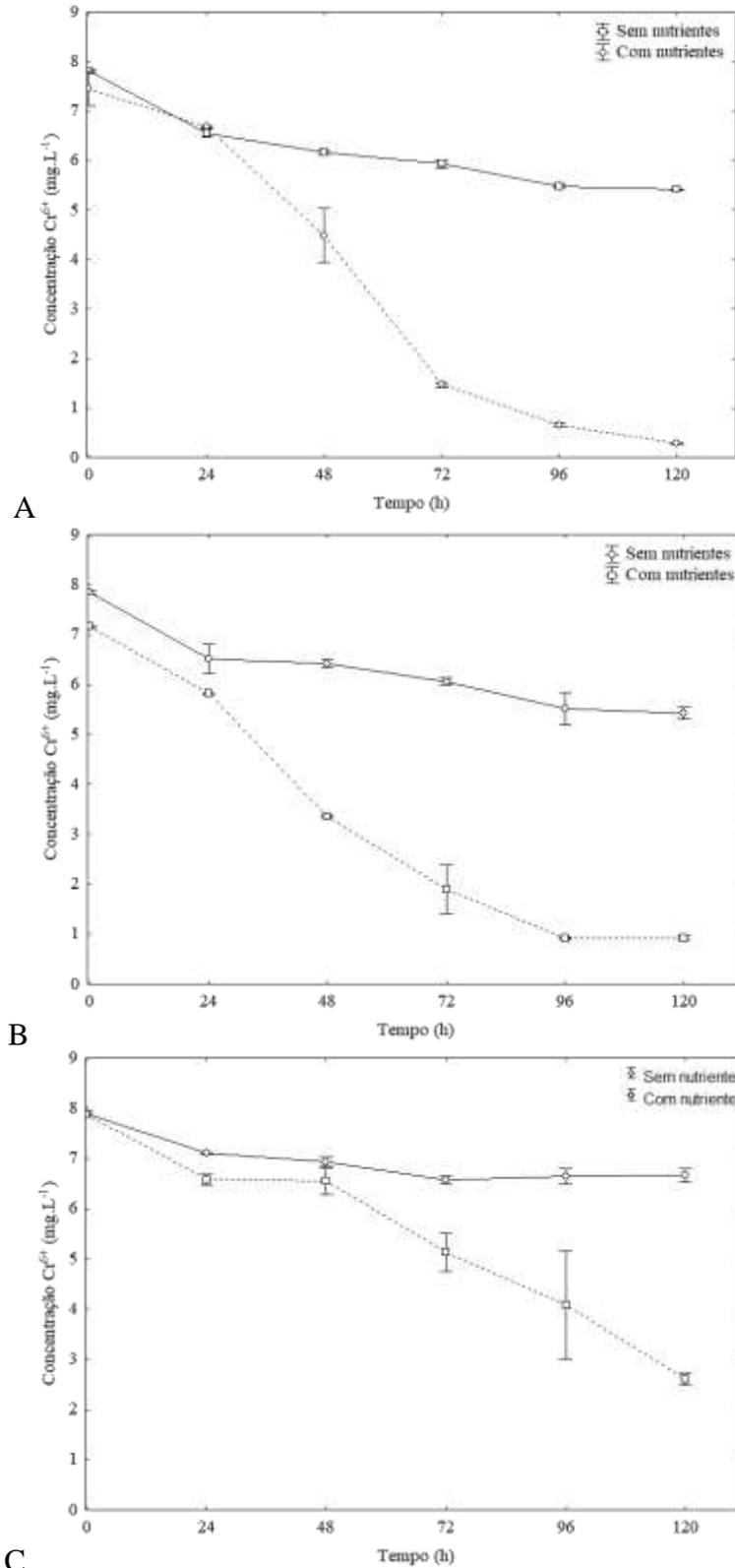
A formação de vacúolos também foi observada por Xu et al. (2017) que através de análises de microscopia eletrônica de varredura, EDX e análise química, observou que a estirpe fúngica *Paecilomyces lilacinus*, após exposta a uma concentração de 50 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, apresentou alta concentração intracelular de Cr<sup>3+</sup> e pequena concentração intracelular de Cr<sup>6+</sup>, além desta constatação, observou-se que o cromo estava presente principalmente intracelularmente em vacúolos. Quanto a análise EDX, os autores observaram que houve também processo de biossorção de Cr<sup>6+</sup> na superfície celular.

É importante observar a constatação de Xu et al. (2017) quanto a presença de alta concentração de  $\text{Cr}^{3+}$  no interior da célula (92,11%), e baixa concentração de  $\text{Cr}^{6+}$  (6,08%). Neste sentido, visto que foram observados vacúolos nas estirpes fúngicas utilizadas, e os autores supracitados utilizaram uma destas cepas, há hipóteses de que o mesmo possa ter ocorrido com os fungos deste estudo. A presença de cromo em estado de oxidação (III) envolve processos metabólicos do fungo, como excreção de proteínas e pequenas moléculas com afinidade e características de oxiredução (Xu et al., 2017), este mecanismo é ilustrado na Figura 9 em “Biotransformação” e “Formação de vacúolos”.

Neste sentido, constata-se que há envolvimento de mecanismos de defesa intra e extracelular nas estirpes fúngicas estudadas e que a tolerância ao metal Cr (VI) é natural dos fungos *Fusarium equiseti*, *Penicillium commune* e *Paecilomyces lilacinus*, visto que as cepas fúngicas utilizadas no estudo em questão são adquiridas comercialmente, não apresentando exposições ao composto antecedentes aos ensaios realizados. Este fato é de extrema relevância, visto que os estudos supracitados utilizam cepas fúngicas isoladas de ambientes onde houve contato com o metal, induzindo os fungos a adaptação morfológica para sobreviver. Geralmente, os locais contaminados com metais apresentam cepas fúngicas resistentes (RUTA et al., 2009). Esta capacidade de biosequestrar ou biotransformar diversos contaminantes orgânicos e inorgânicos, está associada a morfologia dos fungos, principalmente devido a superfície biológica altamente reativa e extensa, alta tolerância a estresses, produção de enzimas e metabólitos secundários (ALBERT et al., 2018).

#### **4.1.2 Capacidade de biotransformação e/ou biossorção dos fungos**

Constatada a tolerância dos fungos ao metal pesado, ensaios de capacidade de redução da concentração de Cr (VI) foram realizados em concentração de 8 mg  $\text{Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os testes foram realizados na presença e na ausência de glicose e sais. Os resultados são apresentados na Figura 12.



**Figura 12.** Gráficos ilustrando o comportamento da concentração de íons de cromo hexavalente no meio fermentativo a  $8 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , sendo representado os dados de média ( $\circ$ ) e erro padrão ( $\square$ ) dos dados experimentais. Nos gráficos são ilustrados o comportamento do meio com nutrientes e se nutrientes, sendo A: *Paecilomyces lilacinus*; B: *Penicillium commune*; C: *Fusarium equiseti*. O controle negativo foi feito e não apresentou alterações de comportamento no decorrer das amostragens.

Fonte: Autora

Ao observar o comportamento dos gráficos é possível constatar que a presença de sais e glicose acarretou numa redução mais efetiva da concentração de íons metálicos no meio, sendo obtidas concentrações finais (média  $\pm$  erro padrão) de  $0,28 \pm 0,04$  mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>,  $0,93 \pm 0,06$  mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup> e  $2,61 \pm 0,15$  mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, para *Paecilomyces lilacinus* (PL), *Penicillium commune* (PC) e *Fusarium equiseti* (FE), respectivamente. Diferente do comportamento na ausência de glicose e sais, que acarretou em uma concentração final de  $5,41 \pm 0,01$  mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>,  $5,43 \pm 0,18$  mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup> e  $6,66 \pm 0,18$  mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, para PL, PC e FE, respectivamente.

Esta diferença no comportamento das cepas fúngicas frente à presença do metal pesado pode estar intimamente relacionado a atividade metabólica fúngica visto que os mecanismos de acúmulo de metal dependem do metabolismo das estirpes fúngicas (PARK; YUN; PARK, 2005), que na presença de glicose e sais ativam estes mecanismos de proteção celular, como a formação de vacúolos observada na análise de microscopia ótica (Figura 11) e ilustrada na Figura 9. É possível observar que ocorre uma redução da concentração do metal estudado na ausência de nutrientes, e este pode estar associado ao mecanismo de biossorção dos íons metálicos na parede celular do fungo, já que para ativação deste mecanismo não necessariamente precisa que ocorra atividade metabólica (PARK; YUN; PARK, 2005).

O processo de biossorção, definido como o processo de ligação dos cátions metálicos na parede celular (Figura 9), é o primeiro mecanismo a ser ativado na presença de compostos tóxicos, visto que a superfície celular é o primeiro componente a entrar em contato com os metais desempenhando o papel fundamental de proteção, agindo como camada protetora, controlando a captação dos íons que são potencialmente tóxicos para a célula (ANAHID; YAGHMAEI; GHOBADINEJAD, 2011; SIDDIQUEE et al., 2015). Este comportamento pode ser observado nos gráficos apresentados na Figura 12, onde é possível perceber que o processo de biossorção possivelmente ocorre nas primeiras 24 horas com maior intensidade nas três estirpes fúngicas testadas, posteriormente, a curva dos ensaios sem nutrientes segue decaindo lentamente até estabilização. Já nos ensaios com nutrientes, os íons metálicos são sequestrados do meio até a finalização do processo em 120 horas, reforçando a hipótese da presença de mecanismos intracelulares dependentes do metabolismo dos fungos.

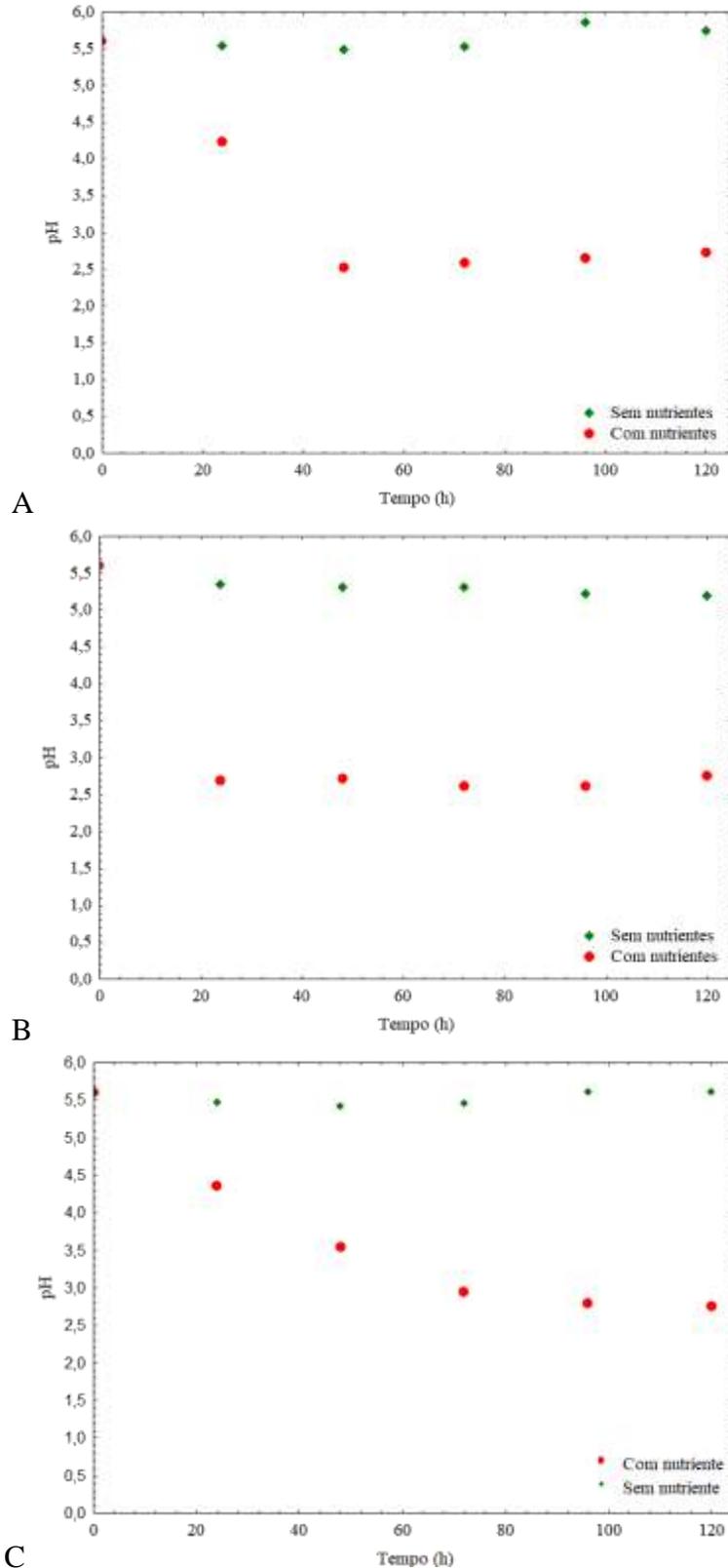
Complementando os dados discutidos, os resultados de quantificação de biomassa para os ensaios de avaliação da redução da concentração de Cr (VI) em 8 mg.L<sup>-1</sup> são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Quantificação da biomassa fúngica para ensaios com 8 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, sendo os dados dispostos como média ± erro padrão. Biomassa inicial: 0,4 g.L<sup>-1</sup>.

Microrganismos	Amostra	Biomassa final (g.L <sup>-1</sup> )
<i>Fusarium equiseti</i>	Com nutriente	0,841 ± 0,132
	Sem nutriente	0,531 ± 0,123
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Com nutriente	1,399 ± 0,008
	Sem nutriente	0,433 ± 0,09
<i>Penicillium commune</i>	Com nutriente	1,325 ± 0,272
	Sem nutriente	0,388 ± 0,012

Constata-se a partir dos resultados que houve aumento da biomassa fúngica nos ensaios com nutriente, indicando que a presença do Cr (VI) no meio não inativou o metabolismo do fungo, que segue crescendo de maneira efetiva. Na quantificação de biomassa fúngica nos ensaios onde não haviam nutrientes não houve metabolismo dos fungos. Estas observações reforçam a hipótese de que a presença de metabolismo intensifica mecanismos de defesa que sequestram do meio os íons metálicos, visto que os resultados para redução da concentração de Cr (VI) foram maiores na presença de glicose e sais, sendo esta a mesma condição para aumento da biomassa fúngica. O aumento da biomassa fúngica é considerado um mecanismo de defesa por alguns autores, como Siddiquee et al. (2015) e Xu et al. (2017), isso porque, quando o fungo concentra a energia no metabolismo dos nutrientes presentes no meio para expansão da células, naturalmente ocorrerá uma distribuição do composto tóxico nas células novas, ocorrendo um processo de diluição da concentração do metal entre as células do fungo, reduzindo a toxicidade para as demais células.

A variação de pH foi importante para reforçar as hipóteses de mecanismos envolvidos no biosequestros e/ou biossorção dos íons metálicos (Figura 13).



**Figura 13.** Gráficos ilustrando o comportamento pH no processo fermentativo a  $8 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nos gráficos são ilustrados o comportamento do meio com nutrientes e se nutrientes, sendo A: *Paecilomyces lilacinus*; B: *Penicillium commune*; C: *Fusarium equiseti*.  
Fonte: Autora

Foi possível constatar a provável ausência de metabolismo fúngico, visualizando o

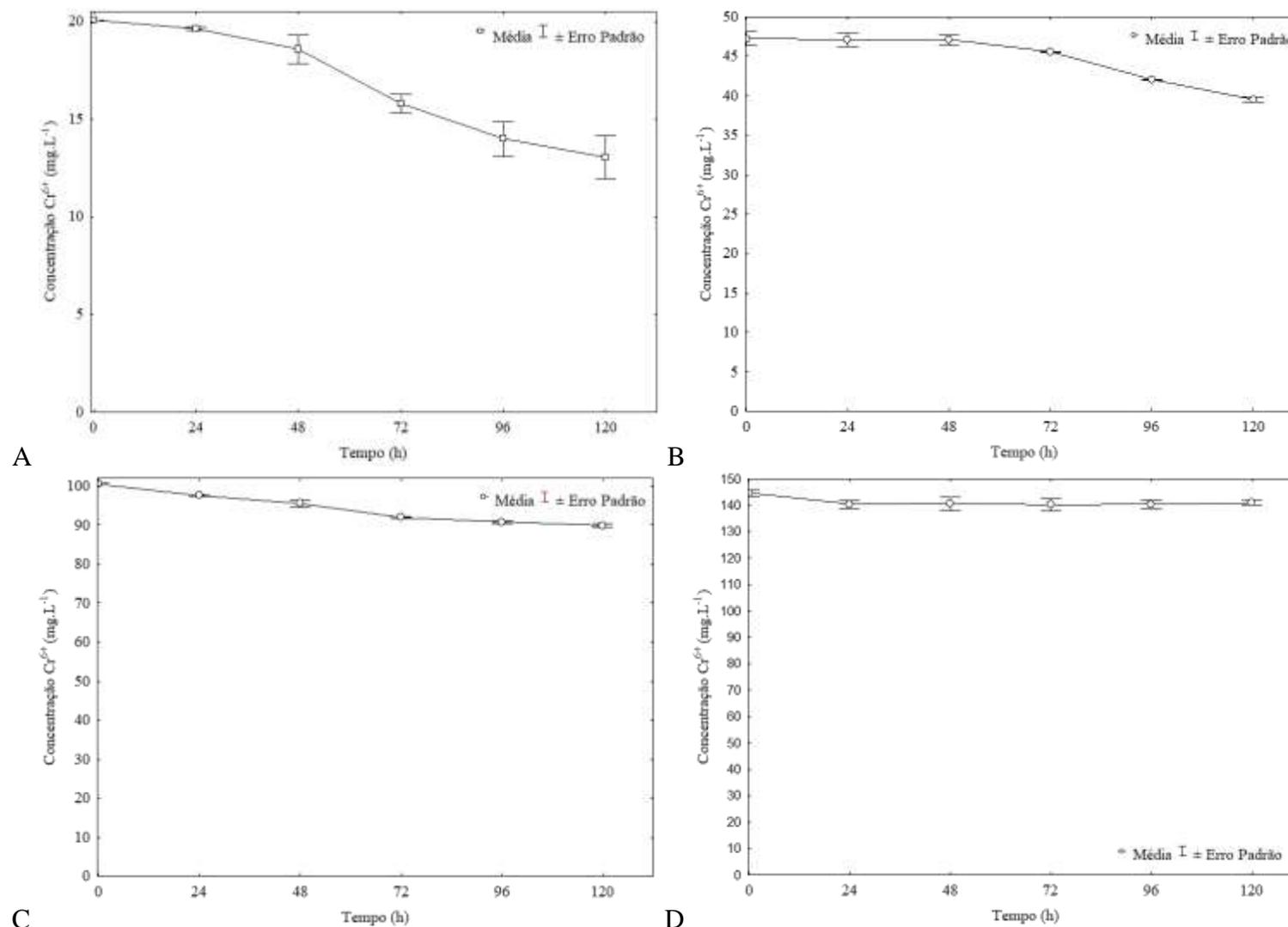
fato de que não houve variação significativa deste parâmetro na ausência de glicose e sais, corroborando com demais discussões frente ao comportamento da concentração do cromo, exposto na Figura 13. Ainda, é possível perceber o decaimento rápido do pH ainda nas primeiras 24 horas, demonstrando a agilidade do fungo para adaptar-se ao meio, bem como a provável liberação de compostos metabólicos que acidificam o meio fermentativo, que podem ser fortemente influenciados pela biotransformação dos íons metálicos do meio fermentativo.

A influência do pH é relatada por Xu et al. (2017), que afirma que em pH elevado mais grupos funcionais com cargas negativas ficam expostos na parede celular dos fungos, e isso resulta numa menor biossorção do  $\text{Cr}^{6+}$  porque menos sítios de ligação ficam expostos. Este fato pressupõe que, se nos ensaios onde não foram adicionados nutrientes fosse iniciado com pH ácido ( $< 3,0$ ) possivelmente ocorreria uma maior redução da concentração de íons metálicos por processo de biossorção (Figura 9), assim como, pode-se interpretar que, o processo de biossorção pode ter maior influência na redução dos íons quando o pH ficou abaixo de 2. Ainda assim, é importante retomar que o processo de biossorção geralmente é o primeiro mecanismo de defesa a ser ativado, por ocorrer na parede celular e esta ser a primeira a entrar em contato com o metal no meio (ANAHID; YAGHMAEI; GHOBADINEJAD, 2011; SIDDIQUEE et al., 2015). Sendo assim, mesmo que em menor eficiência, o processo de biossorção pode ocorrer em  $\text{pH} > 3,0$ .

#### 4.1.3 Exposição das estirpes fúngicas a diferentes concentrações de Cr (VI)

Visando compreender se maiores concentrações dos íons metálicos seriam motivo para a inibição do metabolismo fúngico ou levaria os fungos a morte devido a alta toxicidade do metal, foram realizados ensaios expondo a biomassa fúngica em diferentes concentrações, sendo 20, 50, 100 e 145  $\text{mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os resultados obtidos estão expostos nos gráficos abaixo.

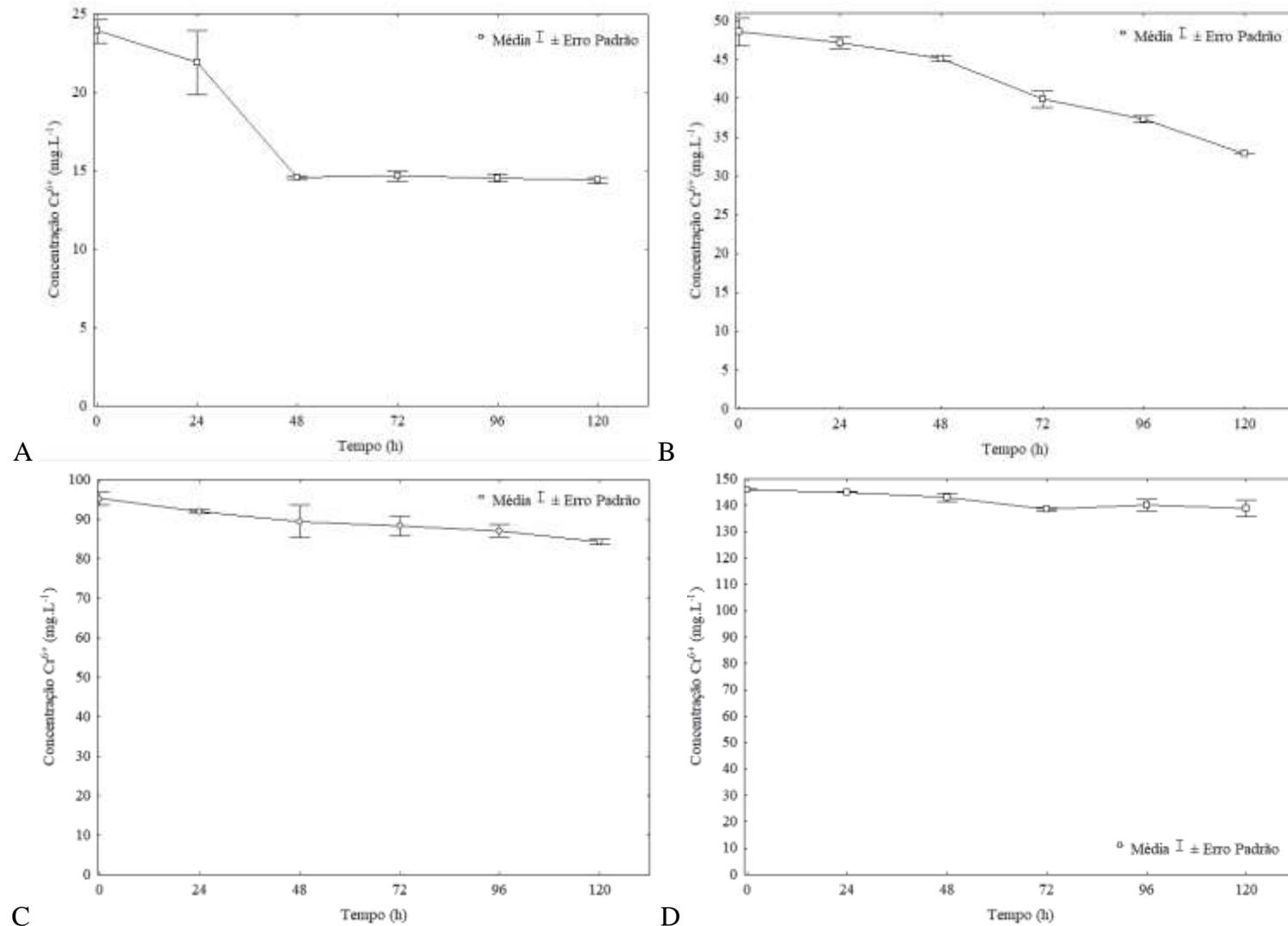
Na Figura 14, dados de remoção de íons metálicos pelo fungo *Fusarium equiseti*, são apresentados. Neste sentido, é possível observar os diferentes comportamentos obtidos no aumento das concentrações, principalmente com relação as maiores concentrações de exposição (100 e 145  $\text{mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ), onde não há alteração significativa da redução do metal no meio. No final do processo de incubação as concentrações ( $\text{mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) estavam em  $13,06 \pm 1,58 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $39,54 \pm 0,43 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $89,87 \pm 0,75 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $140,91 \pm 1,23 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , para os meios contendo 20, 50, 100 e 145  $\text{mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 14.** Comportamento da concentração do cromo hexavalente no meio fermentativo com biomassa do fungo *Fusarium equiseti*, contendo diferentes concentrações, sendo A:  $20 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , B:  $50 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , C:  $100 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , D:  $145 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ . Controle negativo não apresentou redução da concentração.

Fonte: Autora.

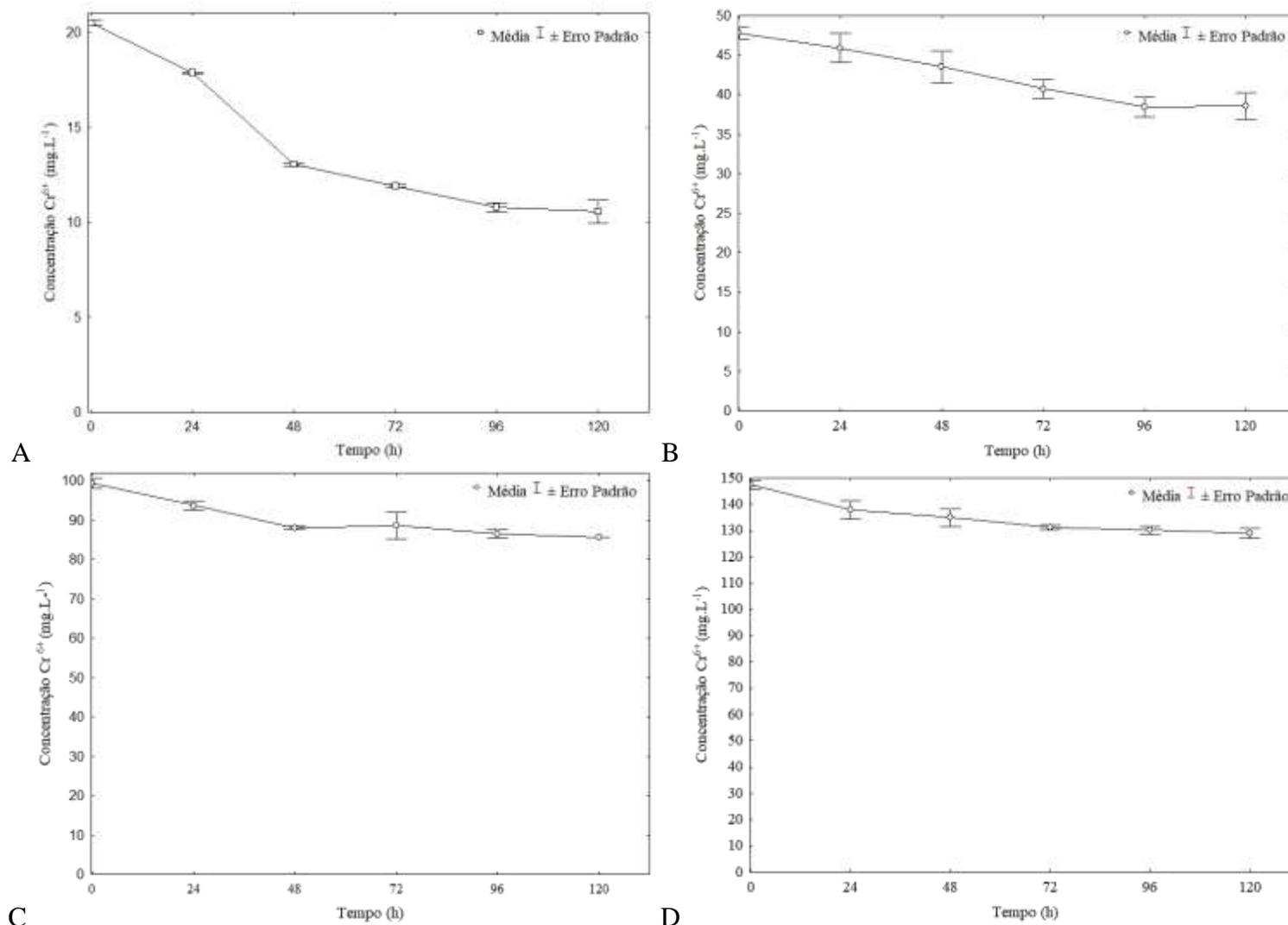
Na Figura 15, dados de concentração de cromo para o meio fermentativo do fungo *Paecilomyces lilacinus* são expostos. O comportamento de redução da concentração foi muito similar a do fungo *Fusarium equiseti*, apresentando redução menos significativa em concentrações elevadas (100 e 145 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>). As concentrações finais dos meios fermentativos foram: 14,41 ± 0,27 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 32,90 ± 0,06 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 84,35 ± 0,93 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 138,81 ± 4,34 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, para os meios contendo 20, 50, 100 e 145 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 15.** Comportamento da concentração do cromo hexavalente no meio fermentativo com biomassa do fungo *Paecilomyces lilacinus*, contendo diferentes concentrações, sendo A: 20 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, B: 50 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, C: 100 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, D: 145 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>. Controle negativo não apresentou redução da concentração.

Fonte: Autora.

Na Figura 16, os resultados são referentes ao fungo *Penicillium commune*, exposto a concentrações de 20, 50, 100 e 140 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>. As concentrações finais foram de 10,56 ± 0,87 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 38,53 ± 2,42 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 85,70 ± 0,01 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, 129,05 ± 2,72 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, para os meios contendo 20, 50, 100 e 145 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>, respectivamente.



**Figura 16.** Comportamento da concentração do cromo hexavalente no meio fermentativo com biomassa do fungo *Penicillium commune*, contendo diferentes concentrações, sendo A: 20  $\text{mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$ , B: 50  $\text{mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$ , C: 100  $\text{mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$ , D: 145  $\text{mg Cr}^{6+}.\text{L}^{-1}$ . Controle negativo não apresentou redução da concentração.

Fonte: Autora.

Constatou-se a partir dos resultados que em maiores concentrações (100 e 145 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>) a redução da concentração do metal não foi efetiva, além de ter diminuído fortemente a produção de biomassa (Tabela 2). Xu et al. (2017) expõe que em concentrações de cromo hexavalente relativamente baixas (<100 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>) ocorre um mecanismo de adaptação frente a exposição ao composto tóxico, onde a cepa fúngica concentra a energia no crescimento para que ocorra a “diluição” da concentração do metal nas células. Quando o nível de toxina é muito alto (>100 mg Cr<sup>6+</sup>.L<sup>-1</sup>) ocorre a diminuição na produção de biomassa devido a limitação na capacidade de tolerância das estirpes, o que resulta na bioacumulação rápida e posterior estabilização do sequestro de íons metálicos do meio.

**Tabela 2.** Quantificação da produção de biomassa nos ensaios da exposição das estirpes fúngicas em diferentes concentrações, sendo os dados dispostos como média ± erro padrão. Biomassa inicial: 0,4 g.L<sup>-1</sup>

Fungo	Concentração (mg Cr <sup>6+</sup> .L <sup>-1</sup> )	Biomassa final (g/L)
<i>Fusarium equiseti</i>	20	1,223 ± 0,268
	50	1,133 ± 0,122
	100	0,534 ± 0,03
	145	0,527 ± 0,108
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	20	1,245 ± 0,428
	50	0,870 ± 0,072
	100	0,341 ± 0,125
	145	0,359 ± 0,03
<i>Penicillium commune</i>	20	1,120 ± 0,005
	50	1,553 ± 0,028
	100	0,672 ± 0,233
	145	0,388 ± 0,111

## 4.2 SUBSTITUIÇÃO DA FONTE DE GLICOSE POR HIDROLISADO

Ao constatar nos ensaios supracitados que o metabolismo dos fungos é de extrema relevância para processos de biosequestro de íons metálicos (PARK; YUN; PARK, 2005), sabe-se da importância da fonte de glicose para a ativação dos metabólitos fúngicos. Neste sentido, visando a substituição da fonte de glicose comercial por uma fonte de glicose alternativa, alguns ensaios foram realizados.

O hidrolisado utilizado passou por processo de caracterização, onde foi constatado a presença de 45,71 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 28,50 g.L<sup>-1</sup> de xilose, 6,32 g.L<sup>-1</sup> de arabinose, 9,18 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,36 g.L<sup>-1</sup> de furfural, e 0,17 g.L<sup>-1</sup> de hidroximetilfurfural, com pH inicial em 4,85. A presença de interferentes é evidente, sendo a de ácido acético a mais proeminente,

com  $9,18 \text{ g.L}^{-1}$ , necessitando uma alta tolerância dos fungos para associar e metabolizar a glicose presente no meio.

Posteriormente a caracterização, ensaios de quantificação de biomassa fúngica na presença de hidrolisado como fonte de glicose, foram realizadas. É importante salientar que para estas análises não foi adicionada solução de cromo, visando avaliar apenas o desenvolvimento das cepas fúngicas. Os resultados de quantificação de biomassa são expostos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados de quantificação da biomassa fúngica em 72 horas de exposição e em 120 horas de exposição, utilizando em um ensaio glicose comercial e em outro o hidrolisado, sendo os dados dispostos como média  $\pm$  erro padrão. Biomassa inicial:  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$

Microrganismo	Tempo (h)	GLICOSE	HIDROLISADO
		Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )
<i>Fusarium equiseti</i>	72	$0,638 \pm 0,167$	$0,468 \pm 0,159$
	120	$1,435 \pm 0,331$	$0,710 \pm 0,061$
<i>Penicillium commune</i>	72	$0,728 \pm 0,158$	$0,677 \pm 0,076$
	120	$1,844 \pm 0,746$	$0,731 \pm 0,182$
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	72	$1,149 \pm 0,140$	$0,669 \pm 0,278$
	120	$1,521 \pm 0,227$	$0,897 \pm 0,157$

A diferença entre o crescimento fúngico na presença de glicose comercial e na presença de hidrolisado é notável, como apresentado na Figura 17. Este fato se deve, principalmente, a facilidade do fungo de perceber e metabolizar rapidamente a glicose comercial, o que não ocorre no hidrolisado visto que as moléculas não estão facilmente disponíveis e assimiláveis pela presença de interferentes, como furfural, ácido acético e hidrometilfurfural.

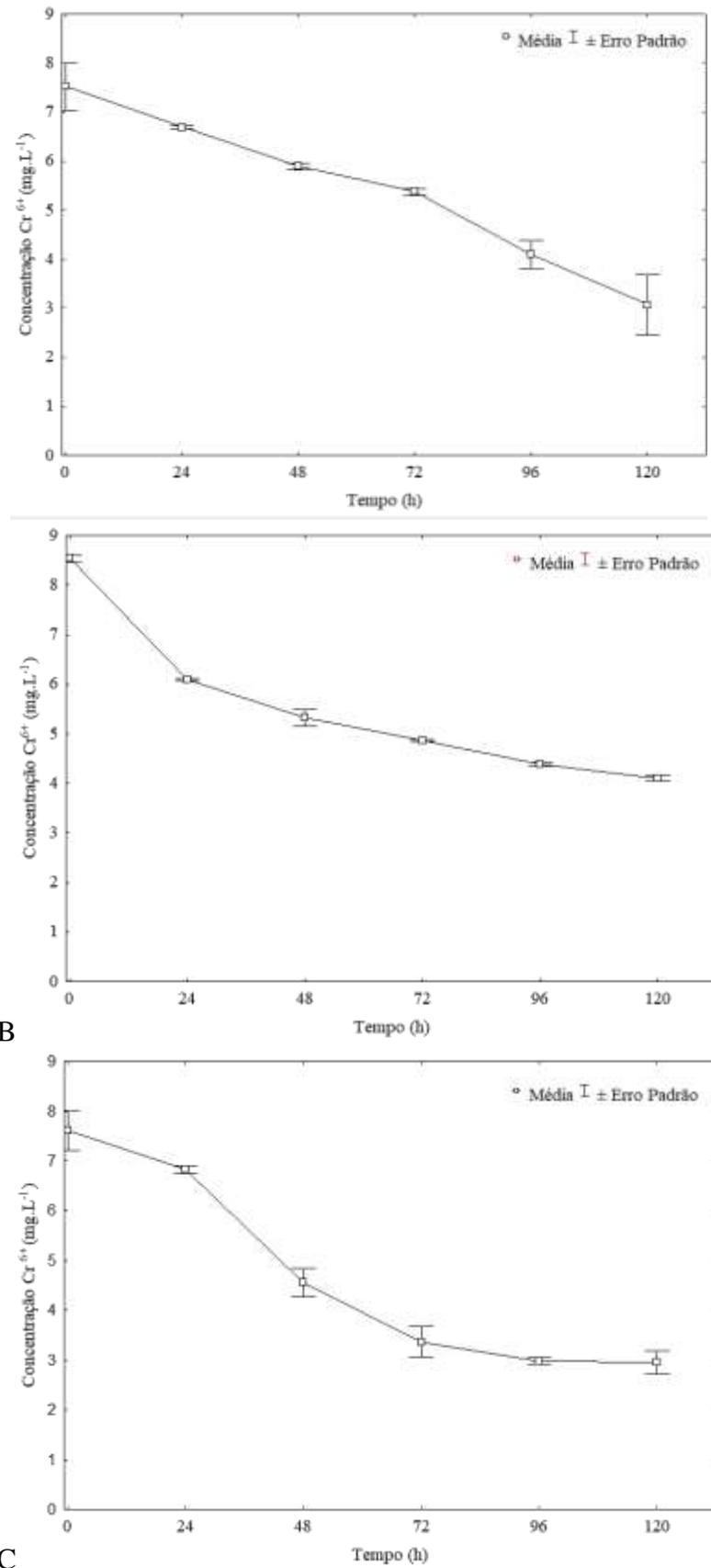


**Figura 17.** Filtros de papéis contendo biomassa do fungo *Penicillium commune* após finalização do processo de 120 horas de crescimento na presença de hidrolisado (esquerda) e glicose (direita).

Fonte: Autora

Esses resultados reforçam a hipótese que os fungos necessitam do seu intenso metabolismo, por este estar fortemente ligado a processos de defesa na presença do metal pesado. O importante a ser observado é que houve capacidade de associar as moléculas de glicose presentes no meio com hidrolisado, indicando ativação do metabolismo fúngico. Concomitante a esta observação, é importante considerar que a busca por processos economicamente viáveis para aplicações em escalas industriais é relevante, e a substituição da fonte de glicose comercial por um subproduto da indústria de bagaço de cana, além de tornar o processo mais viável para ampliação de escala ainda traz um apelo ambiental importante no que diz respeito a utilização de resíduos como produto de outros processos.

A partir dos resultados promissores para crescimento dos fungos utilizando hidrolisado como fonte de glicose, ensaios de redução da concentração de Cr (VI) foram realizados, em condições de  $8 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os resultados estão expostos na Figura 18.



**Figura 18.** Gráficos do comportamento da concentração do cromo hexavalente e ensaios realizados com as cepas fúngicas e a fonte de glicose como hidrolisado de cana de açúcar. A: *Fusarium equiseti* B: *Penicillium commune*; C: *Paecilomyces lilacinus*  
Fonte: Autora

Com a análise dos resultados, constata-se que houve sequestro dos íons metálicos presentes no meio, e o comportamento das curvas de concentração se assemelharam as curvas expostas na Figura 12, onde foram realizados os ensaios com glicose comercial em  $8 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , fortalecendo não mais apenas a hipótese proposta por Park, Yun e Park (2005), sobre a necessidade de metabolismo fúngico para ativação de mecanismos de acúmulo de metal nos estirpes fúngicas, mas também que o fungo conseguiu metabolizar a glicose do hidrolisado e sequestrar os íons mesmo na presença de outros interferentes, possivelmente associando ainda o processo de biossorção. Ainda observa-se que, apesar de similares os comportamentos das curvas, as reduções deste ensaio com hidrolisado foi menor quando comparados ao com glicose, finalizando o processo com concentrações ( $\text{mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de  $2,94 \pm 0,33$ ,  $4,09 \pm 0,07$  e  $3,08 \pm 0,88$ , para PL, PC e FE, respectivamente.

### 4.3 BIORREMEDIAÇÃO DO EFLUENTE DE CURTUME

#### 4.3.1 Caracterização do efluente de curtume

Primeiramente, a caracterização físico-química do efluente foi realizada e os dados obtidos estão expostos na Tabela 4.

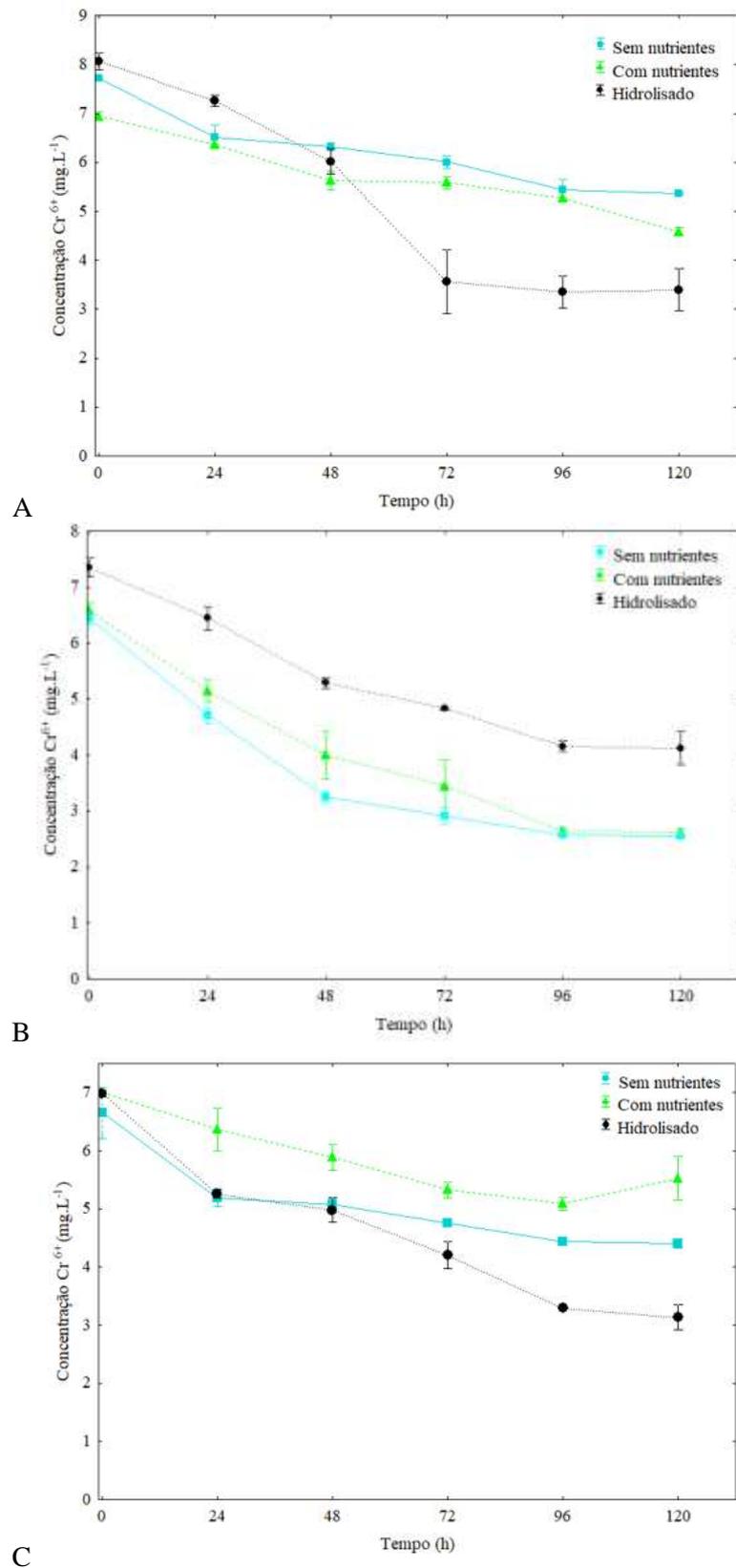
**Tabela 4.** Parâmetros avaliadas no processo de caracterização do efluente de curtume

Parâmetros	Valores
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	5961,9 mg/L.O <sub>2</sub>
Demanda Biológica de Oxigênio (DBO <sub>5</sub> )	217,5 mg/L.O <sub>2</sub>
Óleos e graxas	99 mg/L
Sólidos Totais	91142 mg/L
Condutividade Elétrica (CE)	16710,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Cloretos	27844,2 mg/L
pH	3,49
Oxigênio Dissolvido (OD)	0,65 mg/L.O <sub>2</sub>
Cromo (VI)	$7,22 \pm 1,78$

#### 4.3.2 Avaliação da capacidade dos fungos de biorremediação de efluente de curtume

A biorremediação do efluente de curtume foi realizada em três diferentes condições: com glicose e sais, sem nutrientes e com adição de hidrolisado. Os resultados estão expostos nos gráficos na Figura 19.

Para os fungos FE e PL, os percentuais de remoção mais efetivos foram na condição com hidrolisado como fonte de carbono. Para o fungo PC, as condições com nutrientes e sem nutrientes foram as de maior efetividade.



**Figura 19.** Gráficos dos resultados obtidos para testes realizados no efluente de curtume, em três condições: com adição de glicose e sais; com adição de hidrolisado; apenas efluente, sendo representado os dados de média (○) e erro padrão (I) dos dados experimentais. Estão distribuídos da seguinte maneira: A: *Fusarium equiseti*; B: *Penicillium commune*; C: *Paecilomyces lilacinus*. O controle negativo foi feito e não apresentou diferença significativa.

Fonte: Autora

Os resultados obtidos para FE e PL podem ser interpretados da seguinte maneira. O ensaio realizado apenas na presença de hidrolisado sem adição de sais permitiu que os sais já presentes no efluente de curtume fossem utilizados no metabolismo, o que justificaria a redução ter sido menos efetiva na presença de nutrientes, podendo ter acontecido a inibição dos fungos pela alta concentração de sal no meio. Assim como, a redução ser menos efetiva no meio sem nutrientes pode ser interpretada pela ausência da fonte de glicose, não permitindo que ocorresse o metabolismo, e a concentração de íons fosse retirada do meio por mecanismos de defesa que não dependam do metabolismo do fungo (PARK; YUN; PARK, 2005).

Ainda, segundo Xu et al. (2017), a presença de sulfatos em pH 6,0 pode aumentar a redução de cromo no meio, o que pode ser observado nos resultados de FE e PL, visto que sulfatos podem estar presentes no efluente devido ao processo de curtimento do couro contar com adição de diferentes sais. Este fato dá-se pelo efeito essencial da proteína glutathione, envolvida nos mecanismos de alívio do estresse oxidativo das células, sendo os sulfatos extremamente benéficos para biossíntese desta proteína. Ou seja, a presença de sulfatos aumenta os mecanismos de defesa intracelulares através da biossíntese acelerada de glutathione que induz o aumento da tolerância e a redução do  $\text{Cr}^{6+}$ .

Quanto as concentrações finais ainda presentes no meio do efluente de curtume as menores obtidas para cada fungo foram de  $3,40 \pm 0,61 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  para o fungo FE e  $3,14 \pm 0,31 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  para o fungo PL na presença de hidrolisado. Para o fungo PC a menor concentração foi obtida na condição sem nutrientes, sendo  $2,56 \pm 0,08 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Apesar de promissores, as concentrações que ficaram no meio ainda são tóxicas para o meio ambiente. No Brasil, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 430 de 13 de maio de 2011 que “dispõe sobre condições, parâmetros e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores” regulamenta concentrações máximas de substâncias por litro de efluente lançado em cursos hídricos, sendo para o Cr (VI) exigida uma concentração máxima de  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , e para o Cr (III), considerado 500-1000 vezes menos tóxico que o anterior, a concentração máxima exigida no lançamento de efluente é de  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados demonstrando a capacidade de diferentes biomassas fúngicas na remediação de metais pesados, como *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp*, *Pleorotus sp.*, isolados de diferentes locais e utilizados na remoção de metais pesados e tóxicos que apresentaram resultados notáveis (M.;

SAMUEL; CHIDAMBARAM, 2014; SMILY; SUMITHRA, 2017; MOHAMMADIAN et al., 2017; VASEEM; SINGH; SINGH, 2017). Isso porque, embora os tratamentos químicos atuais possuam alta taxa de eficiência estes métodos não são completamente satisfatórios, principalmente quando trata-se de viabilidade econômica e ambiental, visto que geram grande quantidade de resíduo secundário ao processo de tratamento, são utilizados grandes volumes de reagente químicos, além de realizarem um processo de transferência do metal do efluente líquido para o lodo que deve ser posteriormente encaminhado para ambientes seguros, gerando custos extras e sendo ainda, uma grande ameaça ao meio ambiente (PARK; YUN; PARK, 2005)

Ainda assim, mesmo que o tratamento biológico possa reduzir significativamente os custos de produtos químicos e energia em comparação com o tratamento físico e químico convencional, ainda há muitos obstáculos que devem ser estudados, como a baixa taxa de redução e dificuldade de separação das células (SHARMA; ADHOLEYA, 2011).

Acredita-se, por meio das hipóteses levantadas durante este estudo, que os fungos FE, PL e PC possuem grande possibilidade de biosequestro dos íons metálicos utilizando mecanismos que dependem do metabolismo, sendo assim, possivelmente se ocorresse o fornecimento contínuo de nutrientes, principalmente fonte de glicose, a redução dos íons no meio teria maior efetividade.

## 5 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS

A utilização de fungos *Fusarium equiseti*, *Penicillium commune* e *Paecilomyces lilacinus* no processo de redução da concentração de Cr (VI) em efluente de curtume demonstrou grande potencial, principalmente após estudo dos mecanismos de defesa possivelmente utilizados pelos fungos frente ao estresse causado pela presença do metal. O entendimento destes mecanismos foi essencial para compreender e hipotetizar processo de biorremediação do efluente, e elencar possíveis complementações de processo para tornar mais efetiva a redução da concentração, visto que, apesar de ter ocorrido a redução da concentração de Cr (VI) no efluente, o metal ainda está presente em concentrações de  $3,40 \pm 0,61 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  para o fungo FE e  $3,14 \pm 0,31 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  para o fungo PL na presença de hidrolisado, e  $2,56 \pm 0,08 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  para o fungo PC, sendo tóxico para o meio ambiente e não se enquadrando no previsto pela legislação brasileira.

A análise de microscopia ótica permitiu constatar que a exposição das cepas fúngicas ao metal induz a formação de vacúolos, inchaço celular e crescimento desordenado. Estas características são apresentadas como mecanismos de defesa celular intracelulares, sendo estas as possíveis respostas das células fúngicas a presença do metal. Ainda, os ensaios de redução da concentração de Cr(VI) foram realizados na presença e na ausência de nutrientes, o que permitiu constatar a importância do metabolismo dos fungos no biosequestro dos íons metálicos, sendo obtido concentrações finais de  $0,28 \pm 0,04 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0,93 \pm 0,06 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $2,61 \pm 0,15 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , para *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium commune* e *Fusarium equiseti*, respectivamente para condição com glicose e sais. Diferente do comportamento na ausência de glicose e sais, que acarretou em uma concentração final de  $5,41 \pm 0,01 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $5,43 \pm 0,18 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $6,66 \pm 0,18 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ , para PL, PC e FE, respectivamente. Ao expor as estirpes fúngicas a ensaios de concentrações maiores (20, 50, 100 e  $145 \text{ mg Cr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ ) verificou-se a redução da produção de biomassa, o que pode estar intimamente relacionado a tolerância dos fungos, já que esta é limitada.

É importante salientar que este trabalho é de caráter inovador e está em sua fase inicial, sendo assim, mais estudos devem ser desenvolvidos, com o objetivo de melhorar a eficiência de remoção do metal por parte dos fungos recomenda-se como trabalhos futuros:

- Otimizar o processo, investigando parâmetros de processo como agitação, pH, temperatura e quantidade de biomassa fúngica;
- Estudar processo de fluxo contínuo dos nutrientes, visando o aumento do metabolismo

buscando o melhoramento do biosequestro dos íons;

- Imobilizar os fungos para viabilizar processos de reutilização das células fúngicas em aumentos de escala;
- Estudar o processo de protonação da biomassa visando aumento do mecanismo de bioadsorção;

Enfim, o processo de redução da concentração de íons de  $\text{Cr}^{6+}$  em efluentes de curtume mostrou-se promissor. Com melhoramento do processo através dos estudos propostos acima, no futuro este tratamento biológico poderá ser ampliado e estudado para indústrias de curtume de pequeno porte. Além disso, há uma necessidade e um apelo mundial para o desenvolvimento de novos métodos de tratamento de resíduos e efluentes líquidos que sejam viáveis economicamente e ecologicamente corretos.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Arun; KUMAR, Vinay; PANDEY, Banshi Dhar. Remediation options for the treatment of electroplating and leather tanning effluent containing chromium - a review. **Mineral Processing And Extractive Metallurgy Review**, v. 27, n. 2, p.99-130, abr. 2006.
- AHLUWALIA, Sarabjeet Singh; GOYAL, Dinesh. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p.2243-2257, set. 2007.
- AHMAD, Muhammad Fayyaz; HAYDAR, Sajjad. Evaluation of a newly developed biosorbent using packed bed column for possible application in the treatment of industrial effluents for removal of cadmium ions. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, v. 62, p.122-131, maio 2016.
- ALBERT, Quentin; LELEYTER, Lydia; LEMOINE, Mélanie; HEUTTE, Natacha; RIOULT, Jean-Philippe; SAGE, Lucile; BARAUD, Fabienne; GARON, David. Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*. **Chemosphere**, v. 196, p.386-392, abr. 2018
- ALVES, Neiviane de Jesus. **Extração de Cromo (VI) por salting-out com um solvente aquoso homogêneo e com 2-propanol**. 2010. 34 f. Monografia (Especialização) - Curso de Química, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **3500-CR CHROMIUM**: Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: Water Environmental Federation, 1998.
- ANAHID, Sanaz; YAGHMAEI, Soheila; GHOBADINEJAD, Zahra. Heavy metal tolerance of fungi. **Scientia Iranica**, v. 18, n. 3, p. 502-508, jun. 2011.
- BAZOTI, Suzana Fátima; GOLUNSKI, Simone; SIQUEIRA Diego Pereira; SCAPINI, Thamaris; BARILLI, Évelyn T.; MAYER, Diego Alex; BARROS, Katharina O.; ROSA, Carlos A.; STAMBUK, Boris U.; ALVES Jr., Sérgio L.; VALÉRIO, Alexsandra; OLIVEIRA, Debora de; TREICHEL, Helen. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p.582-587, nov. 2017.
- BLUMER, Solange Aparecida Groppo. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, 2002.
- BRASIL. Congresso. Câmara dos Deputados. Resolução nº 430, de 15 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.. **Lex**. Brasília, 13 maio 2011.

CÁRDENAS-GONZÁLEZ, Juan F.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, Ismael. Hexavalent Chromium Removal by *Paecilomyces sp.* Fungal Strain Isolated from Environment. **Bioinorganic Chemistry And Applications**, v. 2010, p.1-6, 2010.

CONCEIÇÃO, Daniele Priscila da. **Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus sp.* ES29**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

DAI, Libo; CUI, Lan; ZHOU, Dongju; HUANG, Jiajia; YUAN, Siguo. Resource recovery of Cr(VI) from electroplating wastewater: Laboratory and pilot-scale investigation using fibrous weak anion exchanger. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, v. 54, p.170-177, set. 2015.

GERN, R. M. M. **Estudo de Meios de Cultivo para Produção de Biomassa e Polissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso**. 2005. 156 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005

GURIA, Manas Kumar; GUHA, Arun Kumar; BHATTACHARYYA, Maitree. A green chemical approach for biotransformation of Cr(VI) to Cr(III), utilizing *Fusarium sp.* MMT1 and consequent structural alteration of cell morphology. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p.424-433, mar. 2014.

HOSSEINI, Seyed Saeid; BRINGAS, Eugenio; TAN, Nicolas R.; ORTIZ, Inmaculada; GHAHRAMANI, Maral; SHHAHMIRZADI, Mohammad Amin Alaei. Recent progress in development of high performance polymeric membranes and materials for metal plating wastewater treatment: A review. **Journal Of Water Process Engineering**, v. 9, p.78-110, fev. 2016.

HUANG, Chao; LUO, Mu-Tan; CHEN, Xue-Fang; XIONG, Lian; LI, Xon-Mei; CHEN, XinDe. Recent advances and industrial viewpoint for biological treatment of wastewaters by oleaginous microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 232, p.398-407, maio 2017.

JOHO, Masanori; INOUHE, Masahiro; TOHOYAMA, Hiroshi; MURAYAMA, Tetsuo. Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi. **Journal Of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 2, p.164-168, fev. 1995.

JOUTEY, Nezha Tahri; BAHAFID, Wifak; SAYEL, Hanane; GHACHTOULI, Naima El. Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. **Biodegradation - Life Of Science**, p.289-320, 14 jun. 2013.

KANG, Chang-ho; SO, Jae-seong. Heavy metal and antibiotic resistance of ureolytic bacteria and their immobilization of heavy metals. **Ecological Engineering**, v. 97, p.304-312, dez. 2016.

KIM, Changman; LEE, Cho Rong; SONG, Young Eun; HEO, Jinhee; CHOI, Sung Mook; LIM, Dong-Ha; CHO, Jaehoon; PARK, Chulhwan; JANG, Min; KIM, Jung Rae. Hexavalent chromium as a cathodic electron acceptor in a bipolar membrane microbial fuel cell with the

simultaneous treatment of electroplating wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 328, p.703-707, nov. 2017.

KRISHNA, A. Keshav; MOHAN, K. Rama. Distribution, correlation, ecological and health risk assessment of heavy metal contamination in surface soils around an industrial area, Hyderabad, India. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 5, 24 fev. 2016.

LI, Qiang; HARVEY, Linda M.; MCNEIL, Brian. Oxidative stress in industrial fungi. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 29, n. 3, p.199-213, 9 jun. 2009.

LUO, Sheng; QIN, Fan; MING, Yin'an; ZHAO, Huiping; LIU, Yunling; CHEN, Rong. Fabrication uniform hollow Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> nanospheres via Kirkendall effect for photocatalytic reduction of Cr(VI) in electroplating industry wastewater. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 340, p.253-262, out. 2017.

M, Evy Alice Abigail.; SAMUEL, Melvin S.; CHIDAMBARAM, Ramalingam. Hexavalent chromium biosorption studies using *Penicillium griseofulvum* MSR1 a novel isolate from tannery effluent site: Box–Behnken optimization, equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 49, p. 156-164, abr. 2014.

MALAVIYA, Piyush; SINGH, Asha. Physicochemical Technologies for Remediation of Chromium-Containing Waters and Wastewaters. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology**, v. 41, n. 12, p.1111-1172, 28 abr. 2011.

MOHAMMADIAN, Elham; AHARI, Asadollah Babai; ARZANLOU, Mahri; OUSTAN, Shahin; KHAZAEI, Sayyed Hossein. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. **Chemosphere**, v. 185, p.290-296, out. 2017.

NOVAK, Martin; CHRASTNY, Vladislav; SEBEK, Ondrej; MARTINKOVA, Eva; PRECHOVA, Eva; CURIK, Jan; VESELOVSKY, Frantisek; STEPANOVA, Marketa; DOUSOVA, Barbora; BUSEK, Frantisek; FARKAS, Juraj; ANDRONIKOV, Alexandre; CIMOVA, Nikileta; HOUSKOVA, Marie. Chromium isotope fractionations resulting from electroplating, chromatography and anodizing: Implications for groundwater pollution studies. **Applied Geochemistry**, v. 80, p.134-142, maio 2017

PARK, Donghee; YUN, Yeoung-sang; PARK, Jong Moon. Use of dead fungal biomass for the detoxification of hexavalent chromium: screening and kinetics. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p.2559-2565, jun. 2005.

PRADHAN, Debabrata; SUKLA, Lala Behari; SAWYER, Matthew; RAHMAN, Pattanathu. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, v. 55, p.1-20, nov. 2017.

REHMAN, Muhammad Zia Ur; RIZWAN, Muhammad; ALI, Shafagat; OK, Yong Sik; ISHAQUE, Wajid; SAIFULLAH; NAWAZ, Muhammad Farrakh; AKMAL, Fatima; WAGAR, Magssoda. Remediation of heavy metal contaminated soils by using *Solanum nigrum*: A review. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 143, p.236-248, set. 2017.

RUTA, Lavinia; PARASCHIVESCU, Codruta; MATAACHE, Mihaela; AVRAMESCU, Sorin; FARCASANU, Ileana Cornelia. Removing heavy metals from synthetic effluents using “kamikaze” *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p.763-771, out. 2009.

SCARAZZATO, Tatiana; PANOSSIAN, Zehbour; TENÓRIO, Jorge Alberto Soares; PEREZ-HERRANZ, Valentin; ESPINOSA, Denise Croce Romano. A review of cleaner production in electroplating industries using electro dialysis. **Journal Of Cleaner Production**, v. 168, p. 1590-1602, dez. 2017.

SHARMA, Seema; ADHOLEYA, Alok. Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 2, p.309-317, mar. 2011

SHARMA, Smiley; MALAVIYA, Piyush. Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant novel fungal consortium. **Ecological Engineering**, v. 91, p.419-425, jun. 2016.

SHUGABA, A.; WUYEP, P. A.; NORK A. J.; AMEH, A.; LORI, J. A. Bioremediation of Hexavalent Chromium and Tannic Acid in Synthetic Tannery Wastewater Using Free and Calcium Alginate–Immobilized Spores and Mycelia of *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus*. **Bioremediation Journal**, v. 14, n. 3, p.142-149, 23 jul. 2010.

SIDDIQUEE, Shafiquzzaman; ROVINA, Kobun; AZAD, Sujjat Al; NAHER, Laila; SURYANI, Saallah; CHAIKAEW, Pasicha. Heavy Metal Contaminants Removal from Wastewater Using the Potential Filamentous Fungi Biomass: A Review. **Journal Of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 6, p.384-393, 2015.

SMILY, John Rose Mercy Benila; SUMITHRA, Pasumalai Arasu. Optimization of Chromium Biosorption by Fungal Adsorbent, *Trichoderma* sp. BSCR02 and its Desorption Studies. **Hayati Journal Of Biosciences**, v. 24, n. 2, p.65-71, abr. 2017.

TAHERI, Reza; BAHRAMIFAR, Nader; ZARGHAMI, Mohammad Reza; JAVADIAN, Hamedreza; MEHRABAN, Zahra. Nanospace engineering and functionalization of MCM-48 mesoporous silica with dendrimer amines based on [1,3,5]-triazines for selective and pH-independent sorption of silver ions from aqueous solution and electroplating industry wastewater. **Powder Technology**, v. 321, p.44-54, nov. 2017.

VASEEM, Huma; SINGH, Vijay Kumar; SINGH, M. P. Heavy metal pollution due to coal washery effluent and its decontamination using a macrofungus, *Pleurotus ostreatus*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 145, p.42-49, nov. 2017.

XU, Xingjian; XIA, Lu; CHEN, Wenli; HUANG, Qiaoyun. Detoxification of hexavalent chromate by growing *Paecilomyces lilacinus* XLA. **Environmental Pollution**, v. 225, p.47-54, jun. 2017.