



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE

**POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO TRATAMENTOS DA  
TOXICIDADE DO EXTRATO DE TABACO – *Nicotiana tabacum***

**William Bartolomeu de medeiros**

**Foz do Iguaçu**

**2017**



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE

## **POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO TRATAMENTOS DA TOXICIDADE DO EXTRATO DE TABACO – *Nicotiana tabacum***

**William Bartolomeu de medeiros**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Co-orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli-Santos

**Foz do Iguaçu**

**2017**

WILLIAM BARTOLOMEU DE MEDEIROS

**POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO TRATAMENTOS DA  
TOXICIDADE DO EXTRATO DE TABACO – *Nicotiana tabacum***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
UNILA

---

Profa. Me. Juliana Kafka Bilha  
UNILA

---

Profa. Dra. Júlia Ronzella Ottoni  
UDC

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família pelo apoio, carinho e cuidado durante esses longos anos longe de casa. A minha mãe, irmão e irmã por sempre torcerem por mim.

Agradeço muito à professora Rafaella e ao professor Michel, meus orientadores, por terem acreditado no meu potencial e por estarem sempre dispostos em responder minhas dúvidas, sempre com paciência e atenção. Muito obrigado, aprendi muito com vocês!

Aos professores Cleto e Chiba pela atenção e disposição em responder minhas incontáveis dúvidas sobre análises estatísticas.

Ao professor Gleisson, não apenas pelas didáticas e interessantíssimas aulas, mas também pela amizade extra-classe.

À professora Maria Claudia Gross pelo conjunto orientadora/professora, amiga e motivadora. Foi um prazer enorme tê-la conhecido, levarei um pouquinho do que aprendi convivendo com a senhora na formação do profissional que quero ser no futuro.

À Juliana e a Júlia por terem aceitado compor a banca.

À família UNILEIRA que tornou esses anos memoráveis. Dentre todos, não poderia deixar de citar os mais próximos e companheiros dessa viagem: Crovella, Ricardo e Flávia. E os novos tripulantes igualmente importantes nas minhas boas lembranças desse tempo: Lara, Samantha e Marina. Meus sinceros agradecimentos por fazerem parte dessa história.

À Camila, que também faz parte da família unileira, pela amizade incondicional. Obrigado por me aturar todos esses anos e estar sempre presente em todos os meus *ups and downs*.

À Alice, Renata e Rosmary pela ajuda nos experimentos do meu TCC.

A todos os técnicos do laboratório por sempre estarem dispostos a ajudar. Especialmente à Amanda pelas diversas contribuições em meus “calculos” de soluções. Ao Fernando pelas conversas sobre metodologias que me ajudaram a compreender com maior profundidade minhas análises. Ao Gilson que por diversas vezes adiantou meu trabalho autoclavando materiais e incubando placas.

E por fim, mas nem de longe menos importante, à Fran por ser meu maior incentivo e responsável pela minha permanência nessa jornada. Obrigado Fran, seu apoio, carinho e atenção foi fator determinante para eu não desistir no primeiro ano de graduação.

*"Viver é arriscar tudo. Caso contrário você é apenas um pedaço inerte de moléculas montadas aleatoriamente à deriva onde o universo te sopra".*

*Rick and Morty*

MEDEIROS, William Bartolomeu. Potencial de fungos filamentosos no tratamento da toxicidade do extrato de tabaco – *Nicotiana tabacum*. 2017, 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.

## RESUMO

O cigarro é um produto feito a partir de folhas de membros do gênero *Nicotiana*. Membros deste gênero possuem um alcaloide (nicotina) que em altas concentrações corresponde como material tóxico. O cigarro contrabandeado ocupa a primeira posição na lista de produtos que entram de forma ilegal todos os dias no Brasil. Neste sentido, alternativas ecológicas para a destinação ambientalmente correta deste material apreendido, considerando sua toxicidade, se fazem necessárias. Portanto, o presente estudo teve como objetivo selecionar fungos filamentosos preservados na coleção de cultura de micro-organismos da UNILA capazes de diminuir a toxicidade do extrato de fumo adicionado ao meio de cultivo dos micro-organismos. Neste sentido, 38 isolados foram reativados em meio BDA e incubados à 28°C por sete dias. Em seguida, foram utilizados para inocular meio YDF 20% e incubados à 28°C e 150 rpm por sete dias. Após incubação o isolados foram filtrados, utilizando-se o filtrado para realizar o teste de diminuição da toxicidade através do sistema teste *Allium cepa* e o micélio foi utilizado para determinar massa micelial. Um planejamento experimental fatorial foi desenhado para otimizar os resultados de diminuição da toxicidade observado. Como primeira avaliação foi selecionado uma matriz do tipo 2<sup>5-1</sup> para avaliar os efeito do extrato de fumo, extrato de levedura, dextrose, CuSO<sub>4</sub> e pH na redução da toxicidade do extrato de fumo. A partir desta primeira análise um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado com as variáveis independentes extrato de levedura e CuSO<sub>4</sub>. Do total de isolados testados apenas o I.12 teve seu crescimento inibido, enquanto todos os outros 37 isolados apresentou crescimento micelial satisfatório. Destes, apenas o I.17 apresentou potencial de redução da toxicidade, evidenciado pela germinação das cebolas no sistema teste *A. cepa*. O resultado observado para o I.17 foi otimizado com o planejamento experimental, sendo o extrato de levedura e CuSO<sub>4</sub> as variáveis significativas para a melhor resposta de diminuição da toxicidade do tabaco. As análises dos resultados indicam que após a otimização do processo de redução da toxicidade não há diferenças estatísticas com o controle positivo (ANOVA p<0,05), sendo assim, o tratamento da toxicidade do tabaco sendo alcançado com sucesso.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Fungos filamentosos. *Nicotiana tabacum*.

MEDEIROS, William Bartolomeu. The potential of filamentous fungi to toxicity treatment of tobacco extract – *Nicotiana tabacum*. 2017, 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.

### ABSTRACT

The cigarette is a product made of *Nicotiana* genus leaves. Members of this genus have an alkaloid (nicotine) which in high concentrations can turn into a toxic material. The smuggled cigarette occupies the first position of products crossing the borders illegally from Paraguay to Brazil. In this sense, ecological alternatives to the proper destination of the confiscated material are necessary. In this way, the present study aimed to select filamentous fungi deposited in the Unila Microorganism Culture Collection capable of decreasing the tobacco extract toxicity. In order to run this study first the fungi previously isolated were reactivated on PDA media. Later, they were used to inoculate the culture media containing 20% of tobacco extract (YDF media) and incubated at 28°C, 150 rpm for 7 days. After incubation, the YDF medias were filtrated, the mycelium was used to determine the mycelial mass and the liquid was used to test the toxicity decrease by carrying on an experiment using an *Allium cepa* test. A design experiment was used to optimize the observed results of toxicity decreasing. As a first evaluation, a matrix  $2^{5-1}$  was used to examine the effects of yeast extract, tobacco extract, dextrose,  $\text{CuSO}_4$  and pH regarding on the tobacco toxicity decreasing. Afterwards, a rotational central composite design (RCCD) was used to analyze the independent variables yeast extract and  $\text{CuSO}_4$ . Only one fungus had the mycelium growth inhibited in the YDF media, whereas there was satisfactory growth in the mycelial mass presented by the other 37 fungi. In the *A. cepa* test only the fungus I.17 showed the potential to decrease the tobacco extract toxicity, which can be observed by the germination of the onions. The result showed by the I.17 was optimized using the experimental design, which yeast extract and  $\text{CuSO}_4$  were found as significant variables to the best tobacco toxicity decreasing. There was no statistically differences between the positive control and the I.17 after optimization (ANOVA  $p < 0,05$ ). Therefore, the tobacco toxicity treatment was successfully achieved.

**Keywords:** Biorremediation, Filamentous Fungi, *Nicotiana tabacum*.



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
2.1 Cigarro .....	13
2.2 Consumo e malefícios do cigarro .....	13
2.3 Comercialização ilegal do cigarro e seu destino .....	15
2.4 Tratamento biológico do fumo de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	16
2.5 Ensaio de toxicidade com <i>Allium cepa</i> .....	17
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	20
4.1 Avaliação da taxa de crescimento de fungos filamentosos em meio contendo extrato de tabaco e seleção de fungos capazes de diminuir a toxicidade do tabaco .....	20
4.1.1 Massa micelial .....	20
4.1.2 Sistema teste <i>Allium cepa</i> .....	21
4.2 Planejamento de experimento fatorial e otimização de processo .....	22
4.2.1 Experimento fatorial fracionado .....	22
4.2.2 Planejamento fatorial completo .....	23
4.3 Índice Mitótico .....	24
4.4 Caracterização morfológica do isolado Isolado I.17 .....	25
4.4.1 Análise macroscópica .....	25
4.4.2 Análise microscópica .....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1 Avaliação da taxa de crescimento de fungos filamentosos em meio contendo extrato de tabaco .....	27
5.1.1 Crescimento micelial em meio YDF .....	27
5.1.2 Teste de diminuição da toxicidade do tabaco com <i>A. cepa</i> .....	28
5.2 Influência das condições de cultivo na diminuição da toxicidade do tabaco .....	30
5.2.1 Planejamento de experimento fatorial fracionado .....	30
5.2.2 Planejamento fatorial completo .....	32
5.2.3 Teste de validação .....	38
5.3 Caracterização morfológica do isolado Isolado I.17 .....	39
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>8. ANEXOS</b> .....	47

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O cigarro é a forma mais comum de consumo de tabaco, consiste de uma pequena porção seca e picada de folhas de plantas do gênero *Nicotiana*, sendo a espécie *Nicotiana tabacum* a mais utilizada para este fim. Causa dependência de quem faz uso deste produto devido à presença de um alcaloide (nicotina) que rapidamente chega ao sistema nervoso, ao ser consumido através da fumaça do cigarro, causando uma sensação de bem estar. Além da nicotina, a fumaça do cigarro contém aproximadamente 5000 substâncias que já foram quimicamente identificadas, dentre as quais se destacam, por sua toxicidade, o monóxido de carbono, o alcatrão e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (MOREIRA, 2007; PEDROSO, 2003; ROSA, 2013).

Com estudos que comprovaram os males que o cigarro causa à saúde humana, as indústrias visaram processos que diminuíssem sua ação tóxica tais como a utilização de filtro nos cigarros com substâncias adsorventes de particulados na fumaça e processos de maturação das folhas de tabaco para diminuir a concentração de nicotina e alcatrão. No entanto, todos os anos entram no Brasil, de forma ilegal, cerca de quatro milhões de maços de cigarros contrabandeados do Paraguai, dos quais não seguem qualquer processo de qualidade na produção (TRILHA, 2009; ROSA, 2013).

A apreensão deste produto pela Receita Federal do Brasil diminui os impactos causados na saúde da população brasileira como também diminui os impactos negativos as indústrias de tabaco e, portanto, diminuindo danos econômicos no país. Porém, uma vez apreendidos, os cigarros precisam ser destruídos e este procedimento gera custos com transporte, armazenamento e destinação final correta. Atualmente, a prática para destruição do produto apreendido tem sido a incineração, uma alternativa custosa e não ecológica, pois o processo de incineração precisa ser adequado para diminuir os componentes tóxicos liberados à atmosfera, contudo, não é possível eliminar todos os gases prejudiciais que são emitidos com a queima.

Neste sentido, alternativas ambientalmente corretas para a destinação deste produto são necessárias. Tem sido proposta a utilização de resíduos de indústrias do tabaco como substrato para produção de cogumelos comestíveis, evidenciando a

resistência destes organismos a um meio contendo altas concentrações de nicotina. Entretanto, análises mais detalhadas precisam ser realizadas a fim de verificar a biodegradação da nicotina (PEDROSO, 2013).

A utilização de micro-organismos na biorremediação de ambientes contaminados, tanto *in situ* quanto *ex situ*, é amplamente conhecido na literatura. Poluentes ambientais tais como pesticidas, efluentes de indústrias têxteis, metais pesados e derivados da refinação de petróleo vêm sendo tratados com micro-organismos (bactérias e fungos) e apresentaram resultados satisfatórios. Wang et al (2009) já demonstrou ser possível, por exemplo, tratar ambientes contaminados com nicotina utilizando linhagens de *Agrobacterium* sp.

Ainda assim, o tratamento da toxicidade de resíduos do cigarro, que incluem além da nicotina diversos outros compostos tóxicos, é escasso na literatura. Destacando-se, neste sentido, o trabalho de Almeida (2015) que demonstrou ser possível tratar o tabaco proveniente de cigarros apreendidos com o processo de compostagem juntamente com lodo de estação de tratamento de esgoto industrial. Embora, segundo o autor, estudos para compreender a fitotoxicidade do produto desta compostagem precisam ser realizados com mais detalhes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar fungos filamentosos capazes de diminuir a toxicidade de extrato de fumo como estudos preliminares a possível alternativa ecológica para a destinação de cigarros contrabandeados apreendidos. Para tal, será utilizado como bioindicador o sistema teste *Allium cepa* (cebola), um vegetal superior muito utilizado em ensaios ecotoxicológicos por seu baixo custo, facilidade de utilização e observação dos padrões macroscópicos (padrão de crescimento das raízes) e microscópicos (aberrações cromossômicas) (LEME, 2009).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cigarro

O cigarro é uma pequena porção de tabaco seco e picado, enrolado em papel fino ou palha de milho, podendo conter ou não filtro (MOREIRA, 2007). Tabaco é um nome comum dado a membros do gênero *Nicotiana*, planta nativa do continente americano pertencente da família das Solanáceas (PEDROSO, 2003), sendo a espécie *Nicotiana tabacum* a principal fonte de produção de cigarro no mundo todo. Ganhou o título de planta social ou planta da rainha quando foi introduzida pelo embaixador Jean Nicot à França, que usava como medicamento para curar as enxaquecas da rainha Maria de Médicis (MOREIRA, 2007). É extraído de membros deste gênero um alcaloide, principalmente das folhas e talos, que foi denominado nicotina em homenagem ao embaixador (PEDROSO, 2003 *apud* NARDI, 1996).

### 2.2 Consumo e malefícios do cigarro

De acordo com Moreira (2007), no mundo, o consumo anual de nicotina por meio do cigarro é de 73 mil toneladas, com cerca de 1,3 bilhões de tabagistas, sendo que 80% vivem nos países em desenvolvimento. Com estudos que comprovam os malefícios da nicotina presente no cigarro, as indústrias passaram obrigatoriamente a especificar o teor de nicotina em suas embalagens (TRILHA, 2009). Entretanto, a nicotina está num invólucro, que é o cigarro, e, portanto, é administrada ao organismo com milhares de outras substâncias tóxicas. Segundo Moreira (2007), existe um total de 4720 substâncias que já foram quimicamente identificadas, dentre estas a nicotina, o monóxido de carbono e o alcatrão são as mais prejudiciais. Além disso, na segunda metade do século XX estudos evidenciaram a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), aminas aromáticas e N-nitrosaminas, através de análises de identificação de compostos carcinogênicos na fumaça de cigarros (ROSA, 2013).

Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizados por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados. Estas substâncias, de maneira geral, estão associadas ao aumento de incidência de diversos tipos de cânceres no homem (NETO et al, 2000 e AZEVEDO, ARAÚJO & SILVA, 2013). Os HPAs são formados tanto por fontes naturais como por fontes antrópicas, sendo que as

atividades antrópicas são as principais responsáveis na formação destas substâncias. Almeida et al (2007) avaliaram as principais fontes emissoras destes compostos e a fumaça de cigarros aparece na décima primeira posição (Figura 1).

Dentre os HPAs contidos no cigarro o benzo[a]pireno é o mais abundante, ocupando a quarta posição em quantidade de mg/cigarro entre os compostos considerados tóxicos presentes no cigarro, estando atrás apenas do alcatrão, nicotina e monóxido de carbono, respectivamente (ROSA, 2013). O Benzo[a]pireno já foi atribuído como o principal agente carcinogênico entre os HPAs e, apesar de suas principais fontes de emissão ao ambiente incluírem o transporte rodoviário, o uso de combustíveis sólidos e atividades siderúrgicas, sua principal fonte de exposição humana é atribuída a fumaça de cigarro (AZEVEDO, ARAÚJO e SILVA, 2013; NETO et al, 2000).

Fontes de PAH	Massa emitida em 10 <sup>6</sup> g/ano 7-PAH	Massa emitida em 10 <sup>6</sup> g/ano 16-PAH
Fogão a lenha	380,0	6100,0
Lareira	6,0	32,0
Carvão	—	2,0
Queima madeira industrial	—	36,0
Óleo combustível destilado	—	11,0
Produção primária de alumínio	41,0	140,0
Craqueamento catalítico	1,1	22,0
Produção de coque	3,3	41,0
Indústria de papel	0,4	70,0
Queimadas	310	820,0
Fumaça de cigarro (g/cigarro)	5,7	38,0
<b>TOTAL</b>	<b>746 t/ano</b>	<b>7346 t/ano</b>

Figura 1. Resumo das principais fontes de HPAs para atmosfera no Brasil, mencionado pelo autor como PAH em referência ao nome em Inglês *polycyclic aromatic hydrocarbons*. Fonte Almeida et al, 2007.

### **2.3 Comercialização ilegal do cigarro e seu destino**

Além dos riscos que o cigarro causa a saúde, existe um problema ainda maior quando se trata de cigarro falsificado e/ou contrabandeado. Além de o governo deixar de arrecadar impostos, a produção destes cigarros não segue qualquer processo de qualidade que vise à diminuição do impacto à saúde. O problema é realmente sério quando visto este cenário por estimativas que indicam que a cada três cigarros consumidos no Brasil, um é de origem do contrabando (MOREIRA, 2007).

Segundo dados do Instituto de Desenvolvimento Econômico e Social de Fronteiras – IDESF, do percentual de produtos contrabandeados que entram no Brasil pelas fronteiras com o Paraguai, o cigarro corresponde a 67,44% deste total, ocupando a primeira posição entre os produtos que entram no país de forma ilegal. Esta quantidade de cigarros contrabandeados equivale a R\$ 6,4 bilhões, entre perdas da indústria e não tributação, anuais (IDESF, 2015).

O estado do Paraná se destaca em volumes de apreensões de produtos contrabandeados, sobre tudo de cigarros. De acordo com a Equipe de Repressão Aduaneira – ERA da Delegacia da Receita Federal do Brasil em Foz do Iguaçu, durante o ano de 2014, apenas na região da BR 277, foram apreendidos 172 veículos roubados, onde 123 estavam carregados com cigarro em seu interior, representando um total de três milhões e duzentos mil maços de cigarros apreendidos (IDESF, 2015).

Os danos causados pelo contrabando de cigarros, tanto para saúde quanto comercial e tributário, não termina com a apreensão, pois uma vez retirado de circulação este produto precisa ser destruído. Hoje, os cigarros apreendidos, ficam armazenados em galpões da Receita Federal ou são incinerados gerando custos de transporte, armazenamento e queima, pois a incineração precisa ser apropriada para evitar a liberação de substâncias tóxicas que prejudicam o ambiente (ALMEIDA, 2015). Neste sentido, alternativas para um fim ecológico a este produto vêm sendo propostas.

## 2.4 Tratamento biológico do fumo de *Nicotiana tabacum*

Almeida (2015) estudou a compostagem de tabaco de cigarros contrabandeados misturado ao lodo de estação de tratamento de esgoto industrial como uma alternativa ambientalmente adequada para o tratamento tanto do tabaco quanto do lodo, obtendo resultados que indicam ser uma alternativa para o reaproveitamento destes produtos, podendo ainda vir a beneficiar práticas agrícolas. Contudo, o autor sugere que análises à *posteriori* que visem verificar de forma mais ampla a fitotoxicidade, utilizando diferentes modelos como bioindicadores, precisam ser realizadas. Outros estudos somam-se principalmente no uso de cigarros em diferentes métodos de compostagem e monitoramento da toxicidade de resíduos provenientes de cigarros contrabandeados em biorreatores.

Estudos semelhantes em outros países são escassos ou mesmo inexistentes, porem tem crescido a preocupação quanto à degradação da nicotina em si. De acordo com Gurusamy & Natarajan (2013), devido ao aumento do uso de produtos do tabaco, as indústrias têm gerado grandes quantidades de resíduos contendo altas concentrações de nicotina. Resíduos sólidos do tabaco usualmente apresenta uma média de nicotina de 18 g/kg do peso seco, sendo considerado material tóxico pelo Regulamento da União Europeia (European Union Regulations – EUR) quando a concentração de nicotina ultrapassa 0,5 g/kg do peso seco (WANG et al, 2009). Um agravante a este contaminante ambiental é dado por sua característica química em ser facilmente solubilizado em água, podendo chegar a contaminar lençóis freáticos, causando um grande impacto ecológico (GURUSAMY & NATARAJAN, 2013).

Neste sentido, o uso de micro-organismos surge como um método de biorremediação promissor para tratar ambientes contaminados com nicotina. Wang et al (2009) demonstrou a possibilidade de usar linhagens de *Agrobacterium sp*, isolados da rizosfera de solos com plantações de tabaco, como capazes de biodegradar a nicotina presente em resíduos sólidos do tabaco. Em outro trabalho, Wang & Xiu (2012), demonstraram resultados semelhantes utilizando linhagens de *Pseudomonas sp*, contudo com as vantagens de utilizar estes micro-organismos para promover a biodegradação da nicotina em água e solos contaminados. Além disto, a linhagem de *Pseudomonas sp*. demonstrou grande adaptabilidade quanto a

variação do pH no meio, mostrando-se superior comparado as linhagens de *Agrobacterium* sp. nos estudos anteriores.

Dentre os micro-organismos utilizados em biorremediação, os fungos, sozinhos ou em colaboração com bactérias e plantas, possuem diversas características biológicas que os colocam em destaque. Por exemplo, alguns fungos toleram condições ambientais extremas tais como: temperatura de -5°C até 60°C, pH de 1 até 9, além de crescerem em ambientes aquáticos com baixa concentração de oxigênio, podendo resistir até 0,2% de oxigênio dissolvido em água (HARMS, SCHLOSSER & WICK, 2011; KUMAR, 2011). No entanto, apesar de diversos estudos como: Pallu (2006); Kumar (2011); Hussaini, Shaker & Iqbal (2013) e Bonugli-Santos, Durrant & Sette (2012), terem demonstrado a possibilidade de utilizar fungos em diversos processos de biorremediação, tanto *in situ* quanto *ex situ*, de acordo com Harms, Schlosser & Wick (2011), o potencial para biorremediação utilizando fungos ainda não recebeu a atenção merecida.

Apesar da possibilidade da utilização de fungos para a decomposição da nicotina presente em resíduos do tabaco (GURUSAMY & NATARAJAN, 2013) e das características biológicas dos fungos que os colocam como ótima opção para trabalhos de biorremediação (KUMAR, 2011), há poucas referências bibliográficas com a utilização de fungos como alternativas ecológicas ao tratamento de resíduos do tabaco. Destacando, neste sentido, Pedroso (2013) que utilizou resíduos da indústria do cigarro como substrato para produção de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*. Pedroso ainda demonstrou a diminuição de metais pesados e de níveis de nicotina nos resíduos exaurido da produção de *Pleurotus*.

## **2.5 Ensaio de toxicidade com *Allium cepa***

O *Allium cepa* é um vegetal superior classificado dentro da família Alliaceae (JUDD et al, 2009) muito utilizado em ensaios ecotoxicológicos por meio da avaliação de parâmetros macroscópicos como alteração de cor, formato, tamanho da raiz e deformidade e ainda microscópicos como aberrações cromossômicas. Sendo entre as espécies de plantas superiores, usadas para avaliar contaminação ambiental, a mais frequentemente utilizada e sua preferência é devido à facilidade de observar danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico. Além disso, este



sistema teste tem mostrado grande sensibilidade em detectar químicos ambientais (LEME, 2009; MELO E ARRAES & LONGHIN, 2012; BEGATINI, SILVA & TEDESCO, 2007).

O sistema teste *A. cepa* apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da genotoxicidade devido ao seu baixo custo, confiabilidade e os resultados obtidos serem rapidamente reprodutíveis (LEME, 2009). Ademais, segundo Leme (2009), testes com *A. cepa* têm mostrado uma correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores, o que mostra sua grande sensibilidade como bioindicador.

Dentre os parâmetros macroscópicos observados em sistema teste *A. cepa* a raiz é a principal característica observada, pois é a parte da planta que comumente entra em contato com os poluentes do solo ou da água. Portanto, o padrão de crescimento ou mesmo a inibição do crescimento da raiz é o primeiro parâmetro a ser considerado. Além disso, para testar a citotoxicidade de um contaminante frequentemente é utilizado o índice mitótico (IM) da região meristemática das raízes. O IM é dado pelo número total de células em divisão em um ciclo celular. O grau de citotoxicidade de um contaminante pode ser determinado pelo aumento ou diminuição do IM (BEGATINI, SILVA & TEDESCO, 2007; LEME, 2009). Neste sentido, segundo Leme (2009) *apud* Hoshina (2002) IMs significamente menores comparados ao controle negativo pode indicar alterações derivado de ação do contaminante no crescimento e desenvolvimento de organismos expostos. Enquanto que IMs maiores em comparação ao controle negativo indica aumento em divisões celulares o que pode ser prejudicial para células levando-as a proliferação desordenada ou mesmo formação de tumores no tecido. Mas, tanto o aumento ou a diminuição do IM são importantes indicadores para monitoramento de contaminantes ambientais, especialmente contaminantes com potencial tóxico e citotóxico.

O sistema teste *A. cepa* tem sido usado para detectar uma grande variedade de contaminantes ambientais e os resultados têm sido satisfatórios na maioria dos estudos publicados. Dentre os contaminantes ambientais que este sistema teste tem mostrado alta sensibilidade estão alguns metais (Cu, Ni, Cd, Al, Mn, Hg), pesticidas (cipermetrina, Fenvalerato), efluentes de indústrias têxteis e hidrocarbonetos policíclico aromáticos, principalmente benzo[a]pireno (LEME, 2009).

### 3. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo geral selecionar fungos filamentosos capazes de diminuir a toxicidade do extrato de fumo - *Nicotiana tabacum*. Para tanto o projeto contou com os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a taxa de crescimento de fungos filamentosos no meio de cultivo contendo o extrato de fumo;
- Selecionar fungos capazes de diminuir a toxicidade de extrato de fumo;
- Avaliar variáveis bióticas e abióticas no cultivo de fungos filamentosos selecionados na etapa anterior para otimização da diminuição da toxicidade.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Avaliação da taxa de crescimento de fungos filamentosos em meio contendo extrato de tabaco e seleção de fungos capazes de diminuir a toxicidade do tabaco.

Para testar a resistência de fungos e o potencial de diminuição da toxicidade do tabaco foi utilizado como inóculo, para meio de cultivo contendo extrato de fumo, 38 isolados de fungos filamentosos preservados na coleção microbiológica da Universidade Federal da Integração Latino-Americana – UNILA. Foi utilizado como variáveis resposta, o crescimento micelial dos isolados e a germinação de cebolas, através do sistema teste *Allium cepa* (AGUIAR *et al*, 2014; BAGATINI *et al*, 2007; ARRAES & LONGHIN, 2012 ).

Os isolados foram reativados em meio de cultivo Batata Dextrose 2% Ágar 2% (BDA) e incubados por sete dias à 28 °C. Em seguida foram utilizados três discos de cinco milímetros de diâmetro de cada isolado para inocular 50 mililitros (ml), em tubos erlenmeyers, de meio líquido de extrato de levedura 2% Dextrose 2%+ fumo 20% (Meio YDF – preparado de acordo com protocolo em Anexo 1), incubado por sete dias à 28 °C e com agitação de 150 rotações por minuto (rpm).

Após período de incubação, os isolados foram filtrados em gaze, salvando micélio para determinar crescimento da massa micelial. O filtrado foi utilizado para testar diminuição da toxicidade através do teste *A. cepa*.

#### 4.1.1 Massa micelial

O crescimento da massa micelial foi determinado pela diferença do peso final menos peso inicial, utilizando para peso inicial, uma placa de petri (para acomodar micélio) com peso conhecido e para peso final o valor em gramas do micélio desidratado por 24 horas à 80°C (OLIVEIRA *et al*, 2008). O valor final da massa micelial para cada isolado consiste da média aritmética dos valores de massa micelial de cada réplica, sendo um total de três réplicas para cada isolado. A diferença das massas miceliais dos isolados foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) e complementada utilizando o teste de Tukey através do software livre PAST versão 2.17.

#### 4.1.2 Sistema teste *Allium cepa*

O filtrado de cada isolado foi utilizado como meio nutritivo para enraizamento das cebolas, sendo realizado em trélicas. Para controle positivo foi utilizado água filtrada e para controle negativo foi utilizado meio YDF sem inóculo.

Foi usado recipiente contendo 50 mL de meio nutritivo e, utilizando palitos de dentes como suporte, as cebolas foram dispostas sobre o recipiente de modo que o prato do bulbo das cebolas (região onde ocorre emissão de raízes) ficassem imersos ao meio nutritivo (Figura 2). Além disso, sempre que observado a presença de raízes secas pré existentes nos bulbos, essas foram retiradas antes de acondicionar as cebolas para germinação (Adaptado de SILVA, 2009 e ARRAES & LONGHIN, 2012).



Figura 2. Teste de germinação com *Allium cepa*. Cada coluna representa um tratamento testado em tréplica. Fonte: Do autor

As cebolas ficaram dispostas sobre meio nutritivo para germinação durante cinco dias à temperatura ambiente. Após este período, a emissão de radícula foi considerada sempre que as raízes possuísem comprimento maior ou igual à um milímetro. E foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital. O valor final do comprimento das raízes de cada réplica foi considerada através da média aritmética das cinco maiores raízes de cada bulbo (Adaptado de BAGATINI *et al*, 2007; Silva, 2008 e ARRAES & LONGHIN, 2012) e comparado com os controles positivos e negativos. Foi considerado utilizar análise de variância (ANOVA) para verificar a diferença entre os tratamentos sempre que houvesse germinação de cebolas em três ou mais tratamentos e o teste t de *student* sempre que a comparação foi realizada entre dois tratamentos, respeitando sempre as premissas das análises

paramétricas, confirmando à priori a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk.

## **4.2 Planejamento de experimento fatorial e otimização de processo**

### **4.2.1 Experimento fatorial fracionado**

Foi executado um experimento fatorial fracionado como uma análise inicial exploratória, afim de selecionar variáveis fundamentais na otimização dos resultados do isolado I.17 quanto à diminuição da toxicidade do tabaco. Neste sentido cada delineamento é independente do outro e a cada delineamento os níveis das variáveis podem ser alterados (BONUGLI-SANTOS et al. 2016.) Essa estratégia visa a redução no número de ensaios e de etapas laboratoriais comparadas aos ensaios que testam um fator por vez.

. Foi utilizado o planejamento fatorial  $2^{5-1}$  (RODRIGUES & IEMMA, 2005), tendo como variáveis dependentes o crescimento radicular e o índice mitótico da região meristemal das raízes através do teste *A. cepa*. E como variáveis independentes foram utilizados: dextrose, extrato de levedura, extrato de fumo, pH e sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ).

A Tabela 1 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis estudadas, e os valores +1 correspondem aos níveis altos e -1 ao nível baixo, enquanto que os valores 0 (zero) correspondem aos níveis centrais de cada variável. Para cada ensaio foi utilizado três discos de cinco milímetros de diâmetro do isolado I.17 como inóculo em tubos erlenmeyers contendo 50 mL de meio YDF. Em seguida foram incubados por sete dias à 28 °C com agitação de 150 rpm. Após incubação repetiu-se o procedimento anterior para realizar o teste de germinação com *A. cepa*. Portanto, cada ensaio foi filtrado após incubação e o filtrado utilizado como meio nutritivo para germinação das cebolas. Além disso, o procedimento para mensurar o comprimento das raízes também se manteve similar ao realizado anteriormente, contudo para análise estatística foi utilizado software Statistica versão 8.

Tabela 1. Valores usados em cada nível das variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial fracionado.

Variáveis independentes		Níveis		
		-1	0	1
X1	Extrato de fumo	15%	20%	25%
X2	Extrato de levedura	0,50%	1%	1,50%
X3	Dextrose	0,50%	1%	1,50%
X4	CuSO <sub>4</sub>	0	5µmol/L	10µmol/L
X5	pH	6	7,5	8

#### 4.2.2 Planejamento fatorial completo

Para execução do experimento fatorial completo foi utilizado as variáveis que favoreceram o processo durante experimento fatorial fracionado, seguindo esquema conforme Figura 3. As variáveis dependentes permaneceram as mesmas do experimento fatorial fracionado (crescimento radicular e o índice mitótico da região meristemal das raízes) bem como a metodologia de leitura dos resultados. Quanto as variáveis independentes, foram selecionados o extrato de levedura e o sulfato de cobre e os níveis foram estabelecidos conforme Tabela 2. As outras três variáveis (dextrose, extrato de fumo e pH) foram fixadas nos níveis centrais do experimento fatorial fracionado.

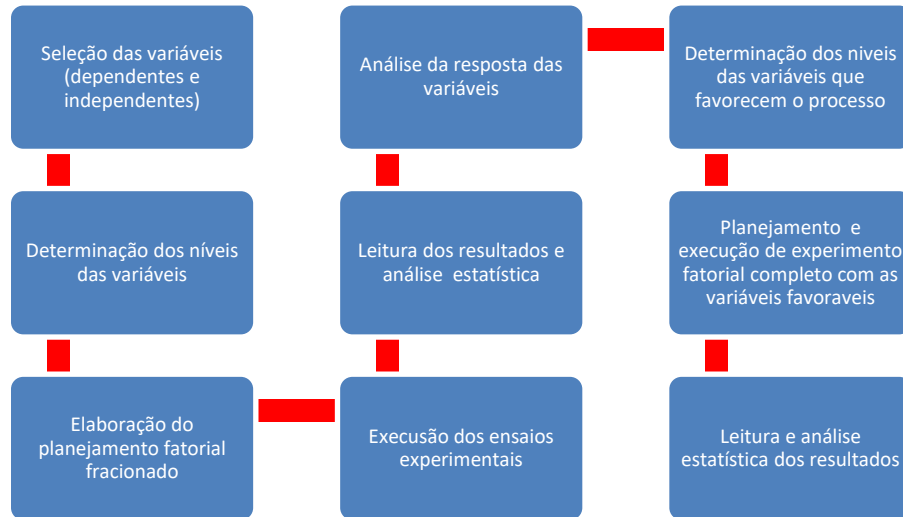


Figura 3. Esquema do planejamento fatorial fracionado e completo. Fonte: Adaptado de Da Silva & Neto, 2013.

Tabela 2. Valores usados em cada nível das variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial completo.

Variáveis		Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
<b>X<sub>1</sub></b>	Ex Levedura	0	0,15%	0,50%	0,85%	1%
<b>X<sub>2</sub></b>	CuSo4	5µmol/L	6,45µmol/L	10µmol/L	13,5µmol/L	15µmol/L

### 4.3 Índice Mitótico

Para cada ensaio onde observou-se emissão de radícula com comprimento maior ou igual à 1 mm, foi preparado quatro lâminas com a região meristemal de uma raiz aleatória para cada lâmina, utilizando metodologia descrita por Guerra & Souza (2002, p25). Em cada uma das quatro lâminas foram contadas, com auxílio de microscópio óptico, 250 células e quantificou-se dentro destas 250 células quantas estavam em alguma das fases da mitose (AGUIAR, 2015). Foi considerado fases da mitose: Prófase, metáfase, anáfase e telófase. O valor do índice mitótico para cada ensaio foi considerado da seguinte forma:

$$IM = \sum_{i=1}^n CMi \cdot q$$

Sendo IM para índice mitótico, CM para células em fases de mitose observada em cada uma das quatro lâminas e  $q$  o quociente de 100 dividido pelo

número total de células observadas. Desta forma foi possível inferir a porcentagem de células em mitose em um total de 1000 células observadas por bulbo emitindo radícula.

#### **4.4 Caracterização morfológica do isolado Isolado I.17**

##### **4.4.1 Análise macroscópica**

A análise macroscópica foi realizada mediante observação direta de colônia previamente crescida em meio malte + ágar (MA) por sete dias à 28 °C. A coloração do micélio reprodutivo bem como a cor dos conídios, serviu de orientação e não como critério determinante de identificação.

##### **4.4.2 Análise microscópica**

Para análise das estruturas microscópicas foi realizado metodologia de microcultivo em lâmina, onde observou-se as estruturas hifálicas, presença de septos e estruturas dos conidióforos.

A técnica de microcultivo foi realizada de acordo com Koneman et al. (2001) *apud Corrêa* (2003), que consistiu primeiramente colocando-se um pedaço de gaze sobre o fundo de uma placa de Petri estéril. Em seguida, dois palitos foram depositados sobre o gaze como suporte para uma lâmina de vidro de 76 x 26 mm. Sobre a lâmina foi depositado um pequeno cubo de meio MA estéril e nele foi inoculado nas bordas uma pequena porção da colônia previamente crescida em MA, com auxílio de alça de inoculação esterilizada em bico de Bunsen. Na sequência uma lamínula foi aquecida em um bico de Busen e disposta sobre o cubo de MA inoculado. A lamínula levemente aquecida favorece uma melhor fixação ao cubo de MA. Dois mililitros de água destilada foi adicionada no gaze com auxílio de uma pipeta e o microcultivo foi incubado por cinco dias à 28°C (Figura 4).



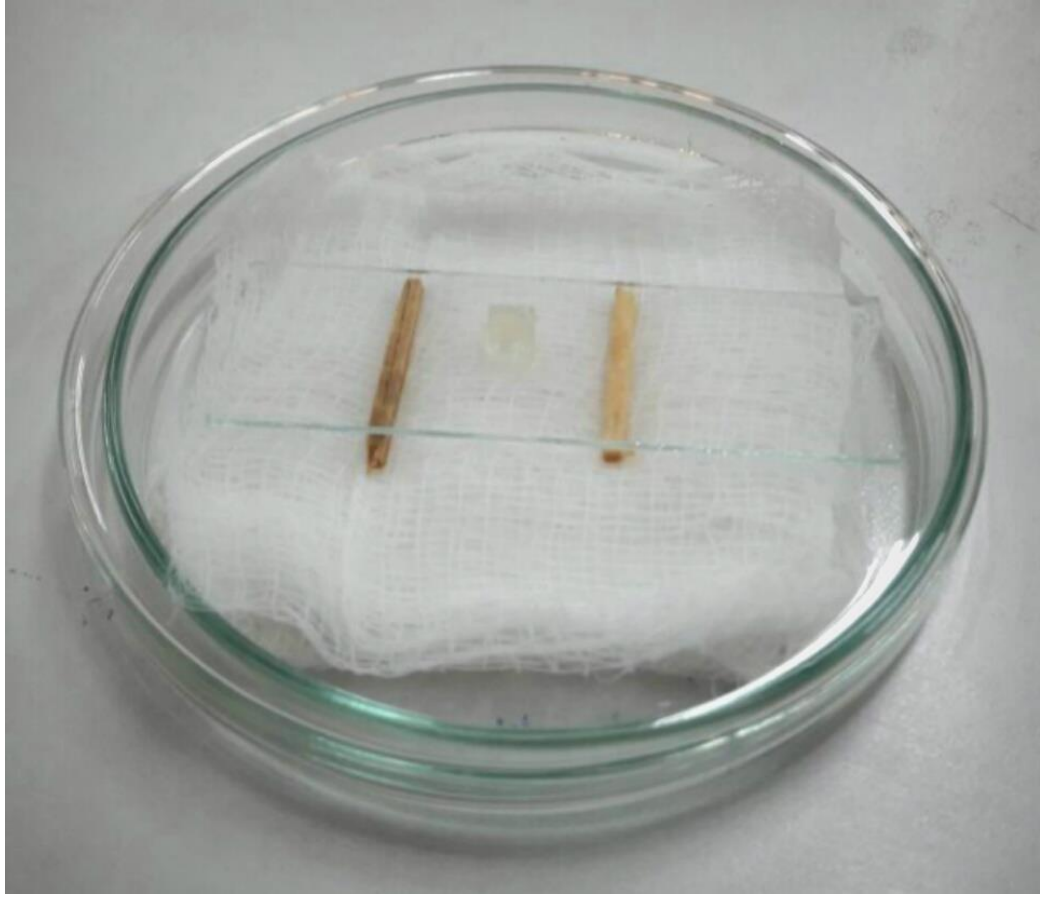


Figura 4. Técnica de Microcultivo em lâmina

Para preparação da lâmina para visualização das estruturas microscópicas, foi retirado a lamínula de cima do cubo de MA com auxílio de pinça esterilizada em um bico de Busen e com muito cuidado para não danificar as estruturas do fungo aderidas na superfície inferior da lamínula. Uma gota do corante azul de metileno foi adicionada em uma lâmina de vidro nova e a lamínula foi disposta sobre a gota. A lâmina foi observa em microscópico óptico e visualizada com aumento de 100x.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da taxa de crescimento de fungos filamentosos em meio contendo extrato de tabaco.

#### 5.1.1 Crescimento micelial em meio YDF

Foram avaliados 38 fungos filamentosos quanto ao crescimento de biomassa em meio YFD. Apenas o isolado I.12 não foi capaz de crescer no extrato de fumo, indicando possivelmente sua intolerância ao meio. Todos os outros isolados testados apresentaram crescimento micelial satisfatório (Figura 5).

O extrato de fumo adicionado no meio de cultivo contém no mínimo três contaminantes em altas concentrações que merecem destaque devido à capacidade mutagênica desses contaminantes e seus impactos ambientais. São eles a nicotina, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPA (principalmente o Benzo[a]pireno) e metais pesados como zinco, chumbo e cádmio (NETO et al, 2000; AZEVEDO, ARAÚJO & SILVA, 2013; TRILHA, 2009; ROSA, 2013).

A tolerância ao meio contendo extrato de fumo, apresentada pela maioria dos isolados testados (97,4%), evidencia a importância da utilização de fungos em trabalhos de biorremediação. Segundo Gurusamy & Natarajan (2013) a utilização de micro-organismos para biorremediação é um método promissor para recuperar ambientes contaminados. O autor inclusive cita a capacidade de micro-organismos, como fungos e bactérias, em utilizar a nicotina como fonte de carbono, nitrogênio e energia para seu crescimento em solos contaminados com nicotina.

A tolerância de fungos ao extrato de fumo também foi estudada por Pedroso (2013) para o gênero *Pleurotus* sp., que considerou a capacidade de crescimento na presença de nicotina um método para o estudo (PEDROSO, 2013). Além disso, já foi demonstrado a eficiência de *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp., *Fusarium oxysporium* e *Trichoderma harzianum* na biodegradação de pesticida organofosforado (RAMOS, 2014; HUSSAINI, SHAKER & IQBAL, 2013) e a utilização de linhagens de *Aspergillus* sp. na biossorção de cádmio (PALLU, 2006), compostos que podem também estar presentes no extrato de fumo.

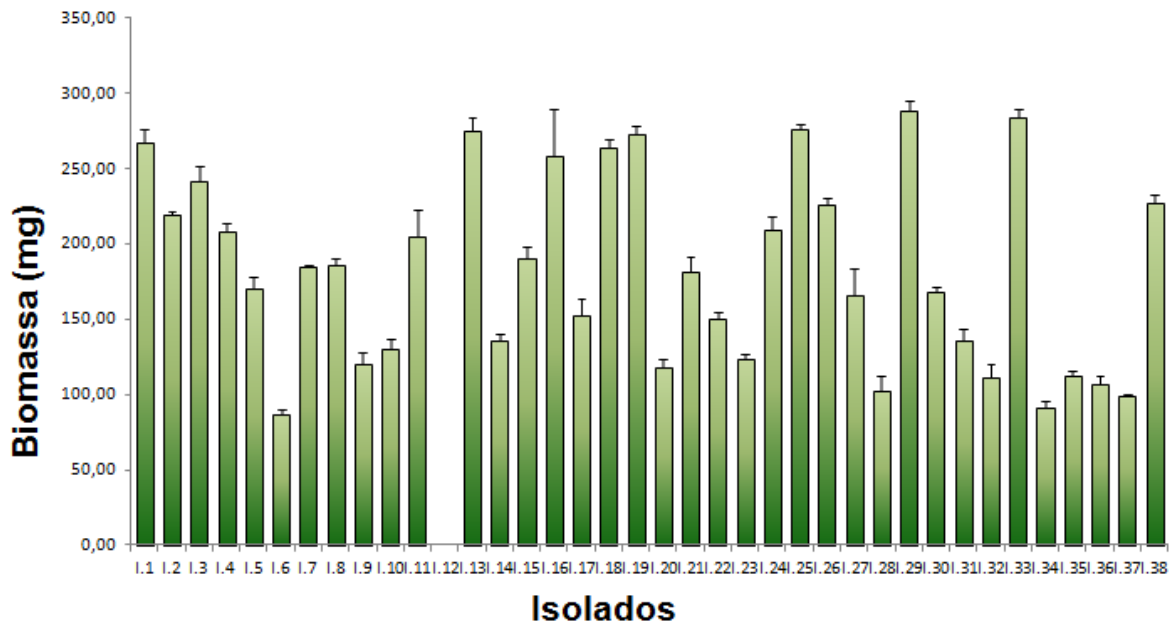
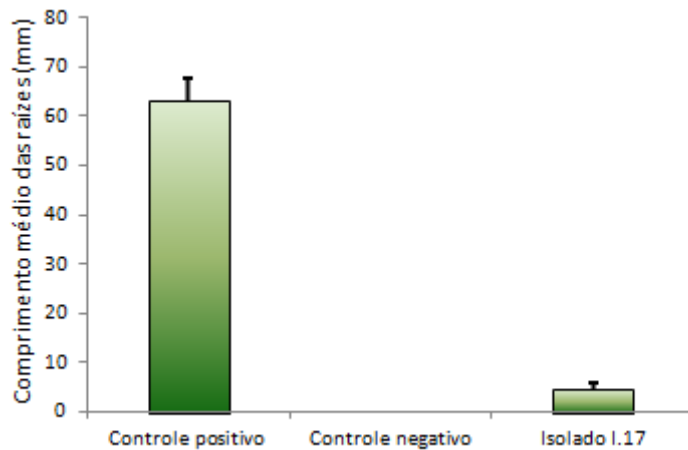


Figura 5. Média do crescimento da biomassa dos isolados testados em meio YDF

Os fungos apresentam a habilidade de atacar compostos orgânicos com uma gama de enzimas oxidoreduases extracelulares bastante diversas e com atividade relativamente não específica, sendo essas enzimas uma possível explicação para o crescimento fúngico ser resistente à ambientes contaminados e sua capacidade em degradar moléculas recalcitrantes, dando a esses organismos vantagens ecológica e um papel fundamental em trabalhos de recuperação de ambientes contaminados (HARMS, SCHLOSSER & WICK, 2011; RHODES, 2015).

### 5.1.2 Teste de diminuição da toxicidade do tabaco com *A.cepae*.

No ensaio de diminuição da toxicidade do extrato do tabaco utilizando o sistema teste *A.cepae*, apenas o sobrenadante do isolado I.17 permitiu a germinação das cebolas (Figura 6). Todos os outros isolados testados não apresentaram potencial em diminuir a toxicidade do tabaco, inibindo a germinação das cebolas.



**Figura 6.** Teste de diminuição da toxicidade do tabaco. Controle positivo – Germinação em água filtrada. Controle negativo – Germinação em extrato de fumo sem inóculo.

Como já discutido anteriormente, o extrato de fumo adicionado no meio de cultivo caracteriza-se como substância altamente tóxica, com a presença de diversos contaminantes. Observando a figura 5, podemos dizer que, a grande maioria dos isolados testados apresentaram resistência/tolerância ao meio com o extrato de fumo entretanto, o teste com *A. cepa* indica que estes isolados não mostraram potencial de diminuição da toxicidade ou a possível diminuição da toxicidade não foi significativa o bastante para ser detectada utilizando o sistema teste *A. cepa*. Por outro lado, o isolado I.17, foi a única linhagem que apresentou uma redução na toxicidade do tabaco, devido ao crescimento da raízes da cebola.

O sistema teste *A. cepa* é utilizado como um bioindicador ideal para o primeiro *screening* da genotoxicidade devido ao seu baixo custo, confiabilidade e os resultados obtidos serem rapidamente reprodutíveis. Além disso, os parâmetros macroscópicos observados no teste (comprimento e características morfológicas da raiz) torna o teste de fácil aplicabilidade e fácil leitura dos resultados. Ademais, é justamente a parte da planta que entra em contato com os poluentes do solo ou da água. Portanto, o padrão de crescimento ou mesmo a inibição do crescimento da raiz é o primeiro parâmetro a ser considerado (LEME, 2009).

Ainda que os isolados testados possam ter utilizado a nicotina como fonte de carbono e nitrogênio (GURUSAMY & NATARAJAN, 2013) e biodegradado as moléculas de HPAs (PASSARINI, 2008; MAGRINI, 2012) ou ainda retirado por bioissorção os metais pesados presentes (PALLU, 2006), outras substâncias contida

no meio podem estar interferindo na germinação das cebolas ou a diminuição desses contaminantes não foi o suficiente para possibilitar o enraizamento das cebolas. Neste sentido, ressalta-se o importante resultado observado para o isolado I.17, que foi capaz de diminuir a toxicidade desta variedade de contaminantes a um nível tolerável que permitiu a germinação das cebolas.

Mesmo o sobrenadante do isolado I 17 possibilitando a germinação da cebola o crescimento obtido foi muito inferior ao controle positivo (figura 6), desta maneira variáveis bióticas e abióticas foram testadas em experimento fatorial com o isolado I.17 com a finalidade de otimizar os resultados de diminuição da toxicidade.

## **5.2 Influência das condições de cultivo na diminuição da toxicidade do tabaco**

### **5.2.1 Planejamento de experimento fatorial fracionado**

O planejamento fatorial nos permite obter informações da interação de diversas variáveis em um sistema. Além disso, o planejamento fatorial apresenta como vantagem a possibilidade de estudar todas as variáveis simultaneamente. Nesta estratégia um delineamento é independente do outro e a cada delineamento os níveis das variáveis podem ser alterados (BONUGLI-SANTOS et al. 2016). Essa estratégia visa à redução no número de ensaios e de etapas laboratoriais comparadas aos ensaios que testam um fator por vez.

Quando se utiliza um planejamento  $2^k$ , k representa a quantidade de fatores analisados em 2 níveis, conhecido como planejamento completo e quando  $k > 4$  muitas vezes os efeitos de altas ordens são quase sempre não significativos (DA SILVA & NETO, 2013). Como alternativa, é possível utilizar um experimento fatorial fracionado, por exemplo  $2^{k-1}$ , e obter informações das variáveis mais importantes e suas interações com um número menor de experimentos sem perda de representatividade estatística. Neste sentido, como primeira avaliação foi selecionado uma matriz do tipo  $2^{5-1}$  para avaliar os efeitos do extrato de fumo, extrato de levedura, dextrose,  $\text{CuSO}_4$  e pH na redução da toxicidade do extrato de fumo.

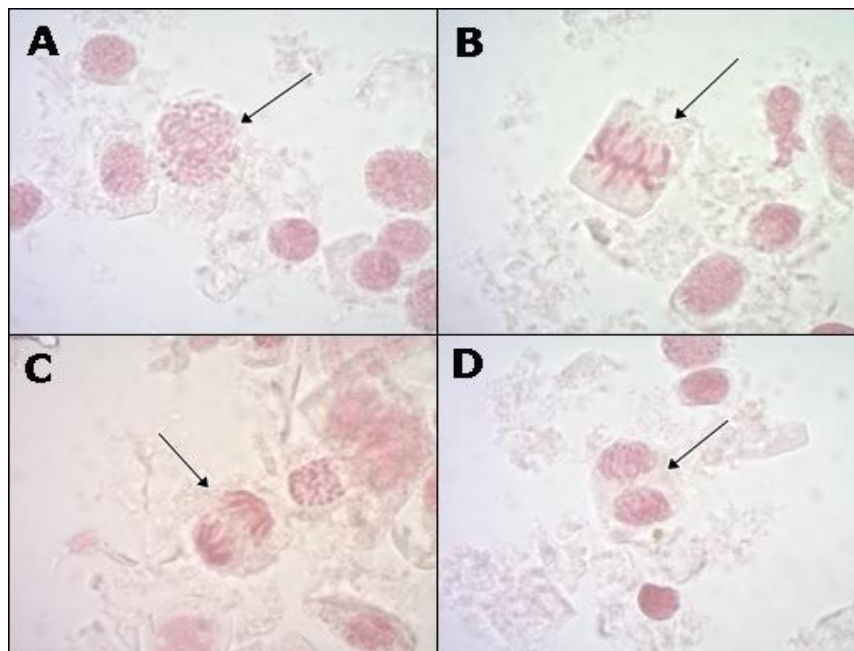
De acordo com as informações contidas na tabela 3 apenas os ensaios 9, 13, 14 e 19 obtiveram respostas no crescimento da raiz e, por conseguinte resposta

para determinação do índice mitótico. A Figura 7 ilustra as células em suas fases da mitose considerada neste trabalho para determinação do índice mitótico.

**Tabela 3.** Matriz do planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$  com resposta do crescimento da raiz e o índice mitótico

Ensaio	Variáveis					Resposta	
	Ext. de Fumo	Ext. de Levedura	Dextrose	cuSO <sub>4</sub>	pH	Comp. médio raízes (mm)	I.M (%)*
1	-1	-1	-1	-1	1	0	0
2	1	-1	-1	-1	-1	0	0
3	-1	1	-1	-1	-1	0	0
4	1	1	-1	-1	1	0	0
5	-1	-1	1	-1	-1	0	0
6	1	-1	1	-1	1	0	0
7	-1	1	1	-1	1	0	0
8	1	1	1	-1	-1	0	0
9	-1	-1	-1	1	-1	4,47	5,7
10	1	-1	-1	1	1	0	0
11	-1	1	-1	1	1	0	0
12	1	1	-1	1	-1	0	0
13	-1	-1	1	1	1	7,66	7,2
14	1	-1	1	1	-1	13,69	11,4
15	-1	1	1	1	-1	0	0
16	1	1	1	1	1	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	2,85	4,1

\* % de células em divisão para 1000 células observadas



**Figura 7.** Fases do ciclo celular considerado para determinar índice mitótico. A - Prófase; B - Metáfase; C - Anáfase e D – Telófase

Os resultados foram avaliados em relação ao efeito de cada variável e sua significância (p-valor) conforme tabela 4 e as variáveis significantes estatisticamente

foram extrato de levedura e  $\text{CuSO}_4$ . A variável extrato de levedura mostrou efeito negativo em relação a resposta, ou seja, nas menores concentrações utilizadas foram observados os ensaios com maior crescimento da raiz e melhor índice mitótico. Inversamente, a variável  $\text{CuSO}_4$  foi importante em sua concentração alta, apresentando efeito positivo ao processo, mostrando que maiores concentrações poderiam indicar melhoras nas respostas estudadas. Utilizando esta metodologia foi possível identificar as variáveis que foram importantes para o processo, além de ser possível inferir suas tendências, positivamente ou negativamente. Neste sentido, a partir destes resultados as variáveis significativas foram selecionadas para o planejamento experimental completo, conforme tabela 2 e as variáveis não significativas foram mantidas nos níveis centrais conforme Tabela 1.

**Tabela 4** Efeito das variáveis na germinação de *A. cepa*.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	p-valor
Mean/Interc.	1,5092	0,3384	0,0210
(1)Ex fumo	0,1955	0,7376	0,8081
(2)Ex Levedura	-3,2280	0,7376	0,0221 *
(3)Dextrose	2,1105	0,7376	0,0645
(4)Cu So4	3,2280	0,7376	0,0221 *
(5)pH	-1,3130	0,7376	0,1731
1 by 2	-0,1955	0,7376	0,8081
1 by 3	1,3130	0,7376	0,1731
1 by 4	0,1955	0,7376	0,8081
1 by 5	-2,1105	0,7376	0,0645
2 by 3	-2,1105	0,7376	0,0645
2 by 4	-3,2280	0,7376	0,0221
2 by 5	1,3130	0,7376	0,1731
3 by 4	2,1105	0,7376	0,0645
3 by 5	-0,1955	0,7376	0,8081
4 by 5	-1,3130	0,7376	0,1731

\* Indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,05$

### 5.2.2 Planejamento fatorial completo

A otimização da diminuição da toxicidade do tabaco foi realizado através do delineamento composto central rotacional (DCCR) ou também conhecido como planejamento fatorial completo com 11 ensaios, incluindo três réplicas nos pontos centrais (tabela 5). Inicialmente os resultados foram avaliados em relação ao

coeficiente de regressão, que também mostra o efeito das variáveis, e também à significância estatística (tabela 6).

**Tabela 5.** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com o crescimento da raiz e índice mitótico

Ensaio	Variáveis		Resposta	
	Ext. Levedura	Cu So4	Comprimento médio das raízes (mm)	Índice mitótico
1	-1	-1	10,7 ± 1,9	3,2 ± 1,8
2	1	-1	0	0
3	-1	1	0	0
4	1	1	34,4 ± 4,3	6,3 ± 2,1
5	1,41	0	0	0
6	-1,41	0	0	0
7	0	1,41	11,6 ± 3,3	5,5 ± 2,8
8	0	-1,41	8,6 ± 1,8	4,1 ± 2,2
9	0	0	25,2 ± 5,7	6,9 ± 5,1
10	0	0	54,3 ± 9,0	12,2 ± 4,4
11	0	0	42,1 ± 1,8	9,7 ± 2,8

\* % de células em divisão para 1000 células observadas

**Tabela 6.** Coeficiente de regressão obtida a partir dos resultados do DCCR

	Regressão	p-valor
Mean/Interc.	40,5645	0,001510
Ext. Levedura (L)	2,9726	0,487216
Ext. Levedura (Q)	-18,7898	0,010624
CuSO4 (L)	3,5047	0,417249
CuSO4 (Q)	-13,6618	0,034293
1L by 2L	11,3025	0,099559

Em seus níveis axiais (-1,41 e 1,41) o extrato de levedura influenciou de forma negativa a diminuição da toxicidade (tabela 5), inibindo a germinação das raízes no teste com *A. cepa*. Exibindo assim, os melhores resultados no ponto médio (0 = 0,5% de extrato de levedura no meio de cultivo).



O mesmo foi observado para o  $\text{CuSO}_4$ , no entanto, nos níveis axiais não houve inibição na germinação de cebolas, mas diminuição do desempenho da diminuição da toxicidade. O melhor resultado também foi o nível central (0 =  $10\mu\text{mol/L}$  no meio de cultivo).

A regressão múltipla a partir dos resultados obtidos (tabela 6) levou a proposição de um modelo matemático de acordo com as variáveis significativas, extrato de levedura e  $\text{CuSO}_4$  (tabela 6). A equação do modelo reparametrizado, a partir das variáveis codificadas, está disposta abaixo:

$$Y = 41 - 19 x_1^2 - 14 x_2^2$$

em que Y é a resposta predita (Comprimento médio das raízes em mm);  $x_1$  e  $x_2$  são, respectivamente, as variáveis independentes concentração de extrato de levedura e de  $\text{CuSO}_4$  em termos dos valores codificados.

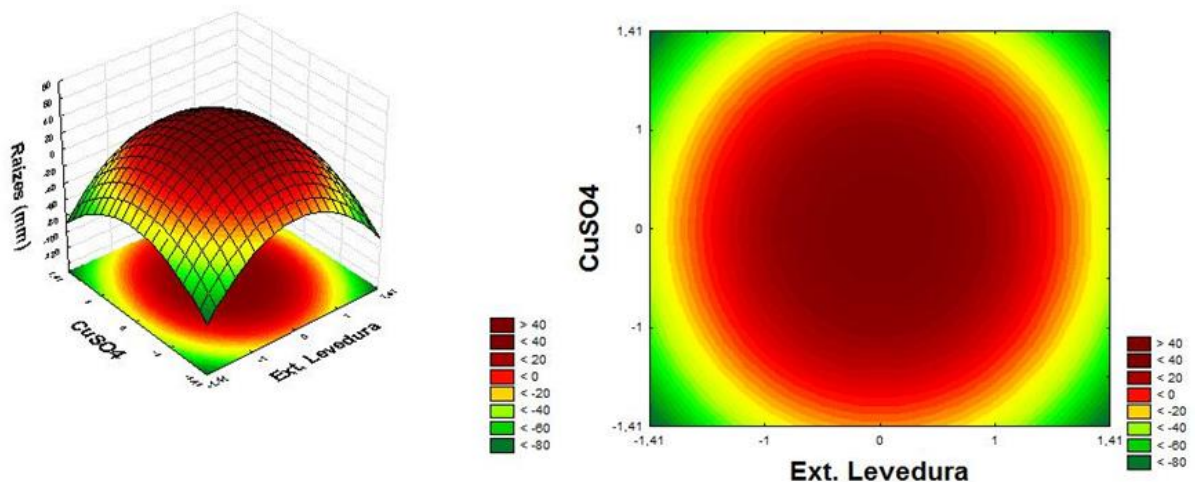
Visando a validação do modelo matemático foi realizado a análise de variância, ANOVA, tabela 7. A ANOVA mostra que o modelo que descreve a resposta predita (Comprimento médio das raízes) em função das variáveis estudadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, pode ser considerado adequado. O  $F_{\text{cal}}$  foi considerado significativo ( $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ), satisfazendo os requisitos para a construção da superfície de resposta (Figura 8) (RODRIGUES & IEMMA 2009). A porcentagem de variação explicada pelo modelo,  $R_2$ , foi de 64%, um valor razoavelmente baixo, contudo obtido possivelmente devido aos desvios obtidos nos ensaios com o ponto central (Tabela 5). Neste sentido, apesar do  $R_2$  baixo a superfície de resposta (elaborada a partir do modelo matemático) será avaliada para a elaboração de um ensaio de validação, uma vez que o  $R^2$  não foi suficientemente significativo.

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) para resposta comprimento da raiz

Fontes de variação	soma dos quadrados	graus de liberdade	quadrado médio	F calc.	F tab
Regressão	2388,040	2	1194,02012	7,311	4,46
Residuo	1306,507	8	163,313403		
F ajuste	878,472	6	146,411971	0,684	19,33
Erro puro	428,035	2	214,0177		
<b>Total</b>	<b>3694,547</b>	<b>10</b>	<b>369,454745</b>		

R<sup>2</sup> 0,64

De acordo com a superfície de resposta (figura 8) o planejamento permitiu a obtenção da condição de otimização da diminuição da toxicidade, favorecendo o crescimento da raiz e a melhor resposta é obtida trabalhando com CuSO<sub>4</sub> e extrato de levedura nos pontos centrais (0,5% de extrato de levedura e 10 µmol/L de CuSO<sub>4</sub>).

**Figura 8.** Superfície de resposta do crescimento da raiz em resposta as variáveis: extrato de levedura e CuSO<sub>4</sub>.

Fungos são conhecidos por serem capazes de expressar uma diversidade de enzimas extracelulares de interesse para biorremediação. Neste contexto, lacase (EC 1.10.3.2) se destaca entre essas enzimas devido sua capacidade de oxidar uma grande variedade de compostos xenobióticos (Baldrian, 2006; Mate & Alcade, 2015). De acordo com Zeng et al (2013) e Majeau et al (2008), lacase é a enzima extracelular que está diretamente ligada a oxidação do benzo[a]pireno, um dos principais HPAs presente no tabaco e de grande importância por sua capacidade

mutagênica. Lacase frequentemente é referenciada como multi-cobre oxidase devido à molécula de cobre (Cu) no centro catalítico (Baldrian, 2006), sendo o cobre um conhecido indutor da atividade enzimática. Neste sentido, é possível que a lacase esteja participando no processo de diminuição da toxicidade, justificando o papel importante da presença de  $\text{CuSO}_4$  identificado no planejamento experimental como indutor da expressão e aumento da degradação dos HPAs presente no extrato de fumo, inferido de forma indireta pelo sistema teste *A. cepa*.

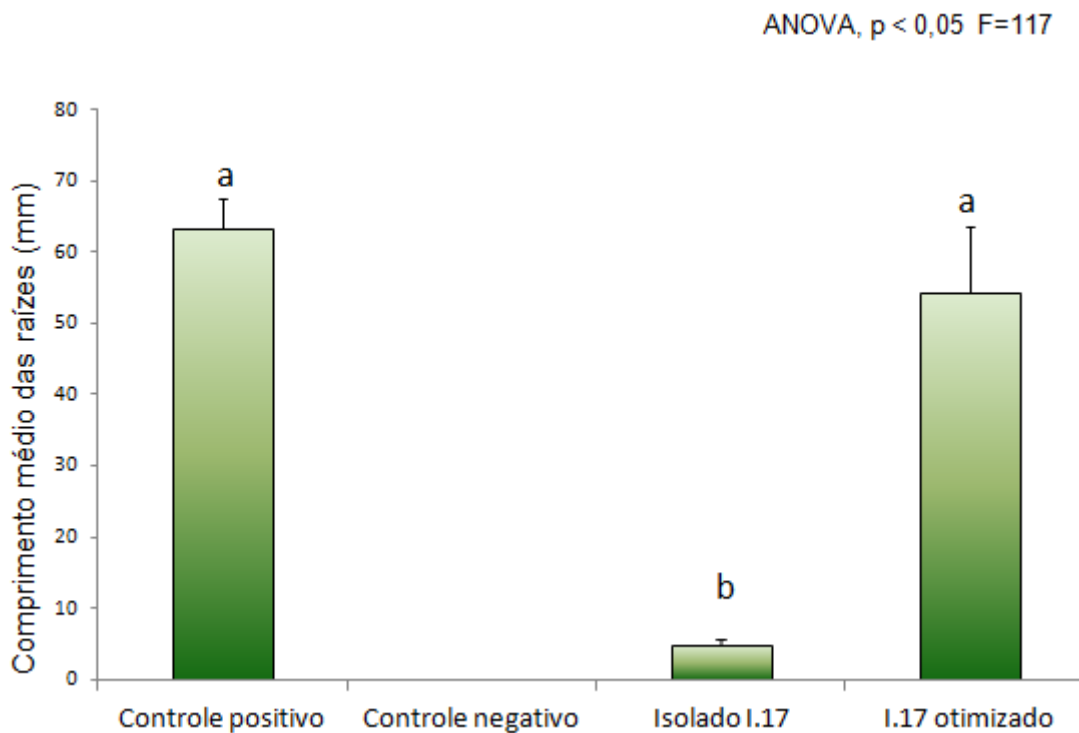
Nossos resultados vão de encontro com trabalho de Santos (2013), onde o autor afirma que a presença de cobre afeta a atividade de lacase levando a um aumento na biodegradação de HPAs. Arora & Sharma (2009) também citam a importância dos HPAs como principais fontes de contaminação do solo e indicam a utilização de lacase como alternativa para biorremediação deste contaminante e outros xenobióticos. Além disso, Passarini et al (2015), demonstrou a influência da presença de  $\text{CuSO}_4$  no meio cultivo na indução da expressão do gene da lacase para *Nigrospora* sp. e *Arthopyrenia* sp. Contudo, é importante ressaltar que outras enzimas ligninolíticas também já foram reportadas como responsáveis na degradação de HPAs, como a lignina peroxidase e a manganês peroxidase (Kadri et al, 2016), porém, não há referências sobre a indução da expressão ou aumento da atividade em resposta a presença de cobre para essas enzimas. Portanto, apesar de que os resultados apresentados aqui não identificaram de forma direta a degradação de HPAs e tão pouco a presença de lacase, é razoável sugerir que muito provavelmente a lacase esteja envolvida na diminuição da toxicidade do tabaco através da degradação dos HPAs presente no meio.

Outra variável significativa para a otimização da diminuição da toxicidade do tabaco foi a presença de extrato de levedura no meio de cultivo. Extrato de levedura fornece uma fonte de fácil assimilação de nitrogênio para o crescimento de fungos e foi citado por Wang et al (2009) como fator importante na degradação de nicotina por possivelmente induzir a rota enzimática responsável pela degradação da nicotina. Nossos resultados (Figura 8 e Tabela 5) indicam que 0,5% de extrato de levedura no meio de cultivo é a quantidade máxima deste substrato para os melhores resultados da diminuição da toxicidade. Valores diferentes desta concentração influenciam de forma negativa os resultados. Segundo Gurusamy & Natarajan (2013), a nicotina

degradada pelos fungos é utilizada como fonte de nitrogênio. Portanto, aumentando-se a disponibilidade de nitrogênio de fácil assimilação (extrato de levedura) torna-se vantajoso para os fungos utilizar esta fonte de nitrogênio ao invés de utilizar a rota enzimática para degradar a nicotina e conseguir o mesmo micronutriente. Nossos resultados estão de acordo com a literatura neste sentido, indicando que um mínimo de extrato de levedura é necessário para conseguir resultados positivos para diminuição de toxicidade, mas acima de 0,5% ou na ausência de extrato de levedura, a diminuição da toxicidade do tabaco é influenciada de forma negativa, indicando uma diminuição da degradação da nicotina.

Por fim, utilizando o planejamento fatorial como metodologia para otimizar os resultados de diminuição da toxicidade do tabaco observado pelo isolado I.17, obteve-se resultados ótimos nas concentrações 0,5% de extrato de levedura e 10  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{CuSO}_4$  adicionado no meio de cultivo (mantendo fixo as outras variáveis em: 1% dextrose; 20% extrato de fumo e pH 7,5). A otimização do processo pode ser considerada de sucesso e o resultado foi comparado com os valores antes da otimização e com o controle positivo (Figura 9).

As análises dos resultados indicam que após a otimização do processo de diminuição da toxicidade não há diferenças estatísticas em relação o controle positivo. Os valores foram significativos para análise de variância (ANOVA  $p < 0,05$ ) e foi complementado pelo teste de Tukey (Figura 9). O resultado observado para variável resposta índice mitótico foi reduntante comparado à variável resposta do crescimento da raiz, servindo para validar os dados. Informações adicionais sobre a superfície de resposta para o índice mitótico estão disponíveis no Anexo 2.



**Figura 9,** Média do crescimento das raízes antes e depois da otimização do processo. Os coeficientes iguais indicam que não há diferença estatística entre os tratamentos.

### 5.2.3 Teste de validação

O ensaio de validação visa confirmar os resultados observados para o delineamento experimental. De acordo com o modelo matemático obtido para o DCCR o valor predito para o crescimento da raiz utilizando os valores centrais de extrato de levedura e  $\text{CuSO}_4$  de acordo com a tabela 2, era de  $54,4 \pm 9,1$  cm. Contudo o valor observado no teste de validação executado com três réplicas foi de  $34,84 \pm 2,2$ cm. Apesar de o valor encontrado diferir do valor predito, o ensaio de validação confirma a eficiência da otimização do processo quanto a redução da toxicidade observada pelo I.17, uma vez que os valores encontrados para o crescimento da raiz no ensaio de validação são consideravelmente maiores dos observados pelo mesmo isolado antes da otimização pelo planejamento experimental (figura 10). Contudo, o valor da validação foi inferior ao obtido no planejamento experimental, ressaltando a importância do  $R^2$  neste tipo de estudo e do teste de validação. A validação mostra que realmente algum desvio ocorreu no ensaio de DCCR que não representava o resultado verdadeiro, o que foi claramente

mostrado pelo  $R_2$  baixo. Porém, o ensaio de planejamento experimental foi de extrema importância uma vez que além dos resultados superiores de crescimento da raiz obtidos na validação, também permitiu o conhecimento das variáveis que influenciam o estudo.

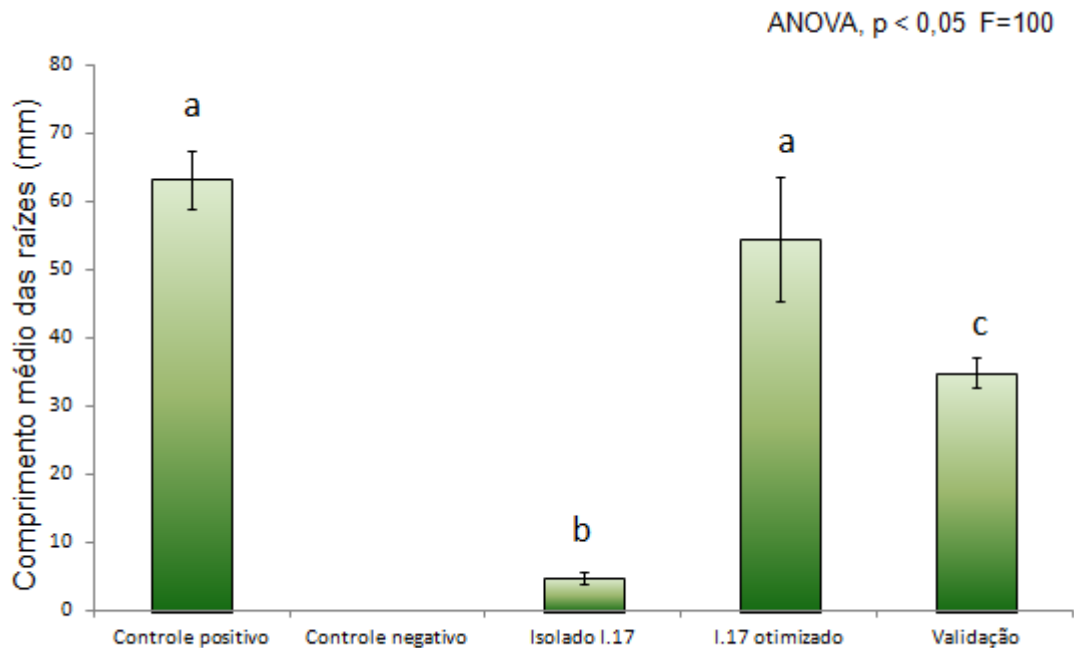


Figura 10 Média do crescimento das raízes no ensaio de validação. Os coeficientes iguais indicam que não há diferença estatística entre os tratamentos.

### 5.3 Caracterização morfológica do isolado Isolado I.17

A figura 11 mostra as características morfológicas do isolado I.17 crescido em MA por sete dias à 28°C e das características morfológicas das estruturas reprodutivas observadas em microscópio óptico. É possível observar que o micélio é hialino, septado e com ramificações que dão origem no seu topo a um grupo de conídios fazendo lembrar a cabeça de um alfinete. De acordo com a literatura (Bonifaz, 2012; Larone, 2011) estas são características do gênero *Acremonium*.

O gênero *Acremonium* é comumente encontrado em solo e na serrapilheira (Borges et al, 2011). Além disso, espécies deste gênero é frequentemente citado como fungo endófito com interesse farmacológico por apresentar moléculas bioativas antifúngicas, antitumorais e antibacterianas (Bezerra et al, 2013; Gama,

2014). Ademais, já foi reportado a capacidade de degradar xenobióticos e de apresentar alta resistência a solos contaminados com cobre e pH elevado (Silva & Monteiro, 2000).

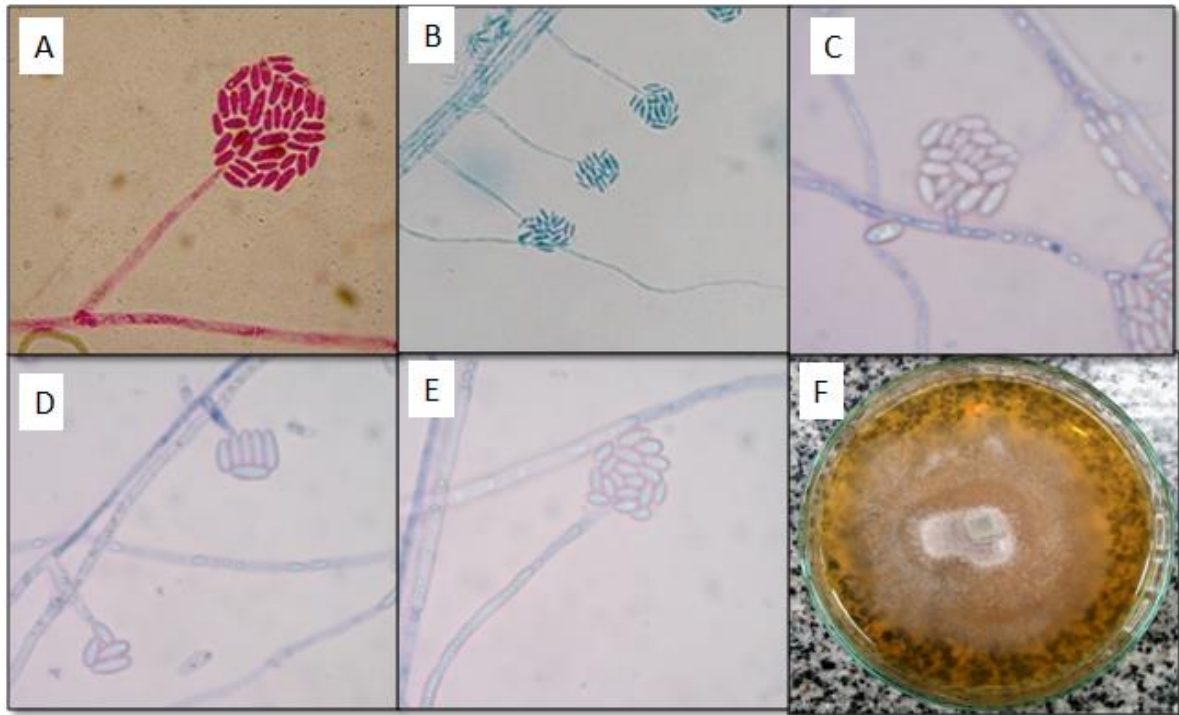


Figura 11 Características micro e macromorfológicas do isolado I.17. A e B referência da literatura (Bonifaz, 2012). C, D e E - formação dos conídios em forma de cabeça (Do autor). F - crescimento em MA (Do autor).

Apesar das características observadas serem características de *Acremonium* sp. de acordo com a literatura disponível, análises moleculares serão necessárias para confirmar identificação.

## 6. CONCLUSÃO

Foram testados 38 isolados em meio contendo 20% de extrato de tabaco, configurando um meio de cultivo tóxico, e 97,4% dos isolados apresentaram resistência/tolerância ao meio. Este desempenho evidencia o potencial destes isolados para trabalhos futuros com biorremediação e *screening* para enzimas de interesse biotecnológico que podem ter auxiliado na expressão da resistência/tolerância ao meio por estes isolados, como as enzimas ligninases.

O isolado I.17 demonstrou ser capaz de diminuir a toxicidade do meio contendo tabaco a níveis suficientemente baixos para permitir a germinação das cebolas no sistema teste *A. cepa*. Isto indica, de forma indireta, a capacidade deste isolado em tolerar e/ou degradar uma série de compostos tóxicos presente no meio. Neste sentido, este resultado merece destaque devido ao potencial deste isolado em ser utilizado tanto no tratamento da toxicidade do tabaco, quanto em outros trabalhos em amostras contaminadas com compostos desta magnitude, destacando por exemplo derramentos de óleos e derivados de petróleo.

A metodologia de otimização do processo demonstrou ser eficaz tanto para identificar as variáveis que favorecem o processo, quanto para determinar suas concentrações ótimas. Vale ressaltar que os resultados observados após otimização do processo não diferem estatisticamente do controle positivo, sendo assim, o tratamento da toxicidade do tabaco alcançado com sucesso. No entanto, sugere-se novas análises utilizando metodologias quantitativas tanto para identificar e quantificar os compostos presente no meio antes e depois do tratamento, quanto para identificar a formação dos metabólitos resultantes.



## 7. REFERÊNCIAS

ABD EL-ZAHER, E. F.; MAHMOUD, Y. A. G. & ALY, M. M. **Effect of different concentrations of phenol on growth of some fungi isolated from contaminated soil.** African Journal of Biotechnology. Vol 10(8), pp 1384-1392, 21 Feb, 2011.

AGUIAR, A. R.; AGUIAR, D.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. **Efeito de metabólitos produzidos por Trichoderma spp. sobre o índice mitótico em células das pontas de raízes de Allium cepa.** Biosci. J., Uberlandia, v. 31, n. 3, p. 934-940, may/june. 2015.

ALMEIDA, F. V. et al. **Substâncias Tóxicas Persistentes (STP) no Brasil. Artigo de Revisão.** Quim. Nova, vol.30, No. 8, 1976-1985, 2007.

ALMEIDA, T. E. **Estudo da compostagem de tabaco de cigarros contrabandeados misturados a lodo de ETE por meio de análises convencionais e espectroscópicas.** Dissertação em Química Aplicada pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015).

ARRAES, A. I. O. M. & LONGHIN S. R.. **Otimização de Ensaio de Toxicidade Utilizando o Bioindicador Allium cepa como Organismo Teste.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.8, N.14; p. 1958 – 2012.

ARORA, D. S. & SHARMA, R. K. **Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications.** 2009, Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-009-86.

AZEVEDO, J. A. H; ARAÚJO, R. S. & SILVA, G. M. M. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Atmosféricos de Fontes Automotivas uma Breve Revisão.** Holos, ano 29, vol 1, 2013.

BALDRIAN. P. **Fungal laccases – occurrence and properties.** FEMS Microbiol. Rev 30 (2006) 215-242.

BONIFAZ, A. **Micologia Médica Básica.** 2012. Cap. 5: Hongos contaminantes, ed. 4, McGrawHill: México. Pag 66 – 67, 600p.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. **Enhanced Textile Dye Decolorization by Marine-Derived Basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 Using Integrated Statistical Design**. Environ Sci Pollut Res (2016) 23: 8659. doi:10.1007/s11356-016-6053-2.

BAGATINI, M. D.; FERREIRA DA SILVA, A. C.; TEDESCO, S. B.. **Uso do Sistema Teste de *Allium cepa* como Bioindicador de Genotoxicidade de Infusões de Plantas Medicinais**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 17(3): 444-447, Jul/Set. 2007.

CORRÊA, Wallace Ribeiro. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos - Sp, 2003. Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000000/00000069.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2017.

DA SILVA, T. A. R. & NETO, W. B. **Estudo da Redução da Acidez do Óleo Residual para a Produção de Biodiesel Utilizando Planejamento Fatorial Fracionado**. Ver. Virtual Quim, Vol 5 No. 5, 828-839, 2013. Disponível em: <<http://www.uff.br/rvq>>. Acesso em 05 nov. 2017.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002. 132p.

GURUSAMY, R. & NATARAJAN, S. **Current Status on Biochemistry and Molecular Biology of Microbial Degradation of Nicotine**. The Scientific World Journal. Vol. 2013. 125385, p. 15.

HARMS, H. SCHLOSSER, D. & WICK, L. Y. **Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals**. Nature Reviews/Microbiology. Doi: 10.1038/nrmicro2519. February 2011.

HUSSAINI, S. Z; SHAKER, M. & IQBAL, M. A. **Isolation of fungal isolates for degradation of selected pesticides**. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci., vol 2(4) March 2013: 50-53.

IDESF. **O Custo do Contrabando.** Instituto de Desenvolvimento Econômico e Social de Fronteiras. Março de 2015.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. xvi, 612 p. ISBN: 9788536317557.

KADRI, T et al. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) by fungal enzymes: A review.** Jorunal of environmental sciences 51 (2017), 52-74.

KUMAR, R. et al. **Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization.** Journal of Genetic Engineering an Biotechnonology (2016) 14, 125-131.

LEME, D. M. & MARIN-MORALES, M. A. **Allium cepa Test in Environmental Monitoring: A review on its Application.** Mutation Research 682 (2009) 71-81.doi: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.

MAGRINI, M. J. **Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolítica por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas.** 2015, 112p. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

MAJEAU, J. A. et al. **Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants.** Bioresource Technology 101 (2010) 2331-2350.

MATE, D. M. & ALCALDE, M. **Laccase engineering: From rational design to directed evolution.** Biotechnonology Advances 33 (2015) 25-40.

MOREIRA, E.D.T. **Classificação de Cigarros Usando Espectrometria NIRR e Métodos Quimiométricos de Análise.** Dissertação em Química pela Universidade Federal da Paraíba, 2007.

NETO, A. D. P. et al. **Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus Derivados Nitrados (NHPAs): Uma Breve Revisão Metodológica.** Química Nova, 23(6), 2000.

PALLU, A. P. S. **Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus sp.*** 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de

Plantas, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.

PASSARINI, M. R. Z. et al. **Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330.** *AMB Express* (2015) 5:19.

PEDROSO, A.L. **Produção de *Pleurotus* spp Em resíduo da Indústria do Cigarro e Avaliação do Substrato Exaurido.** Dissertação em Ciências do Solo pela Universidade Federal do Paraná, 2003.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco (Ed.). **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos.** Barão Geraldo - Campinas - Sp: Casa do Pão Editora, 2005. 325 p.

RHODES. C. J. **Mycoremediation (bioremediation with fungi) – growing mushrooms to clean the earth.** *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26:3, 196-198.

ROSA, D. S. **Caracterização e Avaliação do Potencial de Resíduos Agrícolas como Aditivos no Processo de Filtração da Fumaça Principal de Cigarros.** Dissertação de Mestrado do programa de pós graduação em Ciências dos Materiais – UFRGS. Porto Alegre, Julho de 2013.

RAMOS, S. M. S.. **Isolamento e seleção de fungos de solo para a biodegradação do pesticida organofosforado clorpirifós.** 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SANTO, M. et al. **The role of the copper-binding enzyme – Laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*.** *International Biodeterioration & Biodegradation* (2012) 1-7.

SILVA, P. S. **Avaliação da Toxicidade e Genotoxicidade das Águas do Rio Criciúma (SC) Utilizando como Organismos Bioindicadores *Artemia* sp., *Daphnia magna* e *Allium cepa* L.** Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas – UNESC. Criciúma, Nov. 2008.

TRILHA, R. **Determinação do teor de nicotina em cigarros comerciais e ilegalmente comercializados utilizando microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.** Relatório do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, nov. 2009. p. 35.

ZENG, J. et al. **Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and copper independence.** Chemosphere 148 (2016) 1-7.

WANG, H. H. et al. **Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites.** Journal of Applied Microbiology 112, 258-268. 2011.

WANG, S. N.; Liu, Z & Xu, P. **Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium* sp. Strain S33.** Journal of Applied Microbiology 107(2009) 838-847.

## 8. ANEXOS

### ANEXO I

#### PROTOCOLO – MEIO YDF

##### 1°

- ✓ Pesar 200g de cigarros desmanchados (quebrados em pequenos pedaços, junto com papel e filtro)
- ✓ Separar 1 Litro de água destilada

##### 2°

- Adicione os cigarros desmanchados a um recipiente contendo a água destilada
- Aquecer até temperatura de ebulição
- Após atingir temperatura de ebulição, ferver por 45 minutos
- Após fervura, esperar esfriar e filtrar em papel filtro.
- Armazene o filtrato (extrato de fumo)

##### 3°

- O extrato de fumo (filtrado) está 100% concentrado. Para preparar 1000mL de meio YDF à 20% proceder da seguinte forma:
  - 100g de extrato de levedura
  - 100g de dextrose
  - 200mL de extrato de fumo
  - 800mL de água destilada
    - Aquecer mistura até dissolver os solutos e autoclavar.

#### Referência

PEDROSO, A.L. **Produção de Pleurotus spp Em resíduo da Indústria do Cigarro e Avaliação do Substrato Exaurido.** Dissertação em Ciências do Solo pela Universidade Federal do Paraná, 2003. (ADAPTADO).

## ANEXO II

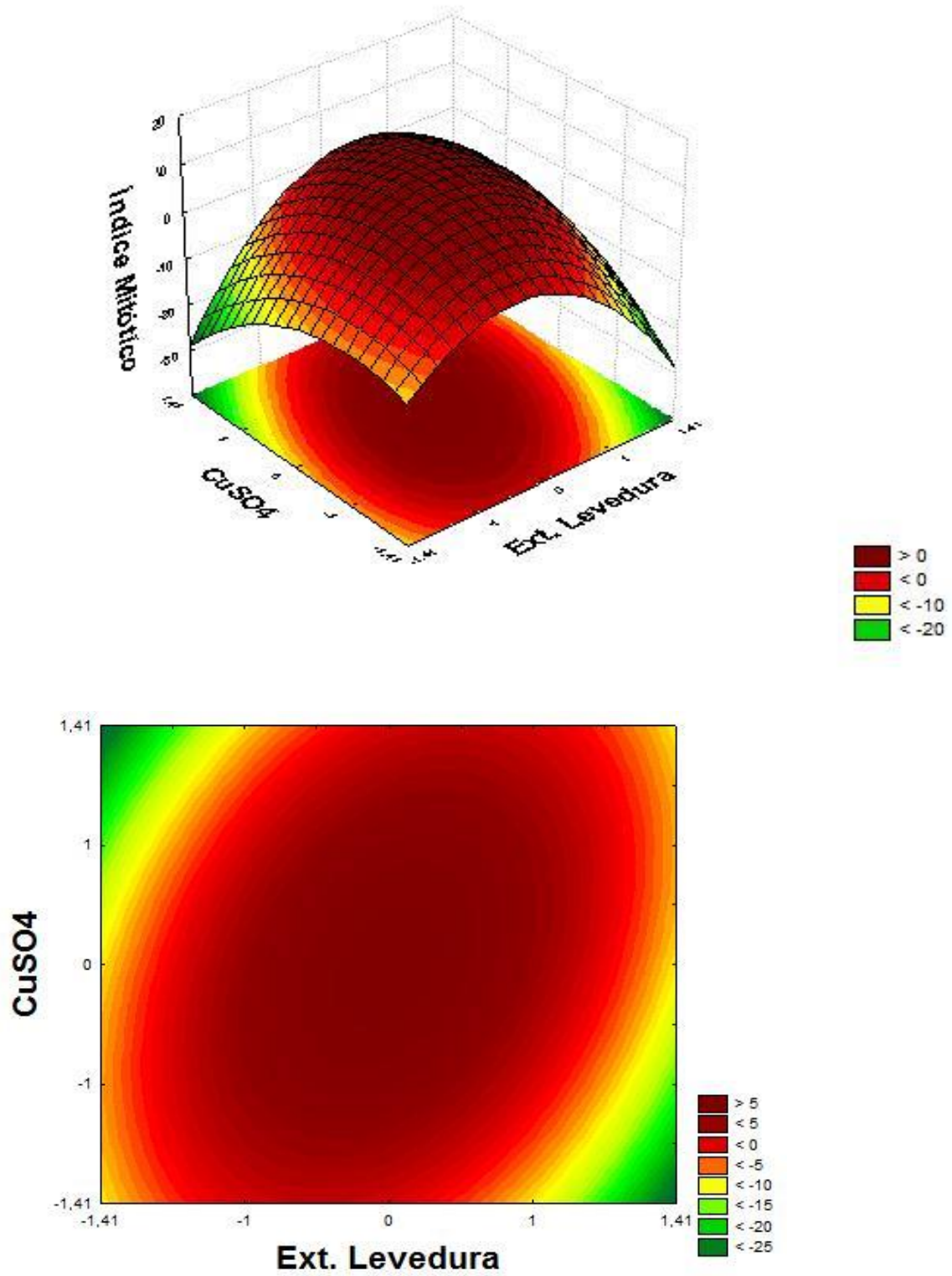


Figura I. Superfície de resposta do índice mitótico em resposta as variáveis: extrato de levedura e CuSO<sub>4</sub>.