



**LUCIANA PEREIRA DIAS**

**BIOACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO  
EM *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp.**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**LUCIANA PEREIRA DIAS**

**BIOACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO EM *Agaricus bisporus* e  
*Pleurotus spp.***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Coorientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Dias, Luciana Pereira.

Bioacumulação de elementos-traço em *Agaricus bisporus* e  
*Pleurotus* spp. / Luciana Pereira Dias. – Lavras : UFLA, 2013.  
53 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Cogumelos comestíveis. 2. Contaminação. 3. Acumulação. 4.  
*Pleurotus ostreatus*. 5. *Pleurotus pulmonarius*. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.222

**LUCIANA PEREIRA DIAS**

**BIOACUMULAÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO EM *Agaricus bisporus* e  
*Pleurotus spp.***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de maio de 2013.

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning UFLA

Dr. Sílvio Júnio Ramos VALE

Dr. Eduardo Alves  
Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da minha vida.

A minha família, por toda compreensão e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu companheiro, Athos e a sua família, pela ajuda e por todo o carinho.

Ao professor Dr. Drauzio, Alene, Dra. Karla e a todos que sempre acreditaram nos meus sonhos.

Às minhas amigas/irmãs Glécia e Maiara e a todos os amigos, por tudo o que fizeram e ainda têm feito por mim.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao professor Dr. Eduardo Alves, pela orientação, paciência e por toda a dedicação.

Ao professor Dr. Eustáquio, pela coorientação.

A todos os professores e colegas do Programa, pelo conhecimento repassado e pelo companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, pelo auxílio, ensinamento e amizade.

Aos técnicos de laboratório Paulinho e Eloísa, por toda a dedicação.

À CAPES, pela bolsa de estudos e ao CNPq e à Fapemig, pela concessão de projetos de auxílio à pesquisa.

## RESUMO

Neste estudo os objetivos principais foram: verificar a tolerância aos elementos-traço *in vitro* em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp; verificar a capacidade de acumulação de diversos elementos-traço em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp; avaliar a produtividade e eficiência biológica em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp. em função dos elementos-traço; utilizar como ferramenta para análise de todos os microelementos, o microscópio eletrônico de varredura acoplado a um sistema de microanálise de raios (EDS). Foi realizado o experimento com elementos-traço na camada de cobertura em *Agaricus bisporus*. No primeiro experimento, o solo foi contaminado com os elementos-traço separadamente, com arsênio, cobre e zinco, (nas concentrações de 150, 300 e 600 mg.kg<sup>-1</sup>), chumbo (200, 400 e 800 mg.kg<sup>-1</sup>) e cádmio (25, 50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup>). No segundo experimento, foi utilizado o solo contaminado com os elementos-traço em diferentes proporções (7, 10, 30 e 50 vezes). Posteriormente, foi realizado o experimento com elementos-traço no substrato de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*. Foi utilizado como substrato palha-de-feijão contendo diferentes proporções do solo contaminado (0, 10, 20, 30, 40%), o qual foi diluído anteriormente 10 vezes com solo não contaminado. De acordo com os resultados, pode-se concluir: 1) No crescimento micelial *in vitro*, as concentrações de inibição foram para As, Cu e Zn (500 mg.kg<sup>-1</sup>), Cd (100 mg.kg<sup>-1</sup>) e Pb 800 (mg.kg<sup>-1</sup>); 2) Na análise de elementos-traço em basidiocarpos de *A. bisporus*, verificou-se que todos os elementos estavam acima do limite de tolerância recomendado; 3) O acúmulo dos elementos individuais nos basidiocarpos de *A. bisporus*, ocorreu em ordem decrescente Zn>Cu>Pb>Cd>As. Já para a amostra de basidiocarpo com todos os elementos a ordem decrescente foi Pb>Zn> Cu>Cd >As; 4) A produtividade de *A. bisporus* foi maior na presença de cobre, chumbo e zinco, e a menor produtividade foi na presença de arsênio, cádmio e do solo diluído; 5) Pode-se observar no crescimento micelial, produtividade e eficiência de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, um aumento no crescimento à medida que se adicionava os elementos-traço. 6) Não foi possível detectar os elementos As, Cd, Cu, Pb e Zn, devido possivelmente pelo fato desses elementos encontrarem-se em locais específicos no cogumelo, dificultando a detecção pela microanálise de raios-X. 7) Foi possível detectar os elementos alumínio (Al) e ferro (Fe) em grandes proporções devido a sua distribuição uniforme no cogumelo. 8) As linhagens dos cogumelos *A. bisporus*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, revelaram uma grande capacidade de acumular os elementos-traço testados.

Palavras-chave: Acumulação, elementos-traço, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius*.

## ABSTRACT

The main objectives, in this study, were to verify the tolerance to trace elements *in vitro* in *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp; verify the ability of accumulation of several trace elements in *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp; evaluate the productivity and biological efficiency in *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp. as a function of trace elements. The analysis of all microelements were done using the scanning electron microscope coupled to an X-ray microanalysis system (EDS). The experiment was conducted with trace elements in the cover layer in *Agaricus bisporus*. In the first experiment, the soil was contaminated with trace elements separately at concentrations of arsenic, copper, and zinc (150, 300 and 600 mg.kg<sup>-1</sup>), lead (200, 400 and 800 mg.kg<sup>-1</sup>) and cadmium (25, 50 and 100 mg.kg<sup>-1</sup>). In the second experiment, we used the soil contaminated with trace elements in different proportions (7, 10, 30 and 50 times). Subsequently, the experiment was conducted with trace elements in the substrate of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. It was used bean straw as a substrate with different proportions of the contaminated soil (0, 10, 20, 30, 40%), which was previously diluted 10-fold with uncontaminated soil. According to the results, it was concluded that: 1) the micelial growth *in vitro* inhibitory concentrations were for As, Cu and Zn (500 mg.kg<sup>-1</sup>), Cd (100 mg.kg<sup>-1</sup>) and 800 Pb (mg.kg<sup>-1</sup>); 2) the analysis of trace elements in fruiting bodies of *A. bisporus*, it was found that all the elements were above the tolerance limit recommended; 3) accumulation of individual elements in the fruiting bodies of *A. bisporus*, occurred in descending order Zn > Cu > Pb > Cd > As. For the basidiocarp sample with all elements the descending order was Pb > Zn > Cu > Cd > As; 4) the productivity of *A. bisporus* was greater in the presence of copper, lead and zinc, and the yield was lower in the presence of arsenic, cadmium and diluted soil; 5) can be observed on micelial growth, productivity and biological efficiency of *P. ostreatus* and *P. pulmonarius* there was an increase in growth when was added trace elements; 6) X-ray microanalysis was unable to detect the elements As, Cd, Cu, Pb and Zn because these elements are found in specific locations in the mushroom, making it difficult to detect; 7) It was possible to detect the elements Al and Fe in larger proportions due to its uniform distribution in the mushroom; 8) The strains of the mushroom *Agaricus bisporus*, *P. ostreatus* and *P. pulmonarius* showed a great ability to accumulate trace elements tested.

Keywords: Accumulation, trace elements, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	10
2.1	Elementos-traço no meio ambiente .....	10
2.1.1	Arsênio .....	11
2.1.2	Cádmio .....	12
2.1.3	Cobre .....	12
2.1.4	Chumbo .....	13
2.1.5	Zinco .....	14
2.2	Interação entre elementos-traço e fungos .....	15
2.3	Bioacumulação de elementos-traço por cogumelos .....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1	Fungos .....	18
3.2	Avaliação da tolerância aos elementos-traço em meio de cultura ...	18
3.3	Cultivo do cogumelo <i>A. bisporus</i> .....	19
3.4	Cultivo dos cogumelos <i>P. ostreatus</i> e <i>P. pulmonarius</i> em substratos contaminados com elementos-traço .....	21
3.4.1	Preparo dos inoculantes .....	21
3.4.2	Preparo do substrato e cultivo .....	22
3.5	Análises químicas para determinação dos elementos-traço .....	23
3.6	Microanálise de raios X (EDS) .....	23
4	RESULTADOS .....	25
4.1	Avaliação da tolerância aos elementos-traço em meio de cultura ...	25
4.2	Produtividade dos cogumelos <i>A. bisporus</i> em função dos elementos-traço no solo de cobertura .....	28
4.3	Análise de elementos-traço em <i>A. bisporus</i> por espectrometria de absorção atômica .....	30
4.4	Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica de <i>P. ostreatus</i> e <i>P. pulmonarius</i> , em função dos elementos-traço no substrato .....	31
4.5	Microscopia eletrônica de varredura .....	33
4.5.1	Microanálise de raios X (EDS) dos microelementos dos solos e dos cogumelos <i>A. bisporus</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>P. pulmonarius</i> .....	33
5	DISCUSSÃO .....	38
6	CONCLUSÃO .....	43
	REFERÊNCIAS .....	45



## 1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas da sociedade do século XXI é a poluição ambiental. Dentre os principais poluentes estão os elementos-traço, cuja quantidade aumenta de forma permanente no ambiente, sendo liberados, principalmente, por meio de atividades industriais e de mineração (CERIBASI; YETIS, 2001; PARAMESWARI; LAKSHMANAN; THILAGAVATHI, 2010). Alguns elementos-traço são de grande interesse biológico e ecológico, pois, ao mesmo tempo em que podem ser classificados como micronutrientes, podem ser também considerados poluentes altamente tóxicos, mesmo em baixas concentrações (SROGI, 2008).

Em vários estudos tem sido demonstrado o potencial de microrganismos tais como algas, bactérias e fungos para a retenção de elementos-traço no ambiente (BUMBAC et al., 2010). Dentre eles, destacam-se os cogumelos devido à sua alta capacidade de acumulação desses elementos (RADULESCU et al., 2010).

Os cogumelos comestíveis são apreciados, principalmente, pelo seu valor gastronômico e nutritivo, além de suas propriedades medicinais. Em tempos recentes, as quantidades de cogumelos consumidos aumentaram muito (BETT; PERONDI, 2011). Dentre os gêneros utilizados na alimentação, destacam-se *Agaricus* e *Pleurotus*, pelo alto valor nutritivo e as propriedades medicinais e, além disso, pela sua elevada capacidade de acumular diversos elementos-traço (ÇAGLARIRMAK, 2007; DEMIRBAS, 2001; GARCÍA; ALONSO; MELGAR, 2005).

Os riscos que a ingestão de cogumelos pode trazer à saúde devem-se à presença de certos contaminantes presentes no meio ambiente, em virtude do grande potencial de acumulação de elementos-traços por cogumelos comestíveis (ZHU et al., 2011) e por esses elementos-traço entrarem na cadeia alimentar,

como resultado da absorção. Se, porventura, esses cogumelos comestíveis contaminados forem consumidos pelos humanos, essas espécies podem constituir uma via de exposição humana, levantando questões de saúde pública (SVOBODA; HAVLÍČKOVÁ; KALÁČ, 2006). Assim, tendo como base os pressupostos descritos, este estudo foi realizado com os objetivos principais de:

- a) verificar a tolerância aos elementos-traço, *in vitro*, em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp.;
- b) verificar a capacidade de acumulação de diversos elementos-traço em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp.;
- c) avaliar a produtividade e a eficiência biológica em *Agaricus bisporus* e *Pleurotus* spp., em função dos elementos-traço;
- d) utilizar, como ferramenta para análise de todos os microelementos, o microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado a um sistema de microanálise de raios X (EDS).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Elementos-traço no meio ambiente

O termo elemento-traço tem sido empregado para definir metais catiônicos e aniônicos presentes em baixas concentrações (usualmente,  $<1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) em solos e plantas. Este termo tem sido preferido em diversas publicações recentes, em substituição à expressão metal pesado, a qual nunca foi definida por nenhum órgão oficial na área de química, sendo, assim, pouco usual (GUILHERME et al., 2005).

Os elementos-traço ocorrem naturalmente no ambiente e estão presentes em rochas, solo, plantas e animais. Podem ocorrer de diferentes formas, como íons dissolvidos em água, como vapores ou como sais ou minerais na rocha, na areia e no solo. Eles também podem estar ligados em moléculas orgânicas ou inorgânicas (DEMIRBAS, 2001).

Muitos elementos-traço são essenciais ao metabolismo microbiano e humanos, enquanto outros não apresentam função metabólica conhecida. Entretanto, todos estes elementos tornam-se tóxicos acima de uma concentração mínima, embora os efeitos sejam dependentes da especificidade do microrganismo (MELO; AZEVEDO, 2008).

A liberação de elementos-traço no ambiente vem aumentando continuamente como resultado de atividades industriais e de mineração (PARAMESWARI; LAKSHMANAN; THILAGAVATHI, 2010). As principais fontes antropogênicas de elementos-traço no solo são mineração e beneficiamento de metais, aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes, lodos de esgotos urbanos e/ou industriais, queima de combustíveis fósseis, águas residuais, resíduos de indústrias de beneficiamento químico, manufatura e

disposição de artigos eletrônicos, de caça e pesca e de treinamento militar e de guerra (CAMARGO; ALLEONI; CASAGRANDE, 2001).

Nos últimos anos, a poluição do solo por elementos-traço tem merecido especial atenção, sendo mundialmente reconhecida como um problema que pode representar sérios riscos à saúde humana e à qualidade do meio ambiente (GUILHERME et al., 2005).

### **2.1.1 Arsênio**

O arsênio (As) é um metaloide amplamente distribuído na crosta terrestre e está presente em mais de 200 minerais, podendo ser encontrado, principalmente, na forma natural de sulfeto, em grande variedade de minerais (MANDAL; SUZUKI, 2002). Na natureza, o arsênio existe numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais.

O efeito tóxico do As depende, principalmente, da forma química do elemento. Tal efeito pode ocorrer na forma de arsenito, arsenato, íon monometilarsênico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA) (ANDERSON; THOMPSON; CULBARD, 1986).

Uma longa exposição a compostos inorgânicos de As pode conduzir a várias doenças, tais como conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (DEMESMAY; OLLE; PORTHAULT, 1994).

### 2.1.2 Cádmio

O cádmio (Cd) é conhecido como um dos principais elementos tóxicos, uma vez que inibe os processos da vida de muitos organismos (VETTER, 1993). O Cd é considerado um elemento relativamente raro, encontrando-se no ambiente em baixos níveis (VARMA, 1988).

Na natureza, é um elemento-traço cuja concentração na crosta terrestre varia de 0,15 a 0,20 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo encontrado em fungicidas, baterias, tratamento da borracha, produção de pigmentos e em indústrias de galvanoplastia dando brilho e resistência à corrosão a objetos (JARUP; AKESSON, 2009).

A exposição ao Cd pode ocorrer por inalação, alimentos contaminados e tabaco (GERHARDSSON et al., 2002). A toxicidade desse elemento, tanto em animais experimentais quanto em humanos, é influenciada por um grande número de fatores, tais como a via de administração, a dose, a duração da exposição, a idade, etc. (CASALINO et al., 1997).

O Cd tem lenta excreção, com meia vida de 10 a 30 anos, e sugere-se que 55 µg/pessoa/dia seja a ingestão máxima tolerável (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2000). Este metal tóxico pode se acumular em diversos órgãos, como pulmão, fígado, rim, testículos, cérebro, ossos, sistema sanguíneo, etc. (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1996).

### 2.1.3 Cobre

O cobre (Cu) faz parte dos elementos químicos considerados micronutrientes, está incluído no ciclo bioecológico e tem papel essencial na nutrição das plantas (KING, 1996). É largamente utilizado na agricultura e, eventualmente, contribui para a poluição de fontes e massas de água ou por meio

de resíduos industriais resultantes da fabricação de produtos à base de cobre (ANDREI, 2005).

Este elemento é considerado um dos mais importantes e essenciais para plantas e animais, sendo a ingestão diária recomendada (RDI) de 9 mg por dia, para homens e mulheres adultos (INSITUTE OF MEDICINE, 2001). O déficit de Cu pode resultar no comprometimento da produção de energia, do metabolismo e do sistema imunológico (SAARI, 2000).

No entanto, se os organismos são expostos a concentrações elevadas de cobre disponível, a bioacumulação pode ocorrer, com possíveis reações tóxicas (MACÊDO, 2006). O excesso de cobre solúvel no organismo humano pode ser tóxico, causando doenças como epilepsia, melanoma, artrite reumatoide, bem como a perda do paladar (SARGENTELLI; MAURO; MASSABNI, 1996).

#### **2.1.4 Chumbo**

O chumbo (Pb) é um elemento tóxico e ocorre como contaminante ambiental, devido ao seu largo emprego industrial e à constante emissão por veículos automotores e pelas indústrias, podendo se acumular no organismo humano pela ingestão de alimentos e líquidos contaminados (GFELLER; MESSONNIER, 2006).

Este metal é reconhecido, pela Organização Mundial da Saúde, como um dos elementos químicos mais perigosos para a saúde humana (WHO, 1996). O Pb pode afetar uma série de sistemas e a grandeza das manifestações clínicas dependerá da intensidade, do tempo de exposição e da sensibilidade individual (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR, 2011).

A legislação brasileira, por meio da Norma Regulamentadora NR-7 (portaria nº 24, de 29/12/1994), estabelece que a concentração máxima de Pb no

sangue deve ser igual ou inferior a 40 µg/dL e o limite de tolerância biológica igual a 60 µg/dL (JACOB; ALVARENGA; MORATA, 2002).

A maior parte do Pb entra no organismo humano pelas vias respiratórias e gastrintestinais. Após absorção, o chumbo pode ser encontrado no sangue e em tecidos moles (ATSDR, 1992). Entretanto, os órgãos críticos para sua ação tóxica são o sistema nervoso, a medula óssea e os rins (PAOLIELLO; CHASIN, 2001).

### **2.1.5 Zinco**

O zinco (Zn) é um importante elemento-traço para o crescimento e o desenvolvimento normal de humanos, e os cogumelos são conhecidos como bons acumuladores desse elemento. Em seres humanos, atua na resposta imune, na função neurológica e na reprodução. A ingestão diária recomendada (RDI) é de 15 mg de Zn e o consumo máximo não associado com efeitos adversos é de 30 mg (RABINOVICH et al., 2007).

Em sua forma metálica, o Zn tem uma limitada biodisponibilidade e não apresenta nenhum risco ecológico. Entretanto, pode reagir com outras substâncias químicas, como ácidos e oxigênio, para formar compostos que podem se tornar potencialmente tóxicos (RADHIKA; SUBRAMANIAN; NATARAJAN, 2006).

Além disso, apesar de o Zn ser um micronutriente, apresenta-se como um elemento potencialmente tóxico, quando presente em concentrações excessivas, podendo afetar o crescimento e exibir toxicidade gastrintestinal, devido à acumulação deste elemento em seres humanos (WALSH et al., 1994). Portanto, o zinco pode trazer sérios riscos à saúde humana, como náuseas, vômito, problemas gastrintestinais, letargia, fadiga e alterações na resposta imune (FOSMIRE, 1990).

## **2.2 Interação entre elementos-traço e fungos**

Os fungos desempenham papel importante na remoção de elementos-traço por meio de sua capacidade de absorver e alocar esses elementos na parede celular, formando um complexo de metal e quitina (ZHOU et al., 1999). A parede celular fúngica é composta, principalmente, de polissacarídeos, alguns dos quais podem estar associados a proteínas, ou outros componentes, como lipídeos e melaninas (GADD, 1993).

A bioacumulação de elementos-traço por fungos tem atraído a atenção de pesquisadores, em vista de possíveis riscos à saúde para os consumidores de cogumelos comestíveis cultivados ou silvestres (WANG; HOU, 2011). Se os elementos tóxicos forem bioacumulados pelo organismo, vários sintomas podem ser observados nos sistemas gastrintestinal, neurológico e imunológico. Em contrapartida, tais fungos são considerados de grande potencial para aplicação na biorremediação de solos contaminados por elementos-traço (GARCÍA; ALONSO; MELGAR, 2005). Todavia, nesse caso, esses fungos não são adequados para o consumo.

## **2.3 Bioacumulação de elementos-traço por cogumelos**

O termo bioacumulação é, normalmente, entendido ser um processo de acumulação de elemento químico mediado especificamente por organismos vivos, em que este é metabolicamente ativo (NAJA; MURPHY; VOLESKY, 2010). Fatores físicos e químicos, como pH, temperatura, ausência ou presença de nutrientes e outros elementos-traço, também influenciam o processo de absorção do elemento. Além disso, os mecanismos de acumulação e adsorção variam de acordo com a espécie microbiana ou, até mesmo, com a cepa estudada (GADD, 1990). Em cogumelos, os potenciais de acumulação são afetados pela



espécie, a composição do substrato, a idade, o micélio e os intervalos entre cada frutificação (KALAC; SVOBODA, 2000).

Em comparação com as plantas, os cogumelos provaram ser boas fontes de muitos elementos-traço (MATTILA et al., 2001), podendo também ser bioacumulados em níveis acima dos limites seguros e, por isso, vêm despertando a preocupação dos pesquisadores na determinação desses elementos em espécies comestíveis (VETTER, 2004).

Os cogumelos da ordem Agaricales destacam-se dentre vários outros porque representam um grande número de espécies de grande importância, do ponto de vista alimentício, etnológico, industrial e ecológico (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Dentre eles, a espécie *Agaricus bisporus* (champignon de Paris) é conhecida como um dos cogumelos mais consumidos no mundo, devido ao seu sabor e textura, sendo também o mais cultivado e consumido no Brasil (URBEN; SIQUEIRA, 2003).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus*, considerando todas as espécies, constituem o segundo grupo mais cultivado no mundo, sendo muito apreciados na alimentação e considerados como sendo de alto valor nutricional (REIS et al., 2012). O *Pleurotus ostreatus* destaca-se como a principal espécie cultivada dentro do gênero, sendo várias linhagens cultivadas comercialmente e mais conhecidas no Brasil como "shimeji" (DIAS et al., 2010; RÚHL; FISCHER; KÚES, 2008). Além de ser um fungo decompositor, com a produção de diversas enzimas extracelulares, destaca-se também por apresentar várias propriedades medicinais, como atividade antitumoral, antioxidante e anticolesterolêmica (GU; SIVAM, 2006).

O cogumelo *P. pulmonarius* é uma espécie relativamente nova, em termos de cultivo, sendo conhecida no Japão como *houbitake* e, no Brasil, como *hiratake* marrom. Trata-se de um cogumelo de sabor suave, rico em vitaminas e aminoácidos e também apresenta propriedades terapêuticas (DIAS et al., 2003).

Além das suas propriedades organolépticas e medicinais, este cogumelo caracteriza-se também pela sua rusticidade, sendo bastante apropriado para as condições do pequeno produtor, não requerendo controle ambiental rigoroso e tolerando temperaturas mais elevadas, frutificando bem a 25 °C ou mais (DIAS et al., 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Fungos

Os experimentos de bioacumulação foram realizados utilizando-se as espécies de cogumelos *A. bisporus*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 3.2 Avaliação da tolerância aos elementos-traço em meio de cultura

A tolerância aos elementos-traço foi avaliada em meio ágar batata dextrose (BDA), posteriormente suplementado com os sais cujas fontes e concentrações estão descritas na Tabela 1. Todos os meios foram preparados com água destilada e o pH foi ajustado para 5,9, incluindo o controle, utilizando-se uma solução de NaOH ou HCl, a 1 mol. Para o inóculo, foi utilizado o *P. pulmonarius*.

O meio BDA foi autoclavado após a suplementação dos metais, exceto para o As, o qual foi esterilizado separadamente por exposição à luz ultravioleta (UV), por 40 minutos, em câmara de fluxo laminar, para prevenir a sua perda por volatilização. Após a autoclavagem, o sal esterilizado por UV foi adicionado ao BDA estéril. Em seguida, os fungos foram incubados, por 6 dias, a 28 °C e o crescimento micelial foi avaliado em mm/dia. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado. Com auxílio do software SISVAR-UFLA, os dados foram submetidos à análise de regressão, a 5% de probabilidade.

Tabela 1 Concentrações de elementos-traço testadas em meio de cultura sólida

Solução	Concentração (mg.kg <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0, 50, 250, 500
Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0, 50, 250, 500
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0, 50, 250, 500
PbSO <sub>4</sub>	0, 200, 400 e 800
CdSO <sub>4</sub> . 8H <sub>2</sub> O	0, 50 e 100

### 3.3 Cultivo do cogumelo *A. bisporus*

O composto de cultivo do cogumelo foi obtido de empresa comercial e foi preparado de acordo com os procedimentos convencionais para a espécie, conforme descrito por Chang e Miles (2004).

O composto colonizado com *A. bisporus* foi distribuído em sacolas de polietileno 30x45 (5 kg/sacola) e coberto com uma camada de cobertura de 5 cm, equivalente a 3,5 kg de solo, o qual foi preparado conforme descrito a seguir. O substrato base utilizado como camada de cobertura foi o Latossolo Vermelho distroférico, obtido de horizonte B. O solo foi seco ao ar, destorroado e homogeneizado, passado em peneira de 4 mm de abertura de malha, sendo feita correção do pH com a adição de calcário calcítico, de acordo com a análise realizada previamente.

Para o primeiro experimento, o solo foi contaminado com os elementos-traço separadamente (As, Cd, Se, Cu, Pb ou Zn), em diferentes concentrações, conforme descrito na Tabela 2.

Os elementos foram acrescentados ao solo na forma de sal e as concentrações dos elementos-traços foram definidas em função dos resultados do crescimento em placa, com as diferentes concentrações de cada elemento.

Para cada elemento-traço, os sais foram adicionados, primeiro, a 1 kg de solo e misturados até garantir uma distribuição uniforme. Depois, a amostra

assim obtida foi misturada ao restante do solo. De cada tratamento foram separadas amostras de 10 g, para análise química.

O experimento consistiu, portanto, de 20 tratamentos (5 tipos de elementos-traço x 4 concentrações), com 6 repetições, totalizando 120 parcelas. A avaliação estatística no cultivo de cogumelos foi realizada por meio de delineamento em blocos casualizado (DBC). Com auxílio do software SISVAR-UFLA, os dados foram submetidos à análise de regressão, a 5% de probabilidade.

Quando a camada de cobertura encontrava-se completamente colonizada, a temperatura foi reduzida para 18 °C e a umidade mantida entre 80% e 90%, para permitir a indução da frutificação. A camada de cobertura de cobertura foi mantida sempre úmida, com regas periódicas duas ou três vezes por semana, de acordo com a necessidade. Para garantir uma uniformidade, cada rega consistiu de 200 mL de água por sacola.

Os cogumelos foram colhidos de acordo com o padrão comercial, com o pílco ainda fechado, sendo as colheitas realizadas pela manhã e à tarde. Após a determinação do peso fresco, os cogumelos foram desidratados, a 65 °C, por 24 horas e armazenados para as análises posteriores.

No segundo experimento foi utilizado o mesmo o solo, porém, acrescido de diferentes proporções de solo contaminado com elementos traço. O solo contaminado com As, Cd, Cu, Pb e Zn foi obtido em área de mineração, coletado no município de Três Marias, MG e acrescentado ao solo normal em diferentes proporções, de forma a apresentar as seguintes diluições: 0, 7, 10, 30 e 50 vezes. Os procedimentos para a cobertura do composto foram os mesmos descritos anteriormente. Como testemunha, foi utilizado o mesmo solo descrito no experimento anterior. O experimento consistiu, portanto, de 4 tratamentos com 6 repetições, totalizando 30 parcelas. A avaliação estatística foi realizada por meio de delineamento em blocos casualizado (DBC). Com auxílio do

software SISVAR-UFLA, os dados foram submetidos à análise de regressão, a 5% de probabilidade. As condições de cultivo, colheita e desidratação foram as mesmas descritas anteriormente.

Tabela 2 Concentrações dos elementos-traço do solo contaminado separadamente (mg/kg)

<b>Elementos</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0, 150, 300, 600
Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0, 150, 300, 600
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0, 150, 300, 500
PbSO <sub>4</sub>	0, 200, 400 e 600
CdSO <sub>4</sub> . 8H <sub>2</sub> O	0, 25, 50 e 100

Tabela 3 Amostra do solo contaminado pela adição de rejeitos de mineração, coletado no município de Três Marias, MG (mg/kg)

<b>Elementos</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>	<b>Diluição</b>	<b>Diluição</b>	<b>Diluição</b>	<b>Diluição</b>
		<b>7x</b>	<b>10x</b>	<b>30x</b>	<b>50x</b>
As	100	14,28	10	3,33	2
Cd	50	7,14	5	1,66	1
Cu	935	133,57	93,50	31,16	18,70
Pb	339	48,42	33,90	11,30	6,78
Zn	5746	820,85	574,60	191,53	114,92

### 3.4 Cultivo dos cogumelos *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* em substratos contaminados com elementos-traço

#### 3.4.1 Preparo dos inoculantes

As culturas de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, bem como os inoculantes, foram preparadas conforme descrito por Dias et al. (2003).

### 3.4.2 Preparo do substrato e cultivo

Foi utilizado como substrato palha de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (bean) contendo diferentes proporções do solo contaminado, o qual foi diluído anteriormente dez vezes com solo normal não contaminado. A palha de feijão foi previamente umedecida de forma a apresentar 70% de umidade e depois, ainda úmida, foi misturada com o solo contaminado diluído nas proporções de 10%, 20%, 30% e 40% da massa total de substrato úmido. Em seguida, o substrato foi acondicionado em sacos de polipropileno com janela para troca gasosa (2 kg/saco), com 10 repetições em cada tratamento, totalizando 50 parcelas.

De cada tratamento foram obtidas amostras em triplicata, para a determinação do pH e da umidade final. Os sacos foram autoclavados, a 121 °C, por 2 horas e, após resfriar até a temperatura ambiente, foram inoculados com 2% do inoculante, colocado na parte superior do substrato. Os sacos foram incubados à temperatura ambiente até a completa colonização do substrato. Durante esse tempo, o crescimento micelial foi medido em mm/dia, com o objetivo de avaliar a velocidade de colonização do substrato.

Após a completa colonização do substrato, a temperatura do ambiente foi reduzida para 16 °C, por 4 dias, para a indução da frutificação e, então, retornada para 24 °C, para permitir o desenvolvimento dos cogumelos, sendo assim mantida até o final do experimento. A umidade relativa do ar foi mantida acima de 90%. Os cogumelos foram colhidos assim que atingiram o ponto máximo de colheita e, depois, pesados, desidratados, a 65 °C, por 24 horas e armazenados para análises posteriores.

A produtividade (P) foi determinada, em porcentagem, por meio da seguinte equação:  $P = [\text{massa de basidiocarpos frescos}/\text{massa fresca de composto}] \times 100$ , e a eficiência biológica (EB) foi determinada, também em

porcentagem, por meio da equação ( $EB = [\text{massa de basidiocarpos frescos}/\text{massa seca de composto}] \times 100$ ).

A avaliação estatística no cultivo de *Pleurotus* foi realizada por meio do delineamento inteiramente casualizado (DIC). Com auxílio do software SISVAR-UFLA, os dados foram submetidos à análise de regressão, a 5% de probabilidade.

### **3.5 Análises químicas para determinação dos elementos-traço**

A determinação dos elementos-traço no solo foi analisada no Departamento da Ciência do Solo da UFLA, pelo método EPA 3051A (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 1986), que prevê a digestão de 1,0 a 0,5 g de material, em 10 mL de  $\text{HNO}_3$ , concentrado em forno de micro-ondas com tubos de Teflon® PTFE, à pressão de 0,76 MPa, por 10 minutos. Já para a mensuração dos elementos-traço nos cogumelos, as amostras foram enviadas para o laboratório Akvos (comercial), onde os elementos foram determinados pelos métodos SMEWW-3120B, para arsênio e SMEWW-3111, para cádmio, cobre chumbo e zinco (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 2005).

O coeficiente de acumulação ( $C_a$ ) dos elementos-traço foi calculado utilizando-se a relação ( $C_a = \text{concentração no cogumelo}/\text{concentração no solo}$ ) (STIHI et al., 2011).

### **3.6 Microanálise de raios X (EDS)**

Cinco basidiocarpos de cada tratamento foram coletados e desidratados, e, destes, quatro porções do micélio, lamelas e estipes foram retiradas de pontos equidistantes entre si e a, aproximadamente, 5 mm distante da borda da lamela.



Para estipe foram retiradas quatro porções de pontos equidistantes entre si a 5 mm distante da base do corpo de frutificação. As lamelas e os estipes coletados foram cortados à mão livre, com bisturi, em pedaços de, no máximo, 2 cm<sup>2</sup>. Os cogumelos desidratados não precisaram passar pelo processo de fixação, indo diretamente para o processo de banho de carbono, para que fossem preparados para microanálise de raios X.

As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com o carbono, no evaporador de carbono (Bal-Tec), para observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40. Um sistema de microanálises de raios X (EDS) (Bruker) acoplado ao MEV foi utilizado para localizar e quantificar os elementos encontrados nas amostras.

Para todos os campos avaliados foi utilizada a distância de trabalho (WD) de 10,5 mm e aumento de 500X. Por meio da seleção de uma área ao acaso foi estabelecido um valor fixo no eixo Y, percorrendo somente o eixo X (ou vice-versa), de forma que não houvesse sobreposição de imagens entre dois campos adjacentes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da tolerância aos elementos-traço em meio de cultura

A partir dos resultados, observaram-se diferentes taxas de crescimento de *P. pulmonarius* na presença dos elementos-traço, com completa inibição a partir das concentrações de 500 mg.kg<sup>-1</sup>, na presença de As, Cu e Zn; 100 mg.kg<sup>-1</sup>, na presença de Cd e 800 mg.kg<sup>-1</sup>, na presença de Pb. Portanto, a menor concentração para inibição total ocorreu com Cd, enquanto a maior concentração ocorreu com Pb. Por isso, não é possível associar as diferenças de concentração inibitória ao uso desses elementos em algum processo metabólico. Entretanto, é possível afirmar que o Cd apresenta um efeito tóxico claramente superior ao Pb (Gráfico 1). Sendo assim, os resultados ressaltam o efeito tóxico do Cd, comparado a outros elementos-traço em meio de cultura (Gráfico 1).

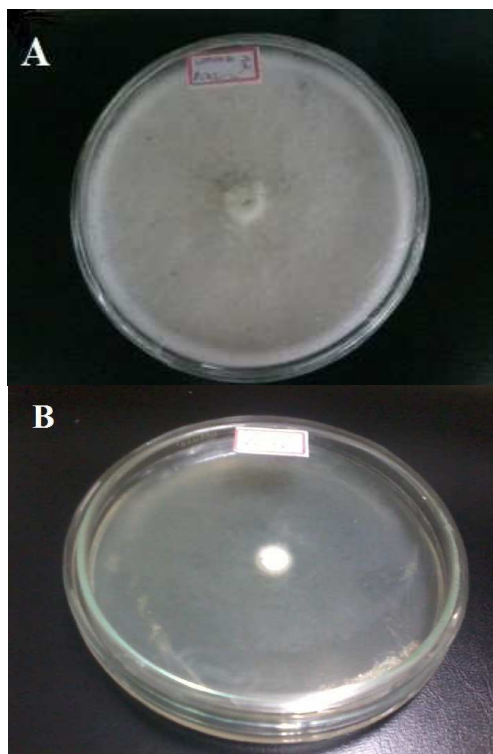


Figura 1 A) Fotografia ilustrando o crescimento de *Pleurotus pulmonarius* sem adição de elementos-traço. (B) Fotografia ilustrando a inibição do crescimento de *Pleurotus pulmonarius* após adição de Cd  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

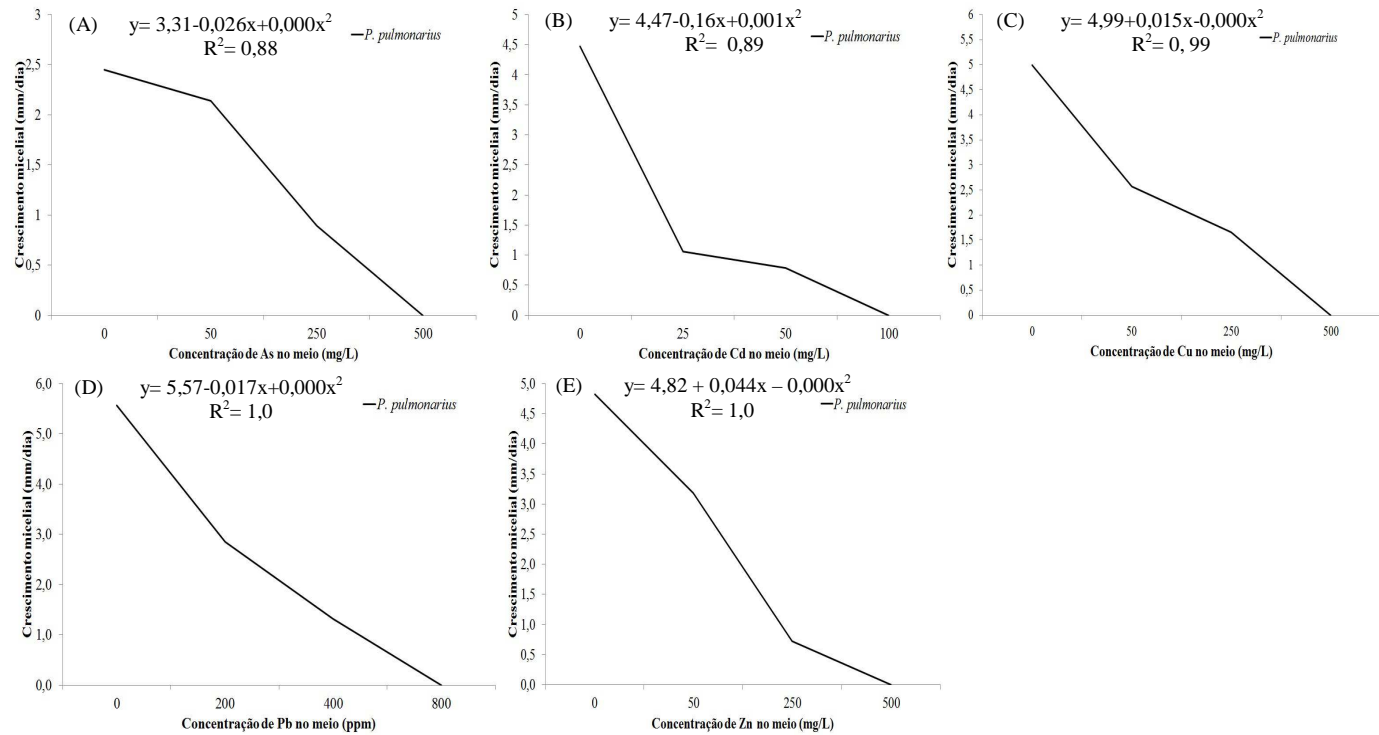


Gráfico 1 Avaliação da tolerância aos elementos-traço por *Pleurotus pulmonarius* em meio de cultura sólido, contendo diferentes concentrações de As (A), Cd (B), Cu (C), Pb (D) e Zn (E)

#### **4.2 Produtividade dos cogumelos *A. bisporus* em função dos elementos-traço no solo de cobertura**

Os resultados de produtividade e eficiência biológica do *A. bisporus* em função do tipo e da concentração dos elementos-traço estão descritos no Gráfico 2. As menores produtividades foram observadas na presença de As e Cd, e no solo diluído. Para As e solo diluído, a queda de produtividade em relação ao controle ocorreu de forma independente da concentração aplicada, confirmando os resultados de bioacumulação obtidos. Mas, para o cádmio, observou-se que o efeito negativo ocorreu em função da concentração, tendo, na concentração de 25 mg.kg<sup>-1</sup>, a produtividade sido igual à do controle (Gráfico 2).

Para os elementos Cu e Zn, houve uma pequena redução na produtividade. Por outro lado, para Pb, não se observou efeito negativo sobre a produtividade do cogumelo, independente da concentração testada (Gráfico 2).

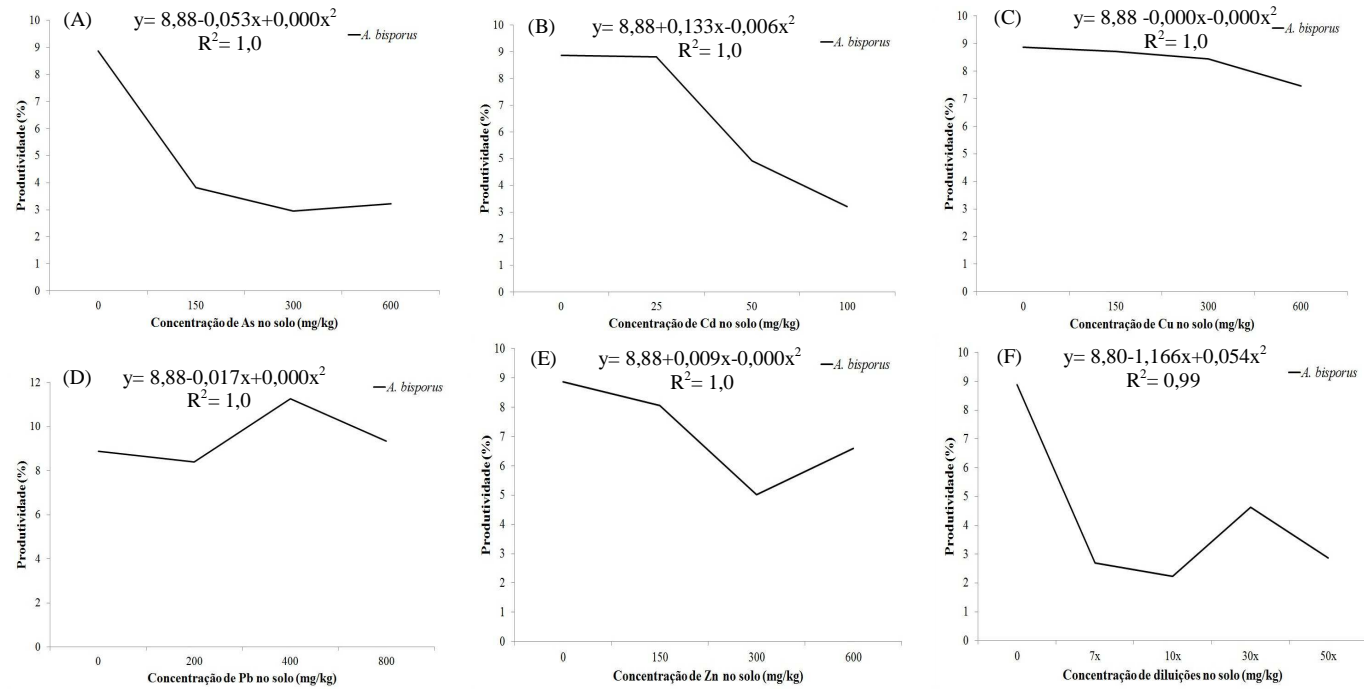


Gráfico 2 Análise de regressão da produtividade de *Agaricus bisporus* (g), em diferentes concentrações de elementos-traço (A) As, (B) Cd, (C) Cu, (D) Pb, (E) Zn e (F) solo diluído (mg/kg)

### 4.3 Análise de elementos-traço em *A. bisporus* por espectrometria de absorção atômica

Os resultados da análise de elementos-traço em basidiocarpos de *A. bisporus* estão demonstrados na Tabela 4, sendo possível constatar que houve maior bioacumulação de Cu e Zn, com 201,8 mg.kg<sup>-1</sup> e 213,8 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Chumbo, arsênio e cádmio foram os elementos menos bioacumulados pelo fungo, com 70,67; 34,54 e 26,61 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Quando o cogumelo foi cultivado utilizando-se o solo contaminado diluído 7X, mas contendo todos os elementos, observou-se um padrão diferente de bioacumulação dos elementos-traço (Tabela 4). As, Cd, Cu e Zn apresentaram bioacumulação bastante inferior, quando comparados aos tratamentos nos quais os mesmos elementos foram adicionados ao solo separadamente. Em contrapartida, o chumbo apresentou a maior bioacumulação no cogumelo, apesar de estar presente em concentração inferior. Esses resultados confirmam que o cogumelo *A. bisporus* tem grande potencial de bioacumulação desse elemento.

Tabela 4 Concentrações de elementos-traço em *Agaricus bisporus*, em função da aplicação de elementos-traço (mg.kg<sup>-1</sup>)

Amostra de <i>Agaricus bisporus</i> com os elementos individuais			Amostra de <i>Agaricus bisporus</i> com todos os elementos diluídos (7x)		
Tratamento (solo/ mg.kg <sup>-1</sup> )	Resultado (mg.kg <sup>-1</sup> )	Coefficiente de acumulação	Tratamento (solo/ mg.kg <sup>-1</sup> )	Resultado (mg.kg <sup>-1</sup> )	Coefficiente de acumulação
As (600)	34,54	0,05	As 14,28	1,11	0,07
Cd (100)	26,61	0,26	Cd 7,14	1,10	0,15
Cu (600)	201,82	0,33	Cu 133,57	14,29	0,10
Pb (800)	70,67	0,08	Pb 48,42	219,92	4,54
Zn (600)	213,79	0,35	Zn 820,85	136,35	0,16

#### **4.4 Crescimento micelial, produtividade e eficiência biológica de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, em função dos elementos-traço no substrato**

Ao contrário do que era esperado, observou-se efeito positivo do solo contaminado no substrato de cultivo de *Pleurotus* (Gráfico 3). No crescimento micelial de *P. ostreatus*, observou-se efeito positivo a partir do tratamento com 20%, entretanto, a velocidade de crescimento manteve-se estável até o tratamento com 40%. Para *P. pulmonarius*, observou-se efeito crescente a partir do tratamento com 10% de solo contaminado, o qual já apresentou maior velocidade de colonização do substrato em relação ao controle, mas a velocidade de colonização continuou crescendo até o tratamento com a maior proporção de solo contaminado (40%). Esses resultados indicam que maiores proporções de solo contaminado poderiam ser utilizadas, uma vez que quanto mais se adicionava o solo contaminado ao substrato, maior era o crescimento de ambas as linhagens, comparando-as com o controle que continha apenas a palha de feijão (Gráfico 3).

De acordo com os resultados de produtividade, também foi observado o efeito positivo na presença de solo contaminado no substrato, com exceção do tratamento com 10% para *P. pulmonarius*. Resultados semelhantes foram observados na eficiência biológica. Provavelmente, a menor produtividade para *P. pulmonarius* no tratamento com 10% foi em função de um maior teor de umidade naquele tratamento. É importante observar também que, para o *P. pulmonarius*, observou-se maior eficiência biológica no tratamento com 40% de solo contaminado, em relação ao controle.



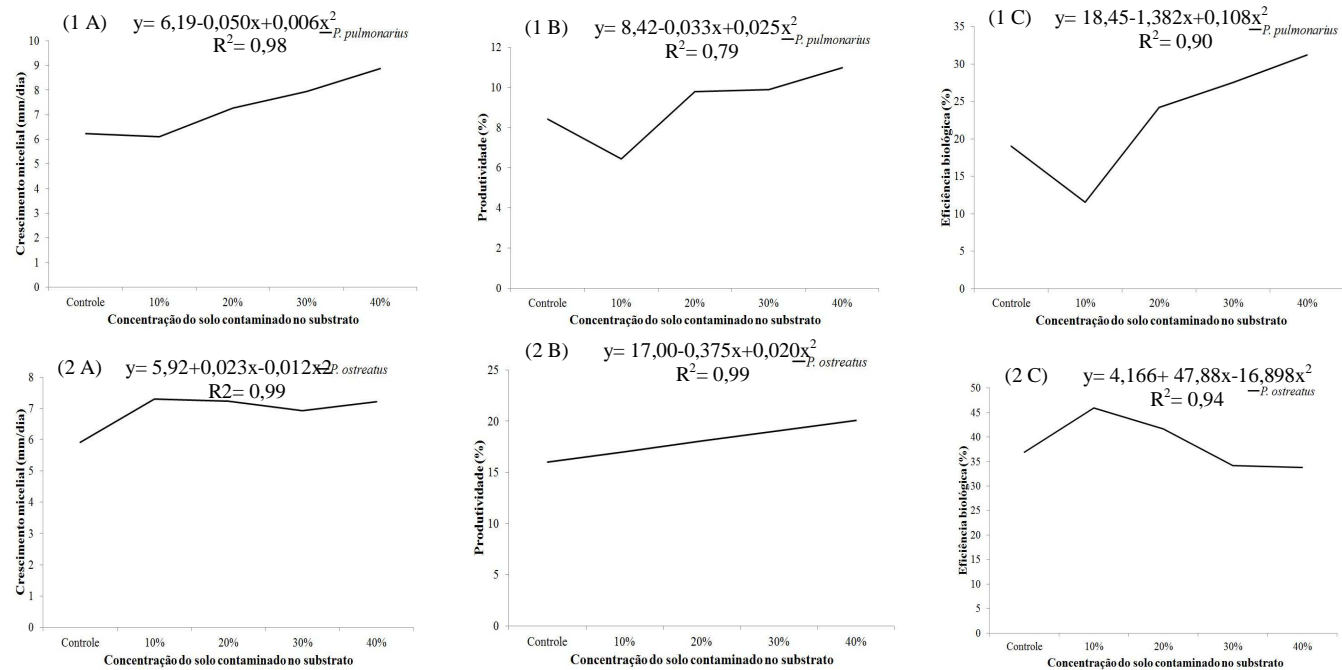


Gráfico 3 (1A) Crescimento micelial de *Pleurotus pulmonarius*, (1B) produtividade de *Pleurotus pulmonarius* e (1C) eficiência biológica de *Pleurotus pulmonarius*, em função dos elementos-traço no substrato. (2A) Crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* (2B) produtividade de *Pleurotus ostreatus* e (2C) eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus*, em função dos elementos-traço no substrato

## **4.5 Microscopia eletrônica de varredura**

### **4.5.1 Microanálise de raios X (EDS) dos microelementos dos solos e dos cogumelos *A. bisporus*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius***

Não foi possível detectar os elementos As, Cd, Cu, Pb e Zn relatados anteriormente (Tabela 5), entretanto, foram observados os elementos alumínio (Al) e ferro (Fe), em grandes proporções (Figura 3).

Foram encontrados diversos microelementos em *A. bisporus*, com a alta concentração dos elementos Al e Fe em todos os tratamentos. Em *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* também foram encontrados diversos microelementos e pode-se observar a presença do Fe em todos os tratamentos e o Al somente nos tratamentos com o solo contaminado (Tabela 6 e 7).

Foi possível verificar que, tanto em *A. bisporus* quanto em *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, na maioria das vezes, os elementos acumularam-se mais no píleo do que no estipe (Tabela 6, 7). Podem-se observar as imagens representativas das microanálises de raios X na Figura 2, Gráfico 4 e Figura 3.

Tabela 5 Microelementos encontrados nos solos contaminados utilizados nos experimentos, com base nos resultados obtidos na microanálise de raios X, em microscópio eletrônico de varredura

Tratamento	Al	S	Cl	K	Fe	Ca	Si	Ti
Solo não contaminado	23,61	0	0	0	22,53	3,55	8,75	1,31
Solo contaminado (As 600)	12,35	0	0	0	5,33	14,21	3,61	0
Solo contaminado (Cd 600)	18,82	1,52	0	0,46	8,49	3,41	6,77	0,49
Solo contaminado (Cu 600)	19,76	0	0,37	1,07	13,56	4,66	6,81	0,77
Solo contaminado (Pb 600)	15,24	0	0	0	13,37	14,38	6,40	0
Solo contaminado (Zn 600)	20,77	0	0,66	2,47	19,26	9,88	7,67	0,98
Solo contaminado (7x)	17,55	0	0	0,87	0	14,05	7,98	0

Tabela 6 Microelementos encontrados no cogumelo *A. bisporus* cultivados em solos contaminados, com base nos resultados obtidos na microanálise de raios X, em microscópio eletrônico de varredura.

Tratamento	N	F	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Fe	Ca	Si
Controle - <i>A. bisporus</i> - L*	4,66	6,25	0,44	0,23	3,04	3,36	1,26	1,85	11,44	1,7	0	0
Controle - <i>A. bisporus</i> - E*	0	0	1,69	1,35	0,40	2,83	2,72	0,73	18,46	0	1,54	0
<i>A. bisporus</i> (As 600) - L	0	0	1,43	0	0,18	4,01	2,51	6,42	17,21	0	0,37	0
<i>A. bisporus</i> (As 600) - E	0	2,49	0	1,05	0	2,73	0,80	1,71	2,68	0	12,14	0
<i>A. bisporus</i> (Cd 100) - L	0	1,70	0,82	1,09	0	2,43	2,77	0,53	30,17	0	1,36	0
<i>A. bisporus</i> (Cd 100) - E	8,03	5,21	0,44	0,23	2,90	11,58	1,13	1,92	11,58	0,14	0	1,27
<i>A. bisporus</i> (Cu 600) - L	0	0	0	1,24	0	5,42	1,86	4,34	26,69	0	0	0
<i>A. bisporus</i> (Cu 600) - E	0	0	0	0	0,53	3,42	2,18	3,02	25,08	0	1,31	0
<i>A. bisporus</i> (Pb 800) - L	0	0	0	0	0,15	3,01	3,22	1,94	15,99	0	0,63	0
<i>A. bisporus</i> (Pb 800) - E	0	1,98	0	3,12	0	21,17	1,59	6,91	3,92	0	3,07	0
<i>A. bisporus</i> (Zn 600) - L	0	0	0	0,65	0,02	2,13	1,21	5,67	14,01	0	1,21	0
<i>A. bisporus</i> (Zn 600) - E	0	0	0	0,72	0	9,00	2,07	4,89	24,48	0	1,38	0
<i>A. bisporus</i> (7x) - L	0	0	0	0	4,78	4,11	1,14	3,72	18,25	0,18	2,57	0
<i>A. bisporus</i> (7x) - E	0	0	0	1,69	0,56	1,91	0	0,52	5,71	2,58	51,24	0

\*L = Lamela; E = Estipe

Tabela 7 Microelementos encontrados nos cogumelos *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, com base nos resultados obtidos na microanálise de raios X, em microscópio eletrônico de varredura

Tratamento	F	Mg	Al	P	S	Cl	K	Fe	Ca	Si
Controle <i>P. ostreatus</i> – L*	0	0	0	0	0	0,66	2,47	0	9,88	7,67
Controle <i>P. ostreatus</i> – E*	0	1,43	0	2,3	0,89	0	11,42	0	0	0
Controle <i>P. pulmonarius</i> - L	0	0	0	0,77	0,39	0	9,19	0	0	0,50
Controle <i>P. pulmonarius</i> - E	0	1,21	0	1,46	0,53	0,45	12,47	0	0	0,10
<i>P. ostreatus</i> (40%)- L	0	0	1,02	8,49	1,88	0,96	3,21	13,74	1,39	0
<i>P. ostreatus</i> (40%)- E	5	1,03	0,06	0,71	0,34	0,38	9,09	0	0	0
<i>P. pulmonarius</i> (40%)- L	0	0	4,25	1,34	1,34	3,25	13,7	40	0	0
<i>P. pulmonarius</i> (40%)- E	5,89	1,2	0	1,91	0,67	0	13,05	0	0	0

\*L = Lamela; E = Estipe

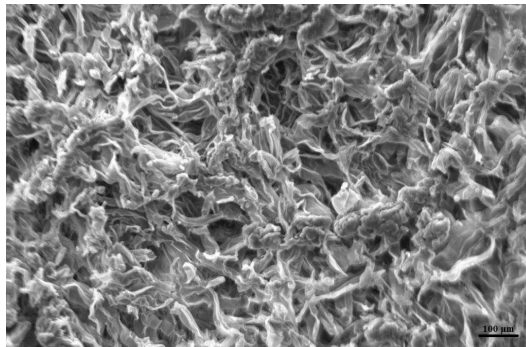


Figura 2 Eletromicrografia de varredura representativa da seleção de uma área do micélio de *Agaricus bisporus* proveniente do solo contaminado diluído 7x

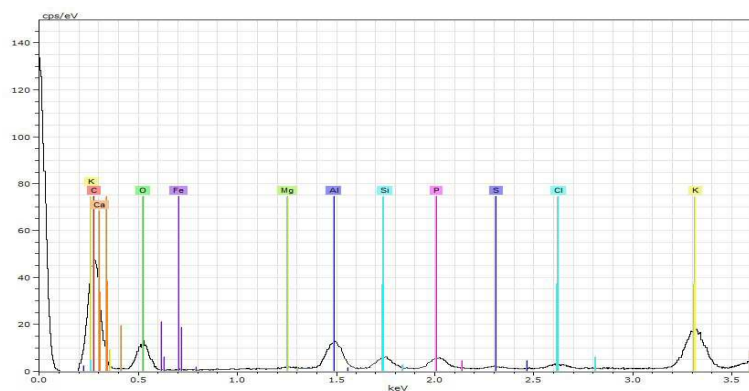


Gráfico 4 Imagem representativa de um gráfico resultante da seleção de uma área do píleo de *Agaricus bisporus* proveniente do solo não contaminado

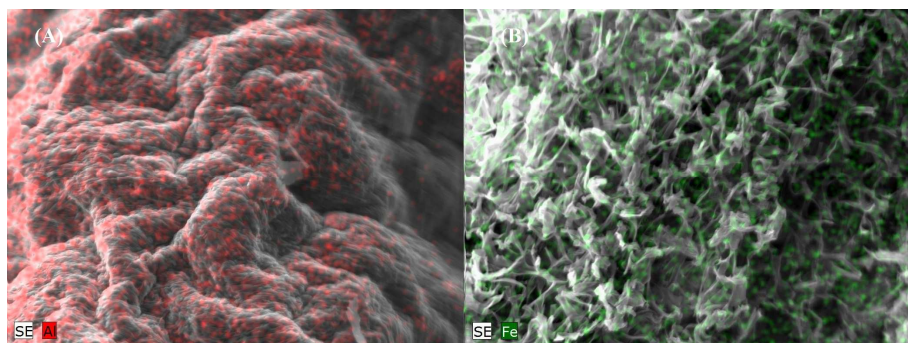


Figura 3 (A) Imagem representativa de um mapa do elemento (Al) de uma área selecionada do estipe de *Pleurotus ostreatus* com 40% de solo contaminado. (B) Imagem representativa de um mapa do elemento (Fe) de uma área selecionada do pôleo de *P. pulmonarius* com 40% do solo contaminado

## 5 DISCUSSÃO

É sabido, que a tolerância dos fungos aos elementos-traço depende da espécie, do tipo e da concentração do elemento-traço, e da sua capacidade de adaptação (AHMAD; ZAFAR; AHAMAD, 2005).

No experimento *in vitro*, como se pode observar, o Cd foi o elemento-traço que teve a maior inibição com a menor concentração (100 mg.kg<sup>-1</sup>). No entanto, essa resistência foi acima da de outros estudos, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o basidiomiceto *Piptoporus betulinus*, nos quais se obteve total inibição com apenas 200 e 250 µMol Cd (22,48 e 28,01 mg.kg<sup>-1</sup>), respectivamente (BALDRIAN; GABRIEL, 2002; PASTERNAKIEWCZ, 2006). Em outros estudos com os fungos *Fusarium* sp. e *Alternaria tenuis*, obteve-se um resultado similar, em que ambos apresentaram significativa inibição do crescimento com 1,0 mMol (112,4 mg.kg<sup>-1</sup>) (GHARIEB, 2001).

Por outro lado, a maior tolerância ocorreu com o Pb, que é considerado um elemento altamente tóxico e sem função biológica conhecida. Resultado similar foi observado em um estudo sobre a tolerância a elementos-traço em estirpes de *Cupriavidus taiwanensis*, isoladas de nódulos de *Mimosa* sp. de ambientes não contaminados, em que Pb foi o metal mais tolerado pelas estirpes dessa espécie, seguido de Zn, Cu e Cd (CHEN et al., 2008).

Em *A. bisporus*, as menores produtividades foram observadas na presença de arsênio, cádmio e no solo diluído. Vários autores relatam a toxicidade dos elementos As e Cd (BALDRIAN; GABRIEL, 2002; PASTERNAKIEWCZ, 2006; GHARIEB, 2001), bem como foram realizados estudos da interação dos elementos-traço, revelando possíveis efeitos tóxicos desses elementos (MUÑOZ et al., 2005; RADHIKA; SUBRAMANIAN; NATARAJAN, 2006; STIHI et al., 2011). Entretanto, para cobre, zinco e chumbo, não se observou efeito negativo, independente da concentração testada.

A tolerância ao chumbo por fungos e bactérias já foi relatada (CHEN et al., 2008; KALAC; BURDA; STASKOVA, 1991; QUINTELAS; TAVARES, 2002). Para os tratamentos com Cu e Zn, os autores relatam que esses elementos são essenciais e só são prejudiciais caso a quantidade exceda o limite aceitável (MACÊDO, 2006; WALSH et al., 1994).

Esses resultados são muito interessantes porque permitiriam a utilização de solos contaminados com maiores concentrações desses elementos. No presente trabalho, a menor taxa de diluição testada foi de 7X e, por isso, será interessante testar diluições menores até o solo contaminado não diluído. A diluição de 7X já era considerada muito baixa, tendo como referência os estudos de tolerância de espécies vegetais a elementos-traço (BECH et al., 2012; MADEJÓN et al., 2009).

A Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda, para alimentos contaminados, o limite máximo de tolerância para As e Cd ( $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), para Cu ( $30,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), para Zn ( $50,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e para Pb ( $0,80 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) (BRASIL, 1965). Como se pode observar no resultado da análise de elementos-traço em basidiocarpos de *A. bisporus*, todos os elementos estavam acima do limite tolerado (tabela 4).

A análise de elementos-traço, individualmente, em basidiocarpos de *A. bisporus* demonstra que a maior acumulação ocorreu em cobre e zinco (Tabela 4). Considerando que esses elementos são também micronutrientes exigidos em baixas concentrações pelos fungos, é possível que essa bioacumulação bastante superior à dos demais ocorra em função da presença de estruturas e mecanismos normalmente utilizados pelo fungo para a sua absorção e utilização no metabolismo. Chumbo, arsênio e cádmio foram os elementos menos bioacumulados pelo fungo. Esse resultado corrobora o de Stihl et al. (2011), que analisaram cogumelos a 500 m de uma mineradora e observaram que, em *Pleurotus ostreatus*, as maiores concentrações foram de Zn ( $41,30 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e Cu



(12,50 mg.kg<sup>-1</sup>), enquanto Cd (0,95 mg.kg<sup>-1</sup>) e Pb (0,64 mg.kg<sup>-1</sup>) obtiveram as menores concentrações. Mendil et al. (2004), analisando os elementos-traço do cogumelo *A. bisporus* coletado próximo a uma rodovia, verificaram também resultado similar, tendo Zn e Cu apresentado a maior acumulação, seguidos de Pb e Cd (Zn 51,8; Cu 11,9; Pb 6,9 e Cd 0,10 mg.kg<sup>-1</sup>). Resultado semelhante foi observado em *Agaricus abruptibulbus*, para Cd, Pb e As, com as concentrações de 9,70; 6,05 e 5,11 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente (PELKONEN; ALFTHAN; JARVINEN, 2006).

O chumbo é um dos elementos que geram maior preocupação quando lançados no ambiente, mas foi necessária uma concentração muito superior à maioria dos demais elementos para provocar a inibição do fungo, bem como a produtividade do cogumelo. Esses resultados demonstram que o chumbo não causa grandes problemas para o metabolismo do *A. bisporus* e, por isso, este cogumelo tem grande potencial de utilização para a bioacumulação desse elemento.

A análise de elementos-traço do solo diluído 7X com todos os elementos em basidiocarpos de *A. bisporus* revela que o chumbo apresentou a maior bioacumulação no cogumelo, apesar de estar presente em concentração inferior (Tabela 4). Em contrapartida, As, Cd, Cu e Zn apresentaram bioacumulação bastante inferior, resultados que confirmam que o cogumelo *A. bisporus* tem grande potencial de bioacumulação de Pb.

Essa alteração no padrão de acumulação dos elementos-traço possivelmente se deve ao efeito de competição pelo sítio de ligação, proporcionando ao elemento Pb uma maior acumulação do que a dos demais elementos. Fato semelhante ocorreu com a bactéria *Arthrobacter viscosus*, em que a maior acumulação ocorreu para chumbo, tendo sido relatada a afinidade desse elemento com a parede bacteriana (QUINTELAS; TAVARES, 2002).

Ao contrário do que era esperado, observou-se efeito positivo da presença do solo contaminado no substrato de cultivo dos cogumelos *Pleurotus* (Gráfico 3). O aumento ocorreu, possivelmente, devido à presença dos elementos-traço, principalmente zinco, que é um elemento conhecido por favorecer o crescimento e o desenvolvimento de fungos (LEVINSKAITE, 2001).

Estudos com *P. pulmonarius* e *P. ostreatus*, utilizando a palha de feijão, resultaram na produtividade entre 17,5% a 20,89%. Este resultado é semelhante ao do presente trabalho com *P. ostreatus*, entretanto, para *P. pulmonarius*, o crescimento foi bem menor do que o esperado. Quanto à eficiência biológica, os autores observaram que ela foi um pouco maior, quando comparada com o presente estudo (59,52%-85,7%) (DIAS et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2012).

Os resultados de produtividade e eficiência biológica foram bastante interessantes porque demonstraram que esses cogumelos podem ser cultivados em substratos com maiores proporções de solo contaminado, uma vez que os elementos-traço presentes não comprometeram a produção. Portanto, caso esses cogumelos apresentem boa capacidade de bioacumulação dos elementos-traço, os mesmos poderão ser importantes modelos para futuros estudos de biorremediação de solos contaminados. Entretanto, esses cogumelos não são indicados para consumo.

Não foi possível detectar os elementos As, Cd, Cu, Pb e Zn, devido, possivelmente, ao fato de esses elementos encontrarem-se em locais específicos no cogumelo, dificultando a detecção pela microanálise de raios X. Entretanto, podem-se observar os elementos alumínio Al e Fe. Esse resultado era esperado para Al e Fe, pois esses elementos encontram-se abundantemente na crosta terrestre e pela distribuição uniforme no cogumelo (Figura 3). Em vários estudos há relatos da alta acumulação de Al e Fe, como, por exemplo, para *A. bisporus* e

*P. ostreatus*, em que a concentração de Fe foi de 1.943 e 3.285  $\mu$ /g (peso seco), respectivamente (MUÑOZ et al., 2005).

Diversos estudos sobre a acumulação de elementos-traço em cogumelos demonstram que, na maioria das vezes, os elementos acumulam-se mais no píleo do que no estipe (KALAC; SVOBODA; HAVLÍCKOVÁ, 2004; MUÑOZ et al., 2005; PELKONEN; ALFTHAN; JARVINEN, 2006). O mesmo resultado foi observado tanto para *A. bisporus* quanto para *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* (Tabelas 6 e7).

Estudos em plantas revelam que, na maioria das vezes, os organismos acumulam os elementos-traços em estruturas específicas, como órgãos e tecidos (FILIPOVIĆ-TRAJKOVIĆ et al., 2012). Entretanto, o mesmo não ocorreu, como se pode observar no mapeamento dos elementos Al e Fe, sendo a distribuição dos elementos na amostra bem uniforme (Figura 3).

É evidente a relevância de estudos da bioacumulação de elementos-traço em cogumelos devido ao alto acúmulo desses elementos. Entretanto, é imprescindível frisar a importância de um cuidado adequado nas áreas de cultivo e com a água utilizada, devido aos possíveis contaminantes presentes no meio ambiente, pois, se por acaso, houver a ingestão de cogumelos contaminados acima do limite de tolerância, esse consumo pode trazer diversos riscos à saúde.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se concluir que:

- a) no crescimento micelial *in vitro*, as concentrações de inibição para As, Cu e Zn foram de 500 mg.kg<sup>-1</sup>, para Cd e Pb as concentrações de inibição foram, respectivamente, de 100 e Pb 800 mg.kg<sup>-1</sup>;
- b) na análise de elementos-traço em basidiocarpos de *A. bisporus*, verificou-se que todos os elementos estavam acima do limite de tolerância recomendado;
- c) o acúmulo dos elementos individuais nos basidiocarpos de *A. bisporus* ocorreu em ordem decrescente, sendo Zn>Cu>Pb>Cd>As. Já para a amostra de basidiocarpo com todos os elementos, a ordem decrescente foi Pb>Zn> Cu>Cd >As;
- d) a produtividade de *A. bisporus* foi maior na presença de cobre, chumbo e zinco, e a menor produtividade foi na presença de arsênio, cádmio e do solo diluído;
- e) pode-se observar que no crescimento micelial, na produtividade e na eficiência de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, houve um aumento no crescimento à medida que se adicionavam os elementos-traço;
- f) não foi possível detectar os elementos As, Cd, Cu, Pb e Zn, devido, possivelmente, ao fato de esses elementos encontrarem-se em locais específicos no cogumelo, dificultando a detecção pela microanálise de raios X;
- g) foi possível detectar os elementos alumínio (Al) e ferro (Fe) em grandes proporções, devido à sua distribuição uniforme no cogumelo;

- h) as linhagens dos cogumelos *A. bisporus*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* revelaram grande capacidade de acumular os elementos-traço testados;
- i) é importante ter um cuidado adequado no cultivo de cogumelos comestíveis, pois a ingestão de cogumelos contaminados acima do limite de tolerância pode trazer diversos riscos à saúde.

## REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Case studies in environmental medicine: lead toxicity**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 2011. 72 p.

\_\_\_\_\_. **Public health assessment guidance manual**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 1992. 30 p.

AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHAMAD, F. Heavy metal biosorption potencial os *Aspergillus* and *Rizopus* sp. isolated from wastewater treated soil. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, Porto, v. 9, n. 1, p. 123-126, 2005.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4<sup>th</sup> ed. New York: J. Wiley, 1996. 869 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21<sup>th</sup> ed. Washington, 2005. 55 p.

ANDERSON, R. K.; THOMPSON, M.; CULBARD, E. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. **Analyst**, Cambridge, v. 111, p. 1143-1152, Oct. 1986.

ANDREI, E. (Ed.). **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 7. ed. São Paulo: Organização Andrei, 2005. 1142 p.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 3, p. 428-430, May/June 2002.

BECH et al. Shoot accumulation of several trace elements in native plant species from contaminated soils in the Peruvian Andes. **Journal of Geochemical Exploration**, Reston, v. 113, n. 1, p. 106-111, Feb. 2012.

BETT, C. F.; PERONDI, M. A. Análise do mercado de cogumelos comestíveis e medicinais: uma prospecção de alternativa de renda para agricultura familiar na região sudoeste do Paraná. **Synergismus Scientifica UTFPR**, Pato Branco, v. 6, n. 1, p. 783-792, 2011.

BRASIL. **Decreto nº 55871**, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Brasília, 1965. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/414d248047458a7d93f3d73fbc4c6735/DÉCRETO+N%C2%BA+55.871,+DE+26+DE+MAR%C3%87O+DE+1965.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

BUMBAC, C. et al. Heavy metals removal using residual fungal biomass. **Journal of Environmental Protection and Ecology**, Cheltenham, v. 11, n. 3, p. 822-829, 2010.

ÇAGLARIRMAK, N. The nutrients of the exotic mushroom (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 3, p. 1188-1194, Mar. 2007.

CAMARGO, O. A.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M. E. (Ed.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPQ; FAPESP; POTAFOS, 2001. cap. 5, p. 1-32.

CASALINO, A. et al. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Antonio, v. 346, n. 2, p. 171-179, Oct. 1997.

ÇERIBASI, I. H.; YETIS, U. Biosorption of Ni(II) and Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system, Kinetics. **Water S.A.**, New York, v. 27, n. 1, p. 15-20, Jan. 2001.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environment impact.** Boca Raton: CRC, 2004. 415 p.

CHEN, W. M. et al. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 364-371, June 2008.

DEMESMAY, C.; OLLE, M.; PORTHAULT, M. Arsenic speciation by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, Illinois, v. 348, n. 3, p. 205-210, 1994.

DEMIRBAS, A. Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. **Food Chemistry**, London, v. 74, n. 3, p. 293-301, Aug. 2001.

DIAS, E. S. et al. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, nov./dez. 2003.

\_\_\_\_\_. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, jul./ago. 2010.

FILIPOVIĆ-TRAJKOVIĆ, R. et al. The potential of different plant species for heavy metals accumulation and distribution. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, n. 1, p. 959-964, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Total diet study statistics on element results.** Washington, 2000. 30 p.

FOSMIRE, G. J. Zinc toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 51, n. 2, p. 225-227, Feb. 1990.



GADD, G. M. Biosorption. **Chemistry & Industry**, Michigan, v. 2, n. 13, p. 421-426, July 1990.

\_\_\_\_\_. Interaction of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, Cambridge, v. 124, n. 1, p. 25-60, May 1993.

GARCÍA, M.; ALONSO, J.; MELGAR, M. *Agaricus macrosporus* as a potential bioremediation agent for substrates contaminated with heavy metals. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Weinheim, v. 80, n. 3, p. 325-330, Mar. 2005.

GERHARDSSON, A. et al. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 16, n. 4, p. 261-266, 2002.

GFELLER, R. W.; MESSONNIER, S. P. **Manual de toxicologia e envenenamentos em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2006. 376 p.

GHARIEB, M. M. Pattern of cadmium accumulation and essential cations during growth of cadmium-tolerant fungi. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 143-151, June 2001.

GU, Y. H.; SIVAM, G. Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. **Journal of Medicinal Food**, San Diego, v. 9, n. 2, p. 196-204, July 2006.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos, sedimentos e nas águas. In: \_\_\_\_\_. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 345-390.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington: National Academy, 2001. p. 224-257.

JACOB, L. C. B.; ALVARENGA, K. F.; MORATA, T. C. Os efeitos da exposição ocupacional ao chumbo sobre o sistema auditivo: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 68, n. 4, p. 564-569, 2002.

JARUP, L.; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 238, n. 3, p. 201-208, Aug. 2009.

KALAC, P.; BURDA, J.; STASKOVA, L. Concentrations of lead, cadmium, mercury and copper in mushrooms in the vicinity of a lead smelter. **Science of the Total Environment**, Madison, v. 105, p. 109-119, June 1991.

KALAC, P.; SVOBODA, L. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 1, p. 273-281, June 2000.

KALAC, P.; SVOBODA, L.; HAVLÍCKOVÁ, B. Contents of cadmium and mercury in edible mushrooms. **Journal of Applied Biomedicine**, Ceske Budejovice, v. 2, n. 3, p. 15-20, May 2004.

KING, L. D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. T.; FONTES, M. P. F. (Ed.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e do desenvolvimento sustentável**. Viçosa, MG: UFV, 1996. p. 823-836.

LEVINSKAITE, M. P. **The mechanism of action of copper-chrome-arsenate preservatives against wood destroying fungi: record 1969**. London: British Wood Preserving Association, 2001. 113 p.

MACÊDO, J. A. B. **Introdução à química ambiental**. 2. ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2006. 1028 p.

MADEJÓN, P. et al. Traditional agricultural practices enable sustainable remediation of highly polluted soils in Southern Spain for cultivation of food crops. **Journal of Environmental Management**, Berkeley, v. 92, n. 7, p. 1828-1836, 2011.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, Seattle, v. 58, n. 1, p. 201-235, Aug. 2002.

MATTILA, P. et al. Content of vitamins, mineral elements and certain phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Davis, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, May 2001.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2008. 647 p.

MENDIL, D. et al. Determination of trace elements on some wild edible mushroom samples from Kastamonu, Turkey. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 2, p. 281-285, Nov. 2004.

MUÑOZ, A. H. et al. Subcellular distribution of aluminum, bismuth, cadmium, chromium, copper, iron, manganese, nickel, and lead in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*). **Biological Trace Elements Research**, New York, v. 106, n. 3, p. 265-277, Sept. 2005.

NAJA, G. M.; MURPHY, V.; VOLESKY, B. Biosorption, metals. In: \_\_\_\_\_. **Encyclopedia of industrial biotechnology**: bioprocess, bioseparation, and cell technology. New York: Wiley, 2010. p. 1-29.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. 144 p.

PARAMESWARI, E.; LAKSHMANAN, A.; THILAGAVATHI, T. Biosorption and metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from metal polluted ecosystem. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, Vigo, v. 9, n. 4, p. 664-671, 2010.

PASTERNAKIEWICZ, A. The growth of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in cadmium enriched media. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, Poznań, v. 5, n. 2, p. 39-46, 2006.

PELKONEN, R.; ALFTHAN, G.; JARVINEN, O. Cadmium, lead, arsenic and nickel in wild edible mushrooms. **The Finnish Environment**, Helsinki, v. 17, n. 1, p. 1-60, Feb. 2006.

QUINTELAS, C.; TAVARES, T. Lead (II) and iron (II) removal from aqueous solution: biosorption by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. **Journal of Resource and Environmental Biotechnology**, London, v. 3, n. 1, p. 196-202, June 2002.

RABINOVICH, M. et al. Copper- and zinc-enriched mycelium of *Agaricus blazei* Murrill: bioaccumulation and bioavailability. **Journal of Medicinal Food**, San Diego, v. 10, n. 1, p. 175-183, Mar. 2007.

RADHIKA, V.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. **Water Research**, New York, v. 40, n. 19, p. 3628-3636, Nov. 2006.

RADULESCU, C. et al. Evaluation of essential elements and heavy metal levels in fruiting bodies of wild mushrooms and their substrate by EDXRF spectrometry and FAA spectrometry. **Romanian Biotechnological Letters**, Buchares, v. 15, n. 4, p. 5444-5456, 2010.

REIS, A. et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry Toxicology**, Albuquerque, v. 50, n. 2, p. 191-197, Feb. 2012.

RÚHL, M.; FISCHER, C. H.; KÜES, U. Lignolytic enzyme activities alternate with mushrooms production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheat-straw based substrate. **Current Trends of Biotechnology and Pharmatology**, Massachusetts, v. 8, n. 4, p. 478-492, Oct. 2008.

SAARI, J. T. Copper deficiency and cardiovascular disease: role of peroxidation, glycation, and nitration. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Winnipeg, v. 78, n. 10, p. 848-855, Oct. 2000.

SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 290-293, maio/jun. 1996.

SIQUEIRA, F. G. et al. Cultivation of *Pleurotus* mushrooms in substrates obtained by short composting and steam pasteurization. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 53, p. 11630-11635, July 2012.

SROGI, K. Developments in the determination of trace-elements by Atomic Spectroscopic Techniques. **Analytical Letters**, Stillwater, v. 41, n. 5, p. 677-724, Apr. 2008.

STIHI, C. et al. Studies on accumulation of heavy metals from substrate to edible wild mushrooms. **Romanian Journal of Physics**, Bucharest, v. 56, n. 1/2, p. 257-264, 2011.

SVOBODA, L.; HAVLIČKOVÁ, B.; KALAČ, P. Contents of cadmium, mercury and lead in edible mushrooms growing in a historical silver-mining area. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 4, p. 580-585, June 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test method for evaluating solid wastes**. Washington, 1986. 255 p. (Report SW-846).

URBEN, A. F.; SIQUEIRA, P. **Cogumelos e suas delícias**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 162 p.

VARMA, A. Handbook of atomic absorption analysis. In: \_\_\_\_\_. **Group IIB elements: Zn, Cd, Hg**. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Ranton: CRC, 1988. v. 2, p. 73-184.

VETTER, J. Arsenic content of some edible mushroom species. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, n. 1, p. 71-74, Apr. 2004.

\_\_\_\_\_. Toxic elements in certain higher fungi. **Food Chemistry**, London, v. 48, n. 2, p. 207-208, June 1993.

WALSH, C. T. et al. Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. **Environmental Health Perspectives**, New York, v. 2, n. 2, p. 5-46, June 1994.

WANG, C.; HOU, Y. Determination of trace elements in three mushroom samples of basidiomycetes from Shandong, China. **Biological Trace Element Research**, Shanghai, v. 142, n. 3, p. 843-847, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Trace elements in human nutrition and health. In: \_\_\_\_\_. **International atomic energy agency expert group**. Geneva: Food and Agriculture Organization, 1996. p. 361.

ZHOU, J. L. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, n. 5, p. 686-693, 1999.

ZHU, F. et al. Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 179, n. 1, p. 191-199, Aug. 2011.