

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

**BIOTECNOLOGIA**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO BISFENOL A: AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE SELEÇÃO**

**EMA CAROLINA ALMEIDA BARCELLOS**

Foz do Iguaçu 2019

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

**BIOTECNOLOGIA**

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGO COM POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE BISFENOL A: AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE SELEÇÃO**

**EMA CAROLINA ALMEIDA BARCELLOS**

Trabalho de Conclusão de Curso II 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 Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Rafaella C. Bonugli Santos

Foz do Iguaçu 2019

EMA CAROLINA ALMEIDA BARCELLOS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGO COM POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO BISFENOL A: AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE SELEÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso II 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 Biotecnologia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rafaella C. Bonugli Santos

UNILA

Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

UNILA

Prof. Dr. Juliana Kafka Bilha

UNILA

Foz do Iguaçu, 14 de Dezembro de 2019

Dedico este trabalho a minha família, que

sempre me incentivou a realizá-lo.

.

**AGRADECIMENTO**

Em primeiro lugar agradeço a minha orientadora, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela paciência e pela disposição, e por contribuir não somente para meu crescimento profissional como também o pessoal;

Aos professores da banca pelas orientações e por dedicarem o seu tempo para me guiar ao caminho do conhecimento;

Aos colegas de faculdade Laryanne Rodrigues, Patrícia Oliveira, Nathalia Delgado, Anabel Rodrigues, Mariana Mendoza e João Pedro Schmitz por estarem sempre comigo me apoiando durante essa caminhada;

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte dessa etapa decisiva da minha vida.

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

**Rick Sanchez**

BARCELLOS, Ema. **Bioprospecção de fungo com potencial de biodegradação do Bisfenol A: avaliação da metodologia de seleção**. 49 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

**RESUMO**

Uma grande quantidade de resíduos químicos industriais é gerada ao longo dos anos, sendo o bisfenol A (BFA) um dos resíduos de maior volume de produção atualmente em uso e faz parte da composição de diversos utensílios tais como: potes plásticos, garafas de água, revestimentos de proteção de embalagens, recipientes para alimentos e selantes em odontologia. Este composto pode gerar subprodutos tóxicos ao meio ambiente e a saúde humana, resultando na desregulação hormonal e efeitos mutagênicos. O presente projeto teve como objetivo avaliar metodologias viáveis para biodegradação do BFA a partir de linhagens isoladas do Parque Nacional do Iguaçu (PNI), um ambiente com características diferenciadas da composição do solo, de grande diversidade de espécies fúngicas e praticamente inexplorado. Inicialmente estudou-se qual o melhor método de diluição do BFA, uma partícula insolúvel em água. A menor concentração de solvente que permitiu a completa dissolução, mantendo suas características foi o etanol 10 %. Foi realizado o ensaio de toxicidade em *Allium cepa* visando avaliar a toxicidade do BFA para utilização como um bioindicador da biodegradação, entretanto, o método foi nocivo devido à presença do etanol 10 % na solução controle, o que descartou o efeito do solvente na toxicidade. A metodologia espectrometria UV-Vis foi otimizada identificando possíveis regiões de absorção entre 270 e 275 nm. Em adição, o crescimento fúngico (em peso seco) foi avaliado como método de seleção. Foram avaliados dois fungos: MD e EL na presença de 100 mg/L de BFA, sendo o MD o fungo selecionado para o ensaio de validação por apresentar o maior crescimento e a possível eliminação do BFA por via degradativa ou por adsorção. O fungo MD cultivado com apenas o BFA como fonte de carbono não obteve crescimento, necessitando de um meio que seja capaz de induzi-lo ao crescimento. Dessa forma, esse trabalho demonstrou boas perspectivas para a degradação desse resíduo em locais contaminados através dos fungos isolados do PNI, necessitando de novos ensaios para validar a metodologia de espectrometria, como uma análise cromatográfica.

**Palavras-chave:** bisfenol A, descontaminação, decomposição, plástico, PNI.

BARCELLOS, Ema. **Bioprospecting of fungus to Bisphenol A biodegradation: methodology of selection**.2019. 49 pg. Undergraduate thesis (Biotechnology Graduation) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2019.

**ABSTRACT**

A large amount of industrial chemical waste has generated over the years, and bisphenol A (BFA) is one of the largest production waste currently in use and is part of the composition of various utensils such as: plastic pots, water bottles, packaging protective coatings, food containers and sealants in dentistry. This compound can generate toxic by-products to the environment and human health, resulting in hormonal dysregulation and mutagenic effects. The objective of this project was to evaluate viable methodologies for BFA biodegradation from strains isolated from the Iguaçu National Park (INP), an environment with different soil composition characteristics, of the great diversity of fungal species and practically unexplored. Initially, the best method for diluting BFA, a water-insoluble particle, was studied. The lowest solvent concentration that allowed the complete dissolution while retaining its characteristics was 10% Ethanol. *Allium cepa* toxicity testing was performed to evaluate the toxicity of BFA for use as a degradation bioindicator, however, the method was harmful due to the presence of 10% Ethanol in the control solution, which ruled out the solvent effect on toxicity. The UV-Vis spectrometry methodology was optimized identifying possible absorption regions between 270 and 275 nm. In addition, fungal growth (dry weight) was evaluated as a selection method. Two fungi were evaluated: MD and EL in the presence of 100 mg / L BFA, being MD the fungus selected for the validation assay because of its higher growth and possible elimination of BFA by degradation or absorption. The MD fungus grown with only BFA as carbon source did not grow, requiring a medium that is able to induce it to grow. Thus, this work showed good prospects for the degradation of this residue in contaminated sites through isolated fungi of NIBP, requiring new assays to validate the spectrometry methodology, such as a chromatographic analysis.

**Key words:** bisphenol A, decontamination, decomposition, plastic, INP**.**

**SUMÁRIO**

[1 INTRODUÇÃO 9](#__RefHeading___Toc25045_3503406486)

[2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11](#__RefHeading___Toc25047_3503406486)

[2.1 BISFENOL A 11](#__RefHeading___Toc25049_3503406486)

[2.1.1 Lacase 15](#__RefHeading___Toc25051_3503406486)

[2.1.2 Métodos para detecção do Bisfenol A 16](#__RefHeading___Toc8258_3642791977)

[2.2 BIODEGRADAÇÃO DO BISFENOL A 17](#__RefHeading___Toc25053_3503406486)

[3. OBJETIVO 19](#__RefHeading___Toc25055_3503406486)

[3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19](#__RefHeading___Toc25057_3503406486)

[4. MATERIAIS E MÉTODOS 20](#__RefHeading___Toc25059_3503406486)

[4.1 OBJETO DE ESTUDO 20](#__RefHeading___Toc25061_3503406486)

[4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE Bisfenol A 20](#__RefHeading___Toc25063_3503406486)

[4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO BFA: MÉTODO *Allium cepa.* 20](#__RefHeading___Toc25065_3503406486)

[4.4 AVALIAÇÃO ESPECTOFOTOMETRICA 21](#__RefHeading___Toc25067_3503406486)

[4.5 ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE: CULTIVO DOS FUNGOS MD E EL EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE BISFENOL A. 21](#__RefHeading___Toc25069_3503406486)

[4.5.1 Avaliação do Peso seco 22](#__RefHeading___Toc25071_3503406486)

[4.6 VALIDAÇÃO 22](#__RefHeading___Toc25073_3503406486)

[5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 24](#__RefHeading___Toc25075_3503406486)

[5.1 SOLUÇÃO DE BISFENOL A 24](#__RefHeading___Toc25077_3503406486)

[5.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO BFA PELO MÉTODO *Allium cepa* 25](#__RefHeading___Toc25079_3503406486)

[5.3 AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMETRICA 27](#__RefHeading___Toc25081_3503406486)

[5.4 ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE 27](#__RefHeading___Toc25083_3503406486)

[5.5 VALIDAÇÃO 30](#__RefHeading___Toc25085_3503406486)

[6. CONCLUSÃO 33](#__RefHeading___Toc25087_3503406486)

[7. REFERÊNCIAS 34](#__RefHeading___Toc25089_3503406486)

8. [APÊNDICES 41](#__RefHeading___Toc25091_3503406486)

1 INTRODUÇÃO

O Bisfenol A (2,2´-bis [4-hidroxifenil] propano, ou BFA) é um composto fenólico que constitui o material de diversos objetos utilizados em nosso cotidiano, tais como: garafas plásticas, mamadeiras, vasilhas, recipientes para pesticidas, resinas para restaurações dentárias, e uma variedade de outros produtos domésticos, industriais e agrícolas. O BFA faz parte da classe dos compostos orgânicos tóxicos muito prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente e atualmente diversas ações buscam diminuir sua comercialização em muitos países, em paralelo, novas pesquisas a respeito de sua degradação e descarte vêm sendo desenvolvidas na tentativa de reduzir seus impactos.

O BFA é um dos produtos químicos de maior volume de produção atualmente em uso, estima-se que no ano de 2009 foram fabricados cerca de 6.000.000 toneladas a nível global (REZG et al, 2014), além disso dados mostram que a demanda cresce entre 6 e 10% ao ano (BERNARDO et al, 2015), o que pode afetar de forma abrupta o meio ambiente. Existem na literatura poucos estudos relacionados à poluição ambiental pelo BFA em relação a seus efeitos na saúde humana. Entretanto, já se sabe que a poluição é resultado principalmente da contaminação da água durante a remoção parcial do BFA na produção industrial e da lixiviação de aterros sanitários e de efluentes, que levam esse material particulado até os rios e mares (FROMME et al, 2002).

Estudos relacionados aos efeitos do BP em camundongos, demonstraram que sua presença em baixas doses na água consumida pode levar à desregulação endócrina pela capacidade do BFA de atuar nos receptores do hormônio estrogênio (KANG et al. 2002). GASSARA e colaboradores (2013) avaliaram que o BFA em baixas doses no organismo humano pode levar a abortos espontâneos em gestantes devido a erros no processo de divisão celular, estes estudos também indicaram que a ingestão do BFA estava acima da ingestão diária permitida (10 µg / kg) pelo Comitê Científico da Comissão Europeia de Alimentos de 2002. Outra pesquisa avaliou a concentração do Bisfenol A em peixes na China, e os pesquisadores constataram alteração na secreção dos hormônios gonadotróficos, tais como o FSH e o LH, entretanto seu mecanismo ainda é desconhecido (WANG et al.2019).

Existe, portanto, além da diminuição do uso, a necessidade de se buscar alternativas para reduzir os impactos do BFA principalmente através da remoção destes fenóis das águas residuais. Os métodos convencionais são muito onerosos por conta dos processos de purificação, além de apresentarem baixa eficiência dos produtos e a formação de subprodutos indesejáveis (GASSARA et al, 2013).

Visando o tratamento do BFA, enzimas ligninolíticas, enzimas capazes de degradar a lignina, um polímero presente na parede celular vegetal, são uma alternativa atrativa de biodegradação, devida, entre outras características, a sua alta especificidade com o substrato, podendo ser utilizadas na degradação de compostos tóxicos como o BFA em águas contaminadas. Entre elas, a enzima lacase produzida por fungos, especialmente do Filo Basidiomiceto, responsáveis pela decomposição da madeira, desempenham um papel importante na biodegradação da lignina e são capazes de oxidar compostos aromáticos recalcitrantes. Neste sentido, estudos recentes relatam o potencial da lacase na biodegradação do BFA (YANG et al, 2013, SOUZA 2018, SARMA et al, 2019), como no trabalho de BARRIOS e colaboradores (2018) onde lacases produzidas por *Pycnoporus sanguineus* (CS43) e *Trametes versicolor* foram capazes de oxidar e degradar 33% de BFA em 24 horas.

Na biorremediação, o custo e a estabilidade da enzima durante a sua fabricação em larga escala contínua sendo um dos desafios para a aplicação enzimática, principalmente no tratamento de rios e lagos. Sendo assim, a busca por processos de biorremediação diferentes aos conhecidos atualmente é uma estratégia interessante para a aplicação biotecnológica e a exploração da biodiversidade de fungos produtores de lacase originários de ambientes pouco estudados pode ser uma ferramenta de sucesso. Entretanto, para um estudo exploratório, visando a busca por processos válidos de biodegradação, as metodologias qualitativas precisam ser diretas e de baixo custo. Poucos trabalhos vêm sendo realizados visando uma detecção direta, mais rápida e sensível do BFA, do que métodos mais onerosos, tal como a cromatografia, o método clássico de detecção.

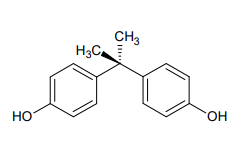
O presente projeto teve como objetivo avaliar metodologias viáveis para o estudo da biodegradação do BFA por fungos produtores de lacase encontrados no PNI, uma vez que, os métodos convencionais cromatográficos não são indicados para projetos de bioprospecção devido especialmente o seu alto custo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BISFENOL A

Bisfenol A (BFA) é o nome comum para 2,2- (4,4’-hidroxifenilico) propano, 4,4’- isopropilidenodifenol, ou 2,2’-bis (4-hidroxifenil) propano (figura 1), suas características químicas são apresentadas na tabela 1, trata-se de um composto sintético utilizado como um intermediário na produção de resinas epóxi e policarbonato, aplicado amplamente na produção de plásticos (OLAJUYIGBE et al, 2019). Estes plásticos têm sido usados em uma diversidade de materiais, tal como resinas de policabonato para revestimento, mas principalmente para produção de plásticos de uso diário (CALAFAT et al, 2004).

**Figura 1.** Estrutura Molecular do Bisfenol A (SANTANA, 2018)



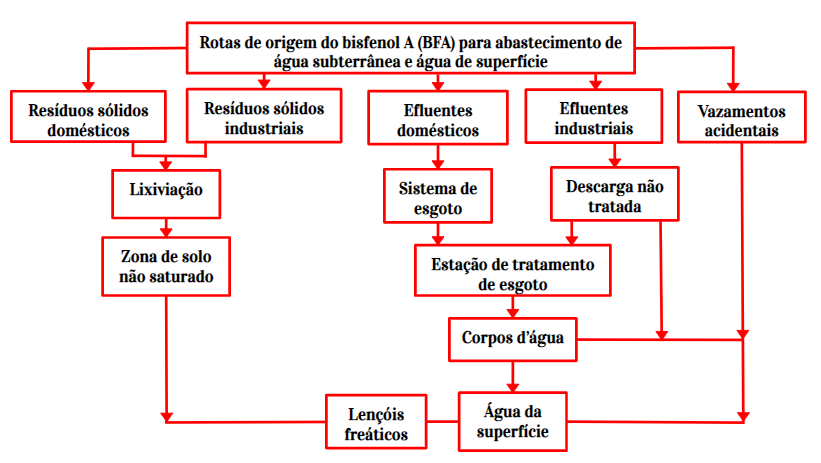
**Tabela 1**. Características químicas do Bisfenol A (adaptado de NATIONAL, 2019).

|  |  |
| --- | --- |
| **Parâmetro** | **Especificação** |
| Fórmula Molecular | C15H1602 |
| Peso Molecular | 228,291 g/mol |
| Ponto de fusão | 150-157 °C |
| Ponto de Ebulição | 250-252 °C |
| Ponto de Inflamação | 227 °C |
| Solubilidade em água | 0.12 mg/ml a 25 °C |
| Densidade | 1,2 g/cm3 a 25 °C |

A toxicidade do bisfenol A ocorre devida à reação desta molécula com o cloro presente na água, durante o processo de cloração no tratamento de água, podendo produzir triclorofenol e quatro subprodutos, o dicloro-BFA, tricloro-BFA e o 2-cloro-BFA, que apresentam um potencial estrogênico ainda maior, atuando como desregulador hormonal no corpo humano (KORSHIN et al, 2002).

Um estudo realizado em Taiwan, na China, revelou que o BFA está presente em águas de afluentes, para isso foram utilizadas 15 amostras do rio Jiulong e seu estuário, em uma estação de tratamento de águas residuais (ETARs), e foi constatada a presença de produtos de transformação do BFA no afluente, o bisfenol A monometil éter (BFA-MME) e bisfenol A dimetil éter (BFA-DME), as concentrações encontradas foram de 10,8 e 36,1 ng / L, com frequência de detecção de 67% e 93%, respectivamente (ASHFAQ et al, 2018). Uma importante fonte de contaminação foi relatada por PETRIE e colaboradores (2019), mostrando aplicação de lodo de águas residuais contaminadas com BFA oriundos de uma estação de tratamento para adubação de cultivos agrícolas, entretanto, segundo os autores, mais estudos são necessários para avaliar os limiares toxicológicos desse composto (PETRIE et al, 2019). KWAK e colaboradores (2018) constataram que o risco ambiental do BFA também afeta as espécies vegetais nativas, podendo ser bioacumulativo para animais, plantas e algas, como consequência da liberação desse composto no ambiente aquático que leva esse material até o solo e consequentemente até águas subterrâneas. A figura 2 resume as principais fontes de contaminação de água por BFA.

**Figura 2.** Possíveis rotas de contaminação do BFA para águas subterrâneas e superficiais (Adaptado de BILAL et al, 2019).

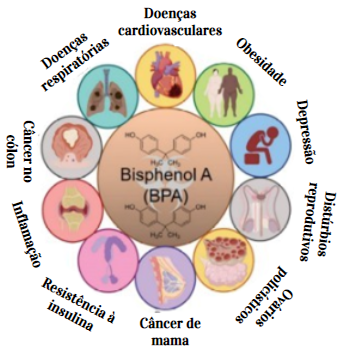


Além da contaminação aquática, em razão do elevado volume de produção e de sua aplicação em muitos compostos comerciais, sua ocorrência no meio ambiente é resultado também da decomposição incompleta de produtos contendo BFA descartados por efluentes industriais (MICHAŁOWICZ et al, 2014). SHAN e colaboradores (2019) avaliaram a presença do BFA e um de seus substitutos análogos, o Bisfenol S (BPS) em peixe, caranguejo, camarão e marisco, utilizados na alimentação humana e concentrações de 0,060 μg / kg de BFA e 0,012 μg / kg de BPS foram identificados, atingindo o nível de biomagnificação, que é o acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para outro, ao longo de uma cadeia alimentar.

A desregulação endócrina hormonal se deve ao fato que o BFA é capaz de se ligar aos receptores hormonais, pois mimetiza a estrutura química do estrogênio, e atua como um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM), o que desregula completamente o metabolismo humano. Em adição, a estrutura química do BFA é representada por dois anéis de fenol insaturados e apresenta homologia estrutural com alguns hormônios estrogênicos, sendo estes: o estradiol (E2), dietilestilbestrol (DES), e o hexestriol e pode atuar como desregulador endócrino por mimetizar a ação destes hormônios (KAWA et al. 2019), além disso o BFA pode estar associado a doenças relacionadas ao estrogênio como a endometriose (FERNANDEZ et al, 2019), esta doença pode levar a obesidade, anovulação, infertilidade, abortos recorrentes e morbidade psicossexual (SHORAKAE et al, 2015). A presença do BFA também está relacionada a ocorrência de câncer de mama e o aumento da próstata em camundongos (CALAFAT, et al, 2004). Além desses, a exposição ao BFA na saúde humana pode resultar em efeitos adversos em praticamente todo o nível celular e fisiológico, como relatado na figura 3.

Devido aos efeitos nocivos à saúde humana alguns países estão buscando alternativas a utilização do BFA, como a utilização dos substitutos análogos ao BFA, sendo estes: o Bisfenol S (BFS), Bisfenol F (BFF) e Bisfenol B (BFB) (QIU et al. 2019). Para a avaliar se estes compostos geram estresse oxidativo, o que leva ao dano celular, ZHANG e colaboradores (2019) utilizaram hemácias, que são modelos para avaliar alterações oxidativas no sangue (por serem as células mais abundantes) e por meio de kits com biomarcadores para avaliar o efeito tóxico e constataram que dentre estes compostos o Bisfenol B (BFB) foi o único com potencial para substituir o BFA pois teve o menor efeito na estrutura secundária do grupo heme.

**Figura 3.** Efeitos adversos da exposição ao BFA na saúde humana (Adaptado de BILAL et al, 2019).



### 2.1.1 Lacase

As lacases (benzenodiol oxigênio oxiredutase) pertencem à família das oxidases que podem catalisar a oxidação de vários compostos fenólicos e aminas aromáticas, enquanto reduzem o oxigênio molecular a água (PIONTEK et al. 2002). São enzimas conhecidas como ligninolíticas capazes de degradar a lignina, um polímero natural encontrado em tecidos vegetais (TUOMELA et al, 2011). Essas enzimas são catalisadoras específicas, podendo ser aplicadas na indústria alimentar, descoloração de corantes, indústria de papel e celulose e biorremediação por uma variedade de fungos (ZENG et al. 2017).

As lacases são produzidas por diversos microorganismos, tais como: fungos, plantas e bactérias (MCGUIRL et al. 1999), entre eles, os fungos Basidiomicetos, incluídos taxonomicamente no filo Basidiomycota, do Reino Fungi são os organismos mais estudados pela alta atividade enzimática. Morfologicamente, esse filo possui esporos de origem sexuada e estruturas personalizadas, os basídios, onde ocorre a cariogamia e a meiose. Durante a maior parte de seu ciclo de vida se apresentam em forma de micélios e hifas, com ansas (alças para proporcionar a discariose), essa característica permite diferenciar este filo de outros filos (ALEXOPOULOS et al. 1996).

Alguns gêneros e espécies são considerados grandes produtores de lacases, destacando-se o gênero Basidiomiceto: Trametes versicolor, Pycnoporus cinnabarinus, Pleurotus ostreatus e Phanerochaete chrysosporium (BILAL et al, 2019), além uma diversidade de fungos Basidiomicetos e Ascomicetos também descritos por RIVERAHOYOS e colaboradores (2013).

Apesar da grande gama de estudos voltados para a aplicação biotecnológica da lacase, para algumas aplicações, como a biorremediação o uso da enzima purificada tornase de alto custo e muitas vezes inviáveis, assim processos de biorremediação diferentes aos conhecidos atualmente é uma estratégia interessante para a aplicação biotecnológica e a exploração da biodiversidade de fungos produtores de lacase originários de ambientes pouco estudados pode ser uma ferramenta de sucesso. Neste sentido, existe uma ampla diversidade de fungos no Parque Nacional do Iguaçu, porém, praticamente desconhecidos. O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) possui 169.695,88 hectares é adjacente ao Parque Nacional do Iguaçu do lado Argentino, em conjunto somam uma área de 250.00 hectares. Ambos os parques são áreas protegidas com grande área de Mata atlântica, que compreendem florestas subtropicais com alto grau de diversidade e endemismo, abrigando numerosas espécies raras devido a características climáticas e de solo. Por esse motivo estas áreas são protegidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio) e pelo sistema nacional do meio ambiente (SISNAMA) abrindo a possibilidade de 22 explorar o potencial de bioprospecção de microrganismos (UNESCO, 2016).

2.1.2 Métodos para detecção do Bisfenol A

Para quantificar o BFA podem ser utilizadas diversas técnicas, especialmente as técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (VANDENBERG et al, 2007), cromatografia líquida (OPPENEER e ROBIEN, 2015) e cromatografia gasosa (HOU et al, 2014). Sendo a cromatografia líquida é a técnica mais utilizada e pode ser acoplada a detectores espectrofotométricos UV-Vis e de fluorescência (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al, 2012).

Visando métodos alternativos de detecção SOUSA (2018) avaliou por meio do espectrofotômetro UV-vis a ação da lacase sobre o BFA, e detectou que os picos de absorção de ambos os compostos (BFA e lacase) foram semelhantes pois apresentam-se sobrepostos no gráfico b da figura 4, assim foi utilizado o espectro de ordem zero, pela técnica de ponto de anulação por uma varredura de 200 a 400 nm por espectrometria derivativa, sendo possível observar a redução da absorbância do BFA devido à sua degradação pela lacase, na região de 288 nm, pois neste comprimento de onda da derivada não ocorreu sobreposição dos picos, sendo possível observar apenas o BFA.

Atualmente novos trabalhos vêm sendo realizados visando uma detecção direta, mais rápida e sensível, do que métodos indiretos (tal como a Cromatografia). XU e colaboradores (2019) relataram um método de detecção do BFA a partir de ácido nucléico, onde uma sequência de DNAse do tipo peroxidase foi dividida em duas partes, e incorporada a um aptâmero anti-BFA como um alvo de reconhecimento, e outra sequência complementar para se ligar. A presença do BFA impediu a associação da sequência do DNA dividida, levando a um sinal reduzido na quimioluminescência desencadeada por DNAse, detectando uma faixa de 5 nM do BFA com alta seletividade. ALLSOP e colaboradores (2019) criaram o primeiro Biosensor de Fibra Óptica portátil capaz de quantificar o BFA *in situ*, através de ligação coop erativa da molécula alvo ao receptor foi obtido uma alta resolução e uma detecção de moléculas de 230 Da, comparado a maioria dos trabalhos com moléculas de tamanhos de 6 KDa a 200 KDa, esse sistema apresentou a vantagem de uma detecção de concentrações muito baixas do BFA. Dessa forma, a detecção através de espectrofotometria UV-Vis na busca de metodologia afetiva para avaliar a biodegradação do BFA, apresenta vantagens por ser menos onerosa e mais rápida em relação as novas e convencionais metodologias utilizados.

2.2 BIODEGRADAÇÃO DO BISFENOL A

A biodegradação tem sido apontada como uma alternativa viável na descontaminação de locais impactados, pois direciona o potencial fisiológico de micro-organismos na degradação de compostos tóxicos, devido à utilização do composto como fonte de carbono (RAHMAN et al, 2003). A utilização de fungos e bactérias isolados de locais impactados, ou a exploração de recursos genéticos desconhecidos, visando aplicação em processos biotecnológicos, tem recebido destaque, sendo esses micro-organismos amplamente utilizados na remediação de poluentes e locais impactados (GOMES et al., 2010).

Os tratamentos físico-químicos convencionais são as etapas de coagulação, floculação, decantação e posteriormente a filtração, cloração e fluoretação onde separam os resíduos da parte líquida (SAAE et al, 2006), entretanto, não existe uma etapa de tratamento específica para tratar o BFA e outros contaminantes emergentes (PESCARA, 2014). Pesquisas estão sendo desenvolvidas para que o tratamento do BFA em tratamento de água sejam efetivas e específicas especialmente pela via de degradação por fotólise heterogênea, entretanto os compostos Ozônio e Peroxido de hidrogênio utilizados para degradar o BFA tem elevado custo o que inviabiliza a utilização dos mesmos (CHIANG et al, 2003).

Alternativamente ao tratamento físico-químico do bisfenol A, pode-se utilizar a biodegradação com a ação de microrganismos produtores de enzimas que degradam este poluente. Os fungos da podridão branca são capazes de mineralizar compostos tóxicos pela ação de enzimas que atuam reciclando estas biomoléculas no ecossistema, sugerindo a sua utilização na biodegradação de compostos recalcitrantes como o Bisfenol A (OHKUMA et al, 2001).

O tratamento biológico pode ser realizado basicamente de duas formas, através da aplicação da enzima purificada diretamente em meio aquoso, como demonstrado por SOUSA (2018) que utilizou como substrato para a produção da lacase a lignina bruta posterior purificação e aplicação da enzima em meio líquido contendo BFA; como também a biodegradação direta, inoculando os microrganismos diretamente na presença do poluente. YANG e colaboradores (2013), realizaram uma biodegradação *in situ* com o fungo *Trametes versicolor* imobilizado em membranas em condições não estéreis de um bioreator por três meses, no cultivo o BFA foi continuamente adicionado às águas residuais sintéticas e a remoção foi de aproximadamente 80 a 90%, a um tempo de retenção de 2 dias. SARMA e colaboradores (2019) também realizaram uma biodegradação *in situ,* para isso eles utilizaram três cepas bacterianas e um consórcio bacteriano, isolados do sedimento do rio Grande. Após 72 horas de crescimento em meio liquido avaliaram parâmetros de biodegradação cinética, formação de metabólitos com capacidade de remoção do Bisfenol A solubilizado no meio de cultura. O resultado foi a remoção de 100% do BFA pelas três cepas, avaliadas separadamente, e o consórcio, que apresentou uma taxa de remoção mais rápida.

,

3. OBJETIVO

O presente projeto teve como objetivo avaliar metodologias viáveis para o estudo de biodegradação do BFA por fungos. Para tanto, utilizou-se como modelo fungos filamentosos isolados do Parque Nacional do Iguaçu visando conhecer seu potencial como recurso biológico para biorremediação de ambientes contaminados.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o teste de toxicidade de *Allium cepa* como bioindicador para o estudo de bioprospecção.
2. Inocular os isolados na presença do BFA e avaliar o efeito do poluente no crescimento fúngico.
3. Avaliar o perfil espectrofotométrico do cultivo fúngico na presença do BFA e otimizar o método de espectrometria UV-Vis para detecção do BFA.
4. Validar um método para bioprospecção dos fungos MD e EL como potencial para biodegradação do BFA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBJETO DE ESTUDO

Para o desenvolvimento do projeto foram avaliados os fungos pertencentes à Coleção de Cultura do Laboratório de Microbiologia da UNILA, obtidos no trabalho intitulado "Edge Effect dos fungos da mata atlântica semidecidual" (DUQUE, 2016), isolados do Parque Nacional do Iguaçu (PNI).

Os isolados EL e MD (em fase de identificação taxonômica) foram selecionados por apresentarem melhores atividades da lacase no projeto, estes foram reativados no próprio meio de cultura do isolamento, o Extrato de Malte a 2% (MA2) , a 28 oC, com objetivo da obtenção de um micélio novo que foi utilizado posteriormente nos ensaios de degradação do Bisfenol A em meio aquoso.

4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO DE Bisfenol A

A dissolução do BFA foi avaliada em duas metodologias. No primeiro ensaio para obter uma solução de 1 g/L do BFA foram testadas diferentes concentrações de etanol anidro P.A. (25%, 10% e 5%), após a adição do BFA em etanol e água destilada estéril as soluções foram aquecidas de 30 a 60 oC com agitação durante 30 minutos. Visando a dissolução direta 1g/L de BFA foi diluído em água destilada e autoclavado por 15 mim a 121oC. Os resultados obtidos foram avaliados através de espectrometria UV-Vis conforme descrito abaixo. Para os ensaios fúngicos foi preparada uma solução estoque de 1 g/L de BFA diluído em etanol anidro 10%.

4.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO BFA: MÉTODO *Allium cepa.*

O teste de toxicidade foi realizado seguindo o método descrito por Fiskesjo (1985). O experimento utilizou o teste padrão *Allium*, utilizando *Allium cepa L.* (cebola). O teste se baseou no contato da cebola com a solução aquosa contendo BFA. As raízes e camadas externas foram cuidadosamente removidas, e o crescimento das folhas foi restrito durante o experimento. Para a seleção das cebolas, estas foram colocadas em copos plásticos com água deionizada, mantidos em local protegido da luz e baixa umidade por 72 horas e aproximadamente 20°C. No final deste período, as cebolas foram removidas da água e o crescimento das raízes foi medido com uma régua. Cebolas que apresentarem um crescimento similar das raízes foram selecionadas e imediatamente utilizadas no teste de toxicidade.

As cebolas selecionadas foram adicionadas nos seguintes ensaios: controle positivo (apenas água deionizada); controle negativo (água deionizada e etanol anidro na proporção 1:1), controle positivo + etanol anidro 10% (concentração mais baixa que permitiu a dissolução do BFA) e os 5 tratamentos com a adição de diferentes concentrações de BFA (10 mg/L, 30 mg /L, 60 mg/L, 80 mg/L e 100 mg/L) todos os testes foram realizados em triplicata. Após 72 horas as raízes foram cordadas e medidas. O valor final do comprimento das raízes de cada réplica foi considerado através da média aritmética das cinco maiores raízes de cada bulbo e comparada com os controles positivos e negativos.

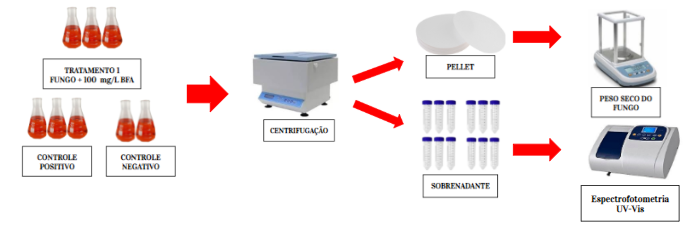
4.4 AVALIAÇÃO ESPECTOFOTOMETRICA

Visando a detecção do BFA por espectrofotômetro UV-Vis (weblaborsp; WUV-M51) incialmente as soluções de BFA preparadas no Item 4.2 foram avaliadas através de um espectro com varredura de 190 a 500 nm. Nesta etapa, devido a coloração transparente das soluções (BFA autoclavado e BFA+etanol) foi utilizada água deionizada estéril como branco. No teste de biodegradabilidade (item 4.5), os controles positivos incluíam meio de cultura (MA2) adicionado da solução de BFA e os negativos continham MA2 sem BFA. Todos os ensaios com meio de cultura (controles e tratamento de biodegradabilidade) foram diluídos na proporção 1:1 e 1:3 (ensaio: água deionizada) para leitura e foram calibrados utilizando o controle negativo para a realização da leitura.

4.5 ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE: CULTIVO DOS FUNGOS MD E EL EM MEIO LÍQUIDO NA PRESENÇA DE BISFENOL A.

Para avaliar o efeito do BFA no crescimento os isolados foram cultivados em meio Ágar Malte 2% por sete dias para reativação, como descrito anteriormente. Três plugues de 9 mm foram inoculados em 50 mL de Extrato de Malte 2% nos seguintes ensaios: Tratamento 100 mg/L de BFA (MA2+BFA+fungo); Controles negativos (sem inoculação fúngica): MA2+BFA; MA2 sem BFA; Controle positivo (MA2+etanol+fungos). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a solução de BFA foi preparada usando água e 10% de etanol anidro, conforme descrito anteriormente. Visando a avaliação do efeito do etanol no crescimento fúngico o controle positivo foi preparado com a adição do etanol no mesmo volume da solução estoque de BFA (item 4.2), porém sem o BFA, apenas etanol 10%, como observado na figura 4.

**Figura 4.** Representação esquemática da metodologia para o ensaio de biodegradabilidade do BFA a partir do cultivo dos isolados EL e MD.



Fonte: a autora, 2019

Os ensaios foram incubados à 28 oC por sete dias a 130 rpm. Após foram transferidos para tubos tipo Falcon e centrifugados à 6000 rpm por 30 minutos à 4 oC. Os sobrenadantes foram conservados a 4 oC para avaliação espectrofotométrica e a biomassa (pellets) separados para a determinação do peso seco.

4.5.1 Avaliação do Peso seco

Para determinar o peso seco os pellets foram dispostos em papel filtro e secos a 60 oC por 24h até obtenção do peso constante. Os resultados foram analisados utilizando ANOVA (um fator) com p < 0,05.

4.6 VALIDAÇÃO

Visando a confirmação do teste de biodegradabilidade e da metodologia espectrofotométrica, o isolado MD foi selecionado para novos tratamentos: Tratamento 1 (100 mg/L de BFA+MA2, mesmo ensaio anterior, repetido como controle), Tratamento 2 (50 mg/L de BFA); Tratamento 3 (100 mg/L de BFA). Nos tratamentos 2 e 3 não foi adicionado o meio de cultivo MA2, o ensaio foi composto apenas pela solução de etanol 10% e BFA, visando a avaliação do crescimento com BFA como única fonte de carbono. Os controles do experimento foram: Controle negativo do tratamento 1 (MA2 + 100 mg/L de BFA), Controle negativo do tratamento 2 (50 mg/L de BFA), Controle negativo do tratamento 3 (100 mg/L de BFA), Controle positivo (MA2+MD) e Controle negativo (MA2). Os ensaios foram realizados em triplicata para a determinação do peso seco conforme descrito no item 4.5 e o sobrenadante preparado na proporção 1:1 e avaliado de acordo com o item 4.4. em espectrofotômetro UV-Vis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SOLUÇÃO DE BISFENOL A

O BFA utilizado no presente trabalho apresentou-se na forma cristalina (figura 5), trata-se de uma substância insolúvel em água e conforme a literatura (SOUZA, 2018) para utilização deve-se fazer a dissolução em solventes orgânicos, geralmente etanol ou acetonitrila 50% ou 100%. Uma vez que a solução foi utilizada em ensaio biológicos o etanol foi selecionado devido a menor toxicidade em relação a acetonitrila. Foram avaliadas concentrações de 25%, 10% e 5% de etanol, o objetivo foi obter a menor concentração de álcool em que BFA possa ser dissolvido. Em etanol 5% não foi possível a dissolução do BFA, enquanto 10% foi a concentração mínima em que o BFA foi dissolvido.

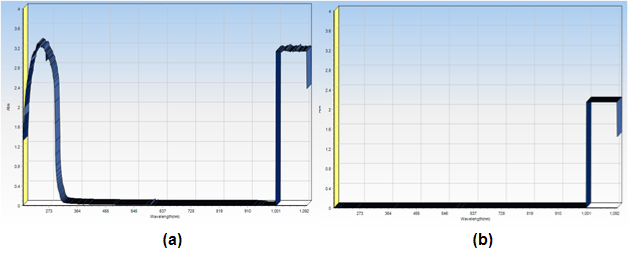
**Figura 5.** Bisfenol A em sua forma cristalina e insolúvel em água.

.Uma imagem contendo armário, interior, forno, sentado

Descrição gerada automaticamente

Fonte: A autora

Visando dissolver o BFA diretamente em água a solução (BFA + água) foi autoclavada. A integridade do BFA após a autoclavagem era desconhecida, portanto foi necessário realizar pelo método de espectrofotometria UV-Vis a comparação do espectro de absorção entre a solução anterior (etanol 10 %) e o autoclavado. No espectro (figura 6) foi possível identificar que o BFA diluído em etanol 10 % sem autoclavagem, apresentou um único pico em 275 nm, como descrito por SANTOS (2018), já o BFA autoclavado não apresentou nenhum pico (solução etanol 10 % ABS275= 2.9318 e solução autoclavada ABS275=0) logo foi possível prever que o BFA foi completamente degradado e que o método de autoclavagem para dissolução do BFA para formar uma solução homogênea não é eficaz. Portanto foi utilizado para os demais experimentos a solução de etanol 10 % para diluir o BFA.

**Figura 6.** Espectro de absorção do BFA na solução etanol 10% (A) e autoclavada (B).

Fonte: A autora.

5.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO BFA PELO MÉTODO *Allium cepa*

Visando utilizar o ensaio de toxicidade para avaliar a biodegradação do BFA após tratamento biológico, o teste de *Allium cepa* foi aplicado. Este teste é mais vantajoso quando comparado com outros bioensaios mais onerosos e também apresenta fácil execução, crescimento e rapidez. Quando a cebola entra em contato com água não tóxica, ocorre estimulação do crescimento das raízes. No entanto, quando os inibidores estão presentes na água, haverá um atraso da divisão celular ou uma inibição total do crescimento das raízes (FISKESJO, 1985).

As diferentes concentrações testadas (10, 30, 60, 80 e 100 mg/L) foram comparadas com os resultados do controle positivo sem a adição de BFA, porém preparado com a mesma concentração do etanol (10 %) com o objetivo de avaliar se o etanol interfere no crescimento das raízes. Conforme a literatura o valor esperado de crescimento da raiz em água pura pode variar de 1,5 até 3,5 cm, como observado na tabela 2.

**Tabela 2.** Variação do comprimento das raízes de *Allium cepa* em água de acordo com a literatura.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Variação do comprimento da raiz de *Allium cepa* em água** | **Tipo de estudo** | **Referência** |
| 1 cm | Toxicidade | (LACERDA et al, 2014) |
| 1,5 a 2,0 cm | Citotoxicidade e genotoxicidade | (BONCIU et al, 2018) |
| 2 cm | Citotoxicidade e genotoxicidade | (TEDESCO et al, 2012) |
| 2,6 cm | Genotocicidade | (BRAGA et al, 2015) |
| 2,0 a 2,5 cm | Citotoxicidade e genotoxicidade | (GOMES et al, 2015) |
| 3,5 cm | Toxicidade | (PALACIO et al, 2015) |

Observa-se na tabela 3 abaixo, que as raízes do controle positivo do nosso estudo, com adição de 10 % de etanol, não obtiveram um resultado satisfatório, sugerindo assim que mesmo a concentração mais baixa de álcool a 10% foi tóxica. Sendo assim o teste foi excluído como uma possibilidade para a metodologia de seleção.

**Tabela 3 :** Resultados do crescimento da raiz em diferentes concentrações de BFA

|  |  |
| --- | --- |
| **Concentração de BFA** | **Média das raízes (cm)** |
| BFA 10 mg/L | 0,6 |
| BFA 30 mg/L | 0,67 |
| BFA 60 mg/L | 0,34 |
| BFA 80 mg/L | 0,141 |
| BFA 100 mg/L | 0,07 |
| Controles Positivo (10% Álcool) | 0,486 |

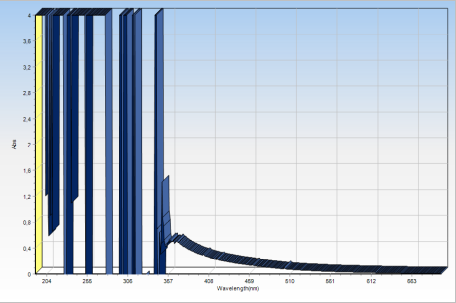
Fonte: a autora

O ensaio de *Allium cepa* foi realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2012), com a intenção de avaliar a toxicidade de BFA, foram utilizadas amostras do rio Sino, aparentemente contaminado. Sem a necessidade de diluição do BFA, eles avaliaram a água desse rio e observaram que houve uma diminuição significativa no crescimento das raízes em comparação com o controle.

5.3 AVALIAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA

Como observado na figura 6 (item 5.1), correspondente ao espectro da solução de BFA em etanol 10 % (275 nm) pode-se observar um aumento progressivo da absorção a partir de 200 nm com pico entre 220 a 294 nm. Esses dados corroboram com o trabalho de SOUZA (2018). Entretanto, quando o BFA é adicionado ao meio de cultura, o espectro apresenta diferentes absorções relacionadas aos constituintes do meio de cultura (figura 7), composto basicamente de substâncias proteicas e maltose.

**Figura 7.** Espectro de absorção do BFA na solução etanol 10% em meio de cultura extrato de malte 2%.



Apesar da diferença no espectro da solução de BFA no meio de cultura em relação ao BFA em água, acreditava-se que como na análise de biodegradabilidade o fungo estaria na mesma condição seria possível fazer uma relação direta entre o controle (figura 8) e o ensaio do tratamento, buscando avaliar a diferença em relação ao perfil espectrofotométrico. Assim, foi dado continuidade na metodologia de espectrofotometria para os testes de biodegradabilidade.

5.4 ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE

Os fungos EL e MD foram crescidos em meio líquido na presença de BFA para avaliar a metodologia de espectrofotometria e o peso seco como métodos analíticos para um estudo de bioprospecção de fungos com potencial de degradação do BFA. Após sete dias de cultivo a biomassa de cada tratamento foi seco e avaliada, conforme tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados do peso seco do cultivo dos fungos MD e El na presença do BFA e controle (sem adição de BFA).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Tratamento MD** | **Controle MD** | **Tratamento EL** | **Controle EL** |
| **Média peso seco** | 190 mg | 170 mg | 143 mg | 176 mg |

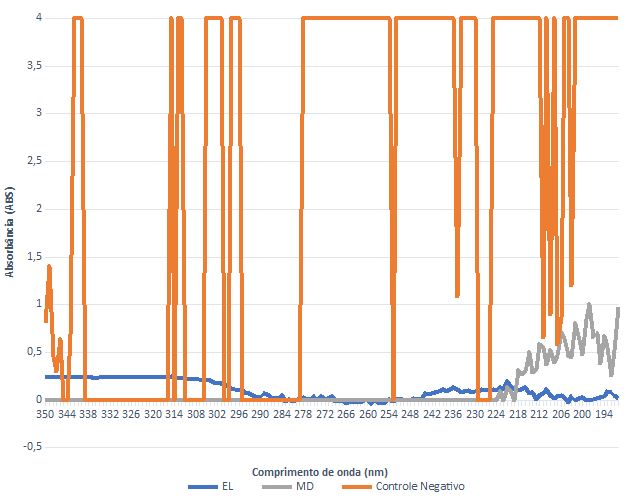
Fonte: A autora

Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) fator único, para avaliar se houve diferenças significativas (P <0,05) nos pesos secos entre os fungos MD e EL em relação aos seus controles. Tanto para o fungo MD quando para o EL não houve significância estatística (p >0,05), logo é possível constatar que não há diferença no crescimento deles em relação a solução contendo o BFA e a solução contendo apenas meio de cultura. Neste sentido, o composto não foi tóxico para os fungos em questão. O fungo MD foi o que obteve um melhor crescimento portanto foi o escolhido para o ensaio de validação.

As avaliações dos perfis de espectro dos sobrenadantes dos cultivos fúngicos foram realizados nas seguintes condições: sem diluição; diluição 1:1 (sobrenadante:água destilada autoclavada); e 1:3 (sobrenadante:água destilada autoclavada). As diluições foram realizadas buscando a melhor faixa de leitura de acordo com a sensibilidade do equipamento e a coloração dos sobrenadantes. A condição que apresentou resultado satisfatório de leitura foi a diluição 1:1. A absorbância em 270nm dos ensaios foram: controle ABS270= 4; MD ABS270= 0; e EL ABS270 = 0,04.

Como será observado a seguir (figura 8) o fungo MD não apresentou nenhum pico em 270 nm (e o fungo EL indicou um pequeno pico em relação ao controle). Ambos resultados podem indicar um perfil de possível degradação ou adsorção do BFA, uma vez que o composto pode apenas ter sido absorvido pelo micélio fúngico, não sendo mais detectado no sobrenadante. Visando a comparação entre o controle e os sobrenadantes as absorbâncias de 350 a 190 nm dos tratamentos e do controle foram plotados em um gráfico (apêndice A). Pode-se observar que no controle há um pico de absorção entre 250 a 280 nm que não foi identificado em nenhum dos ensaios fúngicos, indicando possivelmente a região de absorção do BFA.

**Figura 8**. Espectro de absorção dos sobrenadante dos cultivos fúngicos MD e EL na presença de 100 mg/L de BFA e do controle negativo (meio de cultura MA2 adicionado de 100 mg/L BFA).



\

Esse ensaio possibilita o desenvolvimento de novas estratégias para identificar se o composto ficou de fato aderido ao micélio (através da maceração da biomassa e diluição para posterior leitura no espectro) ou se foi degradado pelo fungo, o que necessita de técnicas mais sensíveis tal como a cromatografia líquida de alta eficiência (SOUZA, 2018). MORE e colaboradores (2010) sugerem que se ocorre a adsorção de um composto tóxico em solução pelo micélio fúngico, é possível utiliza-lo para a remoção do mesmo, por suspensão através de biosorção e biofloculação e então pode ser feita sua retirada, essa metodologia pode ser aplicada no tratamento de água residuárias contaminadas pelo BFA.

5.5 VALIDAÇÃO

Com base no espectrofotômetro e no peso seco o fungo MD foi selecionado para novos ensaios visando a avaliação do potencial de biodegradabilidade. O tratamento 1 (100 mg/L em MA2) correspondeu ao ensaio anteriormente realizado e teve como objetivo um controle do experimento, visando confirmar a atividade fúngica viável no BFA. O tratamento resultou no crescimento de 150 mg de biomassa e seu controle positivo (sem BFA) em 260 mg. Diferente do avaliado anteriormente os resultados do peso seco indicaram uma diminuição no crescimento em relação ao controle (tabela 5), validado pelo teste de ANOVA que indicou uma diferença significativa (p-valor 0,000089) logo o BFA resultou um efeito tóxico no tratamento não observado no ensaio anterior.

**Tabela 5.** Avaliação entre o controle e o tratamento no 1º e 2º ensaio (fungo MD)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **1º Ensaio** |  | **2º Ensaio** |  |
| 100 mg/L BFA | Controle | 100 mg/L BFA | Controle |
| 190 g | 170 g | 150 g | 260 g |

Fonte: a autora (2019)

Esse dado pode indicar uma instabilidade do ensaio, ou seja, diferentes efeitos do composto tóxico do meio de cultura, possivelmente como resultado da expressão de diferentes vias enzimáticas fúngicas, como descrito por DESHMUKH et al. (2016). Uma outra possibilidade para a diferença estatística encontrada na validação e não no ensaio de biodegradabilidade se deve a diferença que ocorreu nos valores dos controles positivos desses ensaios. O controle positivo contém a mesma concentração de etanol (10 %), somente sem o BFA, para avaliar o impacto desta solução no crescimento. Possivelmente esta solução alcoólica alterou o metabolismo resultando na variação da taxa de crescimento entre os ensaios (biodegradação e validação) e esse dado resultou na significância estatística. O efeito do etanol no crescimento fúngico é conhecido, HALLSWORTH e colaboradores (1998) indicaram em 1998 que o etanol induz o estresse fúngico e altera seu crescimento e UYAR (2019) usou etanol 10 % como método de inativação de esporos fúngicos. Esses dados foram importantes pois indicaram uma lacuna no método devido a solução de diluição.

A análise espectrofotométrica, em contrapartida, não indicou redução do pico para o tratamento 1, tanto no seu controle do ensaio (sem crescimento fúngico) como no tratamento a absorbância em 270 nm foi 4 (apêndice A). Esses dados, contradizem os ensaios de biodegradabilidade anterior, mas confirma a diferença no peso seco, indicando que alguma condição está interferindo no processo, gerando variações de crescimento e metabolismo. Ou seja, tanto a peso seco como o espectro de absorbância foram diferentes para a mesma condição de ensaio.

Nos tratamentos 2 (100 mg/L BFA +etanol) e 3 (50 mg/L de BFA + etanol) no meio sem a adição de Malte não ocorre o crescimento fúngico, ou seja, o fungo não consegue utilizar o BFA como fonte única de carbono. Poucas literaturas relatam o crescimento direto do fungo no BFA, a maioria utiliza a enzima lacase purificada ou isolada da biomassa, como método de biorremediação (SOUZA, 2018; TOUMELA et al, 2011; DE FREITAS et al, 2016). Entretanto, o presente trabalho visa uma alternativa mais direta e simples de tratamento, através do envolvimento do metabolismo fúngico na degradação do BFA, durante seu crescimento.

Kamaraj et al. (2012), avaliaram um fungo isolado de um ambiente contaminado na degradação do BFA de 20 a 100 ppm, usando a taxa de crescimento e absorbância a 270 nm como método analítico. De acordo com os autores o método foi eficiente e a degradabilidade do BFA por *Aspergillus* sp. resultou das seguintes causas: resistência das células à toxicidade dos produtos químicos, ampla especificidade de substrato das enzimas iniciais no metabolismo dos produtos químicos e permeabilidade da membrana interna dos produtos químicos. Porém em nenhum momento do trabalho os autores indicaram qual foi o método de diluição do BFA, apenas que a solução de BFA foi filtrada para adição no meio de cultura. Yim et al. (2003) usaram etanol 10 mg/ml para preparo da solução de BFA, que foi adicionado a cada ensaio 24 h após a inoculação resultando numa concentração final de 2 ug/ml.

No trabalho de Fouda et al. (2015) de 50 fungos avaliados apenas dois foram capazes de cresces em 200 mg/L de BFA com potencial de biodegradação e desintoxicação, contudo novamente os autores não indicaram o método de diluição do BFA. Por outro lado, com base neste trabalho (Fouda et al, 2015) podemos concluir que os dados encontrados no presente projeto são promissores, uma vez que os dois fungos avaliados, apenas como modelo para os testes, foram capazes de crescer em 100 mg/L de BFA.

Por fim, um dos trabalhos mais recentes avaliou a produção simultânea de lacase e degradação do BFA com *Trametes versicolor* cultivada em resíduos agrícolas (Zeng et al, 2017). A fermentação em estado sólido com *T. versicolor* foi realizada em resíduos agrícolas contendo BFA (25 mg / kg de substrato sólido), ou seja, sem diluição. Após 10 dias de fermentação, o Bisfenol A residual nas culturas foi extraído por uma mistura de metanol e água (1: 1), agitado a 200 rpm por 4 h e depois centrifugado a 4000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado para medir a concentração residual de BFA. Os autores avaliaram a degradação por métodos cromatográficos, porém a estratégia utilizada deve ser avaliada para futuros estudos.

A literatura mostra que o efeito de um composto específico depende diretamente das fontes de carbono e nitrogênio presentes nesse meio. ASIF e colaboradores (2017) demonstraram em seu estudo que alguns compostos orgânicos e compostos inorgânicos em determinadas concentrações podem induzir ou inibir a produção de lacase, evidenciando que em concentrações adequadas o meio de cultura pode ser determinante para o ensaio de biodegradação. KANNAIYAN e colaboradores (2012) testaram uma variedade de fontes de carbono e nitrogênio em diferentes proporções que fossem capazes de estimular o fungo *Dichomitus squalens* a crescer na presença de sulfato de cobre, que em condições normais é um composto tóxico para o fungo, contudo, os resultados não foram satisfatórios.

De forma semelhante, com base no principal resultado obtido nesse trabalho (a inibição do crescimento fúngico com o BFA como fonte única de carbono), é possível aplicar em trabalhos futuros novos testes com distintas concentrações e fontes desses nutrientes, que possam impactar na estimulação do crescimento e a tolerância ao BFA, e assim capacitar os fungos a utilizá-lo como nutriente.

1. CONCLUSÃO

A proposta desse trabalho foi testar diferentes metodologias de estudo para avaliar o potencial de biodegradação do bisfenol A através de fungos do Parque Nacional do Iguaçu. Para alcançar o objetivo proposto foram realizados: teste de diluição do BFA, que evidenciou dentre as concentrações de álcool, que a concentração de 10% foi a mínima em que o BFA pode ser diluído. Foi utilizada a mesma concentração do etanol no teste de toxicidade *Allium cepa* e observou-se que a solução do controle positivo (comparado com os dados da literatura) foi tóxica para a cebola, devido aos inibidores presentes na água e dessa forma não pode ser validada como metodologia viável. Além disso o BFA foi autoclavado para evitar o uso do etanol 10 %, entretanto a análise espectrofotométrica mostrou que o composto foi degradado.

No ensaio de biodegradação foram testados dois fungos (MD e EL), que mostraram crescimento micelial eficiente em meio contendo uma concentração de 100 mg/L de BFA com adição de MA 2%, com a possibilidade de ter ocorrido adsorção ou degradação do composto pelos isolados, necessitando de novas metodologias para confirmação da hipótese.

O fungo MD apresentou os melhores resultados e, portanto, utilizado no teste de validação. Foi constatado que ocorreu o crescimento fúngico no meio contendo MA 2%, mas não ocorreu em meio contendo apenas o BFA como fonte de carbono, uma vez que ele não apresentou os nutrientes necessários para manter seu metabolismo.

Portanto, o objetivo de obter o crescimento fúngico com meio MA2% na presença de BFA foi alcançado com sucesso e apresenta boas perspectivas. As conclusões obtidas neste trabalho permitem recomendar para pesquisas futuras a utilização de diferentes solventes para a solubilização do bisfenol A e diferentes concentrações de carbono e nitrogênio que possam afetar a tolerância ao BFA como única fonte de carbono sem que ele comprometa o crescimento fúngico no meio de cultura, além da necessitar da otimização das metodologias de seleção e análises cromatográficas para confirmação.

1. REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, W. C.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**.–4th. Ed. New York: Jhon Winley & SONS. 1996.

ALLSOP, Thomas DP et al. An ultra-sensitive aptasensor on optical fibre for the direct detection of Bisphenol A. **Biosensors and Bioelectronics**, 2019.

ASHFAQ, Muhammad et al. Occurrence and fate of bisphenol A transformation products, bisphenol A monomethyl ether and bisphenol A dimethyl ether, in wastewater treatment plants and surface water. **Journal of hazardous materials**, v. 357, p. 401-407, 2018.

ASIF, Muhammad B., et al. Impact of wastewater derived dissolved interfering compounds on growth, enzymatic activity and trace organic contaminant removal of white rot fungi–a critical review. *Journal of environmental management*, 2017, 201: 89-109.

BARRIOS-ESTRADA, Carlos et al. Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 837-844, 2018.

BRAGA, Jacqueline Ramos Machado; LOPES, Diêgo Menezes. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando Allium cepa L. como bioindicador. ***Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science***, 2015, 10.1: 130-140.

BERNARDO, Paulo Eduardo Masselli et al. Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade-Uma Revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz,** v. 74, n. 1, p. 1- 11, 2015.

BILAL, Muhammad; IQBAL, Hafiz MN; BARCELÓ, Damiá. Mitigation of bisphenol A using an array of laccase-based robust bio-catalytic cues–A review. **Science of The Total Environment,** 2019.

BONCIU, Elena, et al. An evaluation for the standardization of the Allium cepa test as cytotoxicity and genotoxicity assay. ***Caryologia***, 2018, 71.3: 191-209.

CALAFAT, Antonia M. et al. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. **Environmental health perspectives,** v. 113, n. 4, p. 391-395, 2004.

CHIANG, Ken et al. Photocatalytic degradation and mineralization of bisphenol A by TiO2 and platinized TiO2. **Elsevier,** Singapura, p.225-237, nov. 2003.

DESHMUKH, Radhika; KHARDENAVIS, Anshuman A.; PUROHIT, Hemant J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation.***Indian journal of microbiology*,** 2016, 56.3: 247-264.

DE FREITAS¹, Emanuelle N., et al. Efeito da temperatura e do pH na degradação de bisfenol A pelas lacases de Pleurotus ostreatus e Pleurotus pulmonarius, 2016.

DUQUE CASTAÑO, Diana Carolina. **Efecto de borde em mongos de un bosque atlámtico semideziduo**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso.

FERNANDEZ, Miriany Avelino Moreira et al. Study of possible association between endometriosis and phthalate and bisphenol A by biomarkers analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 2019.

FOUDA, A., et al. Biodegradation and detoxification of bisphenol-A by filamentous fungi screened from nature. *J. Adv. Biol.* ***Biotechnol*,** 2015, 2: 123-132.

FISKESJÖ, GEIRID. The Allium test as a standard in environmental monitoring.***Hereditas***, 1985, 102.1: 99-112.

FROMME, Hermann et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. **Water research**, v. 36, n. 6, p. 1429-1438, 2002.

GASSARA, Fatma et al. Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. **Chemosphere**, v. 92, n. 10, p. 1356-1360, 2013**.**

GOMES, E. B.; SILVA, R.; ROSADO, A. S.; PEREIRA JR., N. Biotreatment of diesel

waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 5, p. 1-5, 2010.

GOMES, Jennifer Vieira, et al. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the Allium cepa system.***Revista Ambiente & Água***, 2015, 10.1: 48-58.

HALLSWORTH, John E. Ethanol-induced water stress in yeast. ***Journal of fermentation and bioengineering*,** 1998, 85.2: 125-137.

HOU, Jingwei et al. Enzymatic degradation of bisphenol-A with immobilized laccase on TiO2 sol–gel coated PVDF membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 19- 30, 2014.

KAMARAJ, M.; MANJUDEVI, M.; SIVARAJ, Rajeshwari. Degradation of bisphenol a by Aspergillus Sp. isolated from tannery industry effluent.***Int. J. of Pharm. & Life Sci*,** 2012, 3.4: 1585-1589.

KANNAIYAN, Ranjani, et al. Enhancement of Dichomitus squalens tolerance to copper and copper-associated laccase activity by carbon and nitrogen sources. ***Biochemical engineering journal*,** 2012, 67: 140-147.

KANG, J.-H.; KONDO, F. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. **Archives of environmental contamination and toxicology,** v. 43, n. 3, p. 0265- 0269, 2002.

KAWA, Iram Ashaq et al. Bisphenol A (BPA) acts as an endocrine disruptor in women with Polycystic Ovary Syndrome: Hormonal and metabolic evaluation. **Obesity Medicine,** v. 14, p. 100090

KWAK, Jin Il et al. Determination of the soil hazardous concentrations of bisphenol A using the species sensitivity approach. **Journal of hazardous materials**, v. 344, p. 390-397, 2018.

KORSHIN, Gregory V.; KIM, Jaeshin; GAN, Lili. Comparative study of reactions of endocrine disruptors bisphenol A and diethylstilbestrol in electrochemical treatment and chlorination. **Water research**, v. 40, n. 5, p. 1070-1078, 2006.

MCGUIRL, M. A. & DOOLEY, D. M. Copper-containing oxidases. Curr. Opin. **Chem. Biol.** V.3, 138–144, 1999.

MICHAŁOWICZ, Jaromir. Bisphenol A–sources, toxicity andbiotransformation. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738-758,2014.

MORE, T. T., et al. Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. ***Bioresource Technology***, 2010, 101.20: 7691-7700.

NATIONAL Center for Biotechnology Information. **PubChem Database.** Bisphenol A, CID=6623, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A (accessed on June 20, 2019)

OHKUMA, Moriya et al. Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. **Riken Review**, p. 39-42, 2001.

OLAJUYIGBE, Folasade M.; ADETUYI, Oluwafijimi Y.; FATOKUN, Cornelius O. Characterization of free and immobilized laccase from Cyberlindnera fabianii and application in degradation of bisphenol A. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 856-864, 2019.

OLIVEIRA, Joana Paula Wagner; DOS SANTOS, Raíssa Nunes; BOEIRA, Jane Marlei. Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando Allium cepa e Eichhornia crassipes como bioindicadores. ***BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*,** 2012, 1.1: 15-22.

OPPENEER, Sarah J.; ROBIEN, Kim. Bisphenol A exposure and associations with obesity among adults: a critical review. **Public health nutrition**, v. 18, n. 10, p. 1847- 1863, 2015.

PALACIO, Soraya Moreno, et al. Correlation between heavy metal ions (Copper, Zinc, Lead) concentrations and root length of Allium cepa L. in polluted river water. ***Brazilian Archives of Biology and Technology*,** 2005, 48.SPE: 191-196.

PETRIE, Bruce et al. Avaliação do bisfenol-A no ciclo hidrológico urbano. **Ciência do Ambiente Total** , v. 650, p. 900-907, 2019.

PESCARA, Igor Cardoso. Ocorrência e remoção de contaminantes emergentes por tratamentos convencionais de água e esgoto. 2014. 167 f. Tese (Doutorado) **- Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,** 2014.

PIONTEK, Klaus; ANTORINI, Matteo; CHOINOWSKI, Thomas. Crystal structure of a laccase from the fungus Trametes versicolor at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37663- 37669, 2002.

QIU, Wenhui et al. The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 173, p. 192-202, 2019.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alcane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.

REZG, Raja, et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives.***Environment international*,** 2014, 64: 83-90.

RIVERA-HOYOS, Claudia M. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3-4, p. 67-82, 2013

SAAE. Sistemas de Tratamento de Água. Aracruz, v. 1, n. 1, p.1-10, jun. 2006

SANTANA, Felipe Silva de. **Isolamento de bactérias degradadoras de Bisfenol A do ambiente estuarino da Baixada Santista**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N et al. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatographytandemmass spectrometry for compliance with environmental quality standards(Directive2008/105/EC). **Journal of Chromatography** A, v.1223, p. 1–8,2012.

SANTOS, Arthur Hoffmann dos. Avaliação da remoção de Bisfenol-A em matriz aquática através de adsorção em casca de Arachis hypogaea L. 2018.

SARMA, Hemen et al. Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia isolated directly from river sediments. **Environmental Technology & Innovation,** v. 14, p.100314, 2019.

SHAN, Wenchong et al. Development of low matrix effects method for the analysis of bisphenol A and bisphenol S in aquatic products by immunoaffinity purification. **Journal of Chromatography B**, v. 1109, p. 19-24, 2019.

SHORAKAE, Soulmaz et al. The emerging role of chronic low-grade inflammation in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. In: **Seminars in reproductive medicine**. Thieme Medical Publishers, 2015. p. 257-269.

SOUZA, Angélica Vieira da Silva Bertoncello. Otimização da produção de lacase pelo fungo Trametes sp. para a biorremediação de bisfenol A em meio aquoso. 2018

TEDESCO, Solange Bosio; LAUGHINGHOUSE IV, Haywood Dail. Bioindicator of genotoxicity: the Allium cepa test. In: *Environmental contamination*. **IntechOpen**, 2012.

TUOMELA, M.; HATAKKA, A. Oxidative fungal enzymes for bioremediation. 2011.

UNESCO World Heritage Centre. World Heritage List-Iguaçu National Park. 2016. Disponible en <<http://whc.unesco.org/en/list/355>> Acesso em Junho de 2019.

UYAR, Gülsüm Ebru ÖZER; UYAR, Başar. Effects of ethanol and ultraviolet-c treatments on inactivation of Rhizopus oryzae spores which cause postharvest rot.***Food Science and Technology*,** 2018, AHEAD.

VANDENBERG, Laura N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reproductive toxicology**, v. 24, n. 2, p. 139-177, 2007.

WANG, Qing et al. Toxic effects of bisphenol A on goldfish gonad development and the possible pathway of BPA disturbance in female and male fish reproduction.**Chemosphere**, v. 221, p. 235-245, 2019

XU, Jing et al. Rapid and sensitive determination of bisphenol A using aptamer and split DNAzyme. **Chemosphere**, v. 228, p. 110-116, 2019.

YIM, Soon-Ho; KIM, Hyun Jung; LEE, Ik-Soo. Microbial metabolism of the environmental estrogen bisphenol A. ***Archives of pharmacal research***, 2003, 26.10: 805-808.

YANG, Shufan et al. Removal of bisphenol A and diclofenac by a novel fungal membrane bioreactor operated under non-sterile conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 483-490, 2013.

ZHANG, Xun et al. Searching for a bisphenol A substitute: Effects of bisphenolson catalase molecules and human red blood cells. **Science of The Total Environment,** 2019.

ZENG, Shengquan; ZHAO, Jie; XIA, Liming. Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol A with Trametes versicolor cultivated on agriculturalwastes. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 40, n. 8, p. 1237-1245,2017

.

APENDICES

APENDICE A – ENSAIO BIODEGRADABILIDADE FUNGO MD

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Comprimento de onda** | **Controle negativo** | **Replicas** | | | | **Média MD** | | **Média\*diluição** |
| **MD-A** | **MD-B** | **MD-C** |  | |  | |
| 350 | 0,8718 | -0,0871 | -0,0955 | -0,1183 | -0,11 | | -0,21 | |
| 349 | 1,4232 | -0,088 | -0,0977 | -0,1197 | -0,11 | | -0,22 | |
| 348 | 0,4658 | -0,0891 | -0,0993 | -0,1213 | -0,11 | | -0,22 | |
| 347 | 0,301 | -0,0897 | -0,1009 | -0,1225 | -0,11 | | -0,22 | |
| 346 | 0,6435 | -0,0904 | -0,1024 | -0,1237 | -0,11 | | -0,23 | |
| 345 | -0,6368 | -0,0918 | -0,1049 | -0,1254 | -0,12 | | -0,23 | |
| 344 | -0,368 | -0,0917 | -0,1058 | -0,1259 | -0,12 | | -0,23 | |
| 343 | 0,699 | -0,092 | -0,107 | -0,1265 | -0,12 | | -0,23 | |
| 342 | 4 | -0,0923 | -0,1082 | -0,1277 | -0,12 | | -0,24 | |
| 341 | 4 | -0,0926 | -0,1097 | -0,1283 | -0,12 | | -0,24 | |
| 340 | 4 | -0,0925 | -0,1107 | -0,1282 | -0,12 | | -0,24 | |
| 339 | -0,291 | -0,0924 | -0,1125 | -0,1291 | -0,12 | | -0,24 | |
| 338 | -0,3617 | -0,0924 | -0,1136 | -0,1294 | -0,12 | | -0,24 | |
| 337 | -0,6021 | -0,0919 | -0,1136 | -0,13 | -0,12 | | -0,24 | |
| 336 | -0,2576 | -0,0916 | -0,1143 | -0,1299 | -0,12 | | -0,24 | |
| 335 | -0,9294 | -0,0904 | -0,114 | -0,1293 | -0,12 | | -0,24 | |
| 334 | -1 | -0,0895 | -0,1129 | -0,1289 | -0,12 | | -0,24 | |
| 333 | -0,8311 | -0,0886 | -0,1127 | -0,1289 | -0,12 | | -0,24 | |
| 332 | -0,1761 | -0,0873 | -0,1117 | -0,128 | -0,12 | | -0,24 | |
| 331 | -0,6128 | -0,0863 | -0,1114 | -0,1278 | -0,12 | | -0,24 | |
| 330 | -0,1903 | -0,0847 | -0,1097 | -0,1267 | -0,12 | | -0,24 | |
| 329 | -0,331 | -0,0828 | -0,108 | -0,1266 | -0,12 | | -0,23 | |
| 328 | -0,1481 | -0,0812 | -0,1055 | -0,1256 | -0,12 | | -0,23 | |
| 327 | -0,1174 | -0,0806 | -0,1045 | -0,1261 | -0,12 | | -0,23 | |
| 326 | -0,2817 | -0,0799 | -0,1025 | -0,125 | -0,11 | | -0,23 | |
| 325 | -0,055 | -0,0769 | -0,1001 | -0,1241 | -0,11 | | -0,22 | |
| 324 | -0,2632 | -0,0764 | -0,0987 | -0,1245 | -0,11 | | -0,22 | |
| 323 | -0,4416 | -0,0752 | -0,0977 | -0,124 | -0,11 | | -0,22 | |
| 322 | -0,403 | -0,0748 | -0,0961 | -0,1242 | -0,11 | | -0,22 | |
| 321 | -0,3358 | -0,0753 | -0,0951 | -0,1246 | -0,11 | | -0,22 | |
| 320 | -0,3324 | -0,0751 | -0,0941 | -0,1254 | -0,11 | | -0,22 | |
| 319 | -0,2609 | -0,076 | -0,0945 | -0,127 | -0,11 | | -0,22 | |
| 318 | -0,3378 | -0,0764 | -0,0935 | -0,1279 | -0,11 | | -0,22 | |
| 317 | -0,5071 | -0,077 | -0,0934 | -0,1293 | -0,11 | | -0,22 | |
| 316 | -0,4658 | -0,0774 | -0,0923 | -0,13 | -0,11 | | -0,22 | |
| 315 | 4 | -0,0781 | -0,0933 | -0,1325 | -0,11 | | -0,23 | |
| 314 | -0,9823 | -0,0794 | -0,0928 | -0,1328 | -0,11 | | -0,23 | |
| 313 | 4 | -0,08 | -0,0924 | -0,1342 | -0,11 | | -0,23 | |
| 312 | 4 | -0,0845 | -0,0958 | -0,1379 | -0,12 | | -0,23 | |
| 311 | -0,989 | -0,0858 | -0,0976 | -0,1389 | -0,12 | | -0,24 | |
| 310 | -0,699 | -0,0906 | -0,1019 | -0,1448 | -0,12 | | -0,25 | |
| 309 | -0,6651 | -0,0957 | -0,1045 | -0,1494 | -0,13 | | -0,25 | |
| 308 | -0,5229 | -0,0995 | -0,1067 | -0,1527 | -0,13 | | -0,26 | |
| 307 | -0,8451 | -0,1058 | -0,1124 | -0,1576 | -0,14 | | -0,27 | |
| 306 | -0,8653 | -0,1117 | -0,1189 | -0,1643 | -0,14 | | -0,28 | |
| 305 | 4 | -0,1187 | -0,1261 | -0,1713 | -0,15 | | -0,30 | |
| 304 | 4 | -0,1238 | -0,134 | -0,1773 | -0,16 | | -0,31 | |
| 303 | 4 | -0,1322 | -0,1392 | -0,1838 | -0,16 | | -0,32 | |
| 302 | 4 | -0,1411 | -0,1482 | -0,193 | -0,17 | | -0,34 | |
| 301 | 4 | -0,1482 | -0,1567 | -0,1977 | -0,18 | | -0,35 | |
| 300 | -0,7677 | -0,159 | -0,167 | -0,2077 | -0,19 | | -0,37 | |
| 299 | -0,8129 | -0,1695 | -0,1791 | -0,2163 | -0,20 | | -0,40 | |
| 298 | 4 | -0,1829 | -0,1927 | -0,2295 | -0,21 | | -0,42 | |
| 297 | 4 | -0,197 | -0,2094 | -0,2426 | -0,23 | | -0,45 | |
| 296 | 4 | -0,2083 | -0,2191 | -0,2511 | -0,24 | | -0,47 | |
| 295 | -0,5836 | -0,2189 | -0,2381 | -0,2652 | -0,25 | | -0,50 | |
| 294 | -0,3358 | -0,2365 | -0,2565 | -0,2808 | -0,27 | | -0,54 | |
| 293 | -0,7304 | -0,2498 | -0,2736 | -0,2926 | -0,28 | | -0,57 | |
| 292 | -0,1439 | -0,265 | -0,2942 | -0,3052 | -0,30 | | -0,60 | |
| 291 | -0,273 | -0,2739 | -0,3078 | -0,3143 | -0,31 | | -0,62 | |
| 290 | -0,2888 | -0,2943 | -0,3345 | -0,3345 | -0,33 | | -0,67 | |
| 289 | -0,3774 | -0,308 | -0,3523 | -0,3411 | -0,35 | | -0,69 | |
| 288 | -0,9031 | -0,3231 | -0,3672 | -0,3501 | -0,36 | | -0,72 | |
| 287 | -0,1761 | -0,3448 | -0,3891 | -0,3626 | -0,38 | | -0,75 | |
| 286 | -0,2863 | -0,3726 | -0,415 | -0,3794 | -0,40 | | -0,79 | |
| 285 | -0,3823 | -0,3937 | -0,4376 | -0,3979 | -0,42 | | -0,84 | |
| 284 | -0,757 | -0,4442 | -0,4848 | -0,4425 | -0,46 | | -0,93 | |
| 283 | -0,5714 | -0,466 | -0,5161 | -0,4629 | -0,49 | | -0,98 | |
| 282 | -1 | -0,499 | -0,5441 | -0,4914 | -0,52 | | -1,04 | |
| 281 | -0,6864 | -0,5426 | -0,5899 | -0,5322 | -0,56 | | -1,12 | |
| 280 | -0,7347 | -0,5881 | -0,6364 | -0,5826 | -0,61 | | -1,22 | |
| 279 | -1 | -0,6172 | -0,664 | -0,6084 | -0,64 | | -1,27 | |
| 278 | 4 | -0,6563 | -0,6994 | -0,6415 | -0,67 | | -1,34 | |
| 277 | 4 | -0,7102 | -0,753 | -0,6857 | -0,72 | | -1,44 | |
| 276 | 4 | -0,7662 | -0,8122 | -0,7406 | -0,78 | | -1,55 | |
| 275 | 4 | -0,843 | -0,8891 | -0,8157 | -0,85 | | -1,70 | |
| 274 | 4 | -0,8313 | -0,8869 | -0,8126 | -0,85 | | -1,70 | |
| 273 | 4 | -0,8584 | -0,9152 | -0,8356 | -0,88 | | -1,75 | |
| 272 | 4 | -0,8556 | -0,9114 | -0,84 | -0,88 | | -1,75 | |
| 271 | 4 | -0,9431 | -0,9942 | -0,9253 | -0,96 | | -1,92 | |
| 270 | 4 | -0,9408 | -0,9968 | -0,9264 | -0,96 | | -1,92 | |
| 269 | 4 | -0,9762 | -1 | -0,9561 | -0,98 | | -1,96 | |
| 268 | 4 | -1 | -1 | -0,9948 | -1,00 | | -1,99 | |
| 267 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 266 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 265 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 264 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 263 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 262 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 261 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 260 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 259 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 258 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 257 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 256 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 255 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 254 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 253 | -0,6628 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 252 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 251 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 250 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 249 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 248 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 247 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 246 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 245 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 244 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 243 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 242 | 4 | -1 | -1 | -1 | -1,00 | | -2,00 | |
| 241 | 4 | -0,9532 | -1 | -0,9586 | -0,98 | | -1,96 | |
| 240 | 4 | -0,9097 | -1 | -0,9031 | -0,95 | | -1,90 | |
| 239 | 4 | -0,8347 | -0,9618 | -0,8212 | -0,89 | | -1,78 | |
| 238 | 4 | -0,7621 | -0,8994 | -0,7413 | -0,82 | | -1,64 | |
| 237 | 4 | -0,7039 | -0,8385 | -0,669 | -0,75 | | -1,51 | |
| 236 | 4 | -0,6354 | -0,7571 | -0,576 | -0,67 | | -1,33 | |
| 235 | 1,0969 | -0,5056 | -0,6331 | -0,4195 | -0,53 | | -1,05 | |
| 234 | 4 | -0,4036 | -0,5446 | -0,3071 | -0,43 | | -0,85 | |
| 233 | 4 | -0,2926 | -0,4513 | -0,2109 | -0,33 | | -0,66 | |
| 232 | 4 | -0,301 | -0,4448 | -0,2295 | -0,34 | | -0,67 | |
| 231 | 4 | -0,0635 | -0,2266 | 0,0334 | -0,10 | | -0,19 | |
| 230 | 4 | -0,0585 | -0,2235 | -0,0042 | -0,11 | | -0,23 | |
| 229 | -0,7871 | 0,0313 | -0,138 | 0,0233 | -0,06 | | -0,11 | |
| 228 | -0,4472 | 0,1549 | -0,0592 | 0,0421 | -0,01 | | -0,02 | |
| 227 | -0,4861 | 0,0701 | -0,083 | 0,0569 | -0,01 | | -0,03 | |
| 226 | -0,9445 | 0,1573 | -0,0848 | 0,0263 | -0,03 | | -0,06 | |
| 225 | 4 | 0,2592 | -0,092 | 0,0463 | -0,02 | | -0,05 | |
| 224 | 4 | 0,3496 | -0,0051 | 0,137 | 0,07 | | 0,13 | |
| 223 | 4 | 0,4102 | -0,0458 | 0,1331 | 0,04 | | 0,09 | |
| 222 | 4 | 0,4393 | -0,0438 | 0,0272 | -0,01 | | -0,02 | |
| 221 | 4 | 0,3979 | 0,0827 | 0,049 | 0,07 | | 0,13 | |
| 220 | 4 | 0,3076 | -0,0313 | 0,1101 | 0,04 | | 0,08 | |
| 219 | 4 | 0,3332 | -0,0512 | -0,03 | -0,04 | | -0,08 | |
| 218 | 4 | 0,8062 | 0,1434 | 0,1627 | 0,15 | | 0,31 | |
| 217 | 4 | 0,5952 | 0,0918 | 0,1761 | 0,13 | | 0,27 | |
| 216 | 4 | 0,7847 | 0,1018 | 0,2028 | 0,15 | | 0,30 | |
| 215 | 4 | 0,9031 | 0,2239 | 0,2775 | 0,25 | | 0,50 | |
| 214 | 4 | 1,3617 | 0,1399 | 0,1487 | 0,14 | | 0,29 | |
| 213 | 4 | 1,1584 | 0,1498 | 0,1671 | 0,16 | | 0,32 | |
| 212 | 4 | 1,5798 | 0,2576 | 0,3245 | 0,29 | | 0,58 | |
| 211 | 0,6601 | 1,2368 | 0,2706 | 0,2825 | 0,28 | | 0,55 | |
| 210 | 4 | 0,5509 | 0,1434 | 0,2264 | 0,18 | | 0,37 | |
| 209 | 0,9031 | 0,9322 | 0,0941 | 0,4241 | 0,26 | | 0,52 | |
| 208 | 4 | 0,7721 | 0,1031 | 0,295 | 0,20 | | 0,40 | |
| 207 | 0,5898 | 1,0731 | 0,1189 | 0,3461 | 0,23 | | 0,47 | |
| 206 | 0,8751 | 0,8513 | 0,2178 | 0,4895 | 0,35 | | 0,71 | |
| 205 | 4 | 1,1271 | 0,235 | 0,4111 | 0,32 | | 0,65 | |
| 204 | 4 | 0,6368 | 0,1502 | 0,3216 | 0,24 | | 0,47 | |
| 203 | 1,2041 | 4 | 0,1833 | 0,2668 | 0,23 | | 0,45 | |
| 202 | 4 | 0,5708 | 0,2028 | 0,5956 | 0,40 | | 0,80 | |
| 201 | 4 | 4 | 0,3158 | 0,3158 | 0,32 | | 0,63 | |
| 200 | 4 | 1,0334 | 0,2553 | 0,2272 | 0,24 | | 0,48 | |
| 199 | 4 | 4 | 0,4075 | 0,4409 | 0,42 | | 0,85 | |
| 198 | 4 | 4 | 0,2188 | 0,7782 | 0,50 | | 1,00 | |
| 197 | 4 | 4 | 0,301 | 0,359 | 0,33 | | 0,66 | |
| 196 | 4 | 4 | 0,2452 | 0,4523 | 0,35 | | 0,70 | |
| 195 | 4 | 4 | 0,1091 | 0,2775 | 0,19 | | 0,39 | |
| 194 | 4 | 4 | 0,3222 | 0,3445 | 0,33 | | 0,67 | |
| 193 | 4 | 4 | 0,1761 | 0,3724 | 0,27 | | 0,55 | |
| 192 | 4 | 4 | 0,0738 | 0,1829 | 0,13 | | 0,26 | |
| 191 | 4 | 4 | 0,2863 | 0,2319 | 0,26 | | 0,52 | |
| 190 | 4 | 4 | 0,5027 | 0,4649 | 0,48 | | 0,97 | |

APENDICE B – ENSAIO BIODEGRADABILIDADE FUNGO EL

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Comprimento de onda** | **Controle negativo** | **Replicas** | | | | **Média EL** | | **Média\*diluição** |
| **EL-A** | **EL-B** | **EL-C** |  | |  | |
| 350 | 0,8 | 0,0524 | 0,0524 | 0,1808 | 0,12 | | 0,23 | |
| 349 | 1,4 | 0,0522 | 0,0522 | 0,1818 | 0,12 | | 0,23 | |
| 348 | 0,46 | 0,0513 | 0,0513 | 0,1817 | 0,12 | | 0,23 | |
| 347 | 0,301 | 0,0518 | 0,0518 | 0,1829 | 0,12 | | 0,23 | |
| 346 | 0,64 | 0,0516 | 0,0516 | 0,1822 | 0,12 | | 0,23 | |
| 345 | 0 | 0,0513 | 0,0513 | 0,1842 | 0,12 | | 0,24 | |
| 344 | 0 | 0,0513 | 0,0513 | 0,1835 | 0,12 | | 0,23 | |
| 343 | 0,69 | 0,0504 | 0,0504 | 0,1836 | 0,12 | | 0,23 | |
| 342 | 4 | 0,0503 | 0,0503 | 0,1844 | 0,12 | | 0,23 | |
| 341 | 4 | 0,0493 | 0,0493 | 0,1846 | 0,12 | | 0,23 | |
| 340 | 4 | 0,0515 | 0,0515 | 0,1841 | 0,12 | | 0,24 | |
| 339 | 0 | 0,0531 | 0,0531 | 0,1823 | 0,12 | | 0,24 | |
| 338 | 0 | 0,0533 | 0,0533 | 0,182 | 0,12 | | 0,24 | |
| 337 | 0 | 0,0525 | 0,0525 | 0,1811 | 0,12 | | 0,23 | |
| 336 | 0 | 0,0527 | 0,0527 | 0,1785 | 0,12 | | 0,23 | |
| 335 | 0 | 0,0542 | 0,0542 | 0,178 | 0,12 | | 0,23 | |
| 334 | 0 | 0,0553 | 0,0553 | 0,1773 | 0,12 | | 0,23 | |
| 333 | 0 | 0,0556 | 0,0556 | 0,1785 | 0,12 | | 0,23 | |
| 332 | 0 | 0,0587 | 0,0587 | 0,1777 | 0,12 | | 0,24 | |
| 331 | 0 | 0,0581 | 0,0581 | 0,1789 | 0,12 | | 0,24 | |
| 330 | 0 | 0,0582 | 0,0582 | 0,1785 | 0,12 | | 0,24 | |
| 329 | 0 | 0,0598 | 0,0598 | 0,1784 | 0,12 | | 0,24 | |
| 328 | 0 | 0,0613 | 0,0613 | 0,1779 | 0,12 | | 0,24 | |
| 327 | 0 | 0,0593 | 0,0593 | 0,1794 | 0,12 | | 0,24 | |
| 326 | 0 | 0,0633 | 0,0633 | 0,1762 | 0,12 | | 0,24 | |
| 325 | 0 | 0,064 | 0,064 | 0,1732 | 0,12 | | 0,24 | |
| 324 | 0 | 0,063 | 0,063 | 0,1735 | 0,12 | | 0,24 | |
| 323 | 0 | 0,0653 | 0,0653 | 0,1753 | 0,12 | | 0,24 | |
| 322 | 0 | 0,0641 | 0,0641 | 0,1746 | 0,12 | | 0,24 | |
| 321 | 0 | 0,0654 | 0,0654 | 0,1701 | 0,12 | | 0,24 | |
| 320 | 0 | 0,0713 | 0,0713 | 0,1692 | 0,12 | | 0,24 | |
| 319 | 0 | 0,0669 | 0,0669 | 0,1701 | 0,12 | | 0,24 | |
| 318 | 0 | 0,0673 | 0,0673 | 0,1723 | 0,12 | | 0,24 | |
| 317 | 0 | 0,0663 | 0,0663 | 0,1654 | 0,12 | | 0,23 | |
| 316 | 0 | 0,0674 | 0,0674 | 0,1643 | 0,12 | | 0,23 | |
| 315 | 4 | 0,0718 | 0,0718 | 0,1714 | 0,12 | | 0,24 | |
| 314 | 0 | 0,0715 | 0,0715 | 0,165 | 0,12 | | 0,24 | |
| 313 | 4 | 0,0672 | 0,0672 | 0,1643 | 0,12 | | 0,23 | |
| 312 | 4 | 0,0694 | 0,0694 | 0,1621 | 0,12 | | 0,23 | |
| 311 | 0 | 0,0649 | 0,0649 | 0,1635 | 0,11 | | 0,23 | |
| 310 | 0 | 0,0612 | 0,0612 | 0,1587 | 0,11 | | 0,22 | |
| 309 | 0 | 0,0618 | 0,0618 | 0,1565 | 0,11 | | 0,22 | |
| 308 | 0 | 0,0585 | 0,0585 | 0,1579 | 0,11 | | 0,22 | |
| 307 | 0 | 0,0647 | 0,0647 | 0,1532 | 0,11 | | 0,22 | |
| 306 | 0 | 0,0604 | 0,0604 | 0,1467 | 0,10 | | 0,21 | |
| 305 | 4 | 0,062 | 0,062 | 0,1456 | 0,10 | | 0,21 | |
| 304 | 4 | 0,0668 | 0,0668 | 0,1415 | 0,10 | | 0,21 | |
| 303 | 4 | 0,0538 | 0,0538 | 0,1362 | 0,10 | | 0,19 | |
| 302 | 4 | 0,0476 | 0,0476 | 0,1262 | 0,09 | | 0,17 | |
| 301 | 4 | 0,0458 | 0,0458 | 0,1264 | 0,09 | | 0,17 | |
| 300 | 0 | 0,0475 | 0,0475 | 0,1122 | 0,08 | | 0,16 | |
| 299 | 0 | 0,0453 | 0,0453 | 0,0981 | 0,07 | | 0,14 | |
| 298 | 4 | 0,0225 | 0,0225 | 0,104 | 0,06 | | 0,13 | |
| 297 | 4 | 0,0186 | 0,0186 | 0,0966 | 0,06 | | 0,12 | |
| 296 | 4 | 0,0156 | 0,0156 | 0,0854 | 0,05 | | 0,10 | |
| 295 | 0 | 0,0226 | 0,0226 | 0,0759 | 0,05 | | 0,10 | |
| 294 | 0 | 0,0037 | 0,0037 | 0,0631 | 0,03 | | 0,07 | |
| 293 | 0 | 0,0064 | 0,0064 | 0,0579 | 0,03 | | 0,06 | |
| 292 | 0 | 0,0008 | 0,0008 | 0,0477 | 0,02 | | 0,05 | |
| 291 | 0 | -0,0055 | -0,0055 | 0,0378 | 0,02 | | 0,03 | |
| 290 | 0 | -0,0169 | -0,0169 | 0,0444 | 0,01 | | 0,03 | |
| 289 | 0 | 0,0097 | 0,0097 | 0,0557 | 0,03 | | 0,07 | |
| 288 | 0 | 0,0245 | 0,0245 | 0,0352 | 0,03 | | 0,06 | |
| 287 | 0 | 0,0047 | 0,0047 | 0,0272 | 0,02 | | 0,03 | |
| 286 | 0 | -0,01 | -0,01 | 0,0303 | 0,01 | | 0,02 | |
| 285 | 0 | -0,0117 | -0,0117 | 0,0316 | 0,01 | | 0,02 | |
| 284 | 0 | -0,0056 | -0,0056 | 0,0551 | 0,02 | | 0,05 | |
| 283 | 0 | -0,0281 | -0,0281 | 0,0136 | -0,01 | | -0,01 | |
| 282 | 0 | -0,0257 | -0,0257 | 0,0363 | 0,01 | | 0,01 | |
| 281 | 0 | -0,0208 | -0,0208 | 0,0014 | -0,01 | | -0,02 | |
| 280 | 0 | -0,0162 | -0,0162 | 0,0131 | 0,00 | | 0,00 | |
| 279 | 0 | -0,0044 | -0,0044 | 0,0223 | 0,01 | | 0,02 | |
| 278 | 4 | 0 | 0 | 0,0265 | 0,01 | | 0,03 | |
| 277 | 4 | -0,0047 | -0,0047 | 0,012 | 0,00 | | 0,01 | |
| 276 | 4 | 0,0061 | 0,0061 | 0,0015 | 0,00 | | 0,01 | |
| 275 | 4 | 0,0246 | 0,0246 | 0,0122 | 0,02 | | 0,04 | |
| 274 | 4 | 0,0078 | 0,0078 | -0,0015 | 0,00 | | 0,01 | |
| 273 | 4 | 0,029 | 0,029 | 0,0121 | 0,02 | | 0,04 | |
| 272 | 4 | 0,0142 | 0,0142 | -0,0059 | 0,00 | | 0,01 | |
| 271 | 4 | 0,0252 | 0,0252 | -0,0045 | 0,01 | | 0,02 | |
| 270 | 4 | 0,0439 | 0,0439 | -0,0122 | 0,02 | | 0,04 | |
| 269 | 4 | 0,0033 | 0,0033 | -0,0156 | -0,01 | | -0,01 | |
| 268 | 4 | -0,0033 | -0,0033 | -0,0122 | -0,01 | | -0,02 | |
| 267 | 4 | 0 | 0 | -0,0079 | 0,00 | | -0,01 | |
| 266 | 4 | -0,0128 | -0,0128 | -0,0194 | -0,02 | | -0,03 | |
| 265 | 4 | -0,0082 | -0,0082 | -0,0105 | -0,01 | | -0,02 | |
| 264 | 4 | -0,0228 | -0,0228 | 0,0015 | -0,01 | | -0,02 | |
| 263 | 4 | -0,0255 | -0,0255 | 0,0015 | -0,01 | | -0,02 | |
| 262 | 4 | -0,0247 | -0,0247 | 0,0031 | -0,01 | | -0,02 | |
| 261 | 4 | -0,0281 | -0,0281 | 0,0251 | 0,00 | | 0,00 | |
| 260 | 4 | -0,0235 | -0,0235 | 0,0201 | 0,00 | | 0,00 | |
| 259 | 4 | -0,0499 | -0,0499 | 0,0093 | -0,02 | | -0,04 | |
| 258 | 4 | -0,0278 | -0,0278 | 0,0261 | 0,00 | | 0,00 | |
| 257 | 4 | -0,0451 | -0,0451 | 0,0047 | -0,02 | | -0,04 | |
| 256 | 4 | -0,0378 | -0,0378 | 0,0047 | -0,02 | | -0,03 | |
| 255 | 4 | -0,0386 | -0,0386 | 0,003 | -0,02 | | -0,04 | |
| 254 | 4 | -0,0077 | -0,0077 | 0,0119 | 0,00 | | 0,00 | |
| 253 | 0 | -0,0167 | -0,0167 | -0,003 | -0,01 | | -0,02 | |
| 252 | 4 | -0,0105 | -0,0105 | 0,0182 | 0,00 | | 0,01 | |
| 251 | 4 | -0,0273 | -0,0273 | 0,0289 | 0,00 | | 0,00 | |
| 250 | 4 | -0,0245 | -0,0245 | 0,0338 | 0,00 | | 0,01 | |
| 249 | 4 | -0,0062 | -0,0062 | 0,0031 | 0,00 | | 0,00 | |
| 248 | 4 | -0,0124 | -0,0124 | 0,0062 | 0,00 | | -0,01 | |
| 247 | 4 | -0,0094 | -0,0094 | 0,0231 | 0,01 | | 0,01 | |
| 246 | 4 | 0,0144 | 0,0144 | -0,003 | 0,01 | | 0,01 | |
| 245 | 4 | 0,0079 | 0,0079 | 0,0031 | 0,01 | | 0,01 | |
| 244 | 4 | 0,0224 | 0,0224 | 0,0442 | 0,03 | | 0,07 | |
| 243 | 4 | 0,0194 | 0,0194 | 0,044 | 0,03 | | 0,06 | |
| 242 | 4 | 0,0136 | 0,0136 | 0,0517 | 0,03 | | 0,07 | |
| 241 | 4 | 0,0267 | 0,0267 | 0,049 | 0,04 | | 0,08 | |
| 240 | 4 | 0,0206 | 0,0206 | 0,0732 | 0,05 | | 0,09 | |
| 239 | 4 | 0,0356 | 0,0356 | 0,0763 | 0,06 | | 0,11 | |
| 238 | 4 | 0,0306 | 0,0306 | 0,0554 | 0,04 | | 0,09 | |
| 237 | 4 | 0,0392 | 0,0392 | 0,0761 | 0,06 | | 0,12 | |
| 236 | 4 | 0,0667 | 0,0667 | 0,0675 | 0,07 | | 0,13 | |
| 235 | 1,09 | 0,0513 | 0,0513 | 0,0576 | 0,05 | | 0,11 | |
| 234 | 4 | 0,042 | 0,042 | 0,0419 | 0,04 | | 0,08 | |
| 233 | 4 | 0,0585 | 0,0585 | 0,0371 | 0,05 | | 0,10 | |
| 232 | 4 | 0,0344 | 0,0344 | 0,071 | 0,05 | | 0,11 | |
| 231 | 4 | 0,0112 | 0,0112 | 0,0662 | 0,04 | | 0,08 | |
| 230 | 4 | 0,0387 | 0,0387 | 0,0531 | 0,05 | | 0,09 | |
| 229 | 0 | 0,0599 | 0,0599 | 0,0352 | 0,05 | | 0,10 | |
| 228 | 0 | 0,0592 | 0,0592 | 0,0545 | 0,06 | | 0,11 | |
| 227 | 0 | 0,0611 | 0,0611 | 0,0378 | 0,05 | | 0,10 | |
| 226 | 0 | 0,0635 | 0,0635 | 0,0375 | 0,05 | | 0,10 | |
| 225 | 4 | 0,0834 | 0,0834 | 0,0259 | 0,05 | | 0,11 | |
| 224 | 4 | 0,0744 | 0,0744 | 0,0293 | 0,05 | | 0,10 | |
| 223 | 4 | 0,1076 | 0,1076 | 0,0201 | 0,06 | | 0,13 | |
| 222 | 4 | 0,0628 | 0,0628 | 0,0443 | 0,05 | | 0,11 | |
| 221 | 4 | 0,1046 | 0,1046 | 0,092 | 0,10 | | 0,20 | |
| 220 | 4 | 0,0683 | 0,0683 | 0,0598 | 0,06 | | 0,13 | |
| 219 | 4 | 0,0539 | 0,0539 | 0,0526 | 0,05 | | 0,11 | |
| 218 | 4 | 0,0297 | 0,0297 | 0,0742 | 0,05 | | 0,10 | |
| 217 | 4 | 0,0292 | 0,0292 | 0,0811 | 0,06 | | 0,11 | |
| 216 | 4 | 0,0681 | 0,0681 | 0,0614 | 0,06 | | 0,13 | |
| 215 | 4 | 0 | 0 | 0,0645 | 0,03 | | 0,06 | |
| 214 | 4 | 0,0337 | 0,0337 | 0,0507 | 0,04 | | 0,08 | |
| 213 | 4 | -0,0075 | -0,0075 | 0,0134 | 0,00 | | 0,01 | |
| 212 | 4 | 0,0244 | 0,0244 | 0,0249 | 0,02 | | 0,05 | |
| 211 | 0,66 | 0,0351 | 0,0351 | 0,0354 | 0,04 | | 0,07 | |
| 210 | 4 | 0,0675 | 0,0675 | 0,0414 | 0,05 | | 0,11 | |
| 209 | 0,9 | 0,05 | 0,05 | 0,0018 | 0,03 | | 0,05 | |
| 208 | 4 | 0,023 | 0,023 | -0,0073 | 0,01 | | 0,02 | |
| 207 | 0,58 | 0,0368 | 0,0368 | -0,0017 | 0,02 | | 0,04 | |
| 206 | 0,87 | 0,0528 | 0,0528 | -0,0071 | 0,02 | | 0,05 | |
| 205 | 4 | 0,0081 | 0,0081 | 0,0165 | 0,01 | | 0,02 | |
| 204 | 4 | -0,019 | -0,019 | -0,0017 | -0,01 | | -0,02 | |
| 203 | 1,2 | 0,0019 | 0,0019 | 0,0356 | 0,02 | | 0,04 | |
| 202 | 4 | -0,0039 | -0,0039 | 0,0018 | 0,00 | | 0,00 | |
| 201 | 4 | -0,0019 | -0,0019 | 0,0198 | 0,01 | | 0,02 | |
| 200 | 4 | -0,006 | -0,006 | 0,0298 | 0,01 | | 0,02 | |
| 199 | 4 | -0,038 | -0,038 | 0,0378 | 0,00 | | 0,00 | |
| 198 | 4 | -0,0059 | -0,0059 | 0,0018 | 0,00 | | 0,00 | |
| 197 | 4 | -0,0176 | -0,0176 | 0,0202 | 0,00 | | 0,00 | |
| 196 | 4 | 0,0144 | 0,0144 | -0,0018 | 0,01 | | 0,01 | |
| 195 | 4 | 0,0287 | 0,0287 | -0,0053 | 0,01 | | 0,02 | |
| 194 | 4 | 0,0294 | 0,0294 | 0,0073 | 0,02 | | 0,04 | |
| 193 | 4 | 0,0715 | 0,0715 | 0,0204 | 0,05 | | 0,09 | |
| 192 | 4 | 0,0499 | 0,0499 | 0,0269 | 0,04 | | 0,08 | |
| 191 | 4 | 0,0303 | 0,0303 | 0,0214 | 0,03 | | 0,05 | |
| 190 | 4 | 0,0209 | 0,0209 | -0,0073 | 0,01 | | 0,01 | |