

Análise do Comportamento Metabólico do Fungo *Aspergillus niger* na Presença de Metais Pesados Via ANOVA-PCA

Analysis of the Metabolic Behavior of the Fungus Aspergillus niger in the Presence of Heavy Metals Via ANOVA-PCA

Camylle de O. C. da Silva,^a  Licarion Pinto,^b Hellen P. da C. Marques,^a Simone Y. S. Silva,^a 
Marilene N. Oliveira,^a  Patrícia S. B. Marinho,^c  Andrey M. do R. Marinho,^c Ulisses B. Albino,^a 
Sebastião da C. Silva^{a,*} 

^a Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas, CEP 68505-080, Marabá-PA, Brasil

^b Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Instituto de Química, CEP 20550-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

^c Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, CEP 66075-110, Belém-PA, Brasil

*E-mail: simotesilva@unifesspa.edu.br

Recebido: 28 de Setembro de 2023

Aceito: 5 de Julho de 2024

Publicado online: 16 de Julho de 2024

Fungi of the *Aspergillus* genus have stood out for being very promising in the discovery of metabolites with biological activities. The *Aspergillus niger* species is one of the most important microorganisms used in biotechnology, as it allows the production of various compounds for use in industries, presenting a positive biomedical impact, in addition to being resistant to toxic substances, such as metals. In this context, the present work aimed to evaluate the variation in the chemical profile of the species *Aspergillus niger*, via ANOVA-PCA, in a culture medium rich in heavy metals (lead and copper). Initially, an experiment was carried out, varying the cultivation medium (DB (Potato and Dextrose) and Czapeck), concentrations of 0 and 300 ppm of metals, and aeration mode (dynamic and static). Then, a new cultivation was carried out, varying only the concentrations of lead metal (0, 300, 500, and 1000 ppm), in dynamic and static modes and DB medium, for 12 days. The fungal extracts were analyzed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and these data were statistically treated by the ANOVA-PCA method. It was possible to verify that the metals copper and lead did not have a significant influence on the metabolites production of the fungal strain *Aspergillus niger*.

Keywords: Fungi; heavy metal; chemometrics.

1. Introdução

Segundo Silva *et al.*,¹ alguns fungos isolados de áreas de mineração são considerados resistentes a altas concentrações de metais pesados, indicando que os mesmos possuem adaptações fisiológicas que o auxiliam a tolerar a grande concentração destes, no meio em que estão.

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* têm apresentado excelentes propriedades mecânicas de seus micélios, boas taxas de crescimento em concentrações elevadas de metais pesados e elevada capacidade de remover metais pesados do ambiente, levando-os a ser considerados uma potente ferramenta para utilização em processos de biorremediação.²⁻⁵

O fungo *Aspergillus niger* é um dos microrganismos mais utilizados na biotecnologia, pois permite uma produção diversa de produtos com utilização em diferentes tipos de indústrias.⁶ Este fungo exibe notável capacidade metabólica permitindo o crescimento em grande variedade de substratos sob diferentes condições ambientais, além de apresentar capacidade de adaptação e resistência a compostos tóxicos.⁷ Os principais compostos produzidos por esta espécie são enzimas como amilase, glucose oxidase, catalase e ácidos orgânicos como ácido cítrico, ácido glucônico e outros.⁸⁻⁹

Vários estudos vêm sendo realizados, com a perspectiva de avaliar o desenvolvimento e produção de novos compostos de fungos cultivados em meio rico em metais pesados. Os gêneros *Aspergillus*, *Thielavia* e *Penicillium* apresentaram resistência a altas concentrações de nitrato de chumbo, sendo que, para as linhagens do gênero *Aspergillus* todas apresentaram crescimento vegetativo, esporulação e pigmentação dos conídios.¹⁰ Fill *et al.*, (2020) isolaram pela primeira vez uma série de ciclodepsipeptídeos do fungo *P. brasilianum* cultivado em meio de cultura contendo o metal cobre, além de observarem a inibição da produção da verruculogen, composto presente no cultivo do fungo sem a presença do metal.¹¹⁻¹²

Como alternativas tecnológicas para a descoberta de produtos naturais, as análises de pequenas quantidades de compostos presentes em extratos brutos para triagem biológica se

tornaram factíveis devido ao aumento na sensibilidade e na faixa linear dinâmica de algumas plataformas analíticas.¹³⁻¹⁴

O uso de técnicas sensíveis para o isolamento, identificação e a previsão sofisticada de estruturas utilizando ressonância magnética nuclear (RMN) e combinação de ferramentas analíticas, tais como: CLAE-DAD, CLAE-EM ou CG-EM, vem sendo muito utilizada pois oferecem perspectivas para a descoberta de novos metabolitos.¹⁵ Os desafios associados ao uso de tais técnicas em misturas complexas, como produtos naturais, podem ser superados por estratégias emergentes: a metabolômica, que faz o manejo de misturas e utiliza o poder da estatística multivariada para identificar rapidamente biomarcadores.¹⁶

A análise de dados é uma parte muito importante em todo experimento. Atualmente, a análise de dados estatística multivariada está sendo introduzida no tratamento de dados químicos, tendo uma grande popularidade e originando uma nova disciplina, chamada de Quimiometria. Essa análise utiliza a correlação entre muitas variáveis simultaneamente analisadas, extraindo uma quantidade maior de informação.¹⁷

Os métodos quimiométricos estão divididos em dois grupos: os métodos supervisionados e os métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões. Esses métodos são utilizados para identificar as semelhanças e diferenças em diversos tipos de amostras, para agrupá-las e classificá-las.¹⁸

O uso de ferramentas estatísticas para determinar o que diferencia um grupo de amostras das demais, assim como para selecionar os compostos que mais discriminam as amostras, é importante. Outra ferramenta estatística utilizada é a análise de variância (ANOVA), que é utilizada para avaliar se existe diferença significativa entre as classes de amostras. Um método denominado ANOVA-PCA, que consiste na combinação das vantagens estatísticas da ANOVA com as vantagens da PCA para estudar a covariação entre variáveis, vem sendo muito aplicado nas análises dos resultados.¹⁹

O método ANOVA-PCA procura comparar a variabilidade entre grupos associadas a cada fator de um planejamento experimental e depois usa uma análise de componentes principais para avaliar a significância de cada fator, comparando as variações correspondentes ao erro residual. Diante disto, neste trabalho foi utilizado este método para avaliar de que forma a presença dos metais chumbo e cobre afetam no perfil químico do fungo *Aspergillus niger*, quando cultivado em meio de cultura contendo estes metais.

2. Experimental

A linhagem fúngica *Aspergillus niger* utilizada neste estudo foi isolada do rejeito de área de mineração de cobre da empresa mineradora Vale S.A da Mina do Sossego, localizada no município de Canaã dos Carajás, Estado do Pará. Após o isolamento, a linhagem foi armazenada em água estéril, em tubos com meio de cultivo e sob refrigeração²⁰⁻²¹

na micoteca da Faculdade de Química na Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará-UNIFESSPA.

Para reativação da espécie, utilizou-se o meio de cultura sólido BDA (batata, dextrose e ágar), previamente esterilizado em autoclave (Prismatec CS-14190) por 20 minutos na temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

Posteriormente, o meio foi vertido em placa de Petri com diâmetro de 8,0 cm na capela de fluxo laminar (Veco CFLH-09) previamente esterilizada com álcool 70% e com luz ultravioleta. Com o auxílio de uma alça metálica, discos de micélio foram inoculados nas placas de Petri, então as placas foram incubadas em estufa de crescimento tipo B.O.D (Cientec CT-705.330) a 35 °C por sete dias. Após o período de desenvolvimento inicial do fungo, foi realizado o repique da linhagem para novas placas de Petri contendo meio BDA e foram incubadas por mais 7 dias até seu total desenvolvimento.

2.1. Planejamento experimental

Um planejamento experimental 2³, ou seja, com 3 variáveis e dois níveis: concentração do íon metálico (0 ppm e 300 ppm), meios de cultivo BD (Batata e Dextrose) e Czapeck e aeração (estático e dinâmico) foi realizado em triplicata (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis utilizadas no planejamento experimental, para preparação dos extratos fúngicos.

	Variáveis	(-1)	(+1)
1	Concentração metal	0	300
2	Meio de cultivo	BD	Czapeck
3	Aeração	Estático	Dinâmico

2.2. Cultivo da linhagem fúngica nos meios líquidos BD e Czapeck na concentração de 300 ppm dos metais chumbo e cobre

A linhagem fúngica foi cultivada em dois meios de cultura líquidos: BD (Batata e Dextrose) e Czapeck.

O meio BD foi preparado em dois Erlenmeyer de 2000 mL, onde cada um continha 1350 mL. Posteriormente, os frascos contendo o meio de cultura foram levados para esterilização em autoclave por 20 minutos na temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

No preparo do meio de cultura Czapeck, foram pesados 5,4 g de nitrato de sódio (NaNO₃, CRQ), 0,9 g de cloreto de potássio (KCl, Dinâmica), 0,9 g de fosfato de potássio (K₂HPO₄, CRQ), 0,018 g de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O, CRQ), 0,9 g sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O, Impex), 54,0 g de glicose (C₆H₁₂O₆, Neon) e 38,0 g extrato de levedura (Kasvi). Os sais foram dissolvidos em 1800 mL de água destilada em um Erlenmeyer de 2000 mL, e foram levados para esterilização em autoclave por 20 minutos na temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

Foram preparadas soluções metálicas de cobre e chumbo na concentração de 300 ppm utilizando-se sais sulfato de cobre II (CuSO_4 , Dinâmica) e nitrato de chumbo II ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Dinâmica). Os experimentos foram realizados em aeração estática na bancada e dinâmica na Incubadora Shaker (Solab, SL-223), todos em triplicata.

2.3. Extração e obtenção dos extratos de chumbo e cobre

Após o período de desenvolvimento do fungo, adicionou-se acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, Dinâmica) em cada Erlenmeyer, para extrair os metabólitos secretados pelo fungo. Após 24 h, foi realizada uma filtração à vácuo com auxílio de papel filtro e funil de Büchner. Da fase líquida, foi realizada a partição líquido-líquido com acetato de etila, em funil de separação, em triplicata.

O micélio fúngico foi seco na estufa de secagem (Quimis, Q317M-22) e depois foi realizada a extração com etanol 99% (absoluto) e mantido em repouso por 24 h. Após esse tempo, foi realizada uma filtração a vácuo. Este processo foi realizado em triplicata.

As soluções acetato de etila e etanólica foram concentradas em evaporador rotativo (Quimis, Q344B1), obtendo-se 53 extratos de acetato de etila e 53 extratos etanólicos. Após secagem e pesagem, as amostras foram analisadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

2.4. Cultivo da linhagem fúngica nos meios líquidos BD e Czapeck nas concentrações de 300, 500 e 1000 ppm do metal chumbo

Os meios de cultura BD e Czapeck foram preparados seguindo a metodologia usada na etapa anterior. A distribuição do meio e das soluções de metais foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, obtendo-se um volume total de 100 mL de meio de cultura com ou sem metal, em cada Erlenmeyer. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os frascos de Erlenmeyer contendo o meio BD foram armazenados na bancada em modo estático e os contendo Czapeck em modo dinâmico na Incubadora Shaker (Solab, SL-223), por um período de 12 dias.

2.5. Extração e obtenção dos extratos de chumbo

Após o período de desenvolvimento do fungo, foi realizada a extração e obtenção dos extratos. Obteve-se 24 extratos de acetato de etila e 24 extratos etanólico, em seguida foram levados para secagem. Posteriormente as amostras foram analisadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

2.6. Análise do perfil químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para as análises no CLAE-DAD (SHIMADZU

LC-20AP), as amostras foram preparadas na concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e foram transferidas para vials (1,5 mL). Foi utilizada uma coluna RP Kinetex C18 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A fase móvel utilizada foi água ultrapura (solvente A) e metanol (solvente B) (grau HPLC Tedia) utilizando-se um gradiente linear: 0-5 min (30% B), 30-50 min (80% B), 60 min (100% B), 61-65 min (30% B) com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os cromatogramas foram alinhados usando o algoritmo icoshift e a qualidade do alinhamento foi atestado por inspeção visual dos picos mais intensos.²¹

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do método ANOVA-PCA. A modelagem foi feita ao realizar uma PCA na matriz de resíduos. A matriz de resíduos foi calculada de acordo com estudos anteriores²³ e já divulgado em outros trabalhos da equipe, inclusive com o algoritmo usado para o cálculo da matriz de resíduos.²²⁻²³ O cálculo da PCA foi realizado no Chemometrics web app para redução de dimensionalidade.²⁴

A ANOVA-PCA permite a discriminação entre os níveis de um planejamento de experimentos realizando uma análise de PCA. De forma resumida, é possível avaliar se há uma diferença significativa entre os níveis usando os escores de PCA com os limites calculados pelo T2 de Hotelling, e o sinal referente a diferença dessa separação são apresentados no gráfico de pesos. Assim, diferente de um planejamento de experimentos tradicional em que se analisa uma resposta por vez, é possível estudar a significância de um fator usando todo um perfil cromatográfico, o que é mais interessante do ponto de vista metabolômico. Mais detalhes sobre a ANOVA-PCA podem ser encontrados nos trabalhos de Harrington e Herrera.²³⁻²⁴

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise do perfil químico das amostras nas concentrações de 0 e 300 ppm de chumbo e cobre

Nos resultados obtidos pode-se perceber uma diferença mínima no tempo de retenção dos picos das amostras ao sobrepor os picos das 106 amostras analisadas.

A Figura 1 (A, B e C), mostra uma correlação em 2D de PC1 e PC2, PC1 e PC3, PC2 e PC3, respectivamente, com intervalos de confiança que são representados por dois círculos: círculo vermelho que representa o intervalo de confiança das amostras com cobre e o círculo azul das amostras com chumbo.

Nas correlações citadas, observa-se que as amostras estão agrupadas e que não há diferença significativa entre elas, e também que apenas algumas amostras passam dos limites de intervalos, mas que não tem muita significância, ou seja, a diferença dos metais não está influenciando na produção dos metabólitos.

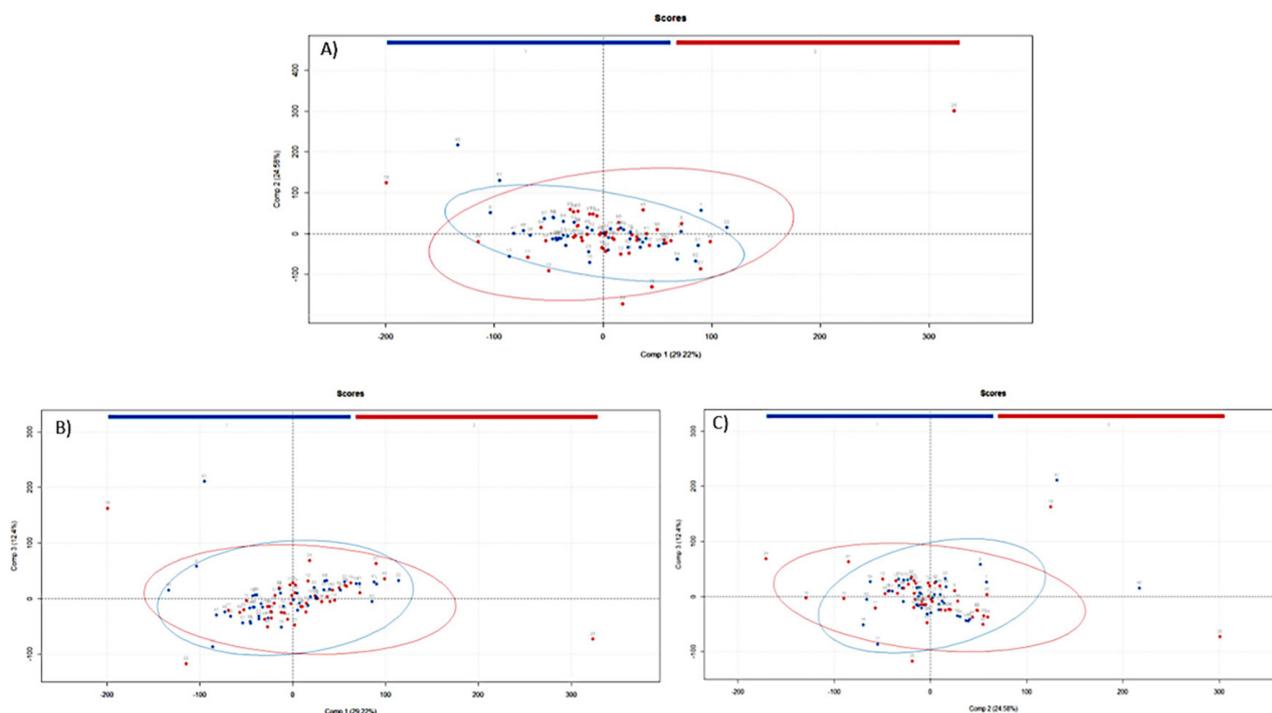


Figura 1. Análise de influência dos metais em 2D, correlacionando PC1 com PC2, PC1 com PC3 e PC2 com PC3 das amostras com os metais Cu e Pb. (Amostras em azul são amostras que contém cobre e amostras em vermelho são amostra que contém chumbo)

A Figura 2, representa a análise da concentração dos metais, onde as marcações vermelhas representam as amostras com concentração de 300 ppm dos íons metálicos Cu e Pb, e as marcações azuis representam as amostras controle (sem metal). Observou-se que não há diferença significativa no tempo de retenção. Porém, ao rotacionar o gráfico no software percebe-se uma tendência de separação em relação as concentrações, isso pode ser devido a alguma

interferência de temperatura do ambiente onde foi realizado o cultivo ou ao estresse ocasionado na concentração do metal (300 ppm).

Na análise do meio de cultivo, ilustrado na Figura 3, observa-se uma grande diferença em relação ao meio de cultura, sendo que, no meio BD (Batata e Dextrose), pode-se observar que as amostras estão mais distantes, demonstrando uma tendência maior de separação, algumas amostras estão

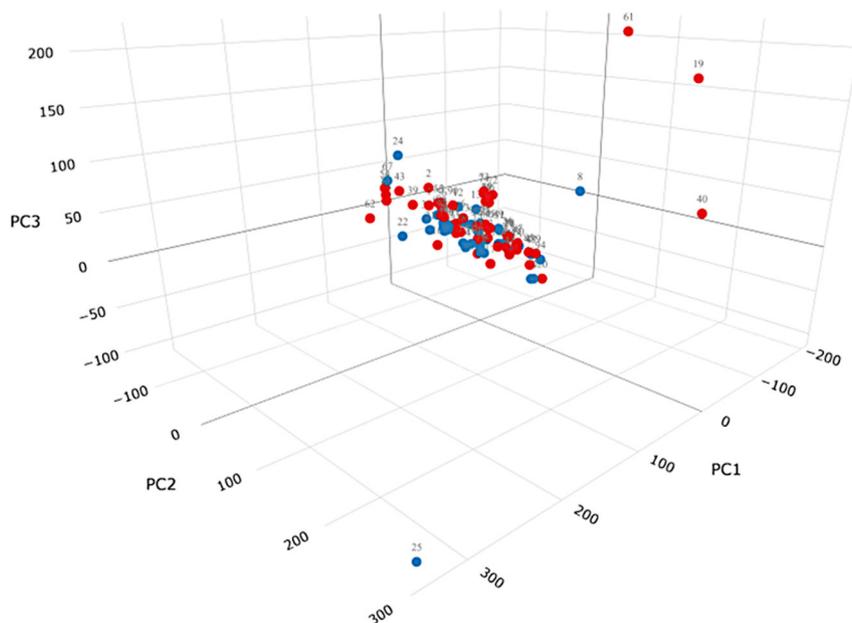


Figura 2. Análise PC1, PC2 e PC3 em 3D das concentrações 0 e 300 ppm dos metais cobre (Cu) e chumbo (Pb) (Bolinhas azuis representam amostras que não contém metais e as em vermelho que contém 300ppm de metal)

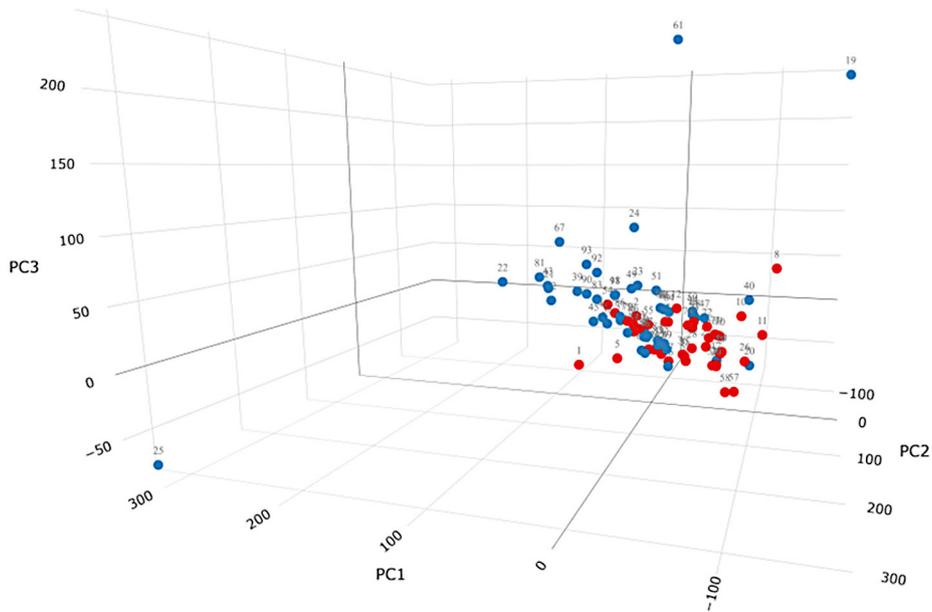


Figura 3. Análise PC1, PC2 e PC3 em 3D dos meios de cultivo BD (Batata e Dextrose) e Czapeak (Bolinhas azuis representam meio de cultivo BD e as em vermelho o meio Czapeak)

sobrepostas a outras, isso significa que elas têm o perfil químico semelhante.

Na Figura 4, temos a análise de 2D de PC1 e PC3, onde observa-se que as análises das amostras do meio Czapeak apresentam-se mais dispersas, enquanto o meio BD se encontra mais aglomerado.

Esperava-se uma produção diferente de metabólitos devido os meios de cultura possuírem composições distintas. Porém, a produção de metabólitos entre os dois meios de cultivos, foram semelhantes, sendo foi observada diferença apenas na quantidade de metabólitos produzidos entre os dois meios, pois no Czapeak a produção de metabólitos foi

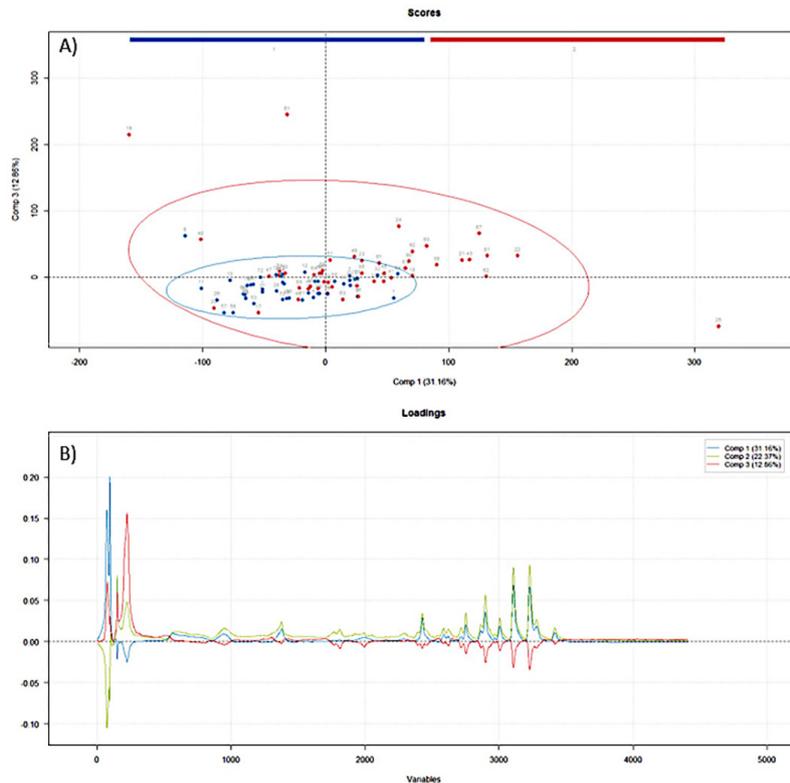


Figura 4. A) Análise PC1 e PC3 em 2D dos meios de cultivo BD (Batata e Dextrose) e Czapeak (Bolinhas azuis representam meio de cultivo BD e as em vermelho o meio Czapeak) e B) análise de Loadings

maior que no meio BD, indicando que existe uma diferença significativa entre eles.

Diante disto foi necessário a análise de *loadings* (Figura 4B), onde se obteve um cromatograma com informações das variáveis para uma determinada amostra. Sendo assim, analisou-se as 106 amostras em conjunto. Comparando-se PC1 e PC3 (Figura 4B), observou-se que eles têm informações parecidas. Os picos situados à direita indicam que há uma quantidade maior das amostras que estão do lado direito do gráfico da figura 4B. O pico em vermelho, situado à esquerda, significa uma quantidade maior das amostras que estão fora do intervalo de confiança, por exemplo, as amostras 19 e 61 (Figura 4A), portanto o meio ideal de cultivo seria o meio Czapeck.

Em relação a aeração estática e dinâmica representadas

na Figura 5, pode-se perceber que as amostras do modo dinâmico estão mais dispersas e as amostras no modo estático estão mais concentradas (Figura 6).

Na análise em 2D, verificou-se que, no modo estático algumas amostras estão concentradas no centro, e no dinâmico as amostras estão mais dispersas e a produção de metabólitos é maior pois há maior dispersão nos escores destas amostras. Isso indica uma maior produção do perfil metabólico, como ilustrado na Figura 6B, podendo inferir que a aeração dinâmica proporciona uma maior abundância de metabólitos em relação ao estático, porém os metabólitos ficam muito dispersos. Já no estático a quantidade é menor, porém os metabólitos ficam mais concentrados. Até o momento não foi identificada nenhuma produção de metabólito diferente nos dois modos.

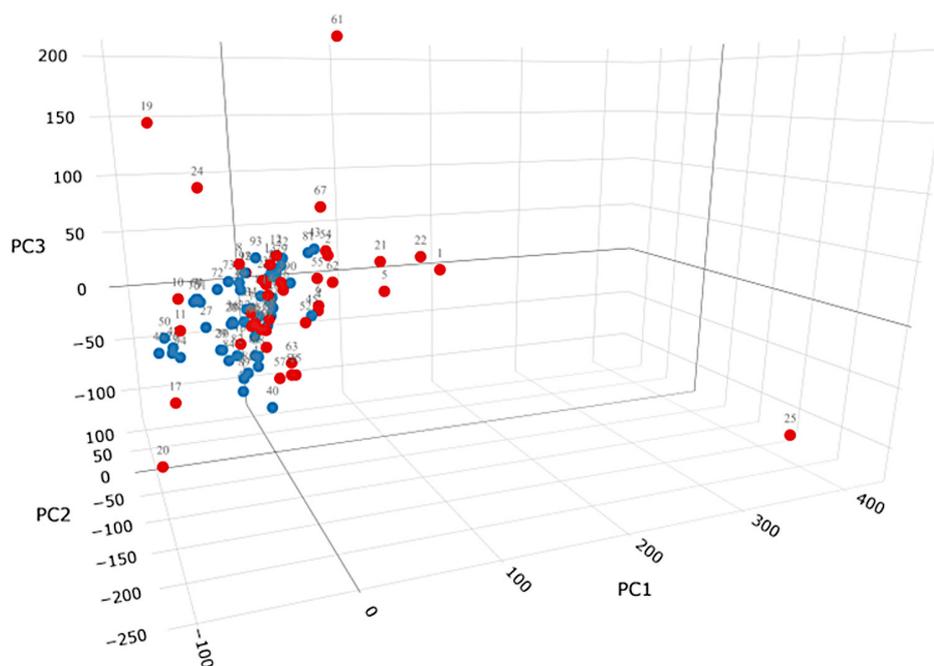


Figura 5. Análise PC1, PC2 e PC3 em 3D em relação a aeração dinâmica e estática. (Bolinhas azuis representam amostras na aeração estática e as em vermelho aeração dinâmica)

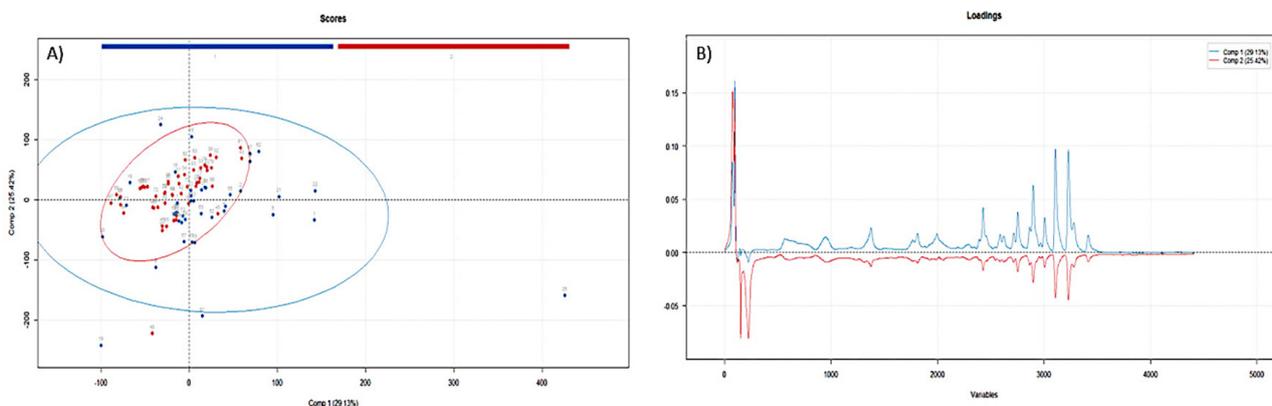


Figura 6. A) Análise PC1 e PC2 em 2D da aeração estática e dinâmica (Bolinhas azuis representam aeração no modo dinâmica e as em vermelho aeração no modo estática) e B) Análise de Loadings

3.2. Análise do perfil químico das amostras nas concentrações de 0, 300, 500 e 1000 ppm de chumbo

Após as análises do cultivo com os metais cobre e chumbo, foi realizado um novo cultivo utilizando apenas o metal chumbo, no meio Czapeck (aeração dinâmica) e no meio BD (aeração estática), variando as concentrações do metal em 0, 300, 500 e 1000 ppm, a fim de verificar se essas concentrações têm influência sobre a produção de metabólitos.

Na Figura 7 estão representados os cromatogramas das 36 amostras sobrepostos referente a variação da concentração dos metais. Os cromatogramas em azul são referentes às amostras que não contém metal. Neles, é possível observar que há uma maior produção de metabólitos. Os cromatogramas em os verdes são referentes

às amostras que contém 300ppm de chumbo, tendo apenas dois picos em maior intensidade, supondo que sejam os picos principais dessas amostras nestas condições. Os cromatogramas em vermelho e preto são referentes às amostras com 500 e 1000 ppm de chumbo, respectivamente. Observou-se que ocorreu uma supressão dos metabólitos produzidos, indicando que nessas duas concentrações tem uma quantidade de produção de metabólitos bem menor.

Nas análises em 2D, correlacionando PC1 e PC2, e 3D ilustradas nas Figuras 8 A e B, observam-se 4 limites de intervalos para cada concentração (Vermelho: 0; Azul: 300; Verde: 500; e Lilás: 1000 ppm). No gráfico, pode-se notar que quando a concentração de chumbo é 0 os metabólitos ficam mais dispersos, ou seja, tem uma quantidade maior de metabólitos, o que realmente foi observado no cromatograma da Figura 7. O limite de intervalo de 300 ppm

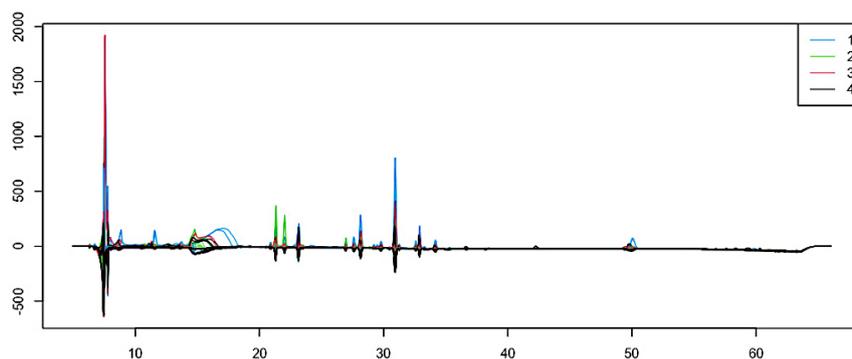


Figura 7. Cromatogramas de 36 amostras contendo 300, 500 e 1000 ppm do metal chumbo sobrepostos no comprimento de onda de 240 nm

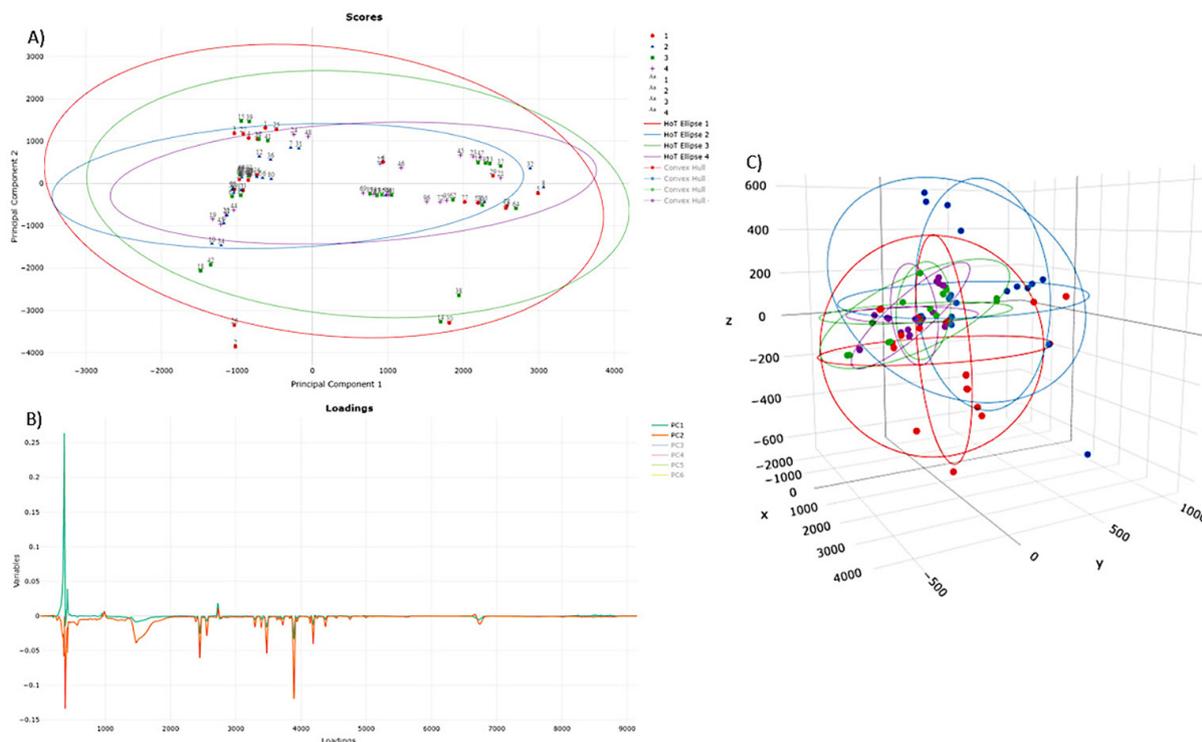


Figura 8. A) Análise PC1 e PC2, em 2D das concentrações do metal chumbo (pontos vermelhos representam a concentração do metal 0, azul de 300 ppm, verde de 500 ppm e lilás de 1000 ppm), B) Análise de Loadings e C) Análise em 3D de PC1, PC2 e PC3

está semelhante com o de 1000 ppm, porém mais deslocado, podendo ser inferido a produção em maior quantidade de alguns metabólitos específicos, na concentração de 300 ppm, que neste caso são os dois picos mais intensos, observado no cromatograma anterior, de cor azul.

Nota-se que os limites de intervalos vão ficando um dentro do outro, isso indica que não está ocorrendo produção de metabólitos diferentes, pois se houvesse os limites de intervalo estariam espalhados, mas nesse caso indica apenas a diminuição de produção deles de acordo com o aumento da concentração do metal. Quando se analisa os compostos que influenciaram nessa diminuição, é possível observar que os compostos produzidos são bem parecidos, analisando tanto na horizontal quanto na vertical no gráfico de loadings, indicando que a influência obtida nessa redução foi de todos os compostos e não de algum específico.

4. Conclusões

No estudo do perfil químico dos extratos enriquecidos com metais obtidos a partir do cultivo do fungo *Aspergillus niger*, foi possível observar que os metais Cu e Pb não tiveram influência significativa na produção de metabólitos da linhagem fúngica *Aspergillus niger*.

Observou-se que as amostras que não contêm metal têm uma maior abundância de metabólitos, enquanto na concentração de 300 ppm de chumbo, a produção de metabólitos já é menor. Nas concentrações de 500 ppm e 1000 ppm de chumbo, ocorre uma supressão dos metabólitos produzidos, indicando apenas que ocorre diminuição de produção de metabólitos de acordo com o aumento da concentração dos metais.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e a empresa VALE pelo auxílio financeiro.

Contribuições dos Autores

Camylle de Oliveira Carvalho da Silva: Mestranda responsável pela Investigação; Licarion Pinto: Pesquisador responsável pelo Software e análise quimiométrica; Hellen Patrícia da Costa Marques: Mestranda responsável pela Investigação; Simone Yasue Simote Silva: Pesquisadora contribui com as análises cromatográficas e redação; Marilene Nunes Oliveira: Pesquisadora colaborou com a Análise formal; Patrícia Santana Barbosa Marinho: Pesquisadora colaborou com recursos; Andrey Moacir do Rosário Marinho: Pesquisador colaborou com recursos; Ulisses Brigatto Albino: Pesquisador contribuiu com a

redação; Sebastião da Cruz Silva: Pesquisador responsável pela Administração do projeto, metodologia e supervisão.

Referências Bibliográficas

1. Silva, R. F.; Antonioli, Z. I.; Andrezza, R.; Junior, C. O. M.; Resumo do XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Gramado-RS, Brasil, 2007.
2. Aquino, S. F.; Brandt, E. M. F.; Chernicharo, C. A. L.; Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária Ambiental* 2013, 18, 187. [Crossref]
3. Andrade, J. D. A.; Augusto, F.; Jardim, I. C. S. F.; Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química* 2010, 35, 17. [Crossref]
4. Tonini, R. M. C. W.; De Rezende, C. E.; Grativol, A. D.; Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis* 2010, 14, 110. [Link]
5. Javaid, A.; Bajwa, R.; Javaid, A.; Biosorption of heavy metals using a dead macrofungus *Schizophyllum commune* fries: evaluation of equilibrium and kinetic models. *Pakistan Journal of Botany* 2010, 42, 2105. [Link]
6. Prakash, R.; Jha, S. N.; Basics of the Genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany* 2014, 4, 26. [Link]
7. Wang, L.; Mizaikoff, B.; Kranz, C.; Quantification of sugar mixtures with near-infrared Raman spectroscopy and multivariate data analysis. A quantitative analysis laboratory experiment. *Journal of Chemical Education* 2009, 86, 1322. [Crossref] [PubMed]
8. Bennett, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. Em *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* Norfolk; Machida, M.; Gomi, K., eds.; Publisher: Caister Academic Press 2010, Ch. 1.
9. Demain, A. L.; Velasco, J.; Adrio, J. L.; Industrial Mycology: Past, Present and Future. In: *Handbook of Industrial Mycology*, 1ª ed., Marcel Dekker: New York, 2005. [Crossref]
10. Braun, A.; Silva, A.; Visentin, C.; Thomé, A.; Biorremediação como alternativa de tratamento de solos contaminados com metais tóxicos. *Revista CIATEC – UPF* 2019, 11, 73. [Link]
11. Alves, M. A. P. M.S.; Silva, S. C.; Silva, S. Y. S.; Junior, J. B. P.; Marinho, P. S. B.; Dantas, K. G. F.; Mota, S. A.; Amaral, J. C.; da Silva, M. F. G. F.; Oliveira, M. N.; Biosorption Potential of the *Aspergillus* sp. and Insights into Secondary Metabolism in the Presence of Copper and Lead. *Journal Brazilian Chemical Society* 2020, 31, 574. [Crossref]
12. Fill, T. P.; Pallini, H. F.; Amaral, L. S.; Silva, J. V.; Bidóia, D. L.; Peron, F.; Garcia, F. P.; Nakamura, C. V.; Rodrigues-Filho, E.; Copper and Manganese Cations Alter Secondary Metabolism in the Fungus *Penicillium brasilianum*. *Journal Brazilian Chemical Society* 2016, 27, 1444. [Crossref]
13. Campos, J., F.; Dos Santos, U., P.; Rocha, P. S.; Damião, M. J.; Balestieri, J. B. P.; Cardoso, C. A.; Paredes-Gamero, E. J.; Estevinho, L. M.; Souza, K. P.; Dos Santos, E. L.; Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jatai).

- Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015, 2015, 296186. [[Crossref](#)]
14. Campos, J. F.; Espindola, P. P. T.; Torquato, H. F. V.; Vital, W. D.; Justo, G. Z.; Silva, D. B.; Carollo, C. A.; Souza, K. P.; Paredes-Gamero, E. J.; Dos Santos, E. L.; Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. *Frontiers in Pharmacology* 2017, 8, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 15. Pilona, A. C.; Selegato, D. M.; Fernandes, R. P.; Bueno, P. C. P.; Pinho, D. R.; Neto, F. C.; Freire, R. T.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Metabolômica de plantas: Métodos e Desafios. *Química Nova* 2020, 43, 329-354. [[Crossref](#)]
 16. Casagrande, J. C.; Macorini, L. F.; Antunes, K. A.; Santos, U. P.; Campos, J. F.; Dias-Júnior, N. M.; Sangalli, A.; Lima Cardoso, C. A.; Do Carmo Vieira, M.; Rabelo, L. A.; Paredes-Gamero, E. J.; Dos Santos, E. L.; De Picoli Souza, K.; Antioxidant and Cytotoxic Activity of Hydroethanolic Extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. *PLoS One* 2014, 9, e112748. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 17. Sena, M. M. D.; Poppi, R. J.; Frighetto, R. T.; Valarini, P. J.; Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova* 2000, 23, 547. [[Crossref](#)]
 18. Ferreira, M. M. C.; *Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações*, 1ª ed., Editora Unicamp: Campinas, 2015. [[Crossref](#)]
 19. Sarembaud, J.; Pinto, R.; Rutledge, D. N.; Feinberg, M.; Application of the ANOVA-PCA method to stability studies of reference materials. *Analytica Chimica Acta* 2007, 603, 147. [[Crossref](#)]
 20. Castellani, A.; Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1967, 70, 181. [[Link](#)]
 21. Martins, I.; Silva, J. B. T. da; Mello, S. C. M. de.; Efeito de quatro diferentes métodos de preservação sobre o crescimento e a viabilidade de fungos agentes de controle biológico. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 88). [[Link](#)]
 22. Häckl, M.; Tauber, P.; Schweda, F.; Zacharias, H. U.; Altenbuchinger, M.; Oefner, P. J.; Gronwald, W.; An R-Package for the Deconvolution and Integration of 1D NMR Data: MetaboDecon1D. *Metabolites* 2021, 11, 452. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 23. Harrington, P. B.; Vieira, N. E.; Espinoza, J.; Nien, J. K.; Romero, R.; Yergey, A. L.; Analysis of variance-principal component analysis: A soft tool for proteomic discovery. *Analytica Chimica Acta* 2005, 544, 118. [[Crossref](#)]
 24. Herrera, J. G.; Ramos, M. P.; Albuquerque, B. N. L.; Aguiar, J. C. R. O. F.; Neto, A. C. A.; Paiva, P. M. G.; Navarro, D. M. A. F.; Pinto, L.; Multivariate evaluation of process parameters to obtain essential oil of *Piper corcovadensis* using supercritical fluid extraction. *Microchemical Journal* 2022, 181, 107747. [[PubMed](#)]
 25. Darzé, B. C.; Lima, I. C. A.; Luna, A. S.; Pinto, L.; Chemometrics web app's part 2: Dimensionality reduction and exploratory analysis Chemometrics and Intelligent. *Laboratory Systems* 2023, 15, 104810. [[PubMed](#)]