



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

RAUL FELIPE NEVES CAVALCANTI

ANÁLISE SECRETÔMICA DE *Aspergillus terreus* DURANTE A
BIODEGRADAÇÃO DE ANTRACENO

Recife, 2015



RAUL FELIPE NEVES CAVALCANTI

**ANÁLISE SECRETÔMICA DE *Aspergillus terreus* DURANTE A
BIODEGRADAÇÃO DE ANTRACENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos de Interesse Industrial

Mestrando: Raul Felipe Neves Cavalcanti

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Recife, 2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Cavalcanti, Raul Felipe Neves
Análise secretômica de *Aspergillus terreus* durante a biodegradação de antraceno /
Raul Felipe Neves Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2015.

80 f.: il.

Orientador: Norma Buarque de Gusmão, Tercilio Calsa Júnior
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos,
2015.

Inclui referências

1. Fungos 2. Enzimas de fungos 3. Proteínas 4. Hidrocarbonetos I.
Gusmão, Norma Buarque de (orient.) II. Calsa Júnior, Tercilio
(coorient.) III. Título.

579.5
196

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-

Recife, 2015

RAUL FELIPE NEVES CAVALCANTI

**ANÁLISE SECRETÔMICA DE *Aspergillus terreus* DURANTE A BIODEGRADAÇÃO DE
ANTRACENO**

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Norma Buarque de Gusmão (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior (Co-orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos (Titular)
Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Edelvio de Barros Gomes (Titular)
Instituto Federal da Bahia

Recife, 2015

Dedico à minha família, aos meus amigos e a todos que me ajudaram nesses dois anos de muita luta e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

À Deus sobre todas as coisas e por tudo.

À minha família que tanto me aturou e me ajudou nessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela oportunidade de convivência com grandes doutores e profissionais e de conhecimento.

À minha turma, que nem nos meus sonhos imaginaria uma turma como essa. Moram todos no meu coração.

Aos meus orientadores pelo norteamento e crescimento profissional durante esses dois anos. Foi um grande aprendizado com os senhores.

Aos amigos do Departamento de Antibióticos, dos Laboratórios de Genômica e Proteômica de Plantas- LGPP e de Microbiologia Ambiental e Industrial LAMAI pela amizade, ajuda, descontração, almoços, cafezinhos, e tudo de positivo a mim depositado. S2 pra vocês.

Aos amigos da vida fora das grades da universidade pelas alegrias e escape de tanta pressão sobre mim. Tamo junto!

Às Centrais Analíticas do Departamento de Química Fundamental- DQF/UFPE e do Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste- CETENE, pelas análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massas, respectivamente.

Em resumo, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

PEDRAS NO CAMINHO

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida
é a maior empresa do mundo...

E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
se tornar um autor da própria história...

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da
sua alma...

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “Não”!!!

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta...

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

(adaptado do texto “Palco da vida” de Fernando Pessoa).

RESUMO

Os fungos filamentosos são micro-organismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por possuírem um versátil sistema enzimático. Essas enzimas são responsáveis pela quebra de moléculas complexas como a lignina e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos-HPAs como o antraceno. Os primeiros passos da biodegradação de HPAs ocorrem fora da célula fúngica, ou seja, as enzimas e os metabólitos que auxiliam nesse processo- como os biosurfactantes- são excretados ao meio externo. O presente trabalho teve como objetivo estudar a degradação do antraceno e as características dos secretomas dos fungos que apresentaram os maiores percentuais de degradação. Dos 20 fungos utilizados, foram selecionados os que apresentaram os menores tempos de degradação do antraceno, indicados pela viragem do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol da coloração azul para incolor. A seguir, foram realizados os testes de degradação em caldo Büshnell Haas, utilizando *Cunninghamella elegans* e *Aspergillus terreus*. Perante os resultados de degradação obtidos por cromatografia gasosa, foi demonstrado que a *C. elegans* SIS41 não degradou o antraceno e o *A. terreus*, capaz de biodegradar 3,0% do HPA presente no meio suplementado com traços de sais e que, para tal, não há produção de biosurfactantes. O material metabolizado e secretado pelo fungo durante 10 e 20 dias, não mostrou toxicidade para a germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas de *Phaseolus vulgaris*, apresentando porcentagem de germinação de 100%; e 70,79% de crescimento radicular, resultando num índice final de germinação igual a 79,63. As atividades enzimáticas do complexo lignolítico foram de 1012 U/L para a MnP, 184 U/L para a LiP e 207,5 U/L para a lacase. A prospecção das proteínas presentes no meio de cultura foi realizada através de solução metanólica de acetato de amônio, sendo obtido o material proteico, porém, metabólitos no secretoma influenciaram negativamente na focalização isoelétrica dos peptídeos, não sendo possível a análise de géis SDS-2D-PAGE. Na espectrometria de massas, foram sequenciadas 36 proteínas, sendo 7 identificadas pela plataforma do *Mascot*. As proteínas com significância estatística apresentaram desde funções catalíticas à de reconhecimento genética dos fungos.

Palavras-chave: Proteínas. Fungos. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.

ABSTRACT

Filamentous fungi are microorganisms able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons by having a versatile enzyme system. These enzyme systems are responsible for the breakdown of complex molecules such as lignin and PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons) such as anthracene. The first step of biodegradation of PAHs occurs outside of the fungal cell, ie: enzymes and metabolites act in this process-like biosurfactantes- that are secreted to the external medium. This study aimed to determine the anthracene degradation and characteristics of secretomes of fungi that showed the best performance in degradation process, and the probable phytotoxicity of the produced biomaterials. A total of 20 fungi were used, and the isolates that showed the lowest levels of anthracene degradation times were selected for further analyses. The efficiency of anthracene degradation was determined by the turn of the redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol blue color to colorless method. The degradation tests were performed in Bushnell-Haas broth using *Cunninghamella elegans* and *Aspergillus terreus*, and the decreases in anthracene concentration were quantified by gas chromatography (GC). *C. elegans* SIS41 did not degrade anthracene. In contrast, *A. terreus* was able to biodegrade 3.0% PAH present in the medium supplemented with salts, but not producing biosurfactants. The materials metabolized and secreted by the fungus for 20 days did not show toxicity to the seed germination and development of *Phaseolus vulgaris*, showing percentage of 100% germination; and 70.79% of root growth, resulting in a final germination rate of 79.63. The enzymatic activity of the lignolytic complex were 1012 U.L⁻¹ to MnP, 184 U.L⁻¹ to LiP and 207.5 U.L⁻¹ for the laccase. The prospection of proteins present in the medium carried out through the methanolic solution of ammonium acetate, resulting in precipitated protein extract. Metabolites in secretome influenced negatively the isoelectric focusing process of the peptides, turning not possible to obtain 2D-SDS-PAGE gels with enough quality for analyses of differential expression. However, using 1D PAGE analysis, 36 proteins were analyzed by mass spectrometry, and seven of them were identified by Mascot platform. The identified proteins were related to catalytic functions from the genetic recognition of fungi.

Keywords: Proteins. Fungus. Polycyclic aromatic hydrocarbons

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural dos 16 HPAs prioritários segundo a USEPA.....	18
Figura 2 - Esquema da estrutura molecular do antraceno mostrando a disposição dos seus 14 átomos de carbono (em preto) e seus 10 átomos de hidrogênio (em cinza).....	19
Figura 3 - Aspecto macroscópico do <i>A. terreus</i> após 7 dias de crescimento em meio ágar extrato de malte (A), microscopia das hifas coradas com azul de Aman (B) e uma placa de contendo <i>Cunninghamella elegans</i> -SIS 41 crescida em meio batata-dextrose-ágar. No detalhe No detalhe hifas e estrutura característica da espécie (C).	22
Figura 4. Ensaio para quantificação do índice de emulsificação a 24 horas (E24) do secretoma de <i>C. elegans</i> SIS41 e do <i>A. terreus</i> frente ao óleo diesel- OD, biodiesel- BD, querosene- Q e gasolina-G.	51
Figura 5 - Quantificação de proteínas totais do secretoma de <i>A. terreus</i> no meio BH com glicerol adicionado do antraceno (AtA) e BH com, somente, glicerol (AtG), em 20 dias de crescimento. ...	54
Figura 6 - SDS-PAGE de amostras do secretoma de <i>A. terreus</i> crescido em meio de cultura BH com glicerol (AtG) e glicerol + antraceno (AtA) durante 20 dias.	55
Figura 7 - SDS-PAGE mostrando as bandas que foram excisadas, destacando as identificadas através da espectrometria por MALDI-ToF. A- tratamento com glicerol e B- tratamento com glicerol + antraceno.....	56
Figura 8 - A: Espectro MS da banda 1G e anotação significativa via PMF no Mascot. B: Espectro MS de banda de SDS-PAGE e anotação não-significativa via PMF no Mascot.	57
Figura 9 - Mapa do secretoma de <i>A. terreus</i> em meio Büshnell-Haas complementado, adicionado de glicerol.	61
Figura 10 - Gel SDS-2D-PAGE do secretoma de <i>A. terreus</i> em meio Büshnell-Haas complementado, adicionado de antraceno e glicerol como fonte co-metabólica	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio Sabouraud	35
Tabela 2 - Micro-organismos selecionados com base na sua capacidade de degradação de compostos derivados do petróleo	36
Tabela 3 - Composição do meio mineral Büshnell-Haas modificado.	38
Tabela 4 - Composição do meio mineral Büshnell-Haas complementado com glicerol ou hexadecano.....	39
Tabela 5 - Representação do ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Bradford.	44
Tabela 6 - Resultados do Teste de Hanson das linhagens testadas para biodegradação de antraceno.	49
Tabela 7 - Médias das triplicatas dos ensaios de atividades enzimáticas totais dos fungos com melhores resultados no teste do potencial redox.....	51
Tabela 8 - Médias dos ensaios de fitotoxicidade em <i>Phaseolus vulgaris</i> de metabólitos e compostos degradados durante a biodegradação do antraceno por <i>A. terreus</i> e <i>C. elegans</i>	53
Tabela 9 - Percentual de germinação das sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> obtidos com os subprodutos da degradação do antraceno acrescido de 1% de glicerol por <i>A. terreus</i>	54
Tabela 10 - Resumo das principais características das proteínas identificadas pelo Mascot e anotadas através do UniprotKB.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
COP	<i>Coat Protein</i> (Proteína de revestimento/ de capsídeo)
CYP	Família dos Citocromos P
DCPIP	2,4-diclorofenol-indofenol
DTT	Ditiotreitol
E24	Índice de Emulsificação em 24 horas
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia gasosa)
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
IAA	Iodoacetamida
IG	Índice de Germinação
LiP	Lignina Peroxidase
mA	Mili ampere
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
Meio BH	Meio mineral de Büshnell-Haas
MnP	Manganês Peroxidase
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Gel de eletroforese de poliacrilamida)
PTMs	<i>Post-translational Modification</i> (Modificações pós-traducionais)
RE	Retículo Endoplasmático
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)

TFA	Ácido tricloroacético
ToF	<i>Time of Fly</i> (Tempo de voo)
U/L	Unidade enzimática por litro
UFPEDA	Coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE
US. EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
%CR	Porcentagem de Crescimento Radicular
%G	Porcentagem de Germinação de sementes
2D	Eletroforese Bidimensional
Q.S.P.	Quantidade Suficiente Para

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O PETRÓLEO	17
2.2 OS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)	18
2.3 OS FUNGOS.....	20
2.3.1 O gênero <i>Aspergillus</i>	21
2.4 A BIODEGRADAÇÃO	23
2.5 A PROTEÔMICA.....	27
2.6 A SECRETÔMICA (O exo-proteoma).....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 ANTRACENO.....	35
3.2 MANUTENÇÃO FÚNGICA	35
3.3 MATERIAL BIOLÓGICO	35
3.4 SELEÇÃO MICROBIANA.....	37
3.5 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.....	37
3.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES:	40
3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS: MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E LACASE.....	40
3.8 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	41
3.9 FITOTOXIDADE	42
3.10 PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES	43
3.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS	43
3.12 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE).....	44
3.13 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (SDS-2D-PAGE).....	45
3.13.1 Focalização Isoelétrica (ief)- 1ª dimensão	45
3.13.2 2D-PAGE- 2ª dimensão	45
3.14 VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS	46
3.15 DIGITALIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS IMAGENS	46
3.16 ANÁLISE DE IMAGENS E SELEÇÃO DAS BANDAS	46
3.17 SELEÇÃO E TRIPSINIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	47
3.18 FRAGMENTAÇÃO (MS E MS/MS) E SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS	47

3.19 ANOTAÇÃO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 SELEÇÃO MICROBIANA:.....	49
4.2 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES.....	50
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	51
4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	52
4.5 FITOTOXICIDADE	53
4.6 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS	54
4.7 SDS-PAGE.....	55
4.8 EXCISÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS.....	56
4.9 SDS-2D-PAGE	61
5 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A presença do petróleo ao longo dos seus milhões de anos no meio ambiente decorrentes de causas naturais ou, mais recentemente, antrópicas ocasionou a adaptação de micro-organismos que se encontravam em contato direta ou indiretamente. Os fungos e bactérias são organismos extraordinários apresentando uma capacidade singular na adaptação a diferentes situações bióticas e/ou abióticas, podendo, a partir de um versátil sistema enzimático, degradar e se nutrir de várias fontes incomuns, a maiorias dos seres vivos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos constituídos por mais de um anel benzênico o que os tornam uma molécula de difícil quebra, ou seja, recalcitrante. Estão presentes no petróleo e seus derivados e possuem relativa toxicidade aos seres vivos. Os HPAs possuem características mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas entre outras, sendo por isso, de importante relevância os estudos do seu impacto aos organismos e ao meio ambiente.

A biodegradação é a capacidade dos micro-organismos em catalisar compostos, conferindo-lhes características diferentes das suas originais, sendo a mais desejada pelos pesquisadores, o decrescimento da sua toxicidade. A biodegradação dos HPAs ocorre, inicialmente, pela inserção de átomos de oxigênio nas suas moléculas através de mono ou dioxigenases, resultando na quebra da ressonância do anel benzênico e da estabilidade molecular.

Os fungos são micro-organismos que apresentam células eucarióticas (uni ou pluricelulares) protegidas por uma parede celular composta por redes de quitina. Cosmopolitas, são capazes de secretar diversos metabólitos e proteínas, garantindo-lhes a capacidade de digestão extracelular pela degradação e absorção dos nutrientes presentes no meio externo, além da comunicação com o meio através das relações ecológicas harmônicas e não harmônicas com outros seres e conferindo a eles o sucesso no estilo de vida seja ele saprofítico ou parasita e pelas características fisiológicas são utilizados para vários processos de biotratamento.

A análise proteômica, ferramenta multidisciplinar capaz de identificar proteínas em larga escala, permite avaliar respostas moleculares resultantes de estímulos ambientais originadas por uma situação fisiológica. A secretômica, sub-ramo da proteômica, surgiu pela necessidade da caracterização de secretados microbianos, tendo em vista a gama de proteínas secretadas por esses organismos, tais como proteases, transferases e hidrolases. Como a proteômica, a secretômica se utiliza de técnicas de fragmentação e separação de extratos proteicos, como a eletroforese (uni, bidimensional e a capilar) e a cromatografia líquida.

A partir da obtenção das proteínas extracelulares é possível identificar os primeiros passos da biodegradação dos HPAs além de se observar os mecanismos de resposta dos fungos frente à toxicidade dos mesmos. Desta forma torna-se necessária a complementariedade nos estudos de degradação de hidrocarbonetos, pela produção de metabólitos originados durante a biodegradação que, às vezes, podem ser igualmente ou mais tóxicos que os compostos originais ao meio ambiente e para o homem.

O referido trabalho tem como objetivo determinar a capacidade de 20 linhagens de fungos na biodegradação do antraceno, com a seleção de uma fonte co-metabólica, a atividade enzimática do complexo lignolítico, observação de produção de biosurfactantes, prospecção e identificação de proteínas secretadas no meio de cultura com a presença do antraceno e a fitotoxicidade dos subprodutos durante os ensaios com o HPA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O aumento da população humana e o desenvolvimento tecnológico induziram uma crescente demanda da utilização do petróleo e de seus derivados como fonte de energia, representando uma grande parcela para a atual economia mundial. No entanto, vem ocasionando sérios problemas ambientais, devido a sua introdução cada vez mais frequente, no meio ambiente (MELO, 2005). Os pequenos vazamentos provenientes do transporte marítimo correspondem a 98% das perdas totais de petróleo e derivados. As perdas acidentais correspondem aos 2% restantes, que contribuem com o lançamento de aproximadamente 400 mil toneladas/ano de óleo no meio ambiente (PIRÔLLO, 2006).

Em ambientes terrestres a distribuição dos derivados líquidos do petróleo é pontual, ou seja, os poluentes são introduzidos diretamente no meio ambiente, podendo ser vistos e quantificados. Os principais riscos da contaminação no solo estão relacionados ao espalhamento vertical- conhecido como percolação, devido à possibilidade de atingir o lençol freático (CORSEUIL et al., 1997; MACIEL, 2009). Os derrames geram danos ao meio ambiente por contaminarem rios, oceanos, solos e lençóis freáticos, causando grande desequilíbrio ecológico. O acúmulo de petróleo e derivados nos ecossistemas possui efeito tóxico sobre os seres vivos e sua toxicidade pode ser analisada pela taxa de mortalidade de organismos de importância econômica ou ecológica (JUVONEN, 1999; CHAPMAN, 2002).

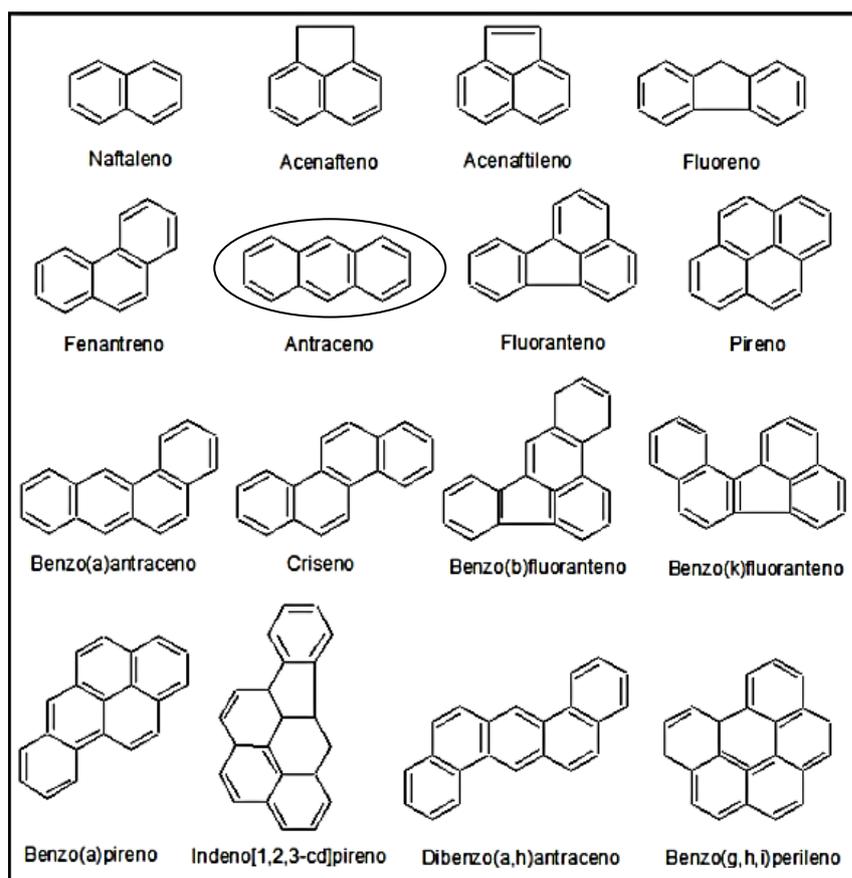
2.1 O PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura complexa, heterogênea, composto por hidrocarbonetos-alifáticos (n-alcanos), alicíclicos e aromáticos (mono e policíclicos), que variam em composição e propriedades físicas de acordo com a sua origem (VAN HAMME, 2003). Estes hidrocarbonetos são compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio, altamente insolúveis em água (PEIXOTO, 2011), e sendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são constituídos de dois ou mais anéis aromáticos fundidos (CRISAFULLY, 2008).

2.2 OS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

Os HPAs são constantemente presentes no meio ambiente sendo considerados contaminantes ubíquos, ou seja, contínuos no meio. Os principais tipos de HPAs estão descritos na figura 1.

Figura 1 - Fórmula estrutural dos 16 HPAs prioritários segundo a USEPA



Fonte: O autor (2015)

As fontes comuns de HPAs no ambiente incluem fontes naturais e/ou de origem antrópica. As fontes naturais podem ser exemplificadas como os incêndios em florestas e pastagens, os escoamentos de petróleo, erupções vulcânicas e exsudato de árvores, enquanto que as fontes antropogênicas de HPAs incluem a incompleta combustão de matéria orgânica no escape de automóveis, queima do alcatrão de carvão, madeira, lixo, óleos lubrificantes usados e filtros de óleo (KAUSHIK, 2006) na indústria petroquímica, a incineração de resíduos sólidos urbanos, derrames e descargas de petróleo (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

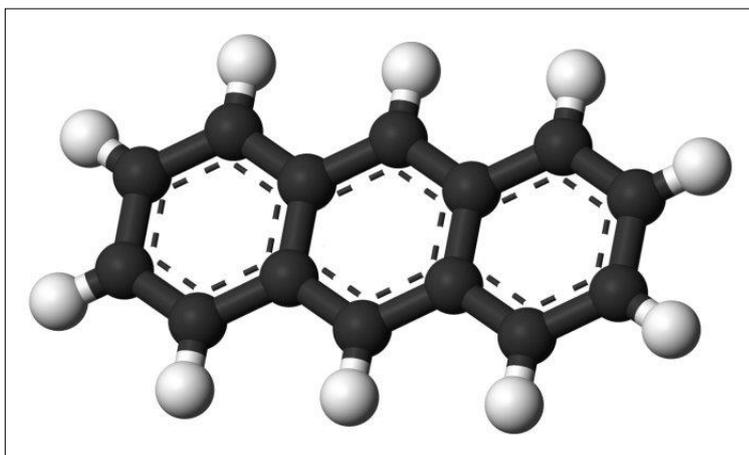
HPAs têm dispostos sérios riscos ao meio ambiente e à saúde humana e conseqüentemente levantado grande preocupação ambiental em todo o mundo. Podem apresentar características desde cancerígenas, teratogênicas, mutagênicas e outras propriedades (CRISAFULLY et al., 2008) como a bioacumulação, biomagnificação e toxicidade persistente.

A USEPA- Agência de Proteção Ambiental Americana (www.epa.gov)- listou 16 HPAs como poluentes prioritários para a investigação da contaminação ambiental (YUAN et al., 2000). Há muito tempo se sabe que os poluentes aromáticos podem ter vários efeitos tóxicos sobre os seres humanos, por exemplo, o benzo(a)pireno, é reconhecido como um poluente prioritário pela Agência de Proteção Ambiental por ser conhecido como um dos mais potentes cancerígenos de todos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. (CAO & NAGARAJAN, 2009).

O destino dos HPAs no ambiente inclui a volatilização, foto-oxidação, oxidação química, adsorção em partículas do solo, lixiviação e degradação microbiana. (WILD e JONES, 1995; HARITASH e KAUSHIK, 2009).

O antraceno- CAS 120-12-7 (figura 2) é um HPA de três anéis benzênicos fundidos. A sua estrutura é encontrada em HPAs reconhecidamente carcinogênicos, como o benzo(a)pireno e benzo(a)antraceno. Por estas razões, o antraceno é utilizado como um composto modelo da família HPA (BONNET et al. 2005; DZUL-PUC et al., 2005; MOHAMMADI; NASERNEJAD, 2009). Apresenta toxicidade relativamente grave e, uma vez em contato com o corpo, parece atacar a pele, sistemas digestivo e linfático, sendo um provável indutor de tumores (DAS, 2008).

Figura 2 - Esquema da estrutura molecular do antraceno mostrando a disposição dos seus 14 átomos de carbono (em preto) e seus 10 átomos de hidrogênio (em cinza).



Fonte: O autor (2015)

A natureza hidrofóbica (baixa solubilidade em água) juntamente com suas estruturas aromáticas conjugadas estendidas os torna substâncias químicas persistentes à degradação devido à baixa biodisponibilidade e alta estabilidade química (SHUTTLEWORTH, 1995; SOARES et al., 2008) ocasionando a sua bioacumulação na cadeia alimentar (EKELUND, 1990; ADEMOLLO, 2008).

Por causa do seu baixo peso molecular em comparação com a maioria dos outros HPAs, o antraceno tem uma solubilidade mais elevada e pode se apresentar em níveis significantes na água, apresentando uma ameaça para o meio ambiente (BONNET et al., 2005), por consequência disso, é importante determinar o impacto desta molécula em organismos vivos nos ecossistemas aquáticos e no solo.

Os hidrocarbonetos alifáticos, particularmente alcanos, ocorrem concomitantemente com os HPAs em óleos brutos de petróleo, e a biodegradabilidade dos mesmos diminui com o aumento do comprimento de sua cadeia (devido à natureza hidrófoba resultante). Deste modo, a biodegradação por micro-organismos, em cenários naturais de poluição ambiental como os derrames de petróleo bruto, pode exigir a capacidade enzimática de metabolizar esta grande fração do óleo (alcanos), além de degradar os HPAs mais recalcitrantes (ZAHED, 2010; SYED, 2013). Partindo desse princípio, o estudo e a utilização de micro-organismos vêm se destacando como uma metodologia amiga do ambiente, baseando-se no uso de fungos, conhecidos por degradar uma grande variedade de compostos complexos, devido ao seu versátil sistema enzimático.

2.3 OS FUNGOS

Estima-se que o reino *Fungi* contenha mais de 1,5 milhões de espécies, porém apenas cerca de 100 mil foram descritas até o momento. Os fungos podem ser observados na forma de leveduras e/ou fungos filamentosos, sendo os basidiomicetos (cogumelos) os mais conhecidos (HAWKSWORTH, 1991; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2010).

Os fungos filamentosos são organismos extraordinários que têm amplo impacto em muitos aspectos da vida humana. Estes organismos são caracterizados por possuírem hifas, de diâmetro de 2-18 μm (fungos superiores) com ou sem septos transversais (fungos inferiores). Dentre estes estão inclusos os *Aspergillus*, *Penicillium* além de espécies de

Trichoderma e *Fusarium*. Entre os fungos inferiores podemos citar espécies de *Rhizopus* e *Mucor*.

Os fungos filamentosos são quimio-organotróficos o que significa que obtêm sua energia e carbono pela oxidação de compostos orgânicos. São organismos muito versáteis no que diz respeito às condições ambientais, podendo alterar suas atividades metabólicas em resposta a variações das condições físicas e químicas de um ambiente (AINSWORTH, 1973; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Na tecnologia de fermentação tradicional, os fungos filamentosos são os principais produtores de uma ampla variedade de metabólitos primários, incluindo os ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico, glucônico, fumárico, kójico, ácido itacônico e ácidos graxos. Eles produzem metabólitos secundários importantes, especialmente na terapêutica humana, por exemplo: penicilina, cefalosporina, alcaloides, griseofulvina, lovastatina, o taxol e o zeranol. Também são produtores de polissacarídeos e biosurfactantes. Alguns fungos filamentosos são usados como alimentos- como os macrofungos, *Agaricus bisporus* (cogumelos de Paris), ao passo que outros fungos são componentes em alimentos fermentados, *Saccharomyces cerevisiae* (leveduras do pão). Podem ser produtores de uma série de enzimas fúngicas, por exemplo, amilases, amiloglucosidases, celulases, pectinases, lacases/ligninases, fitase, proteases, coalhos microbianos, lipases e glucose-oxidases.

2.3.1 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* corresponde a um importante grupo de fungos filamentosos com impacto significativo em diferentes áreas da indústria.

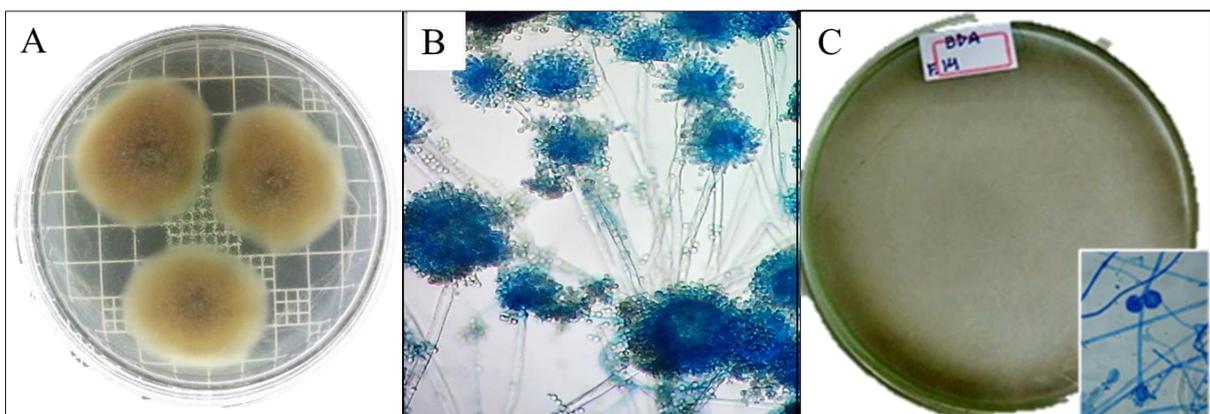
A espécie mais importante economicamente é o *Aspergillus niger*, utilizado para produzir a maior parte do ácido cítrico do mundo (estimada em nove milhões de toneladas/ano) (CROLLA e KENNEDY, 2001), Em contrapartida, o *A. flavus* produz aflatoxinas, composto natural muito tóxico e potente hepatocarcinogênico. Assim, esta espécie apresenta também ameaça a alimentos e rações, contaminando os grãos armazenados e outras plantas de importância econômica com micotoxinas (HEDAYATI et al., 2007), causando prejuízos ao homem e ao produtor. A espécie *Aspergillus oryzae*, está intimamente relacionada com o *A. flavus*, mas não segregam micotoxinas tóxicas e tem sido bastante usado por mais de um milênio, na tradicional indústria japonesa de

fermentação para a produção de alimentos (por exemplo, molho de soja, bebidas alcoólicas) (KOBAYASHI et al., 2007; KNIEMEYER, 2011) e a produção de enzimas industriais (por exemplo, α -amilase) (CARLSEN e NIELSEN, 2001).

Os *Aspergillus* também são clinicamente importantes, como o *A. fumigatus* que é agente patogênico humano proeminente e tem sido relatada por ser responsável por até 40% de mortes associadas à infecção nosocomial (STERNBERG, 1994). Para combater isso, milhares de milhões de dólares por ano são gastos com o objetivo de desenvolver novas terapias antifúngicas (AGRIOS, 1997; KIN et al., 2008).

Apesar de *A. fumigatus* ser mais frequentemente isolado de amostras clínicas, outras espécies, incluindo *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (figura 3) têm emergido como importantes causadores de infecções oportunistas em hospitais. Em particular, tem havido relatos de aumento de pneumonia e infecções disseminadas devido a estirpes de *A. terreus* derivadas de isolados clínicos e ambientais (TOKIMATSU et al., 2007; CASTON et al., 2007). O fato do *A. terreus* estar se tornando mais frequente em relação a outras espécies de *Aspergillus* tem causado preocupação por causa de sua resistência a anfotericina B, que é o principal antibiótico utilizado para o tratamento de infecções fúngicas (BADDLEY et al., 2003; WALSH et al. 2003; HAN et al., 2010).

Figura 3 - Aspecto macroscópico do *A. terreus* após 7 dias de crescimento em meio ágar extrato de malte (A), microscopia das hifas coradas com azul de Aman (B) e uma placa de contendo *Cunninghamella elegans*-SIS 41 crescida em meio batata-dextrose-ágar. No detalhe No detalhe hifas e estrutura característica da espécie (C).



Fonte: O autor (2015)

O *Aspergillus terreus* é um fungo filamentoso importante para a produção biotecnológica de produtos químicos de alto valor, como: ácidos orgânicos, produtos

farmacêuticos e enzimas industriais. Usado para a produção industrial do ácido itacônico (um dos monômeros ou co-monômeros de partida para a síntese química de compostos biomédicos em biorrefinarias avançadas), além de utilizado em todo o mundo no campo da química de polímeros farmacêuticos e na agricultura (OKABE et al., 2009).

O *A. terreus* também é amplamente utilizado para a produção de lovastatina, o primeiro agente da classe das estatinas usado na redução do colesterol para tratar a hipercolesterolemia humana (com vendas estimadas de 15.000 milhões dólares /ano) (HAN et al., 2010). Além disso, *A. terreus* pode produzir um grande número de metabolitos secundários tal como geodin e ciclosporina A, 3,4 e várias enzimas comerciais, tais como celulase, xilanase e a fitase. (LIU et al., 2013).

2.4 A BIODEGRADAÇÃO

Embora os HPAs liberados no ambiente possam sofrer oxidação química, fotólise, volatilização e adsorção em sedimentos e partículas do solo, a principal via para a sua remoção é, provavelmente, por meio da transformação microbiana através da sua biodegradação (YUAN et al., 2000) em comparação com outros métodos físicos e químicos, tais como a combustão, fotólise, aterro e decomposição por ultrassom. A biodegradação acredita-se ser uma alternativa econômica e amiga do meio ambiente na remoção de HPAs (GIRAUD, 2001), assim, mais e mais interesses de pesquisa estão se voltando para a biodegradação dos mesmos (YE, 2011).

Alguns micro-organismos podem utilizar HPAs como fonte de carbono e energia sendo mineralizados em dióxido de carbono e água ou transformados em outras substâncias não tóxicas ou de baixa toxicidade (JOHNSEN et al., 2005; SANTOS et al., 2008). Outros podem degradar ou transformar hidrocarbonetos, dependendo da presença de vias metabólicas, específicas para cada função nas condições ambientais (PEIXOTO, 2011). Além disso, os micro-organismos indígenas podem ser capazes de tolerar e degradar HPAs existentes em águas contaminadas com os de alto peso, nos solos ou sedimentos (SARKAR et al., 2005; MOON et al., 2006).

A biodegradação de hidrocarbonetos, tanto alifáticos e compostos aromáticos, pode ocorrer sob condições anaeróbia ou aeróbia (VAN HAMME, 2003). Em condições aeróbicas, enzimas oxigenases introduzem átomos de oxigênio em hidrocarbonetos (mono-

oxigenases introduzem um átomo de oxigênio a um substrato enquanto dioxigenases introduzem dois) (PEIXOTO, 2011). O catabolismo aeróbico de hidrocarbonetos pode ser mais rápido, devido à vantagem metabólica da disponibilidade de O₂ como recetor de elétrons (CAO, 1999). O produto final da oxidação de hidrocarbonetos alifáticos saturados é a acetil-CoA, que é catabolizada no ciclo do ácido cítrico, em conjunto com a produção de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Esta cadeia repete-se, degradando ainda mais os hidrocarbonetos, os quais são normalmente totalmente oxidados a CO₂ e água (MADIGAN, 2010).

Já os hidrocarbonetos aromáticos, tal como benzeno, tolueno, xileno, naftaleno e o antraceno, podem, também, ser degradados em condições aeróbicas, sendo a degradação destes compostos normalmente serve como um passo inicial na formação do catecol ou um composto estruturalmente relacionado. Uma vez formado o catecol pode ser degradado, resultando em compostos que pode ser introduzido no ciclo do ácido cítrico. (CAO, 1999; MADIGAN, 2010).

Os fungos transformam os HPAs em metabólitos semelhantes aos formadas pelas enzimas de mamíferos. A proteína predominante na via inicial de oxidação de HPAs é o citocromo P450 (CYP) monoxigenase/epóxido hidrolase que catalisa as reações formando transdihidrodióis. Estes passos metabólicos são encontrados em fungos não-lignolíticos, tais como *Cunninghamella elegans*, sendo os genes *cyp* responsáveis por esta biotransformação (PENG et al., 2008; MITRA et al., 2013).

Entre os fungos lignolíticos, além da utilização do citocromo P-450 monoxigenase, também ocorre à produção de enzimas extracelulares lignolíticas, atuantes na degradação da lignina e que conferem uma maior tolerância aos poluentes em concentrações que seriam tóxicas para outros organismos (VAN DEN BRINK et al., 1998). A degradação microbiana por fungos ligninolíticos tem sido intensamente estudada nos últimos anos (CAJTHAML et al., 2001), pois, devido à estrutura irregular da lignina, fungos ligninolíticos produzem enzimas extracelulares com muita baixa especificidade ao substrato, tornando-as adequados para a degradação de compostos recalcitrantes diferentes (HARITASH e KAUSHIK, 2009) além das suas aplicações na indústria química, alimentícia, agrícola, de papel, têxtil, e de setores da indústria de cosméticos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; GOMES et al., 2009; DE SOUZA; PERALTA, 2003; MACIEL et al., 2010).

O sistema ligninolítico consiste de três grupos de enzimas principais como a lignina peroxidase, manganês peroxidase, fenoloxidasas (lacases, tirosinases), e as enzimas produtoras de H₂O₂.

Tem sido observado que enzimas ligninolíticas realizam oxidação, por um elétron, de um radical, produzindo radicais catiônicos dos contaminantes, seguida pelo aparecimento de quininas (MOHAMMADI; NASERNEJAD, 2009).

Estudos anteriores demonstraram que lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2), produzida por fungos de podridão branca isolados de ecossistemas específicos (FARNET et al., 2009) foram capazes de transformar diversos poluentes aromáticos (QASEMIAN et al., 2011), além de serem capazes de catalisar a oxidação de fenóis, polifenóis, e anilinas, juntamente com a redução de 4 elétrons do O₂ molecular para a água (SMITH et al., 1997). No trabalho de Bulter e colaboradores a lacase de *Myceliophthora thermophila* (MtL) foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando evolução dirigida, ampliando a expressão da lacase.

Algumas empresas produzem industrialmente suas enzimas através de fermentações em larga escala, onde células não lisadas são removidas durante o processamento. Sutherland e colaboradores (2004) observaram que a purificação de enzimas de outros materiais e metabólitos solúveis no caldo fermentado não é necessário para a recuperação ambiental, o que pode facilitar o processo de produção e reduzir os custos, mas destacaram que o prazo de validade e a estabilidade ambiental devem ser avaliados para garantir a eficácia da enzima contra o contaminante. Os passos e considerações delineadas por Sutherland e colaboradores (2004) podem ser extrapolados para a biorremediação de qualquer contaminante e seu relatório descreve como produzir um agente enzimático para aplicações em diferentes biorremediações. (PEIXOTO et al., 2011).

A grande vantagem da biorremediação enzimática de xenobióticos, que são ou hidrofóbicos ou fracamente solúveis em soluções aquosas, tais como os HPAs, é que a oxidação enzimática pode ocorrer na presença de compostos orgânicos. Uma desvantagem é que as enzimas relevantes podem ser instáveis, inibidas, ou desnaturadas em solventes orgânicos (ALCALDE et al., 2006).

A remediação enzimática pode ser mais simples do que trabalhar com os organismos, pois a produção das enzimas pode ser realizada em condições de laboratório (SUTHERLAND et al., 2004). A utilização de enzimas isoladas não gera produtos

secundários tóxicos (SETTI et al., 1997) além de não haver, necessariamente, a competitividade entre os organismos vivos (ALCALDE et al., 2006).

Sutherland e colaboradores (2004) também resumiram os principais aspectos a serem considerados, a partir de pesquisas para a produção, em biorremediação enzimática: em primeiro lugar, para uma enzima ser selecionada para uma aplicação em biorremediação, ela precisa ter a capacidade de degradar o contaminante alvo em produtos menos tóxicos. Também é importante para as enzimas almeçadas não dependerem de cofatores para a sua ação, o que aumentaria o processo custos ao nível comercial. O próximo passo consiste em identificar o gene que codifica a enzima selecionada e, se necessário, melhorar a produção enzimática.

Whiteley e colaboradores (2006) relatam que até 2004, foram descritas menos de 1000 enzimas envolvidas na biodegradação de sistemas aromáticos (poluentes orgânicos ou não). Tem sido relatado que a venda mundial de produtos de biotecnologia ambiental para fabricantes dos EUA, incluindo microrganismos, enzimas, misturas microbianas, e nutrientes, totalizaram 153,87 milhões dólares até 2006 (bccresearch.com). As estimativas para o aumento das vendas de misturas microbianas foram superiores as estimativas para o isolamento de micro-organismos e enzimas porque este último tem potencial de mercado limitado (US. EPA; PEIXOTO et al., 2011).

A Agência de Proteção Ambiental americana tem catalogados, atualmente, 20 agentes de biorremediação e somente uma enzima pura como aditivo. O produto, *Petroleum Spill Eater II*[®], é descrito pelo produtor como "agente de biorremediação" com um período de vida útil de 5 anos (US. EPA) e garantia de redução de 36,9 de alcanos e 33,6% de hidrocarbonetos aromáticos, respectivamente, após 7 dias, e redução de 89,8% e 89,6% 28 dias após o tratamento de remediação (PEIXOTO et al., 2011).

Contudo, a biorremediação enzimática pode ser melhorada através de ferramentas moleculares onde, podem ser particularmente adequadas para situações em que a rápida remediação é necessária (SUTHERLAND et al., 2004). Alcalde e colaboradores (2006) relataram que estudos recentes de engenharia de proteínas, metagenômica, e proteômica estão efetivamente contribuindo para a redução de custos, minimizando o uso de produtos químicos e também melhorando as relações de custo/benefício. O uso de ferramentas moleculares para as aplicações de biocatálise também podem ajudar a resolver o problema da utilização de OGM (Organismos Geneticamente Modificados) no ambiente (ALCALDE et al., 2006), por exemplo, se a produção de uma enzima modificada é realizada *in vitro*,

não é necessário introduzir o organismo modificado no ambiente natural (PEIXOTO et al. 2011).

2.5 A PROTEÔMICA

Até o início de 1990 as pesquisas biológicas foram mais focadas nos estudos *in vitro* de componentes individuais como genes e proteínas, individualmente. Esta estratégia mudou no início e meados da década de 1990 para a investigação *in vivo* e em grande escala molecular, começando com projetos de pesquisa de genômica estrutural e transcriptômica, em seguida, a proteômica e a metabolômica. Todos estes juntos constituem as bases metodológicas da biologia de sistemas moderna (TAN et al., 2009; BRUGGEMAN & WESTERHOFF, 2007). Através de uma abordagem única é totalmente esclarecida a complexidade dos organismos vivos. Cada abordagem contribui e deve ser validada, sendo esta considerada como parte de uma análise integradora multidisciplinar em diferentes níveis, que se estende a partir do gene para o fenótipo através proteínas e metabólitos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2010).

Os avanços nas técnicas "ômicas" contribuíram para o melhoramento das pesquisas na área da ecologia microbiana, inclusive nos processos de biodegradação, por exemplo, na identificação e quantificação de enzimas microbianas responsáveis pelo metabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos (KIM et al., 2009; PEIXOTO et al., 2011). Dentre estas, a proteômica se constitui como pesquisa prioritária para qualquer organismo e se configura como uma disciplina fundamental na era pós-genômica. Durante a década passada, a realidade proteômica se encontrava abaixo das expectativas geradas inicialmente e os resultados obtidos ao longo dos últimos 15 anos têm demonstrado que o dinamismo, a variabilidade, e o comportamento de proteínas são mais complexos do que nunca tinha sido imaginado.

Inicialmente, a proteômica foi fundamentada em dois procedimentos principais: a separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e identificação dessas proteínas por espectrometria de massas (GÖRG; WEISS e DUNN et al., 2004; COUTO, 2012). Posteriormente a esse evento, a proteômica tornou-se mais do que apenas um braço da genômica ou uma abordagem experimental, mas uma disciplina científica complexa que lida com o estudo do proteoma celular. No sentido mais amplo, o proteoma pode ser

definido como sendo o conjunto total de espécies de proteínas presentes em uma unidade biológica (organelas, célula, tecido, órgão, indivíduo, espécies, ecossistemas), em qualquer estágio de desenvolvimento e sob condições ambientais específicas.

Usando técnicas proteômicas pode-se saber como, onde, quando e para quê são as várias centenas de milhares de espécies de proteínas produzidas em um organismo vivo, como eles interagem um com o outro e com outras moléculas para a construção da célula, e como trabalham umas com as outras para se encaixarem com crescimento e desenvolvimento programados e, para interagirem com o ambiente biótico e abiótico.

As técnicas proteômicas, porém, possuem limitações, como sensibilidade, resolução e velocidade de captura de dados. Elas, também, enfrentam uma série de desafios como a cobertura do proteoma total, a proteômica de organismos não sequenciados, ou seja, "órfãos", a proteômica *top-down* (HAN, 2006), a quantificação das proteínas (CRAVATT, 2007), PTMs (BHADAURIA, 2007), e a Interactômica (HE, 2008; ZHAO, 2009). A maioria dessas limitações e desafios reflete a dificuldade de trabalhar com a diversidade biológica de proteínas e sua gama de propriedades físico-químicas.

De um modo geral, podemos afirmar que a proteômica consiste numa descrição quantitativa e interativa do conjunto de proteínas expressas, bem como das suas alterações, sob a influência de alterações biológicas, tais como a exposição do micro-organismo a agentes de estresse (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004). A proteômica também desempenha um papel significativo no campo da biotecnologia e pode contribuir diretamente para a otimização de processos de fermentação e para a procura de enzimas biotecnologia relevantes.

Os métodos proteômicos também podem ser aplicados para melhorar a produção de proteínas ou descobrir novas enzimas quer com uma melhor atividade ou estabilidade ou especificidade.

A 2D-PAGE é uma poderosa ferramenta para análise de proteínas que regulam a fisiologia de organismos. A análise do proteoma de micro-organismos em condições de estresse até de patogenicidade, podem dar novas perspectivas para os mecanismos de adaptação ao ambiente e evolução destes micro-organismos, visto que os perfis de expressão das proteínas são adicionalmente adequados para caracterizar estados de dormência, atividade e crescimento relacionados a diferentes condições ecológicas (ISOLA et al., 2011).

Especialmente as espécies de *Aspergillus* são objetos de estudo muito adequados para esta abordagem. Kim et al. (2008) desenvolveram um protocolo baseado em eletroforese 2D e subsequente atividade *in situ* de uma nova β -glicosidase no sobrenadante de culturas de *A. fumigatus*. Uma das duas β -glicosidasas detectada foi heterologamente expressa e ainda caracterizada: mostrava grande estabilidade térmica, superior às β -glicosidasas previamente caracterizadas e, assim, tendo um grande potencial para ser usada na hidrólise da celulose. Outra aplicação de enzimas fúngicas foi mostrada para uma endoprotease prolina-específica de *A. niger*. foi aplicada como uma alternativa à tripsina para a geração de um digestor previsível de peptídeos para uma análise mais aprofundada pela espectrometria de massas (SEBELA, 2009; KNIEMEYER, 2011).

A Espectrometria de Massas- MS- são técnicas capazes de determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003), gerando dados de massa inerentes a peptídeos que possibilitam identificar as proteínas em bancos de dados (CANTÚ et al., 2008). A técnica de espectrometria de massas por MALDI (Ionização/dessorção a laser assistida por matriz) é adequada para análise de peptídeos, por permitir que compostos de alto peso molecular possam ser analisados com elevada sensibilidade e por apresentar características não destrutivas possibilitando a análise de biomoléculas de tamanhos variados.

Comumente, o analisador de massas associado à ionização por MALDI é o do tipo ToF (Tempo de Voo). Estes analisadores são compostos por uma câmara (campo magnético) e um tubo, denominado de tubo de tempo de voo ou zona deriva. Assim, os íons são alinhados no campo magnético, de acordo com a razão massa/carga (m/z). Em seguida, em função desta razão m/z , os íons são direcionados para o tubo de tempo de voo, isento de campo magnético, onde são separados apenas em função das massas moleculares individuais (SANTOS; LIMA, 2010; PASCH; SCHREPP, 2003). No entanto, íons de mesma razão m/z , mas que possuem massas individuais diferentes é detectado no mesmo momento, por isso, o MALDI-TOF/TOF possui dois detectores: um linear e um refletido que compensa esta limitação.

2.6 A SECRETÔMICA (O exo-proteoma)

Levando em consideração a proteômica de micro-organismos, uma nova área também pode ser definida como secretômica. Muitos fungos secretam um grande número de proteínas para acomodar seu estilo de vida como o caso de proteínas aplicadas na adesão superfície das plantas (NEWHEY, 2007), na penetração do tecido-hospedeiro, efetoras de invasão e fatores de virulência (SONG, 2009), proteólise, biossíntese, tradução, alongação, transcrição (MARIAPPAN, et al., 2010) e utilizadas pelos mesmos na adaptação ao ambiente em que desejam colonizar ou já estabelecidos. Este estilo de vida depende da absorção de nutrientes ambientais que são disponibilizados através da ação hidrolizante de grupos de enzimas secretadas.

A secreção de proteínas constitui uma função importante em fungos filamentosos, uma vez que tanto enzimas como proteínas estruturais são secretadas. Por outro lado as proteínas estruturais que são incorporadas à membrana e parede celular estão envolvidas em processos de reconhecimento e interação com outros fungos (PEBERDY, 1994; ODA et al., 2006). Por conseguinte, a secreção de proteínas é crucial para a vida e o crescimento de fungos. Esta capacidade de secreção de enzimas tem sido explorada pela indústria, onde compostos secretados por fungos já são utilizados à décadas (CONESA et al., 2001; SHOJI et al., 2008; MENDOZA, 2013).

Existem dois pontos que devem ser mantidos em mente neste contexto: Em primeiro lugar, num sentido geral, o secretoma inclui tanto as proteínas que são liberadas no meio circundante e aquelas que permanecem ligadas à membrana ou parede celular, ou as proteínas integrais de membrana. Em segundo lugar, o secretoma, como o transcriptoma, é altamente variável dependendo das condições ambientais, incluindo o substrato, temperatura e a fase de crescimento microbiano. Embora o número de estudos de transcriptômica fúngico seja cada vez maior, não é suficientemente grande para tirar conclusões globais para explicar como um secretoma é modulado em resposta às condições ambientais em espécies diferentes (ALFARO et al., 2014).

A secreção de proteínas nos eucariotos pode ocorrer através das rotas clássica e não clássica. Embora seja evidente que certos fungos secretam proteínas através da via não clássica, o mecanismo até esta data é desconhecido e sem assinaturas moleculares claras existentes. A secreção clássica por outro lado, é mediada através da presença de um peptídeo sinal N-terminal que estabelece a base de trânsito do retículo endoplasmático e o

complexo Golgiense na rota de secreção a partir da célula (SCHATZ e DOBBERSTEIN, 1996; WEBER, 2012).

A capacidade elevada da maquinaria de secreção de fungos filamentosos tem sido amplamente explorada para a produção de proteínas homólogas e heterólogas (CONESA et al., 2001). No entanto, o conhecimento das vias de secreção de fungos se encontra numa fase inicial. A maior parte desse conhecimento vem de modelos desenvolvidos em leveduras e eucariotos superiores e têm servido como referência para os estudos sobre as espécies de fungos.

Em fungos filamentosos a secreção de proteínas, através da via clássica, quase sempre acontece em regiões apicais e subapicais das hifas, assim as proteínas direcionadas à via secretora são primeiro enoveladas no retículo endoplasmático (RE), com ajuda de chaperonas como a *BindingProtein* (BiP) cuja função é evitar a interação proteína - proteína, favorecer o correto enovelamento das mesmas e participar na degradação de proteínas que não conseguem atingir a maturidade conformacional (CONESA et al., 2001). Por outro lado calnexina e calreticulina participam no controle de qualidade do RE retendo as proteínas desdobradas, enquanto as foldases como a Proteína Dissulfato Isomerase (PDI) catalisam a oxidação, redução e isomerização de pontes dissulfeto, e a PeptidilProlil Isomerase (PPIase) participa na isomerização *cis* e *trans* da ligação peptídica na extremidade N-terminal dos resíduos de prolina (SALOHEIMO e PAKULA, 2012). Na via secretora, as proteínas corretamente enoveladas são transportadas em direção ao complexo de Golgi com ajuda das vesículas provenientes da membrana do RE chamadas COP II que se fusionam com a membrana alvo (SPANG, 2008). Vesículas COP I realizam o transporte inverso, do complexo de Golgi ao RE, a fim de recuperar as proteínas mal posicionadas. Uma vez no complexo de Golgi as modificações pós-traducionais das proteínas são completadas e encaminhadas para a exocitose (MENDOZA, 2013).

A caracterização de secretomas fúngicos se tornou um objetivo importante desde que, proteínas secretadas foram identificadas como principais efetoras responsáveis pela interação (patogênica ou simbiótica) entre os fungos e outros organismos. Em geral, o estudo do secretoma enfrenta três principais problemas: a presença de metabólitos secretados pelos fungos que potencialmente alteram a extração do secretoma, uma rede de polissacarídeos extracelulares e uma população heterogênea de proteínas diluídas (GIRARD et al., 2013).

Algumas das proteínas secretadas por fungos fitopatogênicos têm funções determinadas e podem incluir uma diversidade de enzimas hidrolíticas que atacam a parede da célula da planta ou degradam outras fontes de carbono e nitrogênio complexas, por exemplo, proteases e glucanases. No entanto, em muitas proteínas secretadas faltam quaisquer motivos funcionais óbvios ou são frequentemente muito pequenas para codificar atividades catalíticas. Estas pequenas proteínas secretadas são frequentemente caracterizadas como efetoras (ou candidatas a efetoras) e acredita-se ter função de neutralizar ou suprimir as defesas do hospedeiro e/ou mascarar a detecção pelos sistemas imunitários dos hospedeiros.

Também é de grande importância para a caracterização experimental de secretomas fúngicos a característica geral de que tais secretomas são obtidos como soluções de proteínas muito diluídas. Portanto, para analisar tais secretomas com eletroforese bidimensional- 2D, as soluções de proteínas muito diluídas devem ser concentradas e separadas de grandes quantidades de metabólitos excretados já mencionados acima. Parece ser difícil de obter géis 2D de secretomas de células fúngicas com uma resolução suficiente boa para análise local. Isto é porque os referidos metabólitos secretados podem precipitar em conjunto com proteínas, assim impedindo a separação uni e bidimensional de proteínas extraídas. Em estudos sobre proteínas extracelulares de basidiomicetos foram feitas tentativas para ultrapassar estes problemas através da realização de ultrafiltração ou diálise antes da concentração da amostra (ABBAS et al., 2005; RAVALASON et al., 2008).

Setenta e três proteínas secretadas por *A. flavus* foram identificadas, sendo 22 relatadas por Medina et al.(2004) e 51 por Medina et al.(2005). Muitas destas proteínas foram proteases, proteínas metabólicas ou proteínas envolvidas no transporte de prótons/elétrons. Em particular, 18 proteínas foram identificadas como sendo únicas para a via de degradação da rutina, quando comparados com fungos cultivados em glucose ou batata-dextrose. Curiosamente, um número substancial de proteínas identificadas (27%) foi marcado como "hipotéticas", devido à anotação incompleta do seu genoma.

As primeiras pesquisas globais sobre proteínas secretadas de *Aspergillus* sp. foram iniciadas por Schwienbacher et al., (2005) onde foram analisadas as principais proteínas secretadas de *A. fumigatus* e comparadas o padrão de proteínas em gel de SDS-PAGE com os obtidos a partir de outro *Aspergillus* sp. As principais proteínas secretadas por *A. fumigatus* foram identificadas como uma mitogilina ribonuclease- curiosamente um inibidor da síntese de proteínas eucarióticas e duas enzimas de degradação de polímeros da

parede celular- a quitosanase chiB e uma β -1,3 endoglucanase. Surpreendentemente, a anti-quitosanase e anticorpos anti-mitogilina foram detectados em soros de pacientes que sofrem de aspergilose invasiva ou aspergiloma, abrindo-se a perspectiva de utilizar anticorpos dirigidos contra proteínas secretadas como marcadores de diagnóstico (KNIEMEYER, 2011).

Paralelamente à secreção de enzimas degradadoras, podem ocorrer a excreção de metabólitos emulsificantes e dispersantes como os biossurfactantes e outros de caráter tóxicos como cadeias de hidrocarbonetos gerados da quebra incompleta dos HPA e micotoxinas.

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, produzidos por alguns microorganismos, que contêm partes hidrofílicas e hidrofóbicas e atuam nas interfaces que possuem polaridades diferentes, tais como água-óleo, óleo-água, ar-água, entre outras (SINGH e CAMEOTRA, 2004; MARTINS, 2008). O uso de biossurfactantes para aumento da biodisponibilidade e consequente aumento da taxa de biodegradação, tem sido bem estudado (RAHMAN et al., 2002; RON e ROSENBERG, 2002; VASILEVA-TONKOVA e GESHEVA, 2004; BAEK et al., 2007; DAS e MUKHERJEE, 2007; MARIANO et al., 2007; YAKUBU, 2007; BORDOLOI e KONWAR, 2009; CAMEOTRA e SINGH, 2009; SEO et al., 2009).

Devido às características de determinados contaminantes, inclusive sua concentração, às vezes a degradação não acontece por completo, gerando produtos recalcitrantes, que podem apresentar um nível de toxicidade mais elevada que o próprio contaminante original. Desta forma, substâncias reconhecidamente tóxicas como hidrocarbonetos do petróleo, por exemplo, que frequentemente são encontradas causando contaminação nos diversos ambientes, devem ser avaliadas quanto à sua ecotoxicidade (MARQUES, Jr., 2002; PEDROZO et al., 2002; HAMDI et al 2007; LIU et al., 2009).

Testes ecotoxicológicos são metodologias que permitem avaliar a toxicidade de substâncias sobre um ambiente através da exposição de organismos vivos. Essa avaliação é feita através de testes específicos, com organismos padrão (plantas, sementes, crustáceos, microalgas, entre outros) e selecionados de acordo com os seguintes critérios: ampla disponibilidade e importância em um grupo ecológico (CHAPMAN, 2002).

Segundo Wang e Keturi (1990), a avaliação da fitotoxicidade tem sido um teste bastante utilizado por se tratar de uma técnica simples, rápida, segura e reproduzível para avaliar os danos causados pelas combinações tóxicas presentes em vários compostos.

As sementes são muitas vezes sensíveis a substâncias tóxicas podendo ser utilizadas como bioindicadores como já mostrado em muitos estudos, demonstrando a sensibilidade de espécies como pepino, feijão, repolho, tomate, espinafre, couve, agrião, alface e soja em testes de toxicidade (OECD, 1984; TIQUIA et al., 1996; GUNDERSSON et al., 1997; HELFRICH et al., 1998). Rivera-Cruz e Trijillo-Narcia (2004) afirmaram que a inibição da germinação e do crescimento vegetal são situações fisiológicas que indicam a toxicidade de hidrocarbonetos (MARANHO et al., 2006).

Os estudos de caracterização do secretoma fornecem uma melhor visão sobre a sua avaliação toxicológica e podem apoiar decisões de alterações para uma bem-sucedida biorremediação, por serem os micro-organismos, excelentes secretores de compostos bioativos extracelulares (RODRIGUEZ, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANTRACENO

O antraceno utilizado para este estudo foi da marca Vetec® com índice de pureza igual a 99 %.

3.2 MANUTENÇÃO FÚNGICA

Os fungos testados foram mantidos em placas de Petri com meio Sabouraud (Tabela 1) por 5 dias em estufa microbiológica a 30 °C. Após o crescimento, foram mantidos a -4 °C até o momento do experimento.

Tabela 1 - Composição do meio Sabouraud

COMPONENTES	QUANTIDADES
Peptona	10 g
Glicose	40 g
Ágar	15 g
Água destilada (pH= 5,6)	P/1 litro

Fonte: O autor (2015)

3.3 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram selecionados micro-organismos, entre leveduras e fungos filamentosos, com reconhecido histórico de degradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo nas Coleções de Culturas Temática do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco- UFPEDA e da Coleção de Cultura UCP (SIS – Projeto RENNORFUN) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (Tabela 2).

Tabela 2 - Micro-organismos selecionados com base na sua capacidade de degradação de compostos derivados do petróleo

Número	Linhagem	Substrato	Referência
1	<i>Rhodotorula aurantiaca</i> - UFPEDA845	Óleo diesel	Miranda et al, 2007
2	<i>Candida albicans</i> - UFPEDA848	Combustíveis	Comunicação pessoal
3	Levedura não identificação (849)	Não determinado	Comunicação pessoal
4	<i>Trichosporon lutetiae</i> - UFPEDA860	Combustíveis	Comunicação pessoal
5	<i>Aspergillus tamaritii</i> - UFPEDA870	Óleos lubrificantes	Maciel et al, 2010
6	<i>Penicillium griseofulvum</i> - UFPEDA880	Querosene	Maciel et al, 2013
7	<i>P. aurantiogriseum</i> -UFPEDA884	Querosene	Maciel et al, 2013
8	<i>Curvularia lunata</i> - UFPEDA885	Combustíveis	Não publicado
9	<i>P. corylophilum</i> - UFPEDA886	Querosene	Maciel et al, 2013.
10	<i>A. japonicus</i> - F85	Óleo cru	Oudot et al., 1993.
11	<i>A. terreus</i> - F113	Combustíveis	Comunicação pessoal
12	<i>A. fumigatus</i> - F133	Antraceno	Ye et al., 2011.
13	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Antraceno	Mohammadi & Nasernejad, 2009.
14	<i>Penicillium</i> sp.	Não determinado	Comunicação pessoal
15	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Naftaleno	Cerniglia et al., 1978.
16	<i>Penicillium</i> sp.	Não determinado	Comunicação pessoal
17	<i>Aspergillus</i> sp.	HPAs (4-7 anéis)	Haritash & Kaushik, 2009.
18	<i>A. niger</i>	Combustíveis	Comunicação pessoal
19	<i>Cunninghamella elegans</i> (SIS 41)	Naftaleno	Cerniglia & Yang, 1984; Sutherland, 1992.
20	<i>C. echinulata</i> (SIS 34)	HPAs	Haritash & Kaushik, 2009.

Fonte: O autor (2015)

3.4 SELEÇÃO MICROBIANA

Para os estudos de degradação foi utilizado o meio mineral de Büshnell-Haas. O meio foi escolhido por ser capaz de suprir as necessidades nutricionais básicas dos microorganismos e sendo adicionado o antraceno como a única fonte de carbono.

Os fungos utilizados no experimento foram selecionados através do Teste de Hanson et al., 1993, utilizando o 2,6-diclorofenol-indofenol- DCPIP (2 mL de solução aquosa 0,08 g/mL) como indicador de oxidação biológica. O ensaio foi realizado em frascos de Erlenmeyer (capacidade de 250 mL) com 50 mL do meio Büshnell-Haas- BH modificado e 0,02g do antraceno, resultando em uma concentração de 1,0 g/L. Os frascos foram autoclavados sendo admitidos como inóculo, 3 blocos de gelose das culturas anteriormente repicadas em tapete com a finalidade de uniformizar o crescimento do micélio. O experimento foi mantido estático e durou até a viragem do indicador redox- da cor azul (forma oxidada) para incolor (forma reduzida)- em estufa microbiológica a 30 °C. O ensaio de seleção foi considerado de acordo com a intensidade e o tempo de viragem como sendo: (+++) para ≤ 3 dias com viragem total da coloração; (++) para $>3 \leq 10$ dias com viragem total da coloração; (+) para $>3 \leq 10$ com viragem parcial da coloração e (-) >10 para os resultados sem a viragem da coloração.

3.5 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

Foram utilizados dois diferentes ensaios durante o estudo: Um ensaio com, somente o antraceno como fonte de carbono (ensaio 1) e, mediante o fraco desempenho dos fungos neste teste, foram propostos novos ensaios para a obtenção de um melhor resultado de degradação do combustível utilizado, com a adição de uma fonte alternativa de carbono. Estes últimos foram propostos para ser ocasionada uma prévia adaptação do fungo no meio de crescimento fúngico na presença do antraceno.

Ensaio 1:

O inóculo usado foi obtido pelo crescimento micelial em placas de Petri a partir do semeio fúngico em tapete, mantido durante cinco dias a 30 °C. Para o ensaio foram usados 3 blocos de gelose de 0,8 cm de diâmetros em Erlenmeyer (capacidade de 500 mL) utilizando 100 mL do meio mineral de Büshnell-Haas (BH) modificado, suplementado

com traços de sais como mostrado na tabela 3, concentração de 0,2 g/L de antraceno e pH 7. Os ensaios foram realizados em triplicata, mantidos estático durante 20 dias em estufa BOD a uma temperatura controlada de 30 °C.

Tabela 3 - Composição do meio mineral Büshnell-Haas modificado.

COMPONENTES	QUANTIDADES
NH ₄ NO ₃	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
CuSO ₄	0,002 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,002 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g
H ₂ O (q.s.p.) (pH= 7,0)	1 litro

Fonte: O autor (2015)

Ensaio 2: Seleção de fonte co-metabólica/Extração de proteínas:

Foram testados como fontes co-metabólicas o glicerol e o hexadecano numa concentração de 1 %, ambos usados como fontes de carbono alternativo ao antraceno no meio mineral de Büshnell-Haas complementado com sais.

Foram inoculados 3 blocos de gelose (0,8 cm de diâmetros) de *A. terreus* em Erlenmeyer (500 mL) utilizando 100 mL do meio mineral de Büshnell-Haas (BH) complementado com sais e 1,0 % de fonte co-metabólica, como mostrado adiante:

- **Ensaio 2'**: Micro-organismo foi aclimatado em caldo BH modificado, complementado com 1 % de glicerol ou hexadecano durante 7 dias, depois sendo acrescentado o antraceno (0,1 g/L) e mantido em BOD a 30°C durante mais 10 dias;
- **Ensaio 2''**: Micro-organismo crescendo em meio BH modificado, complementado com 1 % de glicerol ou hexadecano mais 0,1 g/L de antraceno e mantidos por 10 dias em BOD a 30 °C.

Tabela 4 - Composição do meio mineral Büshnell-Haas complementado com glicerol ou hexadecano

COMPONENTES	QUANTIDADES
NH ₄ NO ₃	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄	0,05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
CuSO ₄	0,002 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,002 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002 g
Glicerol/ hexadecano	1,0 %
H ₂ O	P/1 litro
(pH= 7,0)	

Fonte: O autor (2015)

Ao final, depois de observado o melhor desempenho através da cromatografia gasosa dentre os Ensaios 2' e 2'', o experimento selecionado foi preparado para a captação do secretoma fúngico, juntamente com o seu material bioprocessado, para as etapas seguintes de avaliação da fitotoxicidade e da análise das proteínas liberadas no meio de cultivo. Paralelamente, foi

elaborado seu ensaio controle, neste trabalho sendo utilizado o meio BH modificado, com a fonte co-metabólica previamente escolhida e sem a presença do antraceno.

3.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES:

A produção de biosurfactantes foi medida através da avaliação do índice de emulsificação. Onde, alíquotas de 2 mL de meio foram misturadas a 2 mL de combustível. Os combustíveis usados foram o óleo diesel, o biodiesel, o querosene e a gasolina. Após a adição de 2 mL da alíquota e o combustível os tubos de ensaio foram vigorosamente agitados por 2 minutos, utilizando o *vortex*. A ação emulsificante foi determinada após 24 h onde, o índice de emulsão (*E24*) considerado, é a altura da camada de emulsão, dividida pela altura total e multiplicada por 100 (COOPER e GOLDENBERGER, 1987).

3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS: MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E LACASE

Para a quantificação da lacase, foi utilizada a metodologia descrita por Arora e Gil (2001). Onde foi utilizado 0,03 % v/v do 2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina (ABTS), 0,1 mL de tampão acetato de sódio e 0,1 mL do extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi verificada por meio de espectrofotometria baseada no aumento da absorbância a 420 nm.

A quantificação da manganês-peroxidase, foi avaliada pela oxidação do vermelho-fenol (0,01 % v/v), acrescido de 500µL do extrato enzimático, lactato de sódio (0,25 M), albumina bovina (0,5 % p/v), MnSO₄ (2 mM) e H₂O₂ em tampão fosfato citrato (20 mM, pH 4,5). A leitura foi feita a 610 nm (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; MACIEL et al. 2011).

Para a enzima lignina-peroxidase, observou-se a oxidação do álcool veratrílico (10 mM), em H₂O₂ (2 mM), 1 mL de tampão fosfato citrato (125 mM, pH 3,0) e 500µL do extrato enzimático, sendo a oxidação observada a 310 nm (ARORA; GILL, 2001).

3.8 CROMATOGRAFIA GASOSA

As amostras para a cromatografia gasosa foram colhidas por extração líquido-líquido com diclorometano (CH_2Cl_2) com a finalidade de serem coletados todos os hidrocarbonetos livres na fase aquosa. Em paralelo foram realizados ensaios abióticos para a observação das perdas ocasionadas pela volatilização do antraceno. A cromatografia gasosa foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco onde, após a fase orgânica ser separada, foi injetada (1 μL) em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas- GC-MS com as seguintes especificidades: coluna DB - 5ms (5 % difenil e 95 % dimethylpolysiloxane) com dimensões: 0,25 mm x 30 μm x 0,25 μm ; hélio com gás de arraste utilizado com um fluxo de 1,50ml/min. Temperatura inicial de 80° por 5 min e variando linearmente durante 5 minutos até 250 °C a uma taxa de 10 °C. Após esse período, aquecimento com taxa de 15 °C.min⁻¹ e posterior mudança para 280 °C e assim permanecendo durante 5 min. O corte do solvente foi de 4 minutos.

A identificação do antraceno foi feita por comparação dos tempos de retenção do antraceno nos cromatogramas, onde foi calculada a área dos picos, avaliando os seus decaimentos resultantes da biodegradação do mesmo.

As amostras foram obtidas por extração líquido-líquido através do diclorometano (CH_2Cl_2) com a finalidade de serem coletados todos os hidrocarbonetos livres na fase aquosa. Em paralelo foram realizados ensaios abióticos para a observação das perdas ocasionadas pela volatilização do antraceno. A cromatografia gasosa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial- LAMAI da Universidade Federal de Pernambuco. A fase orgânica, após ser extraída, foi injetada (1 μL) em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas- GC-MS com as seguintes especificidades: coluna DB - 5ms (5 % difenil e 95 % dimethylpolysiloxane) com dimensões: 0,25 mm x 30 μm x 0,25 μm ; hélio com gás de arraste utilizado com um fluxo de 1,50 ml/min. Temperatura inicial de 80° por 5 min e variando linearmente durante 5 minutos até 250 °C a uma taxa de 10 °C. Após esse período, aquecimento com taxa de 15 °C.min⁻¹ e posterior mudança para 280 °C e assim permanecendo durante 5 min. O corte do solvente foi de 4 minutos.

A identificação do antraceno foi realizada por comparação dos tempos de retenção do antraceno nos cromatogramas, onde foi calculada a área dos picos, avaliando os seus decaimentos resultantes da biodegradação do mesmo.

3.9 FITOTOXIDADE

A fitotoxicidade foi avaliada utilizando sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), segundo a metodologia de Tiquia et al., (1996) onde, placas de Petri foram utilizadas contendo papel de filtro impregnado com 3 mL do material biodegradado ao final dos dias de experimento e 7 sementes de feijão colocadas de modo equidistante, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1 % e água destilada esterilizada. Paralelamente, foram feitas placas controle, empregando a água. Todos os testes foram realizados em triplicata, sob a temperatura de 25 °C, durante sete dias. Após esse tempo, dois aspectos foram quantificados: o número de sementes germinadas e o crescimento de suas raízes, calculando-se os seguintes parâmetros: percentual de germinação, percentual de crescimento da raiz e o índice de germinação de acordo com as definições seguintes:

$$\text{Percentual de germinação (\%G)} = \frac{\text{Média de sementes testes germinadas} \times 100}{\text{Média de sementes germinadas no controle}}$$

$$\text{Percentual de crescimento da raiz (\%CR)} = \frac{\text{Média do crescimento das raízes das sementes teste} \times 100}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}}$$

$$\text{Índice de germinação (IG)} = \frac{(\% \text{ Germinação da semente}) \times (\% \text{ Crescimento da raiz})}{100\%}$$

3.10 PROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES

Ao final do ensaio, a fase líquida foi separada da biomassa e do resíduo de antraceno por filtração (membrana com poros de 0,22 μm) e congelada com adição de 0,5 mL de 2-mercaptoetanol para evitar a degradação proteica pela redução das pontes dissulfetos.

Após o descongelado o material foi homogeneizado, com uma alíquota de 100 mL do meio mais 200 mL solução de acetato de amônio em metanol 0,1 M ficando, ao final, uma razão de 2:1 e mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 dia em tubos falcon. Posteriormente, os tubos foram levados à centrifugação de 7.000 xg por 30 minutos e o material “*pelletizado*” resolubilizado em tampão. A extração foi efetivada pela ação do fenol saturado em TRIS, havendo a separação das fases após agitação sob gelo e centrifugação a 1.500 xg. À fase fenólica, foi, novamente, adicionada a solução de acetato de amônio em metanol 0,1 M numa proporção de 5 volumes para 1, seguindo, após 1 hora de precipitação a limpeza das proteínas com sucessivas lavagens à base de metanol absoluto, etanol 70 % e acetona PA. Ao final, o *pellet* já seco foi colocado em solução de ureia e tiouréia (8:2) e mantido em refrigeração até os experimentos posteriores.

3.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS

As proteínas solúveis totais foram quantificadas através do protocolo de quantificação pelo método de BRADFORD (1976), que utiliza o *Coomassie Brilliant Blue G-250* como reagente de coloração e uma solução padronizada de albumina de soro bovino (BSA), na concentração de $2,0\text{ mg.mL}^{-1}$, para estabelecimento da curva padrão. Para a quantificação das amostras, foram utilizados 10,0 μL dos extratos proteicos, adicionado de água deionizada e o reagente de coloração, compondo volume final de 1,0 mL, conforme Tabela 3.

Os padrões e as amostras foram analisados em espectrofotômetro de luz visível (*Biowave DNA – Biochrom, Cambridge*) a 595 nm. Aceitando como procedimento adequado, dados que geram função com correlação maior ou igual a 0,90 ($y = a.x \pm b$, $R^2 \geq 0,95$).

Tabela 5 - Representação do ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

Tubo	Concentração Final [mg/mL]	Volume da Solução padrão de BSA (2mg/mL) [µL]	Volume de água deionizada [mL]	Volume da Reagente de Bradford [mL]	Volume final [mL]
0	0,0	0,0	0,800	0,2	1,0
1	0,2	1,0	0,799	0,2	1,0
2	0,4	2,0	0,798	0,2	1,0
3	0,6	3,0	0,797	0,2	1,0
4	0,8	4,0	0,796	0,2	1,0
5	1,0	5,0	0,795	0,2	1,0
6	1,2	6,0	0,794	0,2	1,0
7	1,4	7,0	0,793	0,2	1,0
8	1,6	8,0	0,792	0,2	1,0
9	1,8	9,0	0,791	0,2	1,0
10	2,0	10,0	0,790	0,2	1,0
Amostras	f(x)=y	10,0	0,790	0,2	1,0

Fonte: O autor (2015)

3.12 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

Realizada com cuba de eletroforese vertical e suporte do gel de poliacrilamida a 12,5 % com 1,0 mm de espessura e dimensões 10x10. Condições de corrida foram de amperagem variada de 17 mA a 140 V por 15 minutos, elevado para 150 V e permanecendo assim por 1 h e 30 min, até o final da corrida. Utilizou-se marcador de baixo peso molecular (*LMW Calibration, GE Life Sciences*). Às amostras (entre 10,0-20,0 µL) foram adicionados iguais volumes de tampão de amostra-SDS e posteriormente, carregadas no gel. Depois da corrida o gel foi corado com solução acética de azul de Coomassie e descorado com solução aquosa de ácido acético até ser alcançado um gel translúcido e com

visualização das bandas proteicas. Posteriormente foi digitalizado em *scanner* de transparência *ImageScanner III (GE Life Sciences)*.

3.13 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (SDS-2D-PAGE)

3.13.1 Focalização Isoelétrica (ief)- 1ª dimensão

A IEF foi realizada com *DryStrip (GE Life Sciences)* de 11 cm e pH imobilizado de 3-10 para cada uma das três réplicas biológicas. As quais foram hidratadas com volume correspondente a 200,0 µg de proteínas dissolvidas em solução de ureia 7 M e tiouréia 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4mM de DTT, *IPG buffer – pH 3-10 não linear 1,0 % (v/v) (GE Life Sciences)* e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Para hidratação completa as fitas foram incubadas em *IPG-Box (GE Life Sciences)* por cerca de 18h á temperatura ambiente (25°C). A focalização foi realizada no aparelho *Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Life Sciences)* e conduzida a 10°C em três etapas: a) 300 V – 30 V.h⁻¹; b) 3500 V – 2900 V.h⁻¹; c) 3500 V- 6170 V.h⁻¹ e foram mantidas condições constantes de corrente a 2 mA e potência de 5 W. Após a focalização as fitas foram armazenadas a -80 °C até a realização da segunda dimensão.

3.13.2 2D-PAGE- 2ª dimensão

Antes da eletroforese 2D-PAGE as fitas foram mantidas em solução de equilíbrio e redução, contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), solução de ureia – 6 M, glicerol 30 % (v/v) e SDS 2 % (m/v), em duas etapas. Na primeira etapa, adicionou-se 1 % (m/v) de ditioneitol (DTT) em 5,0 mL da solução, sendo submetido à agitação por 30 minutos. Na segunda etapa, apenas substituiu o DTT por 2,5 % (m/v) de iodoacetamida (IAA), adicionado em 5,0 mL de nova Solução de Equilíbrio.

A eletroforese foi realizada no sistema *Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Life Sciences)*, em gel de poliacrilamida 12,5 %. A primeira etapa da eletroforese foi realizada a 300 V, 30 mA por 15 minutos seguido de uma segunda fase a 300 V, 80 mA por 30 min e uma terceira de 300 V, 100 mA até o final da corrida, em ambiente refrigerado.

3.14 VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após a eletroforese 2D e coloração, as proteínas foram visualizadas através do método de Candiano et al. (2004) modificado. Os géis foram mergulhados em solução fixadora (etanol 40 %, ácido acético 10 %) por 30 minutos e sob agitação constante. Após o descarte da solução fixadora, adicionou-se a solução corante (*Coomassie blue PlastGel blue R*, *GE Life Sciences*) 0,02 % em metanol, ácido acético e água deionizada na proporção de 3:1:6, respectivamente. Este procedimento foi realizado em duas vezes, com duração de 45 minutos cada um. Após o procedimento de coloração, o gel foi descorado através de quatro lavagens subsequentes em solução descorante (etanol 20 %, ácido acético 5%) de 15 minutos, 45 minutos e duas vezes de 2 horas. Após as lavagens os géis foram armazenados em solução de preservação, ácido acético 5%.

3.15 DIGITALIZAÇÃO E OBTENÇÃO DAS IMAGENS

Após descoloração, os géis foram digitalizados no *ImageScanner III* (*GE Life Sciences*) com uso do programa *LabScan 6.0* (*GE Life Sciences*). Para a digitalização foram utilizados os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 300 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com *Coomassie blue*. Precedente a captura da imagem, foi realizada a calibração do *scanner*, para qual foi utilizada fita de calibração *Kodak 3*, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante.

3.16 ANÁLISE DE IMAGENS E SELEÇÃO DAS BANDAS

As imagens obtidas foram analisadas através do programa *Image Master 2D Platinum v7.0* (*GE Life Sciences*). Estas imagens foram processadas no próprio programa, após realização de ajustes quanto ao tamanho e redução de interferências de contrastes. As bandas foram selecionadas ao olho nu, de acordo com a visualização e levando em conta o contraste das alturas (massas) das bandas no gel.

3.17 SELEÇÃO E TRIPSINIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

As bandas selecionadas foram excisadas manualmente dos géis e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em água deionizada. Em seguida, foi realizada a descoloração e remoção de SDS das mesmas por incubação em solução com 50 % de metanol e 2,5 % de ácido acético por 3 h a temperatura ambiente. Logo após, foram desidratados com solução de acetonitrila a 100 %, posteriormente as proteínas foram reduzida com solução de DTT (Ditiotreitol) a 10 mM por 30 minutos, depois alquiladas em solução de IAA a 50 mM, também por 30 minutos. Posteriormente as amostras foram lavadas com bicarbonato de amônio a 100 mM e novamente desidratadas com acetonitrila a 100 %, este procedimento foi realizado três vezes.

Após essas etapas, foi adicionada a solução contendo tripsina na concentração de $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho seco, *overnight*, garantindo a máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Às bandas, foi adicionada a solução de extração (5 % de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50 % de acetonitrila) e após 40 minutos em banho de gelo, em seguida a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina, este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações.

Por fim, as amostras foram secadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo *Speed-Vac (Eppendorf)* e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises por espectrometria de massas.

3.18 FRAGMENTAÇÃO (MS E MS/MS) E SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS

As proteínas foram sequenciadas em espectrômetro de massas *AutoFlex III TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)*, baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz. Para tanto, os peptídeos após concentrados e secos foram eluídos em Solução de Matriz 1% ácido α -ciano-4-hidrocinâmico. Os espectros MS foram obtidos de acordo com os parâmetros do método refletido, *RP-Proteomics* calibrado no próprio equipamento, excluindo da análise íons com m/z menor que 700 Da (faixa de ruído da matriz). Após a obtenção dos MS, os picos de maior intensidade (superior a 3000) foram fragmentados pelo método LIFT, na presença ou não de Argônio.

3.19 ANOTAÇÃO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS

Os espectros obtidos foram pré-analisados no Software *Flex Analysis* e, em seguida, os arquivos tratados foram lançados no *MASCOT* (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) para a interpretação e identificação das proteínas através dos espectros pela da comparação contra os bancos de dados depositados para o grupo *Fungi*, as informações sobre cada proteína identificada foram procuradas no banco de dados do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO MICROBIANA:

Para o teste foi levado em consideração o gradiente de descoloração do indicador e o tempo. Os melhores resultados relacionados ao tempo e à viragem do DCPIP foram obtidos pelos *A. terreus* e a *C. elegans*, resultando na mudança do indicador da cor azul (forma oxidada) para incolor (forma reduzida) em 3 dias de oxidação biológica do antraceno, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do Teste de Hanson das linhagens testadas para biodegradação de antraceno.

LINHAGEM	RESULTADO	TEMPO (dias)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> - UFPEDA845	+	>10
<i>Candida albicans</i> - UFPEDA848	+	>10
Levedura não identificada (UFPEDA849)	-	NC*
<i>Thricosporon lutetiae</i> - UFPEDA860	+	>10
<i>Aspergillus tamaritii</i> - UFPEDA870	++	10
<i>Penicillium griseofulvum</i> - UFPEDA880	++	7
<i>P. aurantiogriseum</i> - UFPEDA884	+	>10
<i>Curvularia lunata</i> - UFPEDA885	+	>10
<i>P. corylophilum</i> - UFPEDA886	++	5
<i>A. japonicus</i> - F85	+++	7
<i>A. terreus</i> - F113	+++	3
<i>A. fumigatus</i> - F133	-	NC*
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+	>10
<i>Penicillium</i> sp.	-	NC*
<i>Rhizopus arrhizus</i>	-	NC*
<i>Penicillium</i> sp.	-	NC*
<i>Aspergillus</i> sp.	-	NC*
<i>A. niger</i>	-	NC*
<i>Cunninghamella elegans</i> (SIS 41)	+++	3
<i>C. echinulata</i> (SIS 34)	-	NC*

Fonte: O autor (2015)

(-) Sem viragem da coloração, (+++) ≤ 3 dias com viragem total da coloração; (++) $>3 \leq 10$ dias com viragem total da coloração; (+) $>3 \leq 10$ com viragem parcial da coloração; *NC Não Cresceu.

Também foram evidenciados alguns fungos caracterizados pelo ensaio como intermediários, ou por uma fraca viragem do indicador ou pelo longo período de crescimento/adaptação dos micro-organismos ao combustível. Algumas outras espécies não apresentaram a capacidade de crescimento e quebra da molécula do antraceno, como a levedura 849, duas espécies de *Penicillium*, uma espécie de *Aspergillus* além dos *A. niger* e do *A. fumigatus*, *P. chrysosporium*, *Rhizopus arrhizus*, e a *C. echinulata*, contrariando a literatura existente, descrito na tabela 5.

De acordo com Colla et al. (2008), locais impactados com poluentes constituem uma boa fonte de obtenção de micro-organismos para estudos de biorremediação desses mesmos poluentes, uma vez que o local contaminado atua como um meio de cultivo seletivo para esses micro-organismos, sendo que os que permanecem nestes locais tornam-se adaptados.

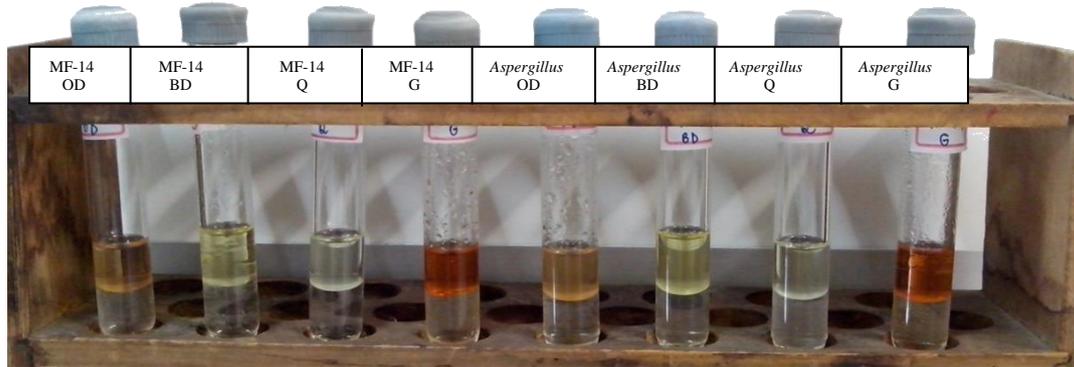
No teste do potencial redox, também, ficou evidenciado, além da recalcitrância do antraceno a existência dos papéis biodegradadores numa população de micro-organismos autóctones, mostrando as potencialidades de cada espécie na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, monoaromáticos e alifáticos.

4.2 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Não foi observada atividade emulsificante, através do Índice de emulsificação em 24 horas- *E24* para o ensaio 1 (Figura 1), logo, o mesmo não foi realizado para os ensaios 2' e 2". Tal resultado pode ter sido revelado pela não necessidade de produção de biosurfactantes pelos fungos na presença do antraceno, já que o mesmo, na sua forma comercial, se apresenta em forma de pequenas escamas ou em pó, ou seja, na forma sólida e não como os combustíveis fósseis apresentados na forma líquida.

Fontes et al., (2008) demonstraram que a atividade emulsificante depende da afinidade entre o biosurfactante com o substrato testado. Evidenciaram ainda a produção de surfactantes durante as fases do crescimento microbiano, comprovando a produção de emulsificantes, tanto na fase estacionária, quanto na de crescimento exponencial, sugerindo que os mesmos podem ser caracterizados como metabólitos primários utilizados pelos micro-organismos como compostos auxiliares no acompanhamento e auxílio na produção de biomassa.

Figura 4. Ensaio para quantificação do índice de emulsificação a 24 horas (E24) do secretoma de *C. elegans* SIS41 e do *A. terreus* frente ao óleo diesel- OD, biodiesel- BD, querosene- Q e gasolina-G.



Fonte: O autor (2015)

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O ensaio 1 evidenciou o *A. terreus* como o mais promissor na produção e eficiência das enzimas do complexo lignolítico, somente sendo inferior na atividade da Lignina Peroxidase da *Cunninghamella elegans*, apresentando um valor de atividade enzimática de 222 unidades enzimáticas por litro, como mostrado na tabela 7.

Tabela 7 - Médias das triplicatas dos ensaios de atividades enzimáticas totais dos fungos com melhores resultados no teste do potencial redox.

Linhagens	Enzimas (U/L)		
	Lacase	MnP	LiP
<i>C. elegans</i> (SIS 41)	82,5	188	222
<i>A. terreus</i>	207,5	1012	184

Fonte: O autor (2015)

Maciel et al. (2010), utilizando fungos isolados de ambiente impactado por petroderivados determinaram as atividades enzimáticas totais e específicas do complexo lignolítico, obtiveram uma espécie de *Aspergillus* sp. como sendo a mais promissora para o uso biotecnológico, apresentando valores de atividade enzimáticas totais entre 7 e 200 U/L dentre todos os 12 fungos filamentosos testados, contudo, Schützendübel et al. (1999) detectaram atividade da MnP de *Bjerkandera adusta* depois de 27 dias nas culturas em meio a base de madeira moída. Esse aumento na atividade da MnP não promoveu o aumento da curva de degradação de HPA neste mesmo tempo, com isso, os autores

relataram que para este micro-organismo não era confirmativo o papel desta enzima na degradação de HPAs.

4.4 CROMATOGRAFIA GASOSA

As análises cromatográficas do ensaio 1 comprovaram uma degradação de apenas 3,0% por parte do *A. terreus* e nenhuma degradação do antraceno pela *C. elegans* (SIS 41) durante os 20 dias do ensaio.

Ye et al., (2011) estudando a biodegradação do antraceno por *Aspergillus fumigatus* isolado de ambiente contaminado, obtiveram taxa máxima de biodegradação de cerca de 65 % quando o pH inicial foi controlado entre 5,0 e 7,5, temperatura fixa de 30 °C e sendo utilizada a lactose como fonte de carbono adicional na concentração igual a do antraceno, concluindo que o *A. fumigatus* poderia ainda utilizar alguns hidrocarbonetos aromáticos tal como benzeno, tolueno, fenol, etc., como fonte de carbono e energia.

Ting et al., 2011 utilizando quatro linhagens de *Ganoderma lucidum* relataram que todas foram capazes de degradar fenantreno e pireno, contudo, comprovou que o potencial de degradação foi afetado positivamente pela adição de: álcool veratrílico, guaiacol, ABTS, ácido cítrico, ácido gálico, ácido tartárico, oxalato, como co-metabólitos. Estes aditivos já eram previamente conhecidos para induzir ou reforçar as atividades de enzimas ligninolíticas como a lacase, MnP e LiP, aumentando as taxas de degradação de ambos os HPAs por *G. lucidum*.

Yuan et al., 2002 relataram que a eficiência da degradação de HPAs pelos micro-organismos é mais vigorosa quando o acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno e o pireno estão presentes simultaneamente em comparação com a taxa de degradação quando os mesmos estão presentes individualmente, afirmando que a presença de todos os cinco compostos fornecem mais fonte de carbono, ou seja, que aclimação cruzada, pode aumentar a velocidade de biodegradação (HARITASH e KAUSHIK, 2009).

No ensaio 2', onde foram realizadas aclimações do *Aspergillus terreus* em meio contendo somente glicerol ou hexadecano a degradação do antraceno foi de 7,51 e 7,97 %, respectivamente, enquanto que nos ensaios 2'', onde o antraceno foi colocado ao mesmo tempo do glicerol, sem aclimação à fonte co-metabólica, ocorreu 1 % de degradação somente onde foi adicionado glicerol ao meio de cultivo.

4.5 FITOTOXICIDADE

Bona et al., (2011) demonstraram em seu trabalho, alterações na estrutura celular de plântulas, causadas por hidrocarbonetos. Outros autores relatam redução da região meristemática apical da raiz, correlacionando indiretamente com a quantidade de hidrocarbonetos presentes no meio contaminado e, de acordo com Alkio et al. (2005), as folhas de *Arabidopsis thaliana* apresentaram lesões e necrose quando cultivadas em solo contaminada pelo fenantreno.

No teste de fitotoxicidade do ensaio 1, foi observada uma toxicidade relativamente pequena dos metabólitos de ambos os fungos, sendo em alguns parâmetros, obtidos resultados superiores ao controle com água, atingindo 100% na porcentagem da germinação das sementes e 100% no crescimento radicular. Este resultado mostra que os metabólitos excretados pelos fungos estudados não apresentaram influências negativas na fisiologia da germinação do feijão, possivelmente apresentando indutores de crescimento.

Contudo, houve uma pequena diferença na toxicidade entre os secretomas fúngicos analisados, sendo do *A. terreus* mais prejudicial à germinação das sementes no crescimento radicular da plântula e, conseqüentemente, refletindo num índice de germinação inferior quando comparado ao secretoma da *C. elegans* (SIS 41) (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias dos ensaios de fitotoxicidade em *Phaseolus vulgaris* de metabólitos e compostos degradados durante a biodegradação do antraceno por *A. terreus* e *C. elegans*.

Linhagem	Germinação da semente (%)		
	Germinação	Crescimento Raiz	Índice de Germinação
<i>C. elegans</i> (SIS 41)	87,49	100	90,56
<i>Aspergillus terreus</i>	100	70,80	79,64

Fonte: O autor (2015)

No ensaio de fitotoxicidade, realizado com o posterior acréscimo de antraceno no meio (Ensaio 2', (Tabela 9) demonstrou que, apesar do maior crescimento micelial e, conseqüente, maiores atividades metabólica e degradante do *A. terreus*, o seu secretoma não se portou como tóxico para a germinação das sementes de feijão, apresentando índice final superior ao ensaio realizado anteriormente e confirmando a baixa toxicidade dos

metabólitos e compostos biodegradados pelo fungo para as plantas e mostrando a potencialidade do uso da biodegradação e biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos como técnica amiga do meio ambiente.

Tabela 9 - Percentual de germinação das sementes de *Phaseolus vulgaris* obtidos com os subprodutos da degradação do antraceno acrescido de 1% de glicerol por *A. terreus*.

Linhagem	Germinação da semente (%)		
	Germinação	Crescimento Raiz	Índice de Germinação
<i>Aspergillus terreus</i>	90,47	95,47	86,62

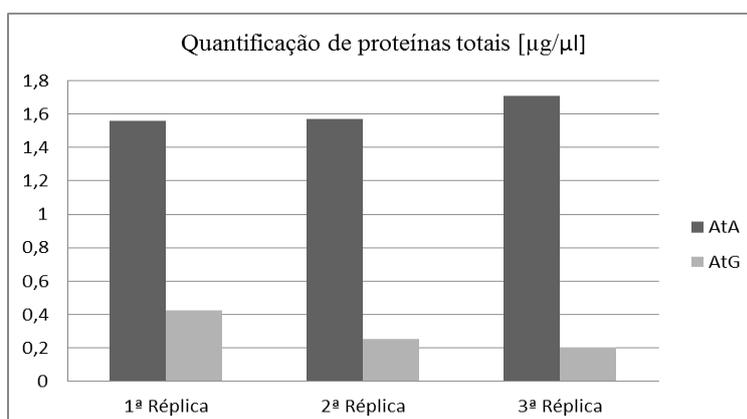
Fonte: O autor (2015)

4.6 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS SECRETADAS

O Protocolo usado para a prospecção do exo-proteoma foi considerado satisfatório por conseguir captá-las no meio de cultura. Houve mais produção e secreção de proteínas no meio contendo o antraceno (Figura 5) possivelmente pela maior disponibilidade de fonte de carbono ou pela maior necessidade da excreção das mesmas.

A média da diferença entre os tratamentos foi de aproximadamente 1,6113 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o ensaio com o antraceno e adicionado o glicerol no meio e de 0,2943 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para o ensaio com somente o glicerol, ou seja, uma média de aproximadamente 5 vezes mais produção de proteínas extracelulares do fungo em contato com o antraceno.

Figura 5 - Quantificação de proteínas totais do secretoma de *A. terreus* no meio BH com glicerol adicionado do antraceno (AtA) e BH com, somente, glicerol (AtG), em 20 dias de crescimento.

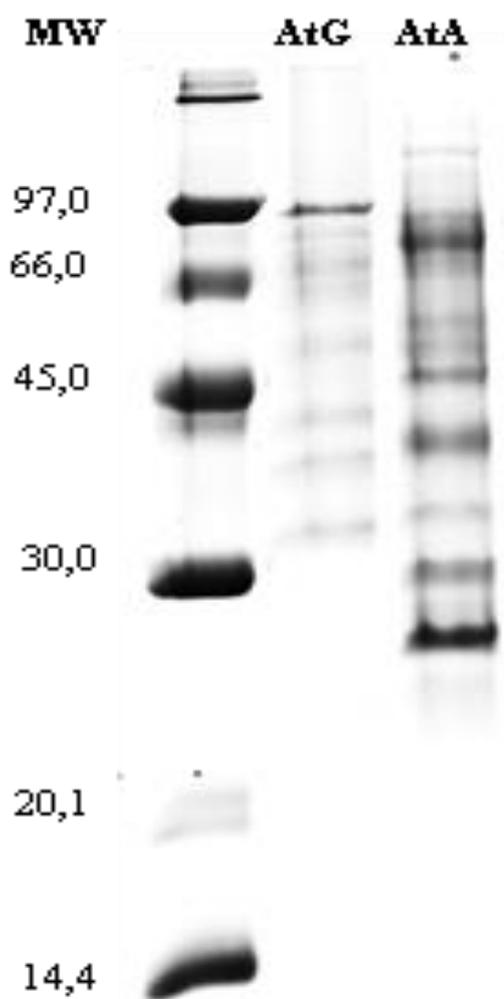


Fonte: O autor (2015)

4.7 SDS-PAGE

O gel obtido e escaneado (Figura 6), mostrado abaixo, permitiu a visualização de bandas correspondentes á grupos proteicos, comprovando com isso, a eficiência do protocolo escolhido. As bandas de cada corrida apresentaram contrastes, mostrando a ocorrência de grupos peptídicos exclusivos e/ou diferencialmente expressos, assim, caracterizando, também, os ensaios microbiológicos como satisfatórios quanto a promoção de estímulos necessários para a modificação da fisiologia e consequente adaptação fúngica ao meio em foram cultivados.

Figura 6 - SDS-PAGE de amostras do secretoma de *A. terreus* crescido em meio de cultura BH com glicerol (AtG) e glicerol + antraceno (AtA) durante 20 dias.

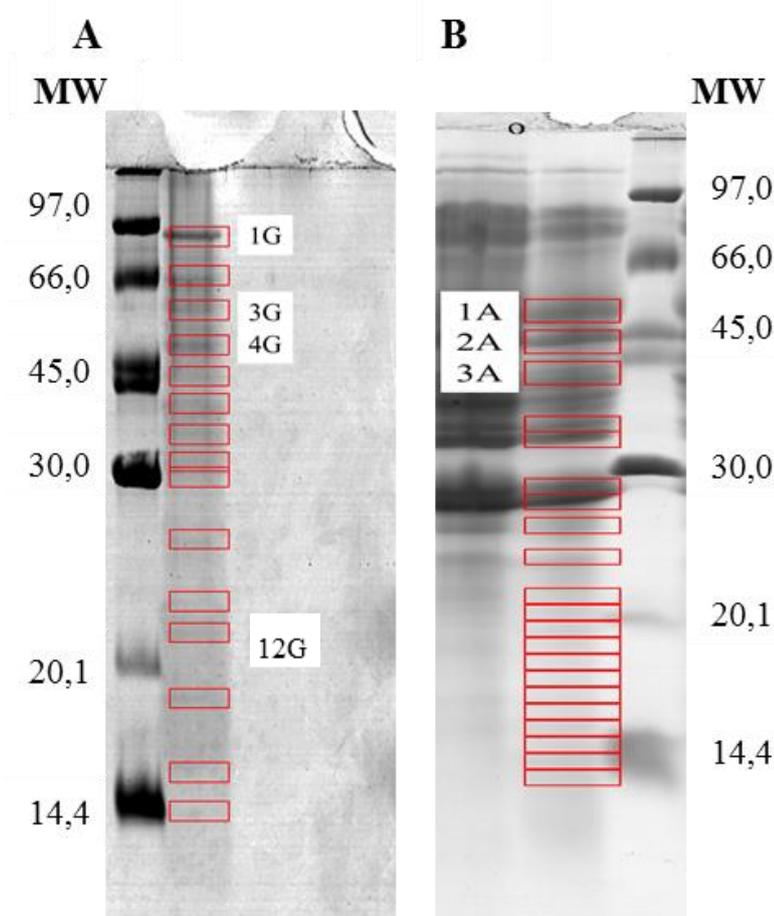


Fonte: O autor (2015)

4.8 EXCISÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS

Das bandas que foram selecionadas e excisadas de cada tratamento submetido o *Aspergillus terreus*, 4 bandas do tratamento com o glicerol e 3 bandas do tratamento adicionado de antraceno foram identificadas pela espectrometria de massa (figura 7).

Figura 7 - SDS-PAGE mostrando as bandas que foram excisadas, destacando as identificadas através da espectrometria por MALDI-ToF. A- tratamento com glicerol e B- tratamento com glicerol + antraceno.

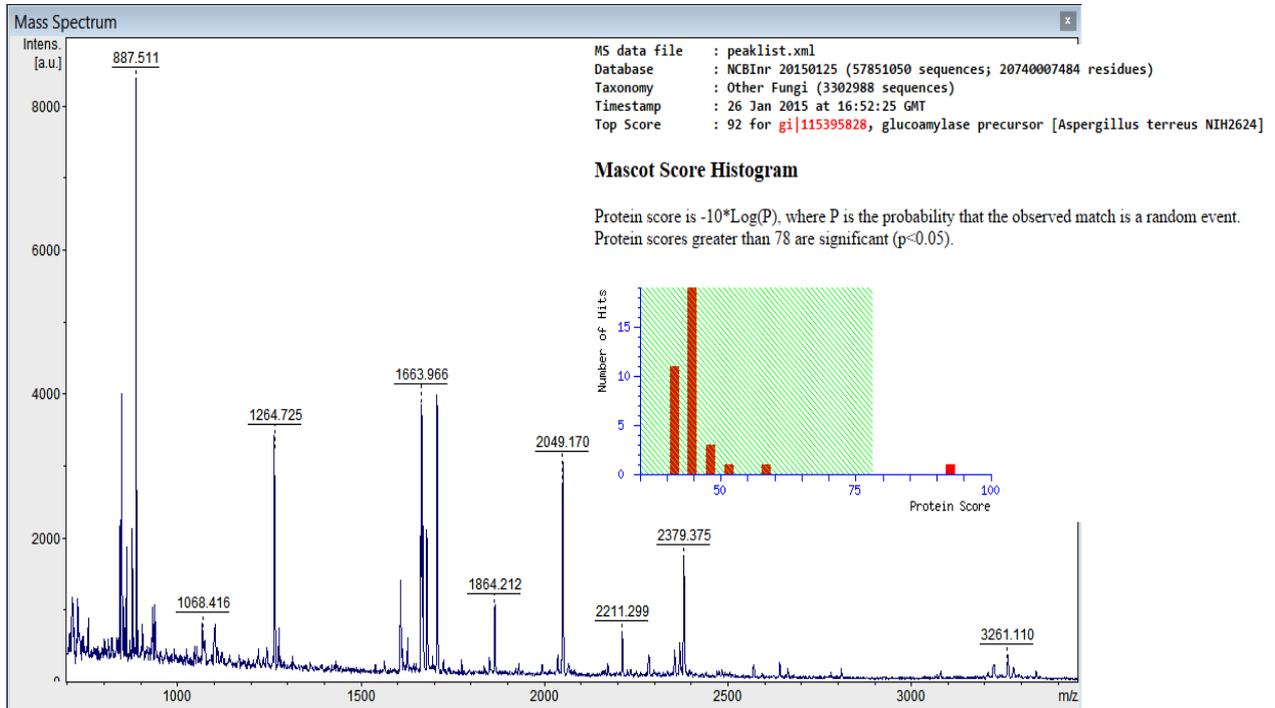


Fonte: O autor (2015)

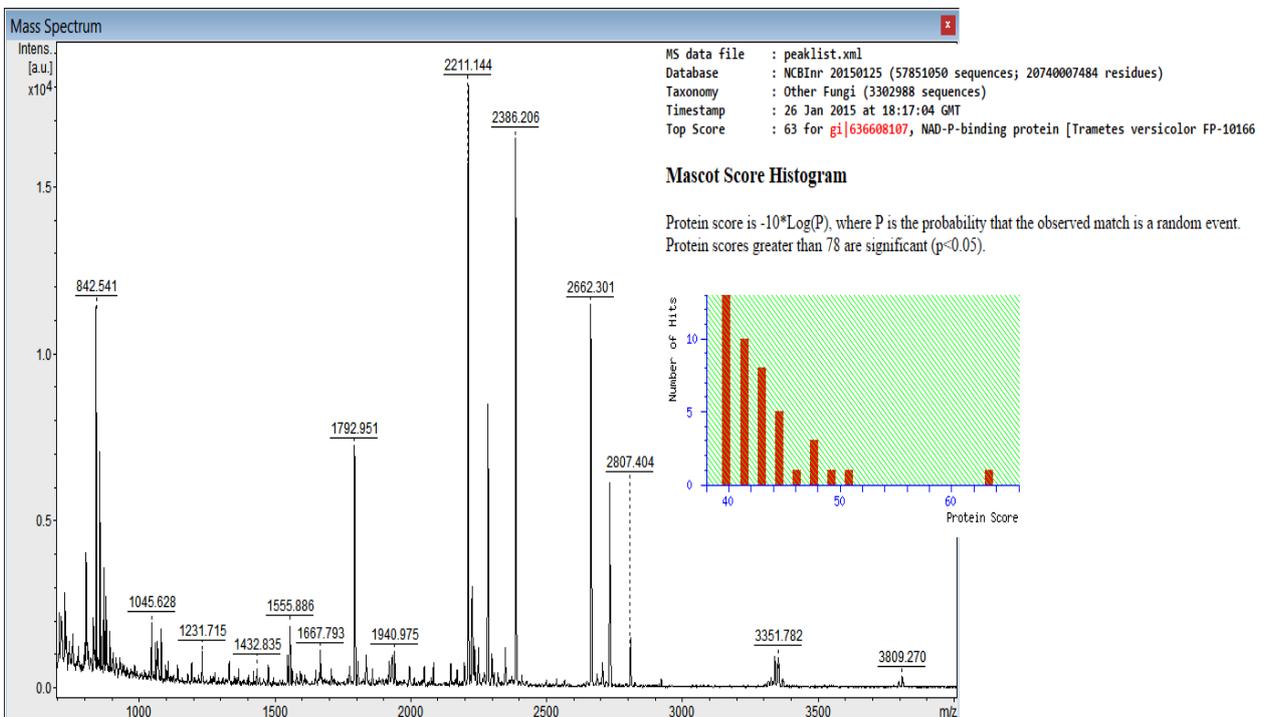
Os espectros, gerados pelo MALDI-ToF-ToF (Figura 8), caracterizaram as amostras digeridas como suficientemente boas para a anotação putativa das proteínas através do método PMF – *Peptide Mass Fingerprint* da plataforma Mascot e destas, 7 foram significativamente anotadas e identificadas com suporte estatístico.

Figura 8 - A: Espectro MS da banda 1G e anotação significativa via PMF no Mascot. B: Espectro MS de banda de SDS-PAGE e anotação não-significativa via PMF no Mascot.

A



B



Fonte: O autor (2015)

Esses resultados podem ser explicados pela ausência de sequenciais curadas, ou ainda pela frequência de atualização dos bancos de dados para fungos, acessados pela plataforma aberta do Mascot. O banco de dados para o *Aspergillus terreus*, por exemplo, possuem apenas 337 proteínas contra 9576 já revisadas para a *Saccharomyces cerevisiae*.

As proteínas identificadas (Tabela 10) foram descritas pelo banco de dados do NCBI e UniprotKB como:

1A: mRNA 3'-end-processing Protein RNA14

Os bancos de dados sugerem várias funções para essa proteína. Para os micro-organismos a que mais sugere é ser um componente do complexo do fator de clivagem IA (ACIA), o qual está envolvido na clivagem endonucleolítica durante a formação do pré-mRNA 3' dependente de poliadenilação. A presença desta proteína coloca em cheque a metodologia usada por ela ser naturalmente encontrada no núcleo ou citoplasma celular. Evidenciando com isso a lise das células fúngicas durante o experimento ou filtração da biomassa.

2A: Uncharacterized Protein

Com atividade oxidoreductase, essa proteína apresenta domínio característico para monoxigenases (Monooxygenase, FAD-binding (IPR002938). Elas incorporam um grupo hidroxila nos substratos e são encontrados em várias vias metabólicas. Nesta reação, dois átomos de oxigênio são reduzidos a um grupo hidroxila e uma molécula de H₂O pela oxidação concomitante de NAD(P)H [PMID: 1444267]. Podendo ser uma das principais efetoras no processo de fragilização da molécula do antraceno pela quebra de ressonância do triplo anel benzênico, facilitando a sua degradação.

Outro dado que refuta a sua descoberta no experimento é a presença, também, do domínio Aromatic-ring hydroxylase-like (IPR003042). As hidroxilases catalisam a monohidroxilação do anel aromático efetuando duas reações em uma única cadeia de polipeptídio; a oxidação de NAD(P)H para gerar dois equivalentes redutores, e a hidroxilação de substratos [PMID: 1444267].

3A: Pyruvate Carboxylase EC 6.4.1.1

Possui atividade catalítica em uma reação de 2-passos, envolvendo a carboxilação da biotina (dependente de ATP) na primeira etapa e a transferência do grupo carboxilo de piruvato no segundo passo.

Essa enzima também é responsável pela formação de glicose a partir de precursores não carboidratos, tais como piruvato, aminoácidos e glicerol.

1G: Glucoamilase

Também possui atividade catalítica, funcionando como acceptora de prótons. Participa do metabolismo de carboidratos na degradação de polissacarídeos.

3G: HET Domain Protein

Possui importância na reprodução fúngica não permitindo que hifas incompatíveis se fundam, ou seja, na incompatibilidade vegetativa, além de participar no processo de morte celular programada. Esse fenômeno restringe a transferência horizontal de elementos citoplasmáticos deletérios como os vírus e impede a pilhagem de genótipos parasitários.

4G: Uncharacterized Protein

Esta proteína ainda não tem representados suas função e domínios descritos nos bancos de dados.

12G: DNA Lyase

Esta enzima possui atividade catalítica nas clivagens de C-C, C-O, C-N e outras ligações por meios que não sejam pela hidrólise ou oxidação, ou, agindo inversamente, adicionando radicais às duplas ligações. Também possui atividade de endonuclease.

Tabela 10 - Resumo das principais características das proteínas identificadas pelo Mascot e anotadas através do UniprotKB.

BANDA	ANOTAÇÃO	ACESSO MASCOT	ID ENTRY	Nº de aa	MW (Da)	pI (CALC.)	COBERTURA DA SEQUÊNCIA	E-VALUE	SCORE	MATCHES	FUNÇÃO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
1A	mRNA 3'-end-processing protein rna14	RNA14_EMENI	Q5B3I8	1075	120,685	5.11	19%	0.019	62	18	Atividade catalítica	Núcleo e/ou citoplasma.
2A	hypothetical protein A1O9_10407	gi 656907695	A0A072P182	583	65,38	6.27	26%	0.027	81	13	Oxidoreductase	Citoplasma
3A	Pyruvate carboxylase (EC: 6.4.1.1)	gi 171696272	B2A941	1117	122,827	6.29	12%	0.0013	94	14	Atividade catalítica	Citoplasma
1G	Glucoamylase EC: 3.2.1.3)	gi 115395828	Q0CPK9	636	67,793	5.16	16%	0.0019	92	10	Atividade catalítica	Secretora
3G	HET domain protein	gi 159128222	B0XZZ9	870	98,187	7.98	26%	0.034	80	18	Reconhecimen to genético	Mitocôndria
4G	Uncharacterized protein	gi 119188861	J3KE03	253	29,339	5.86	41%	0.038	79	9	x	Citoplasma
12G	DNA lyase	gi 632918263	A0A063C888	592	64,742	7.37	23%	0.02	82	12	Atividade catalítica	Mitocôndria

Fonte: O autor (2015)

4.9 SDS-2D-PAGE

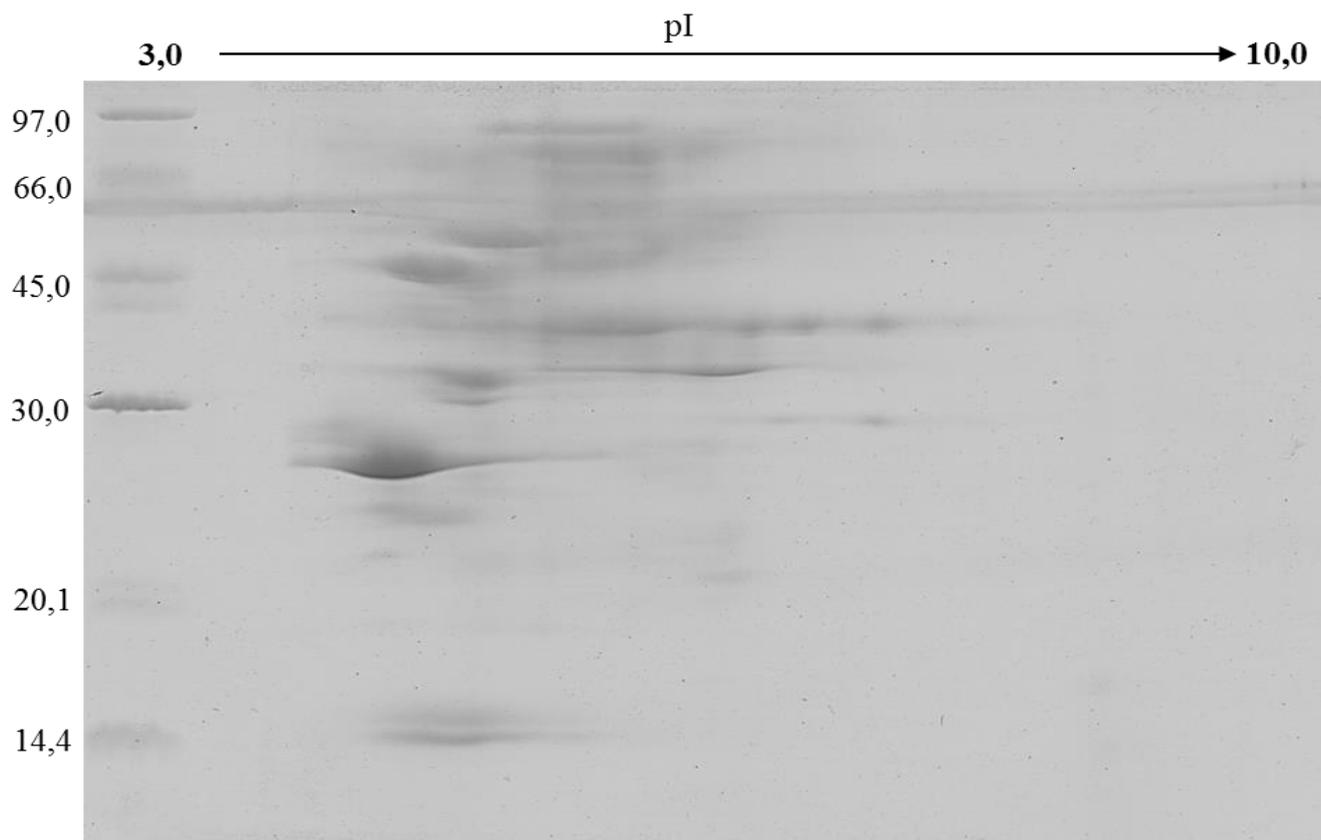
As amostras obtidas não obtiveram uma boa focalização, e com isso algumas proteínas não se localizaram, no gel (Figuras 9 e 10), no seu real ponto isoelétrico, portanto, não foi possível dissertar sobre a caracterização quanto ao pH das proteínas apesar de haver uma maior concentração de *spots* na região de representação ácida do gel fazendo referência a uma possível maior concentração de proteínas ácidas no secretoma do *A. terreus*, além de não poderem ser analisadas estatisticamente pelo *Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Life Sciences)*.

Figura 9 - Mapa do secretoma de *A. terreus* em meio Büshnell-Haas complementado, adicionado de glicerol.



Fonte: O autor (2015)

Figura 10 - Gel SDS-2D-PAGE do secretoma de *A. terreus* em meio Büshnell-Haas complementado, adicionado de antraceno e glicerol como fonte co-metabólica



Fonte: O autor (2015)

5 CONCLUSÕES

1 O fungo *Aspergillus terreus* se apresentou, como a melhor opção entre as 20 linhagens testadas, sendo capaz de degradar 7 % do antraceno, confirmando com isso a recalitrância do mesmo;

2 O material metabolizado pelo fungo durante a biodegradação do antraceno não apresentou toxicidade para as sementes de feijão e nem atuação emulsificante frente aos combustíveis testados, possivelmente pelo baixo desenvolvimento/crescimento fúngico;

3 As enzimas do complexo lignolítico (MnP, LiP e Lacase) do fungo crescido no meio com antraceno, apresentaram uma considerável atividade, apesar da baixa taxa de degradação supondo uma certa ineficiência dessas enzimas na quebra dos HPAs;

4 Não houve diferença nas médias de degradação do antraceno entre os ensaios do experimento 1 e 2, porém, foi demonstrado a importância da presença da fonte co-metabólica concomitantemente ao alvo da degradação desde o início do experimento;

5 O protocolo usado foi efetivo na extração de proteínas, porém, não foi capaz de remover alguns interferentes, os quais, provavelmente, interferiram na focalização isoeletrica das proteínas extraídas;

6 Uma grande quantidade de proteínas do secretoma do *A. terreus*, tanto na presença do glicerol quanto na do antraceno possui seus pontos isoeletricos em pHs ácidos;

7 Foi encontrado no meio de cultivo proteínas intracelulares, de funções catalíticas e uma glicoamilase contendo peptídeo-sinal, indicando o seu provável papel na biodegradação.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A., KOC, H., LIU, F., TIEN, M., **Curr. Genet.** 2005, 47, 49–56.

ADEMOLLO, N.; FERRARA, F.; DELISE, M.; FABIETTI, F.; FUNARI, E.
Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. **Environ. Int.** 43:984–987. 2008.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature, UK**, v. 422,
n. 6928, p. 198-207, 2003.

AGRIOS, G. N. Plant Pathology, 4th edn. **London: Academic Press**, 1997.

ALKIO, M.; TABUCHI, T.M.; WANG, X. & COLÓN-CARMONA, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal of Experimental Botany** 56: 2983-2994. 2005.

ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J. AND BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. Trends in **Biotechnology**, vol. 24, no. 6, pp. 281–287. 2006.

ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation, **Academic Press, San Diego, Calif, USA**, 1994.

ALEXOPOULOS, C. J. , C. W. MIMS , and M. BLACKWELL . **Introductory mycology**. Wiley, New York, New York, USA. 1996 .

ALFARO M, OGUIZA J. A, RAMÍREZ, L, Pisabarro AG. Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. **J Proteomics**. 2014.

AMBROSOLI, R.; PETRUZZELLI, L.; MINATI, J. L.; MARSAN, F.A. Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions, **Chemosphere** 60 (2005) 1231–1236.

- AINSWORTH, G. C. Introduction and keys to higher taxa. Pp. 1-7 in G. C. AINSWORTH, F. K. SPARROW, and A. S. SUSSMAN, eds. The fungi. Vol. 4A: A taxonomic review with keys-ascomycetes and fungi imperfecti. Academic Press, New York. 1973.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microbiol Technology*, v.28, p. 602-605, 2001.
- ATLAS, R. M. "Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 52, no. 2, pp. 149–156. 1991.
- BADDLEY, J.W.; PAPPAS, P.G.; SMITH, A.C.; MOSER, S. A. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. *J Clin Microbiol* 41(12):5525–5529. 2003.
- BAEK, K. H.; YOON, B. D; KIM, B. H.; CHO, D. H.; LEE, I. S.; OH, H. M.; KIM, H. S. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude Oil-contaminated soil with different treatments. *Journal Microbiol Biotechnol*, v. 17, p. 67–73. 2007.
- BONA, C.; SILVA, M. Y. B.; REZENDE, I. M.; SANTOS, G. O.; SOUZA, L. A. INCKOT, R. C. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica* 25(2): 277-285. 2011.
- BONNET, J. L.; GUIRAUD, P.; DUSSER M.; KARDI, M.; LAFFOSSA, J.; STEIMAN, R.; BOHATIER, J. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: tetrahymenapyriformis and selected micromycetes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60 (2005) 87–100.
- BONUGLI-SANTOS R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine derived fungi. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 46, n. 1, p. 32-37. 2010.

- BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. **Journal Hazard Mater.** v.170, p. 495– 505, 2009.
- BRODERICK, J. B. Catechol dioxygenases. **Essays in Biochemistry**, vol. 34, no. 11, pp. 173–189. 1999.
- BRUGGEMAN, F. J. and WESTERHOFF, H. V., “The nature of systems biology,” **Trends in Microbiology**, vol. 15, no. 1, pp. 45–50. 2007.
- BULTER, T.; ALCALDE, M.; SIEBER, V.; MEINHOLD, P.; SCHLACHTBAUER, C. and ARNOLD, F. H. Functional expression of a fungal lacase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 69, no. 2, pp. 987–995, 2003.
- CAJTHAML, T.; PACAKOVA, V.; SASEK, V. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, **Chem. Listy.** 95, 404.2 001.
- CAMEOTRA, S.S. & SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories.** v.8, p.16. 2009.
- CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Peptide sequencing using mass spectrometry: a practical guide. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 669-675. 2008.
- CAO, B.; NAGARAJAN, K. and LOH, K. C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 85, no. 2, pp. 207–228. 2009.
- CARLSEN, M.; NIELSEN, J. Influence of carbon source on alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae*. **Appl Microbiol Biotechnol**;57:346–9. 2001.

- CASTOÑ, J. J.; LINARES, M. J.; GALLEGO, C.; RIVERO, A.; FONT, P.; SOLI'S, F.; CASAL, M.; TORRE-CISNEROS, J. Risk factors for pulmonary *Aspergillus terreus* infection in patients with positive culture for filamentous fungi. **Chest** 131(1):230–236. 2007.
- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin** 44: 7–15. 2002.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.809-813, maio-junho. 2008.
- CONESA, A. et al. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genet Biol**, v. 33, n. 3, p. 155-71. 2001.
- COOPER, D. G. AND GOLDENBER, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 224-229. 1987.
- CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science & Technology**, v. 34, p. 311 – 318. 1996.
- COUTO, M. S. R. Proteínas Extracelulares de *Mycoplasma synoviae* e Estudos Proteômicos das Associações Micorrízicas Arbusculares. (TESE). Florianópolis, 2012.
- CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; and YATES III, J. R. “The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics,” **Nature**, vol. 450, no. 7172, pp. 991–1000. 2007.
- CRISAFULLY, R.; MILHOME, M. A. L.; CAVALCANTE, R.M.; SILVEIRA, E. R.; KEUKELEIRE, D.D.; NASCIMENTO, R. F. Removal of some polycyclic aromatic hydrocarbons from petrochemical wastewater using low-cost adsorbents of natural origin, **Bioresour. Technol.** 99: 4515–4519. 2008.

- CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. **J Biotechnol** 89:27–40. 2001.
- DAS, K., MUKHERJEE, A. K. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. **Journal of Applied Microbiology**. v.102, p.195–203. 2007.
- DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An Overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 159-169. 2008.
- DZUL-PUC, J.D.; ESPARZA-GARCIA, F.; BARAJAS-ACEVES, M.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. Benzo[a]pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust, **Chemosphere** 58: 1–7. 2005.
- EKELUND, R; BERGMAN, A; GRANMO, A; BERGGREN, M. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals—a reevaluation. **Environ. Pollution**.64:107–120. 1990.
- FARNET, A. M.; GIL, G.; RUAUDEL, F.; CHEVREMONT, A. C.; FERRÉ, E. Polycyclic aromatic hydrocarbon transformation with laccases of a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. **Geoderma** 14, 267–271. 2009.
- FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 8, 2091-2099. 2008.
- GIRARD, V; DIERYCKX, C.; JOB, C. and JOB, D. Secretomes: The fungal strike force. **Proteomics** 13, 597–608. 2013.
- GIRAUD, F.; GUIRAUD, P.; KADRI, M.; BLAKE, G.; STEIMAN, R. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment, **Water Res.** 35: 4126–4136. 2001.

- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ R, PRATS E, JORRÍN-NOVO JV. Proteomics of plant pathogenic fungi. **J Biomed Biotechnol.** 2010.
- GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics** [S.I.], v. 4, n. 12, p. 3665-3685. 2004.
- GUNDERSSON, C. A.; KOSTUK, J. M.; MITCELL, H. G.; NAPOLITANO, G. E.; WICKER, L. F.; RICHMOND, J. E.; STEWART, A. J. Multispecies toxicity assessment of compost produced in bioremediation of an explosives-contaminated sediment. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v.16, p.2529-2537. 1997.
- HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry.** v.39, p.1926–1935. 2007.
- HAN, MEE-JUNG; KIM, NAG-JONG; SANG YUP LEE; HO NAM CHANG. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. **Curr Genet** 56:369–382. 2010.
- HAN, X.; JIN, M.; BREUKER, K.; MCLAFFERTY, F. W. “Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses great than 200 kilodaltons,” **Science**, vol. 314, no. 5796, pp. 109–112. 2006.
- HANKARD, P. K.; SVENDSEN, C.; WRIGHT, J.; WIENBERG, C.; FISHWICK, S. K.; SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. **Science of the Total Environment.** v. 330, p. 9–20. 2004.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) A review. **Journal of Hazardous Materials** 169: 1–15. 2009.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, vol. 95, no. 6, pp. 641–655. 1991.

HE, F.; ZHANG ,Y.; CHEN , H.; ZHANG, Z.; and PENG ,Y. L.The prediction of protein-protein interaction networks in riceblast fungus. **BMC Genomics**, vol. 9, article 519. 2008.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology** 153: 1677–1692. 2007.

HELFRICH, P.; CHEFETZ, B.; HADAR, Y.; CHEN, Y.; SCHNABL, H. A novel method for determining phytotoxicity in compost. **Compost Science and Utilization**. v.6, p.6-13. 1998.

<http://www.bccresearch.com/report/BIO019A.html>.

ISOLA, D.; MARZBAN, G.; SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; LAIMER, M.; STERFLINGER, K. Sample preparation and 2-DE procedure for protein expression profiling of black microcolonial fungi. **Fungal Biology**, v. 115, p. 971-977. 2011.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH-degradation insoil, **Environmental .Pollution**. 133: 71–84. 2005.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEM, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEM, J.; LEHTOKARIS, M.: A Battery of Toxicity Tests as Indicators of Decontamination in Composting oils Waste. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 47, p. 156 – 166. 1999.

KAUSHIK, C. P.; HARITASH, A. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health, **Our Earth** 3 (3) 1–7. 2006.

KIM, K.-H., BROWN, K. M., HARRIS, P. V., LANGSTON, J. A., CHERRY, J. R., A proteomic strategy to discover b-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional PAGE in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. **J. Proteome Res.**6: 4749–4757. 2007.

- KIM, S. J.; KWEON, O.; AND CERNIGLIA, C. E. Proteomic applications to elucidate bacterial aromatic hydrocarbon metabolic pathways. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 12, no. 13, pp. 301–309. 2009.
- KIM, Y., NANDAKUMAR, M. P., MARTEN, M. R., The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*. *Brief Funct. Genomics Proteomics* 7: 87–94. 2008.
- KNIEMEYER, O. Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. **Proteomics**: 11, 3232–3243. 2011.
- KOBAYASHI, T.; ABE, K.; ASAI, K.; GOMI, K. et al., Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 71:646–670. 2007.
- LIU, J.; GAO, Q.; XU, N. AND LIU, L. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of *Aspergillus terreus* metabolism. **Mol. BioSyst.** 9: 1939—1948. 2013.
- LIU, Y. J.; ZHANG, A. N.; WANG, X. C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp XA05 and *Sphingomonas* sp FG03. **Biochemical Engineering Journal.** v.44, p.187–192. 2009.
- MACIEL C. DO C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, vol. 8, núm. 3, pp. 299-305. 2010.
- MACIEL, J. M. Biodegradação de Querosene por Culturas Isoladas e em Consórcio Utilizando a Técnica de Bioestímulo (**MONOGRAFIA**). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; and CLARK, D. P. Brock Biology of Microorganisms, **Benjamin Cummings**, 12th edition. 2010.

- MARANHO, L. T.; GALVÃO, F.; PREUSSLER, K. H.; MUNIZ, G. I. B.; KUNIYOSHI, Y. S. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica**. v.20, n°3, p.615-624. 2006.
- MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. & BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.346-353. 2007.
- MARIAPPAN, V.; VELLASAMY, K. M.; THIMMA, J. S.; HASHIM, O. H.; VADIVELU, J. Identification of immunogenic proteins from *Burkholderia cepacia* secretome using proteomic analysis. **Vaccine[S.I.]**, v. 28, n. 5, p. 1318-1324. 2010.
- MARQUES JR, A.N.; MORAES, R.B.C. & MAURAT, C.M. Biologia Marinha. Rio de Janeiro. 311-334. In: PEREIRA, R.C.; GOMES, A.S. (org). **Interciência**. p.382. 2002.
- MARTINS, V. G.; Kalil, S. J.; Costa, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, Vol. 31, No. 8, 1942-1947. 2008.
- MEDINA, M. L.; HAYNES, P.A.; BRECI, L. et al. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics** 5: 3153–61. 2005.
- MEDINA, M. L.; KIERNAN, U. A.; FRANCISCO, W. A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Fungal Genet Biol**;41:327–35. 2004.
- MELO, E. J. V.; Biodegradabilidade de Naftaleno por Linhagens de Bactérias Isoladas do Terminal Portuário de Suape- PE. (**MONOGRAFIA**). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.
- MENDOZA, D. P. G. Proteômica aplicada à caracterização do secretoma de *Trichoderma harzianum*. (**TESE**). 2013.

MOHAMMADI, A.; NASERNEJAD, B. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Hazardous Materials** 161:534–537. 2009.

MOON, H.S.; KAHNG, H. Y.; KIM, J. Y.; KUKOR, J. J.; NAM, K. Determination of biodegradation potential by two culture-independent methods in PAH-contaminated soils, **Environmental Pollution**. 140:536–545. 2006.

NEWAY, L. J.; CATEN, C. E.; AND GREEN, J. R. “Rapid adhesion of *Stagonospora nodorum* spores to a hydrophobic surface requires pre-formed cell surface glycoproteins,” **Mycological Research**, vol. 111, no. 11, pp. 1255–1267. 2007.

ODA. K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA K. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3448–3457. 2006.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals. n° 207. 1984.

OKABE, M.; LIES, D.; KANAMASA, S.; PARK, E. Y. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. **Appl Microbiol Biotechnol** 84(4):597–606. 2009.

PASCH, H.; SCHREPP, W. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. **Springer-Verlag, Hardcover**, 298p. 2003.

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box. **Trends Biotechnol**. 12:50–57. 1994.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Salvador: CRA. 2002.

- PEIXOTO R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. **Enzyme Res.** 2011.
- PENG, R. H.; XIONG, A. S.; XUE, Y.; FU, X. Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y. S.; YAO, Q. H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiol.Rev.** 32:927–955. 2008.
- PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos. **(DISSERTAÇÃO)**. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2006.
- QASEMIAN, L.; GUIRAL, D.; BELGHAZI, M.; FERRÉ, E.; GROS R.; FARNET, ANNE-MARIE. Identification of various laccases induced by anthracene and contribution to its degradation in a Mediterranean coastal pine litter. **Chemosphere** 84:1321–1328. 2011.
- RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology.** v.85, p.257–261. 2002.
- RAVALASON, H.; JAN, G.; MOLLE´, D.; PASCO, M.; COUTINHO, P. M.; LAPIERRE, C.; POLLET, B. et al., **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 80: 719–733. 2008.
- RIVERA-CRUZ, M. C.; TRUJILLO-NARCÍA, A. Estúdio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. **Interciências.** v. 29, p. 369-376. 2004.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology.** v.3, n°4, p. 229-236. 2001.
- SALOHEIMO, M.; PAKULA, T. M. The cargo and the transport system: secreted proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). **Microbiology,** v. 158, n. Pt 1, p. 46-57. 2012.

SANTOS H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E.; ROSADO, A. S. and PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, Air, and Soil Pollution**, vol. 216, no. 1–4, pp. 329–350. 2011.

SANTOS, C.; LIMA, N. A Identificação de Fungos pela Espectrometria de Massa Através da Técnica de MALDI-TOF ICMS. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Micologia** (Eds.: J.C. Dianese, L.T.P. Santos), Sociedade Brasileira de Micologia, p. 566-574. 2010.

SANTOS, E. C.; JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S.; CAMEROON, F. A. O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron stimulated *Pseudomonas* sp., **Bioresour. Technol.** 99:2644–2649. 2008.

SANTOS, P.M.; TEIXEIRA, M.C.; SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia, Lisboa**, p.7-17. 2004.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of bio solids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation, **Environ. Pollut.** 136:187–195. 2005.

SAYANI MITRA, ARNAB PRAMANIK, SRIJONI BANERJEE, SAUBHIK HALDAR, RATAN GACHHUI, JOYDEEP MUKHERJEE. Enhanced Biotransformation of Fluoranthene by Intertidally Derived *Cunninghamella elegans* under Biofilm-Based and Niche-Mimicking Conditions. **Applied and Environmental Microbiology** p. 7922–7930 Vol 79 N.24. 2013.

SCHATZ G, DOBBERSTEIN B. Common principles of protein translocation across membranes. **Science** 271: 1519–1526. 1996.

- SCHÜTZENDÜBEL, A.; MAJCHERCZYK, A.; JOHANNES, C.; HÜTTERMANN, A. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. **International Biodeterioration & Biodegradation** 43; 93±100. 1999.
- SCHWIENBACHER, M.; WEIG, M.; THIES, S.; REGULA, J. T. et al., Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions. **Med. Mycol.** 43, 623–630. 2005.
- SEBELA, M., REHULKA, P., KABRT, J., REHULKOVA, H. et al., Identification of N-glycosylation in prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and evaluation of the enzyme for its possible application in proteomics. **J. Mass Spectrom:** 44, 1587–1595. 2009.
- SEO, J.; KEYN, Y.; LI, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** v.6, p.278- 309. 2009.
- SETTI, L.; LANZARINI, G.; and PIFFERI, P. G. Whole cell biocatalysis for an petroleum desulfurization process. **Fuel Processing Technology**, vol. 52, no. 1–3, pp. 145–153. 1997.
- SHOJI J, Arioka M, Kitamoto K. Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. **Biotechnol Lett.**30:7–14. 2008.
- SHUTTLEWORTH K. L.; CERNIGLIA C. E. Environmental aspects of PAH biodegradation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 54:291–302. 1995.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnol**, 22: 142-146. 2004.

- SMITH, M.; THURSTON, F. and WOOD, D. A. Fungal laccases: role in delignification and possible industrial applications. in *Multi-Copper Oxidases*, A. Messerschmidt, Ed., pp. 201–224, **World Scientific Publishing**, Singapore. 1997.
- SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J. N. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewater s. **Environ. Int.** 34:1033–1049. 2008.
- SONG, J.; WIN, J.; TIAN, M. et al., “Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3,” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 106, no. 5, pp. 1654–1659. 2009.
- SPANG, A. The life cycle of a transport vesicle. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 18, p. 2781-9. 2008.
- STERNBERG, S. The emerging fungal threat. **Science** 266: 1632. 1994.
- SUTHERLAND, T. D.; HORNE, I.; WEIR, K. M. et al. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, vol. 31, no. 11, pp. 817–821. 2004.
- SYED, K., POROLLO, A.; LAM, Y. W.; GRIMMETT, P. E.; YADAV, J. S. CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, lkylphenols, and alkanes. **Appl Environ Microbiol.** 2013 Apr;79(8):2692-702.
- TAN, K.-C.; IPCHO, S. V.; TRENGOVE, R. D.; OLIVER, R. P.; SOLOMON, P. S. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology**, vol. 10, no. 5, pp. 703–715. 2009.

TING, W.T.E.; YUAN, S.Y.; WU, S. D.; CHANG, B.V. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. **International Biodeterioration & Biodegradation** 65: 238 a 242. 2011.

TIQUIA, S. M.; N. F.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**; v.93, n°3, p. 249-256.1996.

TOKIMATSU, I.; KUSHIMA, H.; IWATA, A.; HASHINAGA, K.; UMEKI, K.; OHAMA, M.; KOHNO, K.; ISHII, H.; KISHI, K.; OGATA, M.; HIRAMATSU K.; SAIKAWA, T.; KADOTA, J. Invasive pulmonary aspergillosis with hematological malignancy caused by *Aspergillus terreus* and in vitro susceptibility of *A. terreus* isolate to micafungin. **Intern Med** 46(11):775–779. 2007.

TORRES RODRIGUEZ, Marina Teresa. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. *Rev Cubana Hig Epidemiol, Ciudad de la Habana*, v. 41, n. 2-3, dic. 2003 . Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-0032003000200009&lng=es&nrm=iso>. Acesso em 15 out. 2014.

U.S. EPA, “States Environmental Protection Agency National Contingency Plan Product,” 2011, Disponível em: <<http://www.epa.gov>>. Acesso em 03 set. 2014

V. BHADARIA, W. S. ZHAO, L. X. WANG, et al., “Advances in fungal proteomics,” **Microbiological Research**, vol. 162, no. 3, pp. 193–200. 2007.

VAN DEN BRINK, H. J. M.; VAN GORCOM, R. F. M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 23, p. 1-17. 1998.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 67, no. 4, pp. 503–549. 2003.

- VASILEVA-TONKOVA E.; GESHEVA, V. Potential for biodegradation of hydrocarbons by microorganisms isolated from Antarctic soils. **Z Naturforsch.** v.59, p.140–145. 2004.
- WALSH, T.J.; PETRAITIS, V.; PETRAITIENE, R.; FIELD-RIDLEY, A.; SUTTON, D.; GHANNOUM, M.; SEIN, T. SCHAUFELE, R.; PETER, J.; BACHER, J.; CASLER, H.; ARMSTRONG, D.; ESPINEL-INGROFF, A.; RINALDI, M. G.; LYMAN, C. A. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. **J Infect Dis** 188(2):305–319. 2003.
- WANG, W.; KETURI, P. H. Comparative Seed Germination Tests Using Ten Plant Species for Toxicity Assessment of a Metal Engraving Effluent Sample. **Water, Air, and Soil Pollution.** v. 52, p. 369-376. 1990.
- WATANABE, K.; HAMAMURA, N. “Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation,” **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, no. 3, pp. 289–295. 2003.
- WEBER S. S.; PARENTE A. F.; BORGES C. L.; PARENTE J. A.; BAILÃO, A. M.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells. **PLoS One**. 2012.
- WHITELEY, C. G. and LEE, D. J. “Enzyme technology and biological remediation,” **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 38, no. 3-4, pp. 291–316. 2006.
- WILD, S.R.; JONES, K.C., Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, **Environ. Pollut.** 88 (1) 91–108.1995.
- YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology.** v.6, n°24, p. 2735-2739. 2007.

YE, J. S.; YIN, H.; QIANG, J.; PENG, H.; QIN, H. M.; ZHANG, N.; HE, B.Y. Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. **J. Hazard Mater.** 15;185(1):174-81. 2011.

YUAN, S. Y.; SHIUNG, L.C.; CHANG, B.V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by inoculated microorganisms in soil, Bull. **Environ. Conatm.Toxicol.** 69: 66–73. 2002.

YUAN, S. Y.; WEI, S. H.; CHANG, B.V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture, **Chemosphere** 41: 1463–1468. 2000.

ZAHED, M. A.; AZIZ, H. A.; ISA, M. H.; MOHAJERI, L. Enhancement biodegradation of n-alkanes from crude oil contaminated seawater. **Int. J. Environ. Res.** 4:655– 664v. 2010.