



CARLA DO COUTO SOARES MACIEL

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO SISTEMA LIGNOLÍTICO E
BIOSSURFACTANTE POR *Curvularia lunata* (UFPEDA885), USANDO
ÓLEO DIESEL COMO SUBSTRATO**

**Recife
Dezembro/ 2010**



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

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO SISTEMA LIGNOLÍTICO E
BIOSSURFACTANTE POR *Curvularia lunata* (UFPEDA885), USANDO
ÓLEO DIESEL COMO SUBSTRATO**

**NOME: CARLA DO COUTO SOARES
MACIEL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia de Fungos do Departamento de
Micologia do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de doutor a
em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos Industriais

**Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de
Campos Takaki**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Norma Buarque de
Gusmão**

Recife

Dezembro/ 2010

Maciel, Carla do Couto Soares

Produção de enzimas do sistema lignolítico e biossurfactante por *Curvularia lunata* (UFPEDA885), usando óleo diesel como substrato / Carla do Couto Soares Maciel. – Recife: O Autor, 2010.

142 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takai.

Co-Orientadora: Norma Buarque de Gusmão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas de fungos 2. Biorremediação 3. Biotecnologia 4. Diesel I. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-019

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO SISTEMA LIGNOLÍTICO E
BIOSSURFACTANTE POR *Curvularia lunata* (UFPEDA885), USANDO
ÓLEO DIESEL COMO SUBSTRATO**

CARLA DO COUTO SOARES MACIEL

COMISSÃO EXAMINADORA:

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Edelvio de Barros Gomes
Universidade Federal de Sergipe

Profa. Dra. Maria Aparecida Resende Stoianoff
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTE

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Raquel Diniz Rufino
Universidade Católica de Pernambuco

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS DO SISTEMA LIGNOLÍTICO E
BIOSSURFACTANTE POR *Curvularia lunata* (UFPEDA885),
USANDO ÓLEO DIESEL COMO SUBSTRATO**

CARLA DO COUTO SOARES MACIEL

Data da defesa: 17 de dezembro de 2010.

COMISSÃO EXAMINADORA:

MEMBROS TITULARES

Profa. Dra Maria Aparecida Resende Stoianoff
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Edelvio de Barros Gomes
Universidade Federal de Sergipe

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco

Dedico aos que estiveram sempre ao meu lado, tornando esta caminhada mais tranquila e segura, principalmente: Carlos, Arleide, Rodrigo e Carlos Júnior, sem vocês nada teria sentido. Obrigada por entenderem minha ausência e pelo incentivo para que eu atingisse meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram a concluir este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos...

... a Deus por me carregar nos braços nos momentos em que vi somente um par de pegadas na areia.

... a meus pais Carlos Maciel e Arleide Maciel pelo amor incondicional que sempre dedicaram e ainda pelo apoio, incentivo e paciência devotados desde o início de minha vida acadêmica.

... a meu esposo Rodrigo de Andrade por tanto apoio. Em todos os momentos senti sua presença ao meu lado e seu amor foi um grande incentivador desta conquista.

... ao meu irmão Carlos Júnior pelo companheirismo em todos os momentos.

... a minha avó Leda por sempre ter tido a certeza de que eu conseguiria superar meus objetivos e pelo amor incondicional e atemporal que nos une.

... aos meus familiares pela torcida constante.

... a professora Galba Maria de Campos Takaki pelo exemplo de profissionalismo e principalmente, por ter acreditado em meu potencial.

... a professora Norma Buarque de Gusmão minha grande mestra e amiga. Obrigada por me ensinar valores que levarei para sempre.

... aos meus mestres para toda a vida, serei eternamente aluna e recebedora dos conhecimentos por vocês transmitidos. Muito obrigada por colaborarem para a minha formação, professoras Cristina Maria de Souza Motta, Maria de Fátima Vieira Queiroz de Sousa e Professores: Carlos Alberto Alves da Silva e Edelvio de Barros Gomes.

... aos professores do Departamento de Micologia pelos ensinamentos e incentivo a pesquisa, ampliando cada vez mais meus conhecimentos acadêmicos.

... aos técnicos de laboratório cuja experiência e ensinamentos são primordiais para a realização de uma pesquisa, especialmente Orlando, Luiz Carlos, Humberto e André.

... às secretárias Giovanna, Vanessa, e Sônia.

... aos amigos Rita Miranda, Cynthia Souza, Flávia Arruda, Erik Jonne, Persio Alexandre, Luis Cláudio, Aliny Almeida, Diana Duarte, Nelânia Queiroz, Evelyne Solidônio, Amanda Mendes, Thalice, Mayra, Glória, Darne, Maria Cláudia, Márcio e Miriam pela amizade e carinho sempre constantes vocês foram meu maior presente nesses três anos de pesquisa.

... a amiga Minelli Sousa, por tanta dedicação e companheirismo, este trabalho é seu também.

... aos amigos Adamaris, Rosileide e Yuri pelo companheirismo e ajuda durante o trabalho.

... aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

...a Universidade Federal de Pernambuco, pela acolhida para realização desta e de tantas outras pesquisas desde o início da minha vida acadêmica, especialmente ao Departamento de Antibióticos e ao Departamento de Micologia.

... a Universidade Católica de Pernambuco, pela recepção para realização deste trabalho, especialmente o Núcleo de Pesquisa e Ciências Ambientais.

... a FACEPE pelo apoio financeiro.

... ao projeto Biorremediação de Ambientes Poluídos por Petróleo e Derivados, rede RECUPETRO-PETROBRAS.

... a TRANSPETRO pelas amostras de óleo diesel cedidas.

... a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho objetivou investigar o potencial biotecnológico de *Curvularia lunata* UFPEDA885/URM6179 na produção de enzimas lignolíticas e biossurfactante utilizando óleo diesel como substrato. Para seleção deste fungo, utilizou-se ácido gálico e solução de Manachini acrescida de óleo diesel (2%), seguida da quantificação de lacase (LaC), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Posteriormente, realizou-se planejamento fatorial completo 3^2 variando pH e temperatura, para otimização da produção das enzimas lignolíticas e avaliou-se o efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática. Para a produção de biossurfactante, realizou-se um delineamento composto central rotacional 2^4 variando: inóculo, NH_4NO_3 , $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$. Inoculou-se o fungo em meio mineral Bushnell Haas modificado, acrescido de 2% de óleo diesel, onde foram avaliados: tensão superficial e os efeitos do pH, temperatura e salinidade (NaCl) na atividade emulsificante e na estabilidade da emulsão. Por fim, verificou-se a toxicidade do biossurfactante e a biorremoção de óleo automotivo em solo arenoso. *C. lunata* UFPEDA885 foi selecionado como produtor das três enzimas do sistema lignolítico. No planejamento fatorial, observou-se otimização na produção de LaC em nove vezes ($1940\text{U/L} \pm 4$). Esta enzima, apesar de instável nas condições testadas, foi produzida em maior quantidade por *C. lunata* UFPEDA885, em pH 3,4 a 65°C . Houve otimização na produção de LiP ($1480\text{U/L} \pm 6$) em 24 vezes, sendo estável, com pH ideal para produção de 6,2 a 65°C . A maior produção de MnP por *C. lunata* UFPEDA885 foi $820\text{U/L} \pm 3,5$, um aumento de cerca de 15 vezes, sendo esta enzima estável, com maior produção em pH de 3,4 a 50°C . *C. lunata* UFPEDA 885 produz biossurfactante, reduzindo a tensão superficial até $32,9\text{mN/m}$. Este fungo é capaz de emulsificar até 98% de óleo automotivo, com elevada estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e salinidade. Houve baixa toxicidade frente a sementes de *Cucumis sativa* e a CL50 para *Artemia salina* ocorreu a 25% de extrato bruto do biossurfactante. Por fim, houve remoção de 93,5% de óleo automotivo em solo arenoso pelo extrato bruto produzido. *C. lunata* UFPEDA885 é indicado para produção de LiP, MnP, biossurfactante e bioemulsificante, utilizando óleo diesel como substrato visando aplicação industrial e na biorremediação.

Palavras-chave: Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase, Lacase, Tensão Superficial, Fungos Ascomycetos, Biorremediação.

ABSTRACT

This study aimed at investigate the biotechnological potential of *Curvularia lunata* UFPEDA885/URM6179 producing lignolytic enzymes and biosurfactant using diesel oil as substrate. To check this fungus was used and gallic acid and solution Manachini plus diesel oil (2%), followed by quantification of laccase (Lac), lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP). Subsequently a 3^2 full factorial design varying pH and temperature for optimal production of lignolytic enzymes and evaluated the effect of pH and temperature on enzyme activity and stability. For biosurfactant production, there was a central composite design ranging 2^4 : inoculum, NH_4NO_3 , $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. The fungus was inoculated in mineral medium Bushnell Haas amended, plus 2% of diesel oil, were evaluated: surface tension and the effects of pH, temperature and salinity (NaCl) on the emulsifying activity and emulsion stability. Finally, there was the toxicity of the biosurfactant and bioremoval of automotive oil in sandy soil. *C. lunata* UFPEDA885 was selected as producer of three enzymes. In factorial design, optimization observed production of Lac was nine times higher (1940U / L +4). This enzyme, although unstable in the conditions tested, was produced in greater quantities by *C. lunata* UFPEDA885 at pH 3.4 and 65°C. There optimization in LiP production 24 times (1480U / L +6) and was stable, with optimum production pH 6.2 and 65°C. The highest MnP production by *C. lunata* UFPEDA885 was 820U / L +3.5, an increase of about 15 times, this enzyme being stable, with greater production at pH 3.4 and 50°C. *C. lunata* UFPEDA 885 is producer of biosurfactant reducing the surface tension to 32.9 mN/m. This fungus is capable to emulsify up to 98% of automotive oil with high stability at different pH, temperature and salinity. There was low toxicity to seeds of *Cucumis sativa* and LC_{50} for *Artemia salina* occurred at 25% of crude biosurfactant extract. Finally, there was a removal of 93.5% of automotive oil in sandy soil by the crude extract. *Curvularia. lunata* UFPEDA885 is suitable for production of LiP, MnP, biosurfactant and bioemulsificant using diesel oil as a substrate in order, and industrial use in bioremediation.

Key-words: Lignin peroxidase; Manganese peroxidase, Laccase, Surface tension, Fungi, Ascomycetes, Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Pág.
Figura 01. Frações do petróleo com seus derivados: relação entre o número de carbonos e os pontos de ebulição (Chagas-Spinelli, 2007).	26
Figura 02. Principais grupos de contaminantes ambientais, destacando-se a contaminação por combustíveis líquidos e solventes aromáticos (CETESB, 2008).	29
Figura 03. Formas de contaminação por petroderivados no meio ambiente (CETESB, 2008).	32
Figura 04. Representação esquemática dos principais horizontes típicos do solo (Seabra, 2005).	37
Figura 05. Fases que ocorrem nas regiões saturada e insaturada do solo em um vazamento de hidrocarbonetos (Guiguer, 2000).	41
Figura 06: Representação esquemática do processo de degradação do petróleo relacionando-se fatores abióticos e bióticos (Guiguer, 2000-adaptada).	43
Figura 07: Processos pelos quais o petróleo e seus derivados passam após chegada no ambiente e sua relação cronológica (Bento, 2005).	45
Figura 08. Via catabólica de degradação de HPAs por fungos (a) e bactérias (b) (Cerniglia, 1992).	49
Figura 09. Representação esquemática de como estão distribuídos os contaminantes orgânicos nas diversas fases (Seabra, 2008).	52
Figura 10. Conceito da ecotoxicologia segundo Blaise, 1982 in Zagatto; Bertolotti, 2006.	56
Figura 11. Representação esquemática do aspecto morfológico das estruturas microscópicas de espécies do gênero <i>Curvularia lunata</i> . Fonte: Mycobank, 2010.	63
Figura 12. Unidade de fenilpropano e monômeros da lignina, onde é possível visualizar os anéis aromáticos de sua estrutura (Aguar-Filho, 2008).	69
Figura 13. Representação esquemática das principais estruturas formadas por biossurfactantes (Champion et al., 1995).	74
Capítulo 3.	
Figura 1. Quantificação de biomassa (g/L) e pH produzidos por fungos filamentosos utilizando óleo diesel como substrato, após 72 horas de incubação. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.	87

Figura 2. Atividade total (U/L^{-1}) de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase produzidas pelos fungos filamentosos. Valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Anova de Friedman, sendo a, b,c = $p < 0.05$. 88

Capítulo 4

Figura 1. Efeito do pH na atividade residual (%) das enzimas lacase-LaC, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885. 96

Figura 2. Efeito da temperatura na atividade residual (%) das enzimas lacase-LaC, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885. 96

Capítulo 5

Figura 1. Gráfico de Pareto indicando as variáveis que apresentaram maior influência na redução da tensão superficial por *Curvularia lunata* (UFPEDA 885) em cultivo estático, ao nível de significância de 95%. 107

Figura 2. Superfícies de respostas em função da tensão superficial, para a razão $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ versus NH_4NO_3 (A), $\text{CuSO}_4 \text{H}_2\text{O}$ versus NH_4NO_3 (B), $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ versus $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (C), inoculo versus NH_4NO_3 (D), inoculo versus $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (E) e inoculo versus $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (F). 109

Figura 3. Aspecto do solo arenoso antes da contaminação, após contaminação por óleo automotivo e após biorremediação de 93,5% do óleo pelo biossurfactante produzido por *C.lunata*. 110

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Págs.
Tabela 01. Características físico-químicas dos principais HPAs (Lunsted, 2003)	23
Tabela 02. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes no diesel, suas concentrações e possíveis danos aos seres humanos (Neto <i>et al.</i> ,2000).	28
Tabela 03. Histórico dos principais acidentes envolvendo petróleo e seus derivados.	31
Tabela 04. Principais efeitos causados à saúde humana pelos poluentes atmosféricos (Mariano, 2005-adaptado).	33
Tabela 05. Histórico da utilização dos recursos hídricos nos países desenvolvidos e no Brasil (Ferreira, 2002-Adaptado).	34
Tabela 06. Classificação dos tipos de solo de acordo com o tamanho das partículas segundo a EMBRAPA (Seabra, 2005-adaptada).	37
Tabela 07. Principais técnicas de biorremediação de solos (Seabra, 2008-adaptado).	40
Tabela 08. Fatores que afetam o processo de biorremediação microbiana em ambiente impactado (Esposito; Azevedo, 2004).	48
Tabela 09. Escala de biodegradabilidade dos produtos refinados do petróleo de acordo com os seus constituintes químicos (U.S. Environmental Protection Agency, 1995 <i>in</i> Seabra, 2008).	50
Tabela 10. Fontes e função metabólica dos principais elementos essenciais para os fungos (Esposito; Azevedo, 2004).	61
Tabela 11. Fungos envolvidos na recuperação de ambientes contaminados por diferentes poluentes (Esposito; Azevedo, 2004).	66
Tabela 12. Principais organismos degradadores da lignina (Esposito; Azevedo 2004-adaptado).	70
Tabela 13. Diferenças entre surfactantes químicos e biossurfactantes.	75
Tabela 14. Diversidade de Biossurfactantes e os micro-organismos produtores (Nitschke; Pastore, 2002).	76
Tabela 15. Principais aplicações industriais para os surfactantes químicos e biológicos.	80

Capítulo 3

Tabela 1. Micro-organismos produtores de polifenoloxidasas e sua identificação. 86

Tabela 2. Produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelos fungos selecionados, isolados de ambientes impactados por petroderivados. 88

Capítulo 4

Tabela 1. Matriz do planejamento factorial com valores codificados e reais, entre parênteses para as variáveis independentes pH e temperatura 93

Tabela 2. Valores médios da produção de enzimas ligninolíticas produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885, após 48, 72 e 96 horas. 95

Tabela 3. Estabilidade termica e de pH das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885. 97

Capítulo 5

Tabela 1. Matriz do delineamento composto central rotacional 2^4 , com valores reais e codificados das variáveis independentes. 104

Tabela 2. Caracterização fisico-quimica do solo arenoso do Cabo de Santo Agostinho, PE, Brasil. 106

Tabela 3. Atividade Emulsificante e Tensão Superficial observadas nas 27 condições experimentais de *Curvularia lunata* UFPEDA885 em óleo diesel. 107

Tabela 4. Análise de Variância (ANOVA) do modelo quadrático de regressão. 108

Tabela 5. Caracterização de efeito e estabilidade da emulsão produzida por *Curvularia lunata* UFPEDA885. 111

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Objetivos	20
CAPÍTULO 2	
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Os hidrocarbonetos	22
2.1.1 O petróleo: aspectos históricos e composição química	24
2.1.1.1 O óleo diesel	26
2.2 Contaminação ambiental por hidrocarbonetos e seus efeitos	28
2.2.1 Contaminação atmosférica	32
2.2.2 Contaminação dos recursos hídricos	33
2.2.3 Contaminação dos solos	35
2.3 O processo de degradação dos hidrocarbonetos do petróleo	40
2.3.1 Processos abióticos de degradação	42
2.3.2 A biorremediação	46
2.3.2.1 Fatores que influenciam na biorremediação	47
2.4 Ecotoxicidade como parâmetro para avaliação da biodegradação	56
2.5 O potencial dos fungos na descontaminação de locais impactados	58
2.5.1 Características gerais dos fungos	58
2.5.1.1 O gênero <i>Curvularia</i>	61
2.5.2 Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos	63

2.5.2.1 Manganês peroxidase e aplicações	67
2.5.2.2 Lignina peroxidase e aplicações	68
2.5.2.3 Lacase e aplicações	70
2.5.3 Produção de Biossurfactantes	72
2.5.3.1 Aplicações dos biossurfactantes	78

CAPÍTULO 3

Artigo: Produção de Enzimas do Complexo Lignolítico por Fungos Filamentosos Isolados de Locais Impactados por Petroderivados	82
Resumo	82
3.1 Introdução	82
3.2 Material e Métodos	84
3.2.1 Materiais	84
3.2.2 Métodos	84
3.3 Resultados e Discussão	85
3.3.1 Seleção de fungos produtores de polifenoloxidasas	85
3.3.2 Produção de biomassa pelos fungos selecionados	86
3.4 Conclusões	89
3.5 Agradecimentos	89

CAPÍTULO 4

Artigo: Produção e Caracterização de Enzimas Lignolíticas de <i>Curvularia lunata</i> -UFPEDA 885, Utilizando Óleo Diesel	91
Resumo	91
4.1 Introdução	91
4.2 Material e Métodos	92
4.3 Resultados	94
4.4 Discussão	97
4.5 Agradecimentos	99

CAPÍTULO 5

Artigo: Produção do biossurfactante de <i>Curvularia lunata</i> -UFPEDA 885 a partir de óleo diesel	101
Resumo	101
5.1 Introdução	102
5.2 Material e Métodos	102
5.3 Resultados e Discussão	106
5.4 Conclusões	111
5.5 Agradecimentos	112
CAPÍTULO 6	
6. CONCLUSÕES	114
6.1 Conclusões do Artigo 1	114
6.2 Conclusões do Artigo 2	114
6.3 Conclusões do Artigo 3	114
CAPÍTULO 7	
7. REFERÊNCIAS	117
CAPÍTULO 8	
8. ANEXOS	134
8.1 Caracterização físico-química do óleo diesel	135
8.2 Artigo aceito para publicação	136

Capítulo 1. Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados têm sido amplamente utilizados como fonte de combustível e energia. O óleo diesel é o combustível derivado do petróleo mais utilizado no mundo, sendo constituído basicamente por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, com pequenas frações de enxofre, nitrogênio e oxigênio (Ponte, 2008). Durante a produção, o transporte e o refino do petróleo e seus derivados, são gerados resíduos que podem causar contaminação ambiental (Verdin *et al.*, 2004).

Para conter os danos ambientais causados pelas atividades industriais, a biorremediação tem sido apontada como eficaz, por utilizar o potencial fisiológico de micro-organismos para degradar xenobióticos, utilizando-os como fonte de carbono e energia (Semple *et al.*, 2001). A biorremediação de solos impactados pelo óleo diesel é frequentemente limitada pela falta de microbiota autóctone. Contudo, nem sempre a mineralização ocorre e a biorremediação tem por objetivo a degradação de poluentes orgânicos em concentrações que não sejam detectáveis ou, se detectáveis, que seja abaixo dos limites estabelecidos, como seguros e aceitáveis pelos órgãos reguladores (Chagas-Spinelli, 2005). De modo geral, a biorremediação é uma tecnologia limpa e que pode estar associada a outras formas de tratamento tanto “in situ” quanto “ex situ” (Rahman *et al.*, 2003).

Os fungos filamentosos possuem uma alta flexibilidade metabólica, sendo capazes de degradar polímeros complexos e sobreviver em ambientes considerados extremos, com valores de pH baixos, pobres em nutrientes e com baixa umidade relativa (Pereira; Lemos, 2003). Além disso, apresentam uma grande capacidade de adaptação a diversos tipos de substratos, inclusive xenobióticos como o óleo diesel. Nesses casos, a inoculação de culturas com as habilidades desejadas de catabólitos produzidos através da bioaumentação torna-se uma opção essencial. Este processo de adaptação é chamado de aclimação e permite que micro-organismos sejam capazes de produzir metabólitos como enzimas lignolíticas ou biossurfactantes utilizando os substratos xenobióticos como fonte de carbono e produzindo biomassa (Mancera-Lopez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). O crescimento fúngico por meio do alongamento e ramificação das hifas permite a colonização de grandes áreas, aumentando a superfície de contato do fungo com o contaminante (Tavares, 2006).

A utilização de petroderivados como fonte de carbono para estímulo do crescimento microbiano e indução da produção de enzimas tem ocasionado otimização da síntese de enzimas de aplicação em processos industriais e na biorremediação (Feng *et al.*, 2009). Fungos Ascomicetos como *Curvularia lunata*, durante o metabolismo secundário, são

produtores das enzimas oxidativas extracelulares: lacase e peroxidases (Narkhede; Vidhale, 2005; Alexopoulos, 1996). As lacases oxidam compostos fenólicos e não-fenólicos, sendo utilizadas na descontaminação de efluentes de celulose e petroquímicos, na biodegradação de pesticidas e compostos fenólicos e em biossensores de nanopartículas (Couto; Herrera, 2006). Da mesma forma, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase oxidam compostos fenólicos e não fenólicos, sendo empregadas na biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), organoclorados, corantes, em nanotecnologia e “kits” de diagnósticos laboratoriais (Hamid; Rehman, 2009; Husain *et al.*, 2009).

A capacidade microbiana de crescer em presença de compostos oleosos como os petroderivados ocorre principalmente pela produção de enzimas hidrolíticas para a produção de biossurfactantes. Os biossurfactantes são produtos do metabolismo secundário de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), sendo moléculas anfipáticas com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, atuando na redução da tensão superficial e interfacial entre água-óleo, óleo-água e de sistemas oleosos, podendo ser aplicados na Recuperação Melhorada de Petróleo (MEOR), na remoção e limpeza de óleo em tanques de combustíveis, na recuperação terciária de petróleo, entre outros (Cunha *et al.*, 2004). Os biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos têm sido pouco descritos na literatura. A espécie *C. lunata*, é descrita como sendo capaz de crescer em substratos contendo compostos oleosos e esta habilidade já foi comprovada pela produção de agentes tensativos, entretanto este ainda não foi caracterizado (Paraszkiewicz *et al.*, 2002). Neste contexto, estudos foram realizados no sentido de selecionar e otimizar as condições de produção de enzimas lignolíticas, como também de realizar a produção e caracterização de biossurfactante por *Curvularia lunata*-UFPEDA 885, utilizando como única fonte de carbono óleo diesel.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial biotecnológico do fungo *Curvularia lunata*-UFPEDA885 na produção de enzimas lignolíticas e de biossurfactante e otimizar as condições de síntese, utilizando óleo diesel como única fonte de carbono.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar um fungo produtor das enzimas do complexo lignolítico;
- Verificar a influência do pH e da temperatura na produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelo fungo selecionado utilizando óleo diesel como substrato;
- Caracterizar os efeitos do pH e temperatura na atividade e estabilidade das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase;
- Investigar a produção de biossurfactante pela redução da tensão superficial e pela atividade emulsificante;
- Avaliar a influência da quantidade de inóculo, nitrogênio, cobre e manganês na produção de biossurfactante pelo fungo selecionado utilizando óleo diesel como substrato;
- Verificar a formação e a estabilidade da emulsão frente a pH, temperatura e salinidade variados;
- Isolar, caracterizar e verificar a toxicidade do biossurfactante produzido;
- Avaliar a eficiência do biossurfactante na biorremoção de óleo de motor contaminante de solo arenoso.

Capítulo 2. Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 OS HIDROCARBONETOS

Os hidrocarbonetos são compostos químicos binários que apresentam em sua estrutura molecular, átomos de carbono e hidrogênio. Eles são produzidos a partir da combustão incompleta de combustíveis fósseis, em incêndios de florestas, através da síntese microbiológica, por motores de combustão à gasolina e principalmente pela combustão do diesel. As fontes naturais de hidrocarbonetos são o gás natural, o carvão e o petróleo, sendo este último o mais encontrado no ambiente (Baird, 2002).

Estes compostos podem ter diferentes classificações, sendo uma delas de acordo com o peso molecular. Compostos com até 10 átomos de carbono são formados por moléculas pequenas, são extremamente voláteis, evaporando e dissolvendo sem deixar resíduos. São ainda mais biodisponíveis, sendo absorvidos mais facilmente por seres vivos, além de serem potencialmente inflamáveis. Os compostos de médio peso molecular (C_{11} a C_{22}) apresentam-se em moléculas mais complexas, com evaporação e dissolução mais lenta e formando alguns resíduos remanescentes. São menos biodisponíveis que os de baixo peso molecular. Por fim, os compostos de alto peso molecular apresentam cadeias com mais de 23 átomos de carbono, constituindo moléculas grandes, com baixa capacidade de evaporação e dissolução, alto tempo de residência no ambiente. Os compostos médios e pesados, acima classificados, apresentam maior atividade cancerígena e mutagênica em seres vivos (Cotta, 2008; Lunstedt, 2003).

Os hidrocarbonetos alifáticos apresentam em sua estrutura química átomos de carbono e hidrogênio principalmente, arranjados em cadeias lineares ou formando cadeias cíclicas não aromáticas. Os principais hidrocarbonetos alifáticos são os alcanos, alcenos, alcinos e alcadienos, cicloalcanos, cicloalcenos, a sendo classificados de acordo com as ligações entre esses átomos: simples, duplas ou triplas (Lunstedt, 2003).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos-HPA formam-se pela combustão incompleta de substâncias orgânicas a altas temperaturas e apresentam em suas cadeias vários anéis aromáticos e ainda, dois ou mais anéis benzênicos condensados, o que vai contribuir para variações nas suas propriedades físico-químicas (tabela 01) (Lunstedt, 2003).

Devido a sua composição química, a presença de HPA no ambiente indica a presença de petróleo ou seus derivados, permanecendo no ambiente por longos períodos. A

persistência dos HPA no ambiente, principalmente nos solos está relacionada com a quantidade de anéis benzênicos que existem na molécula e estes permitem o acúmulo no complexo coloidal do solo (koh *et al.*, 2004).

Tabela 01. Características físico-químicas dos principais HPA.

HPA	Nº de anéis	FM	MM (gmol ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)	SA* (mgL ⁻¹)	PV* (Pa)	Log K _{ow}	Sinônimos
<i>Naftaleno</i>	2	C ₁₀ H ₈	128,17	80,2	218	31	1,0x10 ⁻²	3,37	Nafteno
<i>Acenaftileno</i>	3	C ₁₂ H ₈	152,20	92,5	280	16	9,0x10 ⁻¹	4,00	Acenaftaleno
<i>Acenafteno</i>	3	C ₁₂ H ₁₀	154,21	93,4	279	3,8	3,0x10 ⁻¹	3,92	
<i>Fluoreno</i>	3	C ₁₃ H ₁₀	166,22	115	295	1,9	9,0x10 ⁻²	4,18	
<i>Fenantreno</i>	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	99,2	340	1,1	2,0x10 ⁻²	4,57	
<i>Antraceno</i>	3	C ₁₄ H ₁₀	178,23	215	340	0,045	1,0x10 ⁻³	4,54	
<i>Pireno</i>	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	151	404	0,13	6,0x10 ⁻⁴	5,18	Benzo[d,e,f]fenantreno
<i>Fluoranteno</i>	4	C ₁₆ H ₁₀	202,26	108	384	0,26	1,2x10 ⁻³	5,22	Benzo[j,k]fluoreno
<i>Benzo[a]antraceno</i>	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	167	435	0,011	2,8x10 ⁻⁵	5,91	1,2-benzantraceno; benzo[b]fenantreno; 2,3-benzofenantreno; tetrafeno
<i>Criseno</i>	4	C ₁₈ H ₁₂	228,29	258	448	0,006	5,7x10 ⁻⁷	5,91	1,2-benzofenantreno; benzo[a]fenantreno
<i>Benzo[e]acefenantrileno</i>	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	168	-	0,0015	-	5,80	Benzo[b]fluoranteno; 3,4-benzofluoranteno; 2,3-benzofluoranteno
<i>Benzo[k]fluoranteno</i>	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	217	480	0,0008	5,2x10 ⁻⁸	6,00	11,12-benzofluoranteno
<i>Benzo[a]pireno</i>	5	C ₂₀ H ₁₂	252,32	177	495	0,0038	7,0x10 ⁻⁷	5,91	3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno
<i>Benzo[e]pireno</i>		C ₂₀ H ₁₂	252,32	178	311				1,2-benzopireno; 4,5-benzopireno
<i>Dibenzo[a,h]antraceno</i>	6	C ₂₂ H ₁₄	278,35	270	524	0,0006	3,7x10 ⁻¹⁰	6,75	1,2,5,6-dibenzantraceno
<i>Indeno[1,2,3-cd]pireno</i>	6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	164	-	0,00019	-	6,50	2,3-fenilenopireno
<i>Benzo[g,h,i]perileno</i>	6	C ₂₂ H ₁₂	276,34	278	-	0,00026	1,4x10 ⁻⁸	6,50	1,12-benzopireno

FM= fórmula molecular; MM = massa molar; PF = ponto de fusão; PE=Ponto de Ebulição; AS= solubilidade em água; PV = Pressão de vapor; Kow=coeficiente de partição octanol:água

Fonte: Lunstedt, 2003.

Na atualidade, já se conhece centenas de HPA, entretanto a *US Environmental Protection Agency* e o *National Institute for Occupational Safety and Health* destacaram 17 poluentes considerados prioritários: Naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno. Estes compostos são monitorados pelo governo norte americano a fim de evitar contaminações ambientais severas. No Brasil a legislação específica a respeito da contaminação dos solos por HPA encontra-se em processo de estruturação, sendo adotadas medidas provisórias diferentes de acordo com as necessidades de cada estado, do solo impactado e principalmente de acordo com o tipo de poluente (Cotta, 2008).

Os HPA depositam-se no ambiente de modo natural ou através da ação antrópica, sendo a primeira limitada à queimada espontânea de florestas e emissões vulcânicas. As fontes antrópicas são as maiores responsáveis pela liberação dos mesmos no ambiente e se dá através da queima de petróleo e seus derivados, principalmente os combustíveis automotivos (Lopes; Andrade, 1996). Estes compostos são extremamente tóxicos tanto para o homem quanto para o meio ambiente. Podem provocar irritação nos olhos, na pele,

no sistema respiratório, vertigem, fraqueza, dores de cabeça, náuseas, anorexia e até leucemia (Sanches, 2009).

2.1.1 O Petróleo: Aspectos Históricos e Composição Química

A presença de compostos nitrogenados e clorofilados pressupõe a participação de matéria orgânica de origem animal e vegetal no processo de formação do petróleo. Em sua grande maioria os pesquisadores modernos tendem a reconhecer como válida apenas a teoria orgânica que determina as principais condições para a formação do petróleo: existência de matéria orgânica adequada; o material orgânico deve ser preservado da ação de bactérias aeróbicas; o material orgânico depositado não deve ser movimentado por longos períodos; a matéria orgânica em decomposição por bactérias anaeróbicas deve sofrer a ação de temperatura e pressão por longos períodos; deve haver um gradiente geotérmico; proteção contra oxidação e contra a destruição bacteriana; rocha-fonte (rocha sedimentar); rocha-reservatório (rocha sedimentar). Nestas condições, o gás e o petróleo seriam gerados e acumulados (Milani *et al.*, 2000).

Conhecido desde os primórdios da civilização humana, o petróleo foi descrito por Heródoto, grande historiador do século V a.C., como produto na construção de cidades; enquanto que Nabucodonosor utilizou como material de liga nas construções dos célebres jardins suspensos da Babilônia. Os egípcios utilizavam petróleo para embalsamento de mortos ilustres e em suas pirâmides seculares, ao passo que os gregos e romanos utilizavam para fins bélicos. No continente americano, os incas e os astecas conheciam o petróleo e, a exemplo da Mesopotâmia, o empregavam na pavimentação de estradas (PETROBRAS, 1975).

Geralmente, o petróleo aproveitado pelas civilizações antigas era aquele que aflorava à superfície do solo. No entanto, a necessidade de busca por água em certas regiões dos Estados Unidos levou a descoberta dos primeiros poços de petróleo em ambiente marinho, no ano de 1859 (Secondary Energy Infobook, 2007).

Em 1930, a indústria petroquímica surgiu, tendo como base o petróleo, para produzir numerosos equipamentos, objetos, produtos como plásticos, adubos, corantes, detergentes, álcool comum, acetona e gás hidrogênio, entre outros (Weinhagen, 2006). Dessa forma, a indústria de refino teve um impulso fenomenal, garantindo o abastecimento de milhares de veículos e o funcionamento dos parques industriais. A gasolina passou a ser o principal derivado do petróleo a ser utilizado nas grandes cidades, enquanto ocorria uma ampliação

do sistema de estradas, exigindo mais asfalto. Em 1938, 30% da energia consumida no mundo provinham do petróleo (Shah, 2004).

A partir desse período, a produção brasileira de petróleo vem crescendo a cada ano, atingindo em 2006 cerca de 629 mil barris de petróleo de acordo com o Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural-2007 divulgado pela Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2007). Hoje, a exploração petrolífera se processa baseada em ciências auxiliares, como: estudo da formação das rochas no tempo e no espaço de sua origem; estudo dos micro-organismos fósseis; estudo da composição das rochas e mapeamento aéreo fotográfico, além dos métodos geofísicos e geoquímicos. Mais atualmente, estes estudos são facilitados pelo emprego da computação eletrônica (Shah, 2004).

A quantidade de empresas que utilizam petroderivados é crescente da mesma forma que a quantidade de aplicações econômicas do petróleo. Quanto aos postos revendedores de combustíveis, somam-se segundo dados da Agência Nacional de Petróleo - ANP, no Brasil, o total de vinte e nove mil oitocentos e quatro (Ponte, 2008).

Em relação à composição química do petróleo, já foram encontradas 636 diferentes composições espalhadas pelo mundo e as proporções dos compostos variou bastante: de 40% a 80% de hidrocarbonetos alifáticos, de 15% a 40% de hidrocarbonetos aromáticos e por fim, de 0 a 20% de resinas e asfaltenos. Além dos compostos usuais, metais pesados como níquel, vanádio, zinco, também foram observados (Melo; Azevedo, 2008).

O grupo dos hidrocarbonetos alifáticos é subdividido em alcanos, alcenos e cíclicos. Estes são mais leves e insolúveis que a água, na maioria das vezes. Em casos de moléculas menores, estas são hidrossolúveis e mais voláteis que as moléculas maiores. Os alcanos são também conhecidos como parafinas e apresentam de 5 até 40 átomos de carbono. São pouco tóxicos aos organismos vivos apesar de apresentarem potencial anestésico e narcotizante. Os alcenos são encontrados em pouca quantidade fazendo parte da composição química do petróleo. Os cicloalcanos são formados por até 6 átomos de carbono formando anéis. Estes correspondem de 30% a 60% da composição química do petróleo (Melo; Azevedo, 2008).

Os hidrocarbonetos aromáticos compreendem o benzeno, os alquiбенzenos e os policíclicos, enquanto que os asfaltenos são a fração pesada do petróleo com complexas estruturas químicas e átomos de carbono e hidrogênio, associados a átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio. São extremamente tóxicos aos organismos vivos, sendo muitas vezes comprovadamente carcinogênicos (Melo; Azevedo, 2008).

O petróleo bruto, segundo Mariano (2006), não tem uma ampla aplicação, sendo utilizado somente como óleo combustível. Para que seu potencial seja economicamente utilizável, ele precisa passar pelo processamento de refino, que engloba diversas etapas químicas e físicas, originando as inúmeras frações de destilação. Estas frações são em seguida processadas e convertidas nos derivados finais do petróleo, que vão apresentar as mesmas frações do petróleo original, porém com intervalos nos pontos de ebulição mais restritos (figura 01).

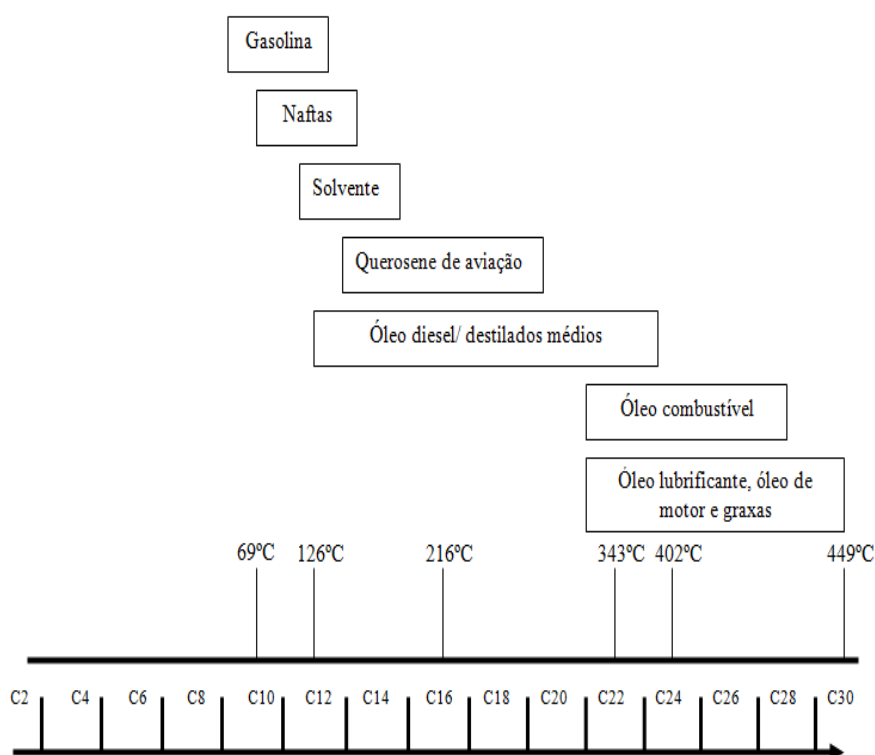


Figura 01. Frações do petróleo com seus derivados: relação entre o número de carbonos e os pontos de ebulição (Chagas-Spinelli, 2007).

2.1.1.1 Óleo Diesel

O diesel é constituído de 8 a 40 átomos de carbono, normalmente sendo mais pesado do que os que compõem a gasolina, o que confere a este combustível, maior massa específica, menor volatilidade e menor solubilidade em água. Sua composição química é bastante complexa, sendo formado por 40% de n-alcanos, 40% de iso e ciclo-alcanos, 20% de hidrocarbonetos aromáticos e na menor fração composta por isoprenóides, compostos oxigenados, sulfurados e nitrogenados (Mazzuco, 2004).

Dentre os hidrocarbonetos policíclicoaromáticos (HPA), são encontrados fazendo parte da composição do óleo diesel: naftaleno, metilnaftaleno, dimetilnaftaleno,

acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, e os monoaromáticos (BTEx), como benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno, p-xileno (Mazzuco, 2004).

De acordo com Chagas-Spinelli, 2007, a alta concentração de aromáticos no diesel é devido ao processo de destilação para se chegar ao diesel, que ocorre na mesma faixa em que são destilados os HPA e os derivados alquílicos (160°C a 410°C).

Combustível derivado do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos, o óleo diesel apresenta ainda em sua composição enxofre, nitrogênio e oxigênio e selecionados de acordo com as características de ignição e de escoamento adequadas ao funcionamento dos motores diesel (PETROBRAS, 2009).

O setor de transportes de óleo diesel no Brasil, é responsável por 76% do consumo total do combustível; o agropecuário, representa cerca de 16% do consumo; e o de transformação, que utiliza o produto na geração de energia elétrica, corresponde à cerca de 5% do consumo total de diesel. Dentro do Setor de Transporte, a maior parte do diesel (97%), é consumida pelo Setor Rodoviário. Isto ocorre devido ao formato da matriz de transporte brasileira. Devido a isso, o óleo diesel é, na atualidade, considerado o petroderivado mais utilizado no mundo (Ponte, 2008).

O abastecimento de óleo diesel no mercado interno brasileiro se dá através de 13 refinarias, das quais 10 pertencem a PETROBRAS. Segundo o Sindicato Nacional das Empresas Distribuidoras de Combustíveis (SINDICOM), o Brasil consumiu no ano de 2004, 39,1 bilhões de litro de óleo diesel se tornando auto-suficiente em 2006 (BiodieselBr, 2010).

Além das 13 refinarias presentes no Brasil, foi assinado um acordo entre a PETROBRAS e a Petróleos da Venezuela S.A. (PDVSA) para a instalação de mais uma refinaria, agora no estado de Pernambuco, na região portuária de Suape. A unidade terá capacidade de processar 200 mil barris de petróleo por dia e terá como principal produto o diesel (Suape, 2010).

No óleo diesel, as frações denominadas de leve e pesadas, são obtidas através do refino do petróleo, pelo processo inicial de destilação atmosférica. A estas frações, podem ser agregadas diversas outras como a nafta, o querosene e o gasóleo leve de vácuo, resultando assim no óleo diesel como produto final (PETROBRAS, 2009).

Alguns dos HPA que fazem parte da composição do diesel apresentam potencial carcinogênico, sendo perigosos em casos de acidentes (tabela 2). Os diferentes danos à saúde humana dependem, entretanto, das formas de exposição ao contaminante, sendo mais freqüentes em caso de contato com água contaminada: alterações no DNA: troca de cromátides-irmãs, aberrações cromossômicas e síntese descontrolada de DNA (Netto *et al.*, 2000).

Tabela 2. Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos presentes no diesel, suas concentrações e possíveis danos aos seres humanos.

HPA	Concentração (µg/mL)	Danos aos seres humanos
Naftaleno	622,4	Possível carcinogênico
Acenafteno	2.341,1	Não citado
Acenaftileno	1.496,7	Não citado
Fluoreno	76,4	Não carcinogênico
Fenantreno	265,5	Não carcinogênico
Antraceno	6,9	Não carcinogênico
Fluoranteno	10,7	Não carcinogênico
Pireno	18,2	Não carcinogênico
Benzoantraceno	3,5	Provável carcinogênico
Criseno	16,3	Não carcinogênico
Benzo(b)fluoranteno	1,5	Possível carcinogênico
Benzo(a)pireno	1,7	Provável carcinogênico
Benzo(ghi)perileno	0,2	Não carcinogênico

Fonte: Netto *et al.*, 2000.

O diesel caracteriza-se por ser um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. Quando presente no ambiente pode trazer danos diretos e indiretos à água, solo e ar, além de causar danos à população humana. (Colla; Costa, 2003; Mariano, 2006).

2.2 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR HIDROCARBONETOS E SEUS EFEITOS

O excesso de poluentes no ambiente têm sido um dos principais motivos de preocupação por parte da sociedade contemporânea. De acordo com a CETESB (2008), os solventes aromáticos, os combustíveis líquidos e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos constituem os principais grupos contaminantes no Brasil (figura 02).

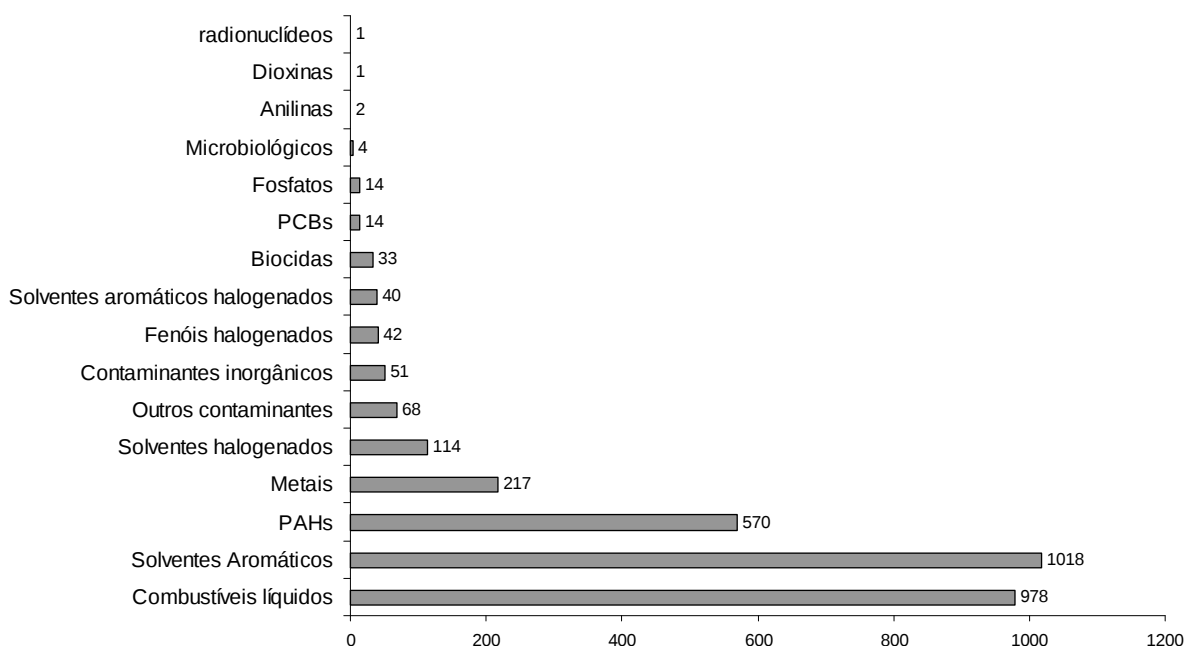


Figura 02. Principais grupos de contaminantes ambientais, destacando-se a contaminação por combustíveis líquidos e solventes aromáticos (CETESB, 2008).

Do ponto de vista ambiental, as refinarias são grandes geradoras de poluição, sendo emissoras de solventes aromáticos e de HPA. Consomem grandes quantidades de água e de energia, produzem grandes quantidades de despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e degradação. Em decorrência de tais fatos, a indústria de refino de petróleo, pode ser, e muitas vezes é, uma grande degradadora do meio ambiente, pois tem potencial para afetá-lo em todos os níveis: ar, água, solo e, conseqüentemente, a todos os seres vivos que habitam nosso planeta (Mariano, 2005).

A contaminação por hidrocarbonetos do petróleo pode ocorrer de diferentes formas durante as etapas de produção, transporte e refino. Os campos de extração de petróleo e gás natural no Brasil estendem-se desde o litoral do Rio Grande do Norte até o Paraná. A região sudeste concentra as principais atividades de produção, transporte e estocagem de petroderivados através do Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), em São Sebastião, SP. Cerca de 50% da produção nacional de petróleo concentra-se no TEBAR (Almeida, 2006). No Nordeste, o Complexo Industrial e Portuário de Suape-PE, movimenta atualmente cerca de 5 milhões de toneladas de carga por ano, destacando-se entre elas derivados do petróleo, produtos químicos como alcoóis e óleos vegetais. Em 2011 haverá na região, a instalação da Refinaria do Nordeste (REFINE) que terá capacidade para processar cinco mil barris/dia de petróleo inicialmente, alcançando a marca de 30 mil barris/dia um ano, após o início da operação em 2011 (Suape, 2010).

A dimensão da problemática ambiental associada às refinarias pode ser mais facilmente compreendida se atentarmos para alguns fatos ocorridos no Brasil. Desde a década de 70 e 80, a região da Refinaria Presidente Bernardes era conhecida como “Vale da Morte”. A poluição gerada pelo pólo petroquímico, do qual a refinaria faz parte, atingia níveis alarmantes. A poluição atmosférica provocou diversas doenças respiratórias na população, ocorreram vários casos de bebês nascidos com má formação e a poluição também ocasionava a precipitação de chuvas ácidas, responsáveis pela degradação da paisagem local. Outro exemplo são os acidentes na REDUC (Refinaria Duque de Caxias, Rio de Janeiro) e na REPAR (Refinaria Presidente Getúlio Vargas, Araucária, Paraná), ocorridos em 2001. Esses acidentes resultaram em danos à imagem não apenas da Petrobras, empresa responsável pelas duas refinarias, mas também da indústria de refino nacional como um todo. Os fatos mencionados destacam que para construção de novas refinarias no Brasil são necessárias medidas de mitigação de prováveis impactos ambientais (Mariano, 2005).

Ainda de acordo com Mariano (2005), a Baía da Guanabara, Rio de Janeiro, atualmente em processo de despoluição, é outro exemplo de contaminação pelas etapas no processamento do petróleo. Há na região além do despejo diário de seis toneladas de petróleo nas águas, cerca de oitenta mil toneladas de resíduos de tanques e unidades de produção estocadas e oito mil tambores com borras, que podem alcançar o lençol freático da região, assim como a própria Baía da Guanabara.

Segundo Silva (2004), no Brasil as regiões costeiras estão mais suscetíveis a derramamentos de petróleo e seus derivados, já que os maiores índices de acidentes têm sido registrados nas operações realizadas nos portos e terminais, cerca de 90,8% do total.

Além da contaminação que ocorre durante o processo de refino, nas operações de lavagem dos tanques dos petroleiros em pleno oceano, são derramadas grandes quantidades de combustíveis. Apesar de tal operação ser proibida, a prática ainda persiste em decorrência da dificuldade de fiscalização pela extensão da costa brasileira (CETESB, 2008).

Apesar de pontuais e da ocorrência em menor frequência, os acidentes envolvendo vazamento de petroderivados no mar constitui um problema de escala mundial devido ao grande impacto causado aos locais contaminados. Os derramamentos no mundo já superam 5,6 milhões de toneladas de óleo espalhados desde a década de 70 e todos os anos 600.000 toneladas de combustível são derramadas em acidentes ou descargas ilegais, com graves

consequências econômicas e ambientais (Gomes, 2004). Desde a década de 60 vêm se observando o aumento de acidentes envolvendo petróleo e seus derivados (tabela 03).

Tabela 03. Histórico dos Principais acidentes envolvendo petróleo e seus derivados.

Local/período	Tipo de acidentes	Tipo de óleo e quantidade derramada	Referência
Costa da Inglaterra e França, 1967	Vazamento do navio petroleiro: <i>Torrey Canyon</i>	Óleo cru, 117 mil toneladas	Simpson, 1968
França, 1978.	Vazamento do navio petroleiro: <i>Amoco cadiz</i>	Óleo cru, 200 mil toneladas	Crapez <i>et al.</i> , 2002.
Alasca, 1989.	Vazamento do navio petroleiro: <i>Exxon valdez</i>	Petróleo, 140 mil toneladas	Crapez <i>et al.</i> , 2002.
Rússia, 1994	Rebentamento de uma conduta.	Petróleo: 270 mil toneladas	Sagers, 1994.
Brasil, Baía de Guanabara, de 1998 a 2001	Vazamento do navio petroleiro:	Petróleo: 1 mil tonelada	Bento, 2005
Espanha, 2002	Vazamento do navio petroleiro: <i>Prestige</i>	Petróleo: 77 mil toneladas	Martins, 2005
Golfo do México, 2010	Explosão de plataforma	Petróleo: pelo menos 10 mil toneladas	Folha UOL, 2010

No Brasil, o primeiro grande derrame ocorreu em 1973 pelo vazamento de um navio que carregava petróleo em São Sebastião-SP. Apesar de poucas informações sobre a magnitude do problema, estima-se que no Brasil existam mais de 20 mil áreas impactadas, segundo o relatório da comissão mista para analisar acidentes na Petrobras/Repar (CREA-PR), no período de 1975 a 2001, 33 acidentes ocorreram envolvendo derramamento de milhões de litros de petróleo e seus derivados, no Brasil, tendo contaminação de solos, rios e mar (CETESB, 2008).

Além das atividades nas refinarias, os pequenos vazamentos em postos de combustíveis merecem destaque, pois de acordo com a CETESB (2008), estes totalizam cerca de 73% do total de petroderivados despejados no ambiente (figura 03).

No Brasil existem aproximadamente 35.000 postos de gasolina. Como na década de 70 houve um grande aumento do número de postos de gasolina no país, é de se supor que a vida útil dos tanques de armazenamento, que é de aproximadamente 25 anos, esteja próxima do final, o que consequentemente pode aumentar a ocorrência de vazamentos nos postos do país (ANP, 2007).

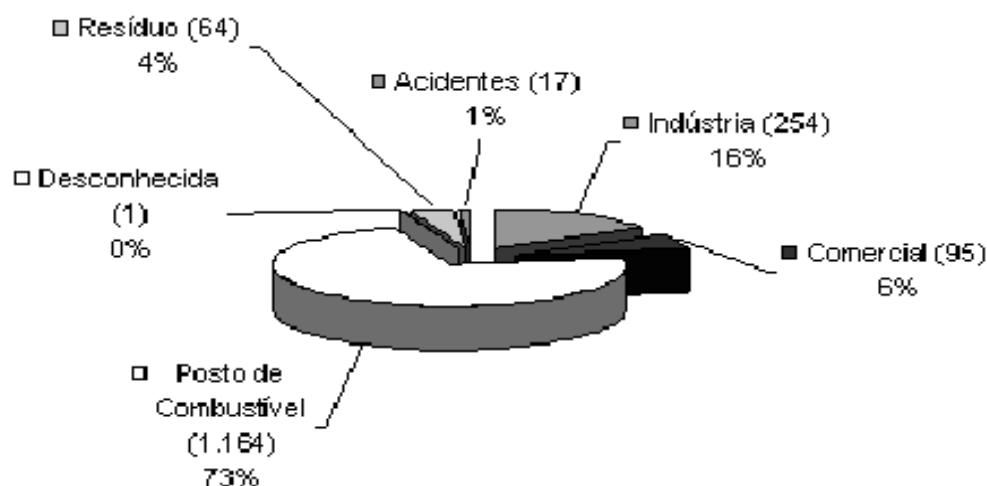


Figura 03. Formas de contaminação por petroderivados no meio ambiente. Fonte: CETESB, 2008.

2.2.1 Contaminação Atmosférica

Os hidrocarbonetos do petróleo penetram na atmosfera, principalmente através da combustão incompleta da gasolina ou do óleo diesel pelos automóveis (Delhomme *et al.*, 2010). As reações fotoquímicas, não permitem que se tenha uma estimativa real da quantificação devido a sua complexidade. As principais frações observadas na atmosfera proveniente do petróleo são moléculas de óxido de enxofre, nitrogênio, monóxido de carbono e material particulado (Mariano, 2005). Quando presente no ambiente de modo accidental, o petróleo e seus derivados passam por processos de evaporação e foto-oxidação transformando-se em estruturas moleculares diferentes, podendo ser mais ou menos tóxicas do que as frações originais (Fingas, 1994).

Uma das principais consequências da poluição atmosférica por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos consiste na ocorrência de chuvas-ácidas. O potencial hidrogeniônico das chuvas é levemente ácido pela presença de CO₂, porém, a presença de óxidos de enxofre e de nitrogênio combinados com sulfatos e nitratos, contribuem para a formação dos ácidos sulfúrico e nítrico, fazendo com que o pH das chuvas torne-se mais ácido ficando inferior a 5.6. As chuvas ácidas são extremamente prejudiciais para as florestas e conseqüentemente para todo o ecossistema (Paoletti *et al.*, 2010).

A aceleração do efeito estufa, também é uma consequência da poluição atmosférica, pois os gases que são emitidos tendem a associar-se rompendo as moléculas de ozônio que protegem a Terra dos raios UV solares. Dessa forma os raios solares estão incidindo diretamente sobre a superfície do planeta, aquecendo e alterando suas condições climáticas (Ministério da Ciência e Tecnologia, 2002).

Em relação à saúde humana, os principais efeitos da toxicidade atmosférica são: irritação nos olhos, dores de cabeça, tontura, náuseas, vômito, falência cardíaca proveniente do estresse provocado por doenças crônicas respiratórias, bronquite, asma, enfisema pulmonar e até câncer de pulmão. Dentro da população de risco, crianças e pré-adolescentes estão mais susceptíveis (tabela 04) (Mariano, 2005; Yogev-Baggio *et al.*, 2010).

Tabela 04. Principais efeitos causados à saúde humana pelos poluentes atmosféricos.

Poluente Atmosférico	Principais Efeitos
SOx	'Mortality harvest'
Material particulado (PM ₁₀)	Profunda penetração nos tecidos pulmonares, agravamento de asma e bronquite
NOx	Aumento da gravidade das doenças respiratórias agudas
CO	Diminuição da tolerância ao esforço em pacientes cardíacos
Oxidante fotoquímico	Aumento da susceptibilidade a infecções

Fonte: Mariano, 2005- adaptado.

Dentre os sintomas mais comuns de toxicidade atmosférica para os ecossistemas, destacam-se a redução de colheitas, necrose em caules e folhas, clorose e queda prematura das folhas. Dentre as espécies vegetais mais sensíveis destacam-se aveia, erva doce, beterraba, espinafre e bétula branca. As chuvas ácidas podem provocar acidez dos rios com o conseqüente aumento das concentrações de alumínio, cádmio, zinco e mercúrio dissolvidos na água, que irão prejudicar os organismos filtradores e os seres que se alimentarem deles (Mariano, 2005).

2.2.2 Contaminação dos Recursos Hídricos

Os primeiros relatos escritos a respeito do uso da água datam de 4000 a.C., época em que o homem utilizava este recurso basicamente para irrigação das lavouras, dessedentação de animais e consumo humano (Ferreira, 2002). Tendo-se por base uma retrospectiva cronológica, é possível observar que a utilização da água tanto no Brasil quanto no mundo, teve um percurso de graves contaminações sem a utilização consciente deste recurso. Somente após a década de 80, surgiu a preocupação com o esgotamento das águas potáveis e contaminação das águas marinhas e suas conseqüências para os ecossistemas e o equilíbrio ambiental (tabela 05).

Tabela 05. Histórico da utilização dos recursos hídricos nos países desenvolvidos e no Brasil. Fonte: Ferreira, 2002-Adaptado

Período	Utilização da água	
	Países desenvolvidos	Brasil
De 1945 a 1960 Crescimento da engenharia	Uso dos recursos hídricos para abastecimento, navegação, hidroeletricidade, medidas estruturais de controle das enchentes.	Inventário dos recursos hídricos, início dos empreendimentos hidroelétricos e projetos de grandes sistemas
1960 a 1970 Início da pressão ambiental	Controle de efluentes, legislação para qualidade da água dos rios	Início da construção de grandes empreendimentos hidroelétricos, deterioração da qualidade da água de rios e lagos próximos à centros urbanos.
1970 a 1980 Controle ambiental	Contaminação de aquíferos, deterioração de grandes áreas metropolitanas, controle na fonte de drenagem urbana, controle da poluição doméstica e industrial, legislação ambiental	Ênfase em hidroelétricas e abastecimento de água, início da pressão ambiental, deterioração da qualidade da água dos rios devido ao aumento da produção industrial e concentração urbana
1980 a 1990 Globalização	Impactos climáticos globais, preocupação com a conservação das florestas, prevenção de desastres, controle dos impactos da urbanização, contaminação de aquíferos.	Redução no investimento em hidroelétricas, piora das condições urbanas, enchentes, qualidade baixa das águas, aumento de investimentos em irrigação e criação de legislação ambiental.
1990 a 2000 Desenvolvimento sustentável	Desenvolvimento sustentável, conhecimento sobre o comportamento ambiental, contaminação ambiental das grandes metrópoles, pressão para controle da contaminação ambiental.	Legislação de recursos hídricos, investimentos no controle sanitário das grandes cidades, início da privatização dos serviços de energia e abastecimento.
2000 até atualidade Ênfase na água	Desenvolvimento da visão mundial da água, uso integrado dos recursos hídricos, melhora na qualidade da água das fontes não pontuais rural e urbana, desenvolvimento do gerenciamento dos recursos hídricos dentro de bases sustentáveis.	Avanço no desenvolvimento dos aspectos institucionais da água, privatização do setor energético, aumento de usinas térmicas para produção de energia, aumento da disponibilidade de água no nordeste, desenvolvimento de planos de drenagem urbana.

No Brasil, segundo Pavanelli (2007), o potencial hídrico superficial representa 12% da água doce do planeta e 58% da América do Sul. Apesar dessa grande disponibilidade de água, o crescimento desordenado das cidades tem acarretado perda de quantidade e qualidade das águas. A qualidade das águas no que se refere à baixos índices de resíduos tóxicos, depende de parâmetros físicos, químicos e biológicos. Uma das características físicas que mais influencia na qualidade da água é a temperatura, com relação às características químicas, temos a concentração e interação dos compostos químicos como oxigênio dissolvido, e a característica biológica que mais se sobressai é a composição florística e faunística do ecossistema aquático (Ferreira, 2007). Os fatores que determinam a qualidade das águas variam de acordo com o período do ano, pois o regime de chuvas influencia diretamente os rios e córregos. Entretanto a ação antrópica ainda constitui o

principal fator determinante para modificação das características físicas, químicas e biológicas (Godoi, 2008).

De acordo com Zhu *et al.*, (2004), a contaminação das águas de rios e lagos afeta a potabilidade e traz conseqüências indesejáveis para quem a consome. A poluição das águas na atualidade representa um problema crescente, e tanto seu consumo quanto sua poluição devem ser reduzidos drasticamente de modo a garantir a sobrevivência das espécies animais e vegetais do planeta (Ma, 2009).

A contaminação das águas brasileiras tem aumentado nos últimos anos. Dentre as fontes de contaminação inclui-se o despejo de material tóxico das atividades industriais e agrícolas. Há aproximadamente 20 mil áreas contaminadas no Brasil, o que põe em risco a saúde da população. Grandes quantidades de petróleo (3×10^3 litros) são derramadas em ambientes marinhos a cada ano (Almeida, 2006).

Quando presente no ambiente, o óleo comporta-se de maneira bem singular. Este processo relaciona-se com o movimento e a distribuição do óleo no meio físico, além da matéria particulada que afeta as características físicas e químicas do óleo e sua susceptibilidade aos processos de degradação (Seabra, 2008).

Os impactos ambientais da poluição dos sistemas hídricos estão relacionados com a destruição de habitats, desorganização estrutural, e funcional da biota aquática, perda hídrica em termos qualitativo e quantitativo. Esses efeitos podem provocar repercussão na economia e na saúde pública. Os impactos diretos à saúde humana provocados pela poluição dos recursos hídricos são vários, destacando-se ocorrência de florações de cianofíceas e conseqüente emissão de microcistinas que são hepatóxicas solúveis em água e estáveis quimicamente. Estas substâncias são extremamente nocivas à saúde humana (Ferreira, 2007). Os metais pesados contaminando as águas podem provocar de acordo com Baird (2002), acúmulo no tecido adiposo, atingir os rins, pulmões, cérebro, aparelho cardiovascular e ossos. Os demais resíduos considerados poluentes na água podem provocar dores de cabeça, tontura, enjôo, vômitos, diarreias (Ferreira, 2002).

2.2.3 Contaminação dos solos

O solo é de grande importância para os ecossistemas, sendo base para a vida e habitat de seres humanos, animais, plantas e outros organismos como os micro-organismos que atuam na decomposição de matéria orgânica promovendo o equilíbrio e a renovação química, além de ter propriedades filtrantes, de tamponamento e de conversão de substratos o que o torna protetor dos recursos hídricos (Seabra, 2008).

Resultante da ação de agentes intempéricos em sedimentos e enriquecido de detritos orgânicos, o solo é formado em duas fases: gênese e pedogênese. Por receberem plantas em decomposição, os solos superficiais são ricos em matéria orgânica, apresentando maior quantificação nas concentrações de micro-organismos, em comparação com solos mais profundos. Os micro-organismos mais encontrados no solo são fungos e bactérias, sendo responsáveis pelo processo de decomposição da matéria orgânica (Seabra, 2005).

O perfil do solo é caracterizado por ser um sistema complexo composto por frações orgânicas e minerais. O clima influencia diretamente na origem e evolução do solo, além da composição do seu material de origem, do relevo, do tempo e dos organismos vivos que nele sobrevivem. Alguns fenômenos físicos alteram o formato e o tamanho dos solos e os fatores químicos modificam sua composição. Dessa forma, com o passar do tempo, o solo transforma-se pela ação da gravidade, das águas, do vento e ainda pela ação dos fenômenos físicos, químicos e biológicos. Os fatores supracitados associados à textura, cor, consistência, estrutura e atividade biológica do solo são essenciais para identificação e diferenciação das camadas que compõe as camadas do solo, além de análises químicas, físicas e mineralógicas (Seabra, 2005). Os principais horizontes do solo encontram-se descritos na figura 04.

A textura do solo baseia-se nos teores de areia, silte e argila. Os diferentes tamanhos das partículas não influenciam na composição química ou cor, entretanto, influenciam na capacidade de retenção de água e no transporte de massa no solo. Em solos arenosos, a água é drenada rapidamente em oposição ao que ocorre no solo argiloso. Na tabela 06, é possível visualizar o sistema de classificação dos solos quanto à textura adotado pela EMBRAPA.

Fatores como porosidade e a condutividade hidráulica, podem influenciar nas características do solo. A porosidade é a relação volume dos espaços vazios em função do volume total. A condutividade hidráulica (K) está relacionada com a permeabilidade do fluido com a água. A densidade absoluta do solo também é um dos parâmetros importantes em razão entre sua massa seca e o seu volume.(Seabra, 2005).

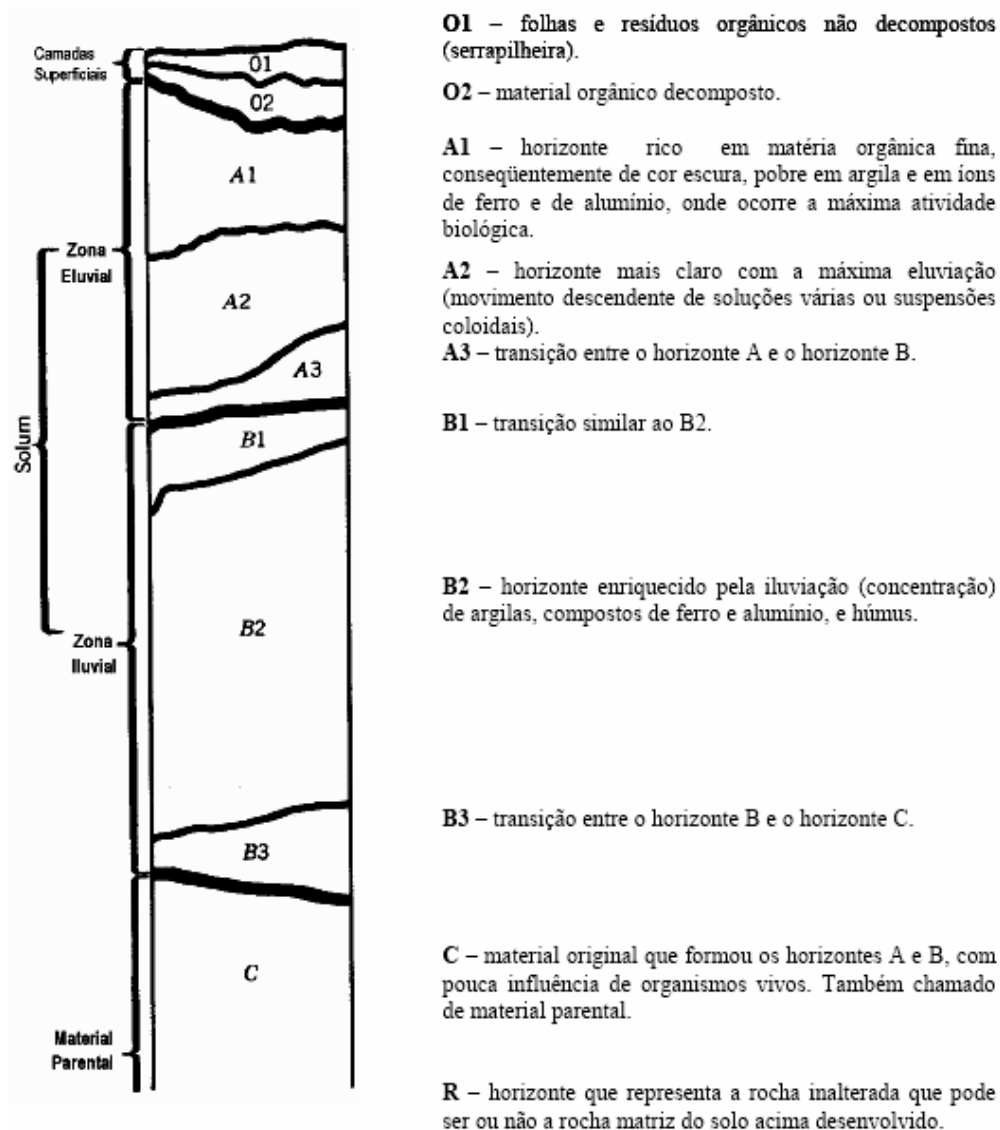


Figura 04. Representação esquemática dos principais horizontes típicos do solo. Fonte: Seabra, 2005.

Tabela 06. Classificação dos tipos de solo de acordo com o tamanho das partículas segundo a EMBRAPA.

Classificação	Tamanho das partículas (mm)
Argila	0,0002 – 0,002
Silte	0,002-0,04
Areia Fina	0,04-0,3
Areia Grossa	0,3-2
Cascalho	2-30
Seixo	30-80

Fonte: SEABRA, 2005-adaptada

A atmosfera presente no solo apresenta teores baixos de oxigênio e altos de vapor de água e CO₂ em comparação com a atmosfera. Os solos compactados com baixa porosidade ou alagados acabam por gerar condições anaeróbias para os micro-organismos locais. É indispensável um bom arejamento do solo para que ocorra a respiração das raízes e dos organismos aeróbios presentes no solo (Pavanelli, 2007).

A contaminação dos solos teve início com o surgimento das primeiras sociedades humanas. Segundo Seabra (2008), existem registros de solos poluídos por rejeitos de mineração e de fundição de metais desde o século I a.C. Com a Revolução Industrial, a poluição dos solos pelos rejeitos gerados cresceu consideravelmente. As atividades resultantes do crescimento urbano, a extração de recursos e o aterro de resíduos constituem processos que provocam impactos no solo e nas águas subterrâneas. A indústria petrolífera gera em suas atividades, um risco ambiental inerente que precisa ser constantemente gerenciado com o intuito de evitar possíveis vazamentos e conseqüente poluição ambiental (Seabra, 2008; Rodrigues; Duarte, 2003).

A poluição dos solos pode ocasionar a perda de algumas de suas funções e ainda provocar contaminação das águas subterrâneas (Rodrigues; Duarte, 2003; CETESB, GTZ, 2001). Dentre os principais efeitos destacam-se perturbações físicas com alterações estruturais das características geológicas, alterações na topografia e remoção da camada vegetal. Todos esses fatores podem levar à erosão, mudança na densidade e consistência do solo, desagregação da superfície, alteração da microbiota natural, contaminação das águas subterrâneas, levando a perda das qualidades do solo (Gunther, 2005).

A introdução de poluentes no ambiente pode ter diferentes destinos no solo, estando relacionado diretamente com a umidade, o tipo de argilomineral, a área, a capacidade de troca de cátions, potencial Hidrogeniônico, temperatura, potencial redox, porosidade, permeabilidade e principalmente, das características do poluente. Os poluentes orgânicos líquidos têm sua poluição acentuada de acordo com a densidade do composto. Compostos menos densos que a água (LNAPL) permanecem no solo e ao percolarem infiltram-se nos lençóis freáticos sendo transportados por longas distâncias do local de contaminação original. Os poluentes mais densos que a água (DNAPL) depositam-se no leito do lençol freático, constituindo foco de contaminação por longos períodos (Bragato, 2006).

Os poluentes orgânicos são divididos em compostos clorados, compostos nitrogenados e hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos do petróleo são geralmente do tipo “LNAPL”, o que favorece sua dispersão. Ao entrar em contato com o solo, os

petroderivados soltam vapores ou formam bolsões tanto no solo quanto no aquífero, desencadeando a contaminação ambiental (Bragato, 2006).

O comportamento de uma mistura de hidrocarbonetos em água é bem diferente quando em comparação com os solos. Esta diferença está relacionada com o movimento e a distribuição do óleo no meio físico, a presença de matéria particulada, a susceptibilidade à biodegradação. A presença de complexo coloidal do solo é essencial para manutenção da sua fertilidade, entretanto, ele dificulta a remoção de poluentes neste ambiente, pois retém facilmente substâncias orgânicas e inorgânicas por adsorção física, formando ligações químicas de médias a fortes (Delle Site, 2001).

Poucos estudos mostram a relação entre a exposição a estes hidrocarbonetos durante um processo de contaminação e os efeitos em animais quanto em lesões pulmonares, renais, hepatológicas e hepáticas. Os seres humanos expostos aos grandes vazamentos não foram muito bem avaliados, conseqüentemente, o tempo em que as pessoas devem permanecer afastadas dos locais dos acidentes durante o tratamento ambiental também ainda não foi delimitado (Chagas-Spinelli, 2007).

Processos de descontaminação do solo constituem operações difíceis e com custos elevados. A agência Européia do Ambiente estimou custos totais de descontaminação de solos contaminados na Europa entre 59 e 109 milhões de euros, somente na Áustria os gastos atingiram 67 milhões e na Espanha 14 milhões de Euros, (Pavanelli, 2007). De acordo com Nikakhtari *et al.*, (2010), tem-se utilizado cada um número maior de micro-organismos para remediar solos contaminados com petroderivados.

A biorremediação de solos, de um modo geral pode ser aplicada *in situ*, que consiste na biodegradação de poluentes no próprio local impactado sem a escavação do solo. Porém, pode ser utilizada também a aplicação *ex situ*, onde a biodegradação ocorre fora do sítio de contaminação, a modificação das características do solo ocorrem de modo mais intenso, podendo haver redução na quantidade de matéria orgânica, nutrientes e capacidade de troca catiônica, tendo por conseqüência a redução das propriedades filtrantes, de tamponamento e de depuração (Melo; Azevedo, 2008).

Geralmente, uma única tecnologia não é capaz de remediar totalmente um local contaminado, desse modo, é indispensável a combinação de várias técnicas. As principais técnicas empregadas para remediação de solo estão listadas na tabela 07.

Tabela 07. Principais técnicas de biorremediação de solos.

Técnica empregada	Local de aplicação	Tempo de tratamento	Custo
<i>Landfarming</i>	<i>Ex situ</i>	De 6 meses a 2 anos.	US\$ 30 a 60/ tonelada
<i>Land Treatment</i>	<i>In situ</i>	De 6 meses a 2 anos.	US\$ 30 a 70/m ³
Biopilha	<i>Ex situ</i>	De 3 a 6 meses.	US\$ 100 a 200/tonelada
Compostagem	<i>Ex situ</i>	De 3 a 6 meses.	US\$ 50 a 70/tonelada

Fonte: Seabra, 2008-adaptado.

O *Landfarming* consiste em uma técnica onde é feita a impermeabilização do solo contaminado, que é disposto e homogeneizado periodicamente por aragem. São controlados as taxas de umidade e aeração, os nutrientes e o pH do solo. No *Land treatment*, o processo ocorre em escala de campo, a superfície do solo é revolvida por aragem e tem como princípio o mesmo do *Landfarming*, sem a construção de uma célula impermeabilizada. A técnica de biopilha emprega o solo contaminado e disposto em pilhas impermeabilizadas com mantas, onde é possível controlar pH, umidade, nutrientes, oxigênio e temperatura. Na compostagem, o solo é colocado em pilhas e é revirado mecanicamente, neste caso há um maior controle da permeabilidade do solo. O tratamento de solo em biorreator ocorre *ex situ* e consiste em condições controladas de tratamento, sendo aplicado geralmente com o solo em fase lama (Seabra, 2008).

O solo é um recurso natural e como tal deverá ser utilizado. Qualquer alteração das suas propriedades físicas, químicas ou biológicas que venham a ocasionar graves prejuízos à vida do homem e dos ecossistemas em geral será considerada poluição e, portanto deve-se minimizar seus impactos, além de utilizar seus recursos de maneira sustentável de modo à preservar os solos para usufruto das gerações futuras (Odum, 1997).

2.3 PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

Problemas ligados à poluição ambiental se acentuaram e trouxeram como consequência a necessidade da conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes nos rios, solos, lagos, oceanos e atmosfera, bem como aumento nos investimentos para o desenvolvimento de tecnologias de remediação. Ao serem liberados no solo, os hidrocarbonetos migram verticalmente pela zona não saturada sob influência das forças gravitacional e capilar, horizontalmente migram pelas

forças capilares (Mariano, 2006). Forças capilares são as que influenciam no movimento dos hidrocarbonetos de fase líquida através dos poros do solo. Elas dependem do solo estar molhado com água ou com hidrocarbonetos em fase líquida, das propriedades físicas e químicas dos hidrocarbonetos em fase líquida e das características do próprio solo (Guiguer, 2000). A migração dos hidrocarbonetos no solo ocorre em quatro fases (figura 05).

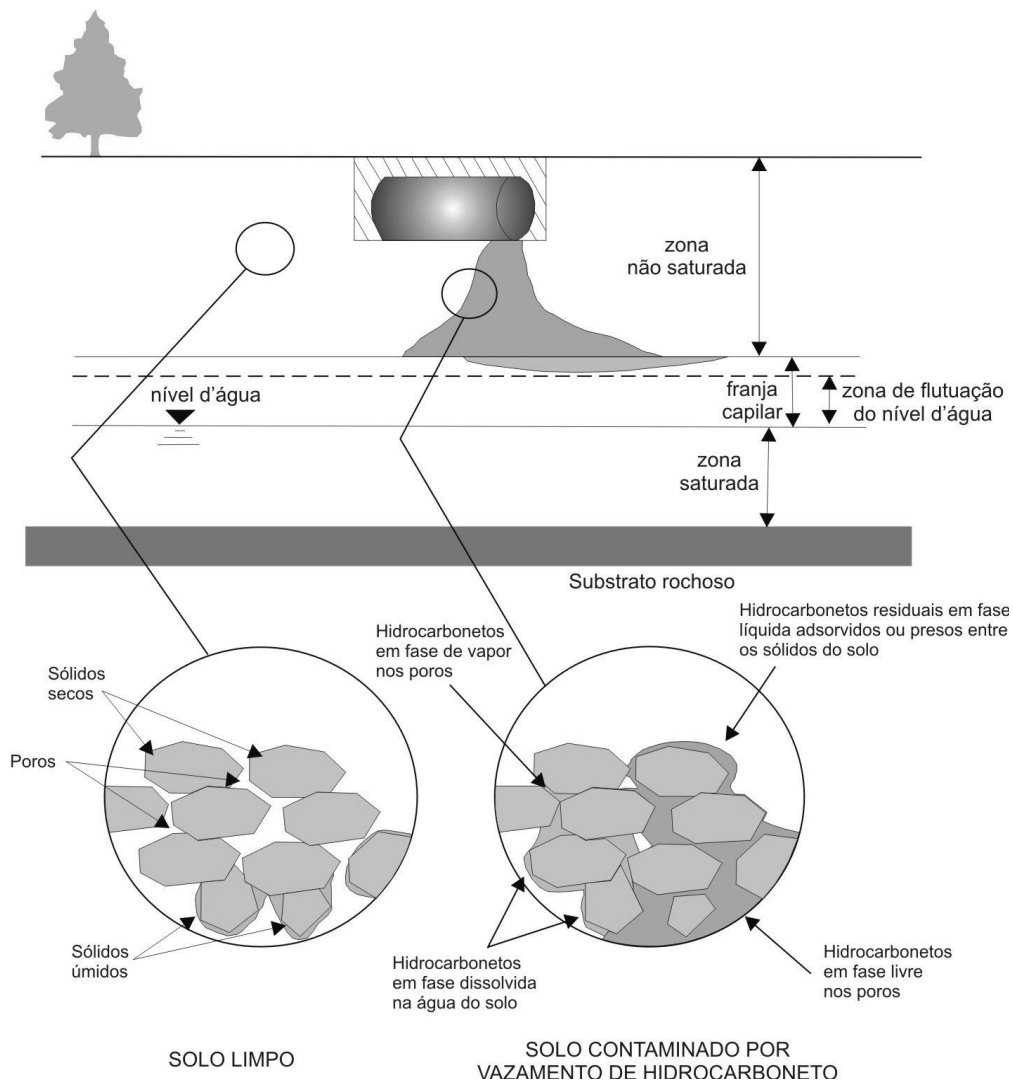


Figura 05. Fases que ocorrem na região saturada e insaturada do solo em um vazamento de hidrocarbonetos. Fonte: Guiguer, 2000.

A primeira é a fase líquida residual que permanece no solo com resíduo líquido imóvel, sendo adsorvido entre os sólidos do solo. A segunda é a fase líquida livre, que constitui o líquido livre não residual que passa pelo solo e quando atinge as águas subterrâneas que flutuam. A terceira é a fase dissolvida que está presente na superfície

sólida do solo, formando películas, ou na água formando a pluma de contaminação. Na última fase, o vapor vai ocorrer havendo condensação ou adsorção tanto na superfície sólida quando na água (Guiguer, 2000).

Os compostos voláteis tendem a se dividir no solo movendo-se pela zona saturada e insaturada e ainda migrando para o ar (Mariano, 2006). Em alguns casos os HPA ficam fortemente adsorvidos na matéria orgânica do solo o que os torna indisponíveis para a degradação. Esta aderência afeta diretamente sua biodisponibilidade e faz com que estes compostos permaneçam no solo por um longo período de tempo (Cotta, 2008).

Em ambiente aquoso, os HPA de baixa massa molar, dissolvem-se facilmente ficando disponíveis para os processos de degradação. Os HPA de alto peso molecular associam-se às partículas na atmosfera e na água tornando-se mais recalcitrantes (Cotta, 2008).

2.3.1 Processos Abióticos de Degradação

Independente da forma com que o petróleo e seus derivados atingem o ambiente, uma vez presentes e em contato com o solo ou com água, vários processos físico-químicos e biológicos vão ocorrer, variando ao longo do tempo de contaminação (figura 06).

De acordo com Zanardi (1996), Bento (2005) e Chagas-Spinelli (2007), os processos abióticos que envolvem o derrame de petróleo bruto ou de seus destilados estão classificados em:

- **Evaporação:** As frações mais leves evaporam provocando um aumento da viscosidade. Esse processo está relacionado com o estado do mar ou lago, a superfície da mancha, a pressão de vapor, a espessura da mancha e as condições climáticas locais. Após a contaminação ambiental, a primeira etapa pela qual os derivados do petróleo passam é a evaporação que ocorre durante as primeiras 48 horas. Ela reduz o volume do poluente, dissipando as frações mais leves e conseqüentemente mais voláteis. A evaporação pode remover de 30 -50% do composto original, dependendo principalmente da composição do composto derramado, das propriedades físicas do composto, da área de superfície de derrame e da velocidade dos ventos;
- **Espalhamento:** Este processo ocorre em virtude da ação de ventos, marés, ondas e correntes. O comportamento do petroderivado é afetado por eles durante as primeiras horas após o derrame, desde que o ponto fluido do óleo seja menor que a

temperatura ambiente. O processo faz com que a mancha de óleo derramado se expanda e aumente de área, diminuindo de espessura e garantindo assim uma maior transferência de massa por evaporação e dissolução;

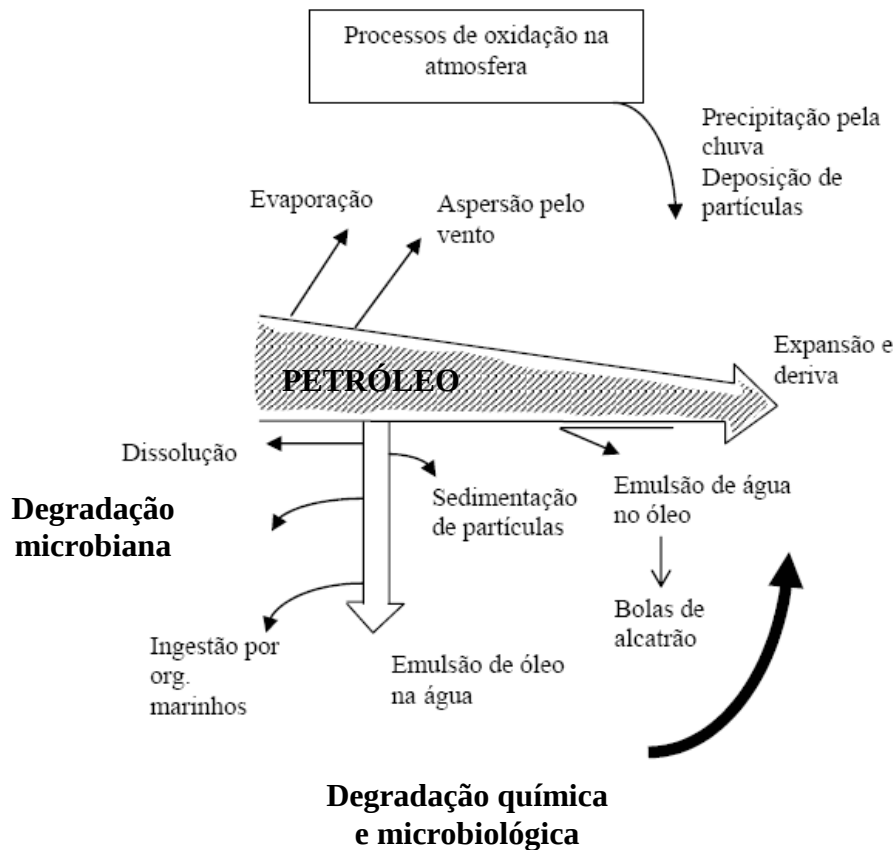


Figura 06: Representação esquemática do processo de degradação do petróleo relacionando-se fatores abióticos e bióticos. Fonte: Guiguer, 2000-adaptada.

- **Dissolução:** Ocorre quando a contaminação é superficial. Durante o desgase do petroderivado derramado, há um aumento da superfície exposta o que permite a partição das frações de baixo peso molecular. Os hidrocarbonetos saturados são “dissolvidos” na coluna d’água. Esse processo tem uma influência negativa sobre o ecossistema, pois expõe os seres vivos da coluna d’água às frações que antes eram apenas superficiais, ocorrendo a bioacumulação dos constituintes nos organismos (Albert, 2010). A dissolução influencia negativamente a evaporação, pois as frações que se dissolvem atrapalham a evaporação. A dissolução dos compostos de baixo peso molecular vai ocorrer, principalmente quando este emerge à superfície. As

frações mais leves como o benzeno são particionadas na coluna de água e quase que removidas da composição original;

- **Emulsificação:** Processo irreversível que impede as operações de limpeza, pois provoca o aparecimento de uma mistura viscosa e flutuante. Este processo é resultado da dispersão de gotas de água no meio oleoso, formando uma matéria altamente viscosa de cor marrom à alaranjada. A emulsificação consiste no aumento da densidade, viscosidade e do volume do poluente. Nesse momento do processo de degradação, o processo de limpeza fica mais difícil;
- **Adsorção:** Ocorre a incorporação de frações oleosas aos tecidos de organismos vivos e partículas suspensas, este processo reduz cerca de 15% da massa original do poluente.
- **Sedimentação:** Após a remoção do óleo da coluna d'água pelos processos supracitados, este ainda pode sedimentar, quanto mais espesso ele ficar. Ocorre também a formação de piche (massas semi-sólidas compactadas de óleo intemperizado agregado a partículas da coluna d'água ou ao assoalho oceânico e causam danos graves aos ecossistemas.
- **Oxidação fotoquímica:** Os compostos mais solúveis vão se dispersar reagindo com a luz solar e o oxigênio, os radicais livres desses compostos reagem com as moléculas de oxigênio e com isso ocorre a quebra das moléculas maiores em compostos mais solúveis na água. Além da degradação de algumas frações mais leves dos hidrocarbonetos, ocorre a transformação das frações originais em compostos oxigenados como ácidos carboxílicos, cetonas, fenóis e alcoóis. Estes compostos podem ser ou não menos recalcitrantes que os compostos originais.

A relação dos processos que os hidrocarbonetos passam e sua relação com o tempo está exemplificada na figura 07. Muitos desses processos ocorrem naturalmente, sendo empregados processos adicionais com o intuito de acelerar a degradação dos poluentes e remediar o ambiente impactado. Os tratamentos empregados incluem processos físicos, químicos e biológicos (Seabra, 2008).

Como método físico, as barreiras de contenção mecânicas são muito utilizadas, separam a água do óleo, o que facilita a sua captação por barcos de apoio através de bombas recuperadoras de óleo (Crapez *et al.*, 2002). Pode-se ainda utilizar como método físico de remoção, algumas técnicas que de acordo com Abdanur (2005), estão sendo empregadas como procedimentos de rotina nos países mais desenvolvidos. Dentre os

processos, destacam-se air stripping, dessorção térmica, atenuação natural monitorada, solidificação e estabilização, tratamento térmico in-situ, vitrificação, bombeamento e tratamento (Pump and Treat-PT) e injeção de ar.

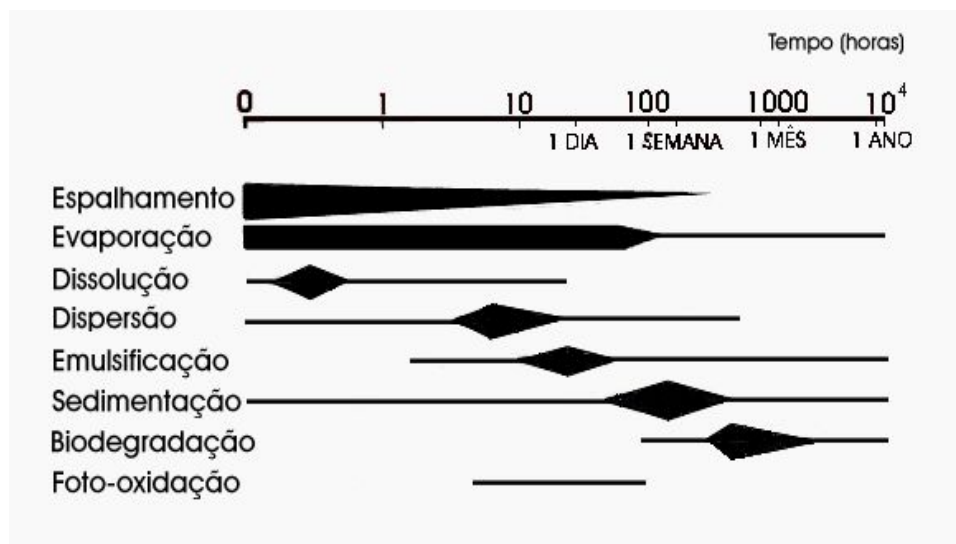


Figura 07: Processos pelos quais o petróleo e seus derivados passam após chegada no ambiente e sua relação cronológica. Fonte: Bento, 2005.

Substâncias absorventes do óleo como palha, espuma de polietileno, barreiras de absorção também são freqüentemente empregadas, entretanto ainda não há um destino compatível com o ambiente para esse material contaminado o que dificulta a eficácia do processo. Os métodos químicos podem facilitar ainda mais a degradação dos contaminantes. Dentre os métodos mais comuns destacam-se a neutralização, oxidação, aplicação de surfactantes e a extração por solventes (Mariano, 2005).

Os surfactantes de síntese química são os mais utilizados em processos de remediação, tendo um mercado mundial de mais de 9,4 bilhões de dólares por ano. A maioria dos surfactantes é obtida por síntese química a partir de derivados do petróleo, entretanto sua aplicação e utilização podem causar impacto ambiental, uma vez que são tóxicos e não são biodegradáveis (Desai; Banat, 1997; Qin *et al.*, 2009).

Os procedimentos abióticos podem ser implementados no tratamento de plumas, para águas subterrâneas e/ou para descontaminar solos, entretanto, de acordo com Cotta (2008), estes processos requerem longos períodos de tempo e altos custos. Devido às dificuldades encontradas na remediação abiótica, vem se tentando buscar alternativas mais

compatíveis com o ambiente visando minimizar o impacto ambiental e promover uma remediação efetiva e com os mínimos impactos ao meio ambiente (Desai; Banat, 1997).

2.3.2 A Biorremediação

O termo engloba uma série de tecnologias e técnicas distintas para o tratamento de solos, águas contaminadas e outros resíduos. Surgiu como a forma menos agressiva de tratamento de xenobióticos no meio ambiente, sendo um processo biótico, pois utiliza para remoção dos poluentes, o potencial fisiológico de organismos que vão degradar poluentes como os hidrocarbonetos, utilizando-os como fonte de carbono e energia (Desai; Banat, 1997; Rahman *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2003).

A biorremediação age sobre o poluente através da catálise biológica e deste modo degrada os contaminantes ambientais em pequenas moléculas, sendo definida como um processo espontâneo ou controlado. Existem várias vantagens na aplicação da biorremediação, destacando-se a eliminação permanente dos resíduos, é uma tecnologia limpa, compatível com o ambiente, requer um baixo custo e ainda pode ser utilizada *in situ*, *ex situ* ou estar associada a outras técnicas de tratamento (Semple *et al.*, 2001).

O mecanismo básico de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo é a oxidação dos anéis aromáticos, tendo como produto final o dióxido de carbono, água, as formas inorgânicas de nitrogênio, fósforo e enxofre e os próprios componentes celulares a este processo denomina-se mineralização (Mazzeo, 2009; Diplock *et al.*, 2009). Como nem sempre a mineralização ocorre, a biorremediação tem por objetivo a degradação de poluentes orgânicos em concentrações que não sejam detectáveis ou, se detectáveis que seja abaixo dos limites estabelecidos, como seguros e aceitáveis pelos órgãos reguladores (Chagas-Spinelli, 2005). Não é sempre que o processo de biorremediação resulta em compostos compatíveis com o ambiente, em alguns casos os metabólitos resultantes são mais tóxicos do que os componentes originais e por isso, deve-se sempre realizar testes e ecotoxicidade com os subprodutos da biodegradação, visando assim a descontaminação completa do produto a níveis atóxicos ou considerados toleráveis (Nunes, 2006).

Segundo vários autores, alguns critérios devem ser conhecidos quando se refere a processos de biorremediação (Boopathy, 2000; Chagas-Spinelli, 2005).

- Devem-se ter micro-organismos ou consórcios microbianos com necessária atividade catabólica;

- Os organismos devem ter a capacidade de transformar os compostos a uma taxa razoável e baixar assim as suas concentrações, aos níveis que estejam dentro das normas estabelecidas;
- O local impactado não deve apresentar concentrações ou combinações de compostos químicos inibitórios às espécies biodegradantes, ou meios de diluição devem ser empregados;
- Deve ser feito um acompanhamento dos subprodutos gerados de modo que se selecione processos em que haja baixa toxicidade dos resíduos;
- Os poluentes devem estar disponíveis aos micro-organismos existentes;
- As condições locais devem ser simuladas visando o crescimento microbiano ou sua atividade, através de suplemento de nutrientes orgânicos, oxigênio ou outro aceptor de elétrons, umidade favorável, temperatura estável, fonte de carbono e energia para o crescimento do micro-organismo caso o poluente seja cometabolizado;
- Os custos devem ser menores que as outras tecnologias empregadas.

Todos estes critérios são importantes e a não conformidade de algum deles pode acarretar falha no processo de biodegradação. De acordo com Soriano *et al.*, (2007) convencionou-se uma ordem crescente de susceptibilidade das frações do petróleo ao ataque microbiano: *n*-alcanos- alcanos ramificados-aromáticos de baixo peso molecular-cicloalcanos-poliaromáticos-compostos polares. A principal exceção à essa ordem é a degradação dos asfaltenos que são de difícil degradação por bactérias em ambiente contendo *n*-alcanos de 12 a 18 átomos de carbono (Leahy; Colwell, 1990).

2.3.2.1 Fatores que Influenciam na Biorremediação

O processo de biorremediação, por utilizar sistemas biológicos, é influenciado por vários fatores, tanto relacionados ao poluente, quanto aos próprios micro-organismos ou ao ambiente em que eles encontram-se (tabela 08).

O metabolismo dos fungos constitui-se de uma série de reações químicas que, em geral, servem para duas funções gerais. A primeira é anabólica onde há troca de nutrientes estruturais e funcionais. A segunda é a função catabólica, relacionada com a extração de energia química ou de elementos nutritivos de substâncias complexas por fornecer energia através de reações anabólicas (Putzke J; Putzke M, 2002). Ainda segundo os mesmo autores, o metabolismo dos fungos geralmente está dividido em dois tipos principais:

metabolismo primário, que envolve reações metabólicas necessárias para manter e aumentar a população microbiana e metabolismo secundário que envolve a produção de numerosos compostos que não são essenciais à sustentabilidade do fungo.

Tabela 08. Fatores que afetam o processo de biorremediação microbiana em ambiente impactado.

Quanto aos Micro-organismos	Quanto ao Poluente
Presença de população microbiana no local.	Biodisponibilidade físico-química dos poluentes.
Ativação, mutação e transferência horizontal de genes.	Tipo, composição, concentração e toxicidade do poluente no ambiente.
Interação microbiana no ambiente (competição, sucessão e predação, por exemplo).	Solubilidade e miscibilidade em/com a água.
Aumento da população microbiana degradadora do poluente	
Fontes de carbono alternativas para estimulação de cometabolismo.	

Fonte: Esposito; Azevedo, 2004.

A biorremediação pode ser limitada pela inibição do metabolismo fúngico. Isto pode ser causado por produtos químicos ou toxinas presentes no ambiente ou produzidos pelos próprios micro-organismos. A presença de contaminantes (poluentes\substratos) em níveis tóxicos para a microbiota é bastante citada (Esposito; Azevedo, 2004).

De acordo com Seabra (2008), uma população microbiana necessita de condições ambientais específicas para biodegradar um determinado contaminante, pois caso contrário, os micro-organismos entram em latência, reduzindo suas atividades metabólicas e conseqüentemente não realizando a biorremediação.

Os micro-organismos utilizam os hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia e existem algumas considerações sobre este processo segundo Pereira-Jr. *et al.*, (2009):

- Os hidrocarbonetos alifáticos são em geral mais facilmente biodegradados que os aromáticos;
- Os hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal são mais fáceis de serem biodegradados que os de cadeia ramificada. A introdução de uma estrutura ramificada na molécula reduz sua biodegradabilidade.
- Hidrocarbonetos saturados são mais susceptíveis à degradação que os insaturados. A presença de ligação dupla ou tripla carbono-carbono dificulta a biodegradação.
- Por fim, os hidrocarbonetos alifáticos com cadeias a partir de 8 átomos de carbono são mais facilmente biodegradáveis tanto menor seja o tamanho de sua

cadeia. O comprimento ideal da cadeia para a biodegradação é de 10 a 20 átomos de carbono.

As bactérias e os fungos apresentam diferenças no que se refere ao ataque dos substratos em questão, os fungos filamentosos utilizam a hidroxilação para iniciar a destoxificação, a maioria das bactérias utiliza a oxidação como ponto de partida para a fissão dos anéis, seguida da assimilação (Pereira-Jr. *et al.*, 2009). A via catabólica de degradação dos HPA por fungos filamentosos e bactérias está apresentada na figura 08.

Os fungos filamentosos em presença de oxigênio e monoxigenases produzem fenol e trans-dihidrodiol a partir de óxido arenoso. As bactérias, por sua vez, produzem ácido cis-cis mucônico e o semi-aldeído 2 hidroxí-mucônico, ambos formados a partir de uma molécula de catecol que sofre clivagem. Para ação bacteriana é necessária a presença de NAD^+ , oxigênio e enzimas dióxigenases (Cerniglia, 1992).

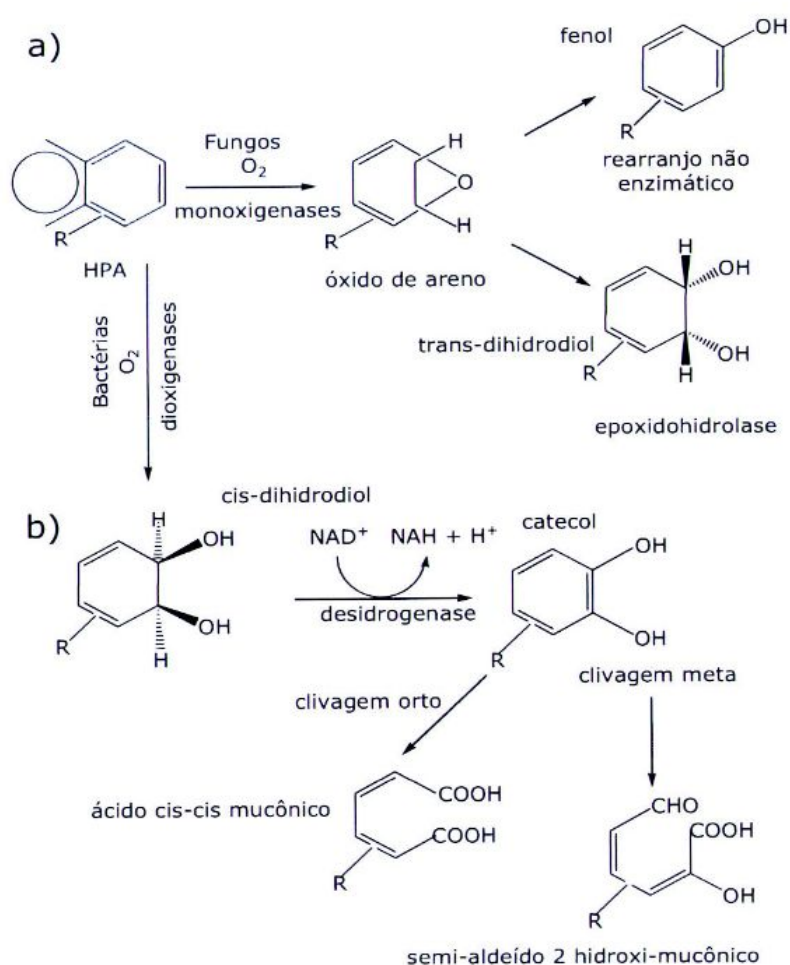
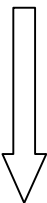


Figura 08. Via catabólica de degradação de HPA por fungos (a) e bactérias (b) .
Fonte: Cerniglia, 1992.

A estrutura química dos HPA tem influencia direta na sua biodegradabilidade, na tabela 09, é possível verificar a relação entre a estrutura química dos hidrocarbonetos do petróleo e sua biodegradabilidade, tem-se como o composto mais biodegradável a gasolina com as frações *n*-butano, *n*-pentano, *n*-octano e nas frações menos biodegradáveis tem-se destaque para os óleos combustíveis e lubrificantes com os constituintes pireno e Acenaftenos, respectivamente (Seabra, 2008).

Tabela 09. Escala de biodegradabilidade dos produtos refinados do petróleo de acordo com os seus constituintes químicos (U.S. Environmental Protection Agency, 1995 *in* Seabra, 2008).

Escala de biodegradabilidade	Produtos refinados do petróleo	Constituintes químicos dos hidrocarbonetos
Mais biodegradável	Gasolina	<i>n</i> -butano, <i>n</i> -pentano, <i>n</i> -octano
	Óleo diesel	Nonano
	Gasolina	Metilbutano, dimetilpenteno, metiloctano
	Gasolina	BETEX
	Óleo diesel, querosene	Propilbenzenos
	Óleo diesel	Decanos
	Querosene	Dodecanos
	Óleos combustíveis	Tridecanos
	Óleos lubrificantes	Tetradecanos
	Óleo diesel	Naftalens
	Querosene	Fluorantenos
	Óleos combustíveis	Pirenos
	Óleos lubrificantes	Acenaftenos
Menos biodegradável		

Concentração do Contaminante

A concentração do contaminante segundo Seabra (2008), tem relação direta com a eficiência na biodegradação. Os hidrocarbonetos, por exemplo, apresentam baixos índices de solubilidade e biodegradação limitada, devido à sua alta concentração. As altas concentrações dos contaminantes podem causar inibição da biodegradação, devido à limitação de nutrientes ou de oxigênio ou ainda provoca efeitos tóxicos exercidos pelos hidrocarbonetos voláteis. De acordo com Maciel *et al.*, (2010), fungos do gênero *Penicillium*, apesar de possuírem a capacidade de utilizar querosene de aviação como fonte de carbono, demonstram uma redução na eficácia de degradação do poluente de acordo com o aumento da concentração do mesmo, sendo os resíduos gerados após degradação de 30% de querosene tóxicos para sementes de *Brassica oleraceae*.

Biodisponibilidade do Contaminante

Em relação à biodisponibilidade do contaminante à microbiota degradadora, vários fatores influenciam, havendo destaque para as taxas de dissolução do poluente no ambiente, emulsificação do substrato pelo micro-organismo e ainda a eficiência do suprimento de contaminantes e nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento dos micro-organismos. Os hidrocarbonetos quando dissolvidos, solubilizados ou emulsificados são mais disponíveis à biodegradação, esta disponibilidade do poluente está diretamente relacionada ao processo de biodegradação. Segundo Seabra (2008), os principais fatores que afetam a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos à ação dos micro-organismos são:

- Os hidrocarbonetos presentes em uma mistura complexa como o petróleo são, em sua maioria biodegradados por culturas microbianas mistas de maneira simultânea e em diferentes velocidades. A velocidade de biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo varia em função do desaparecimento de certos componentes e da mudança da biota presente no sistema;
- Os alcanos C1-C4 são degradados por poucas espécies microbianas. Os alcanos de C5-C9 são tóxicos a muitos micro-organismos devido ao seu efeito solvente, pois rompem a estrutura da membrana lipídica dos micro-organismos. Os *n*-alcanos C10-C22 são os mais facilmente metabolizados. Os alcanos que apresentam massa molar maior, do tipo graxa sólida, não são tão biodegradáveis por serem sólidos e hidrofóbicos à temperatura ambiente;
- Os alcenos são raros no petróleo bruto;
- Os iso-alcanos são bem menos biodegradáveis em comparação com os *n*-alcanos correspondentes. O radical metila pode retardar ou bloquear completamente a biodegradação;
- Alcenos tendem a ser mais tóxicos em condições aeróbias, sendo menos degradáveis quando em comparação com os análogos *n*-alcanos;
- Os hidrocarbonetos monoaromáticos são tóxicos, mas em concentrações reduzidas podem ser biodegradados e utilizados como fonte de carbono por diversos fungos;
- Os compostos poliaromáticos com de 2 a 4 anéis são biodegradados também, porém a eficácia desse processo está inversamente proporcional à

quantidade de anéis. Os naftalenos com 2 anéis aromáticos são degradados mais lentamente que os monoaromáticos;

- Cicloalcanos de baixo peso molecular raramente servem como substrato, sendo degradados lentamente e em baixas concentrações. Já os compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, enxofre ou oxigênio em sua cadeia podem ter a eficácia da biodegradação limitada. Os asfaltenos quando condensados são altamente resistentes à biodegradação;

Os índices de biodegradação estão relacionados diretamente às interações das moléculas dos contaminantes, das partículas do solo, da água intersticial e dos micro-organismos degradadores dos contaminantes. Na figura 09, é possível visualizar a representação esquemática de como está disposta a dissolução dos compostos orgânicos na fase aquosa. Este processo envolve as partículas sólidas do solo, dissolvidas na fase vapor, sorvidas nas partículas sólidas ou na matéria orgânica ou ainda como líquido de fase não aquosa (Seabra, 2008).

Além das características do contaminante, fatores ambientais também vão atuar diretamente na eficácia do processo de biorremediação.

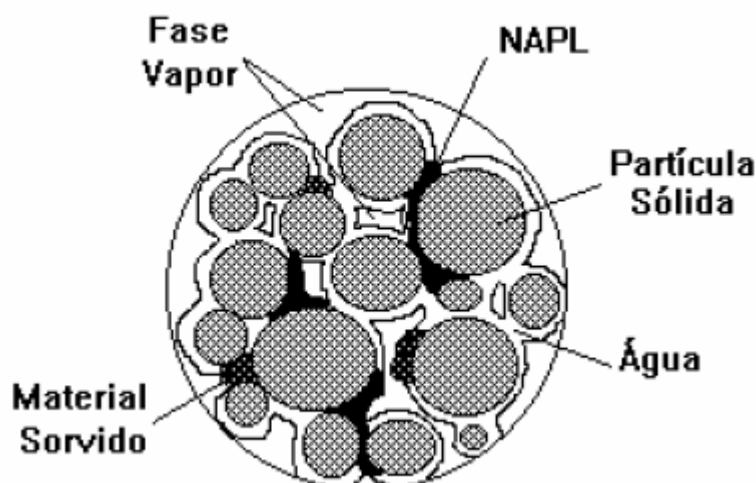


Figura 09. Representação esquemática de como estão distribuídos os contaminantes orgânicos nas diversas fases. Fonte: Seabra, 2008.

Condições ambientais e de cultivo

- *Temperatura*

A temperatura está diretamente relacionada com a composição da microbiota, além de influenciar nas características físico-químicas dos hidrocarbonetos. À baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilidade de alcanos tóxicos de cadeias

curtas diminui, sua solubilidade aumenta e há uma redução da atividade enzimática, acarretando assim uma redução das taxas de degradação pelos micro-organismos (Seabra, 2008).

Em temperaturas elevadas, a taxa de metabolismo aumenta, atingindo valores ideais entre 30°C a 40°C. Acima desse valor, ocorre um decréscimo da biodegradação ou a interrupção do processo devido ao aumento da toxicidade dos hidrocarbonetos, à membrana celular e pela desnaturação enzimática (Leahy; Cowell, 1990).

No solo, a temperatura também afeta a biodegradação, as taxas de degradação através de enzimas e o metabolismo microbiano dobram a cada aumento de 10°C, até que a temperatura iniba suas atividades, o que ocorre geralmente, a partir de 40°C (Leahy; Colwell, 1990). Além de afetar diretamente, a temperatura pode provocar efeitos indiretos na biodegradação, pois ela altera as propriedades dos contaminantes no que se refere, por exemplo, à viscosidade do óleo, composição química ou até mesmo toxicidade à microbiota. Temperaturas baixas, por exemplo, aumentam a viscosidade dos óleos e reduz sua solubilidade, inibindo o início da biodegradação (Seabra, 2008).

- *Umidade e Atividade de Água*

A umidade afeta diretamente a atividade microbiana, pois a água é um componente indispensável à viabilidade de células vivas. Além disso, a umidade auxilia nas trocas gasosas e ainda ajuda no transporte de nutrientes. Os fungos são considerados os micro-organismos com maior capacidade de crescer em ambientes com baixa umidade relativa (Esposito; Azevedo, 2004).

A atividade de água refere-se à quantidade de água que efetivamente está disponível para os micro-organismos no processo de biodegradação, estando diretamente condicionada ao tipo de solo e à estrutura do poluente (Pereira-Jr *et al.*, 2009).

- *pH*

Este é um dos fatores que mais influencia no desenvolvimento microbiano. Em condições naturais, os fungos são mais tolerantes a condições ácidas (Leahy; Colwell, 1990). Em processos de biodegradação de hidrocarbonetos, a faixa ótima de pH varia de 5,5 a 8,5 (Maciel, 2008). O pH influencia na solubilidade do contaminante em água e na intensidade de sorção deste pelo solo, além de estar relacionado com a composição da microbiota. Alterações bruscas no pH podem vir a causar mudanças na comunidade microbiana, pois cada micro-organismo exibe uma faixa ótima de pH para atuação em processos de biorremediação (Seabra, 2008).

- *Salinidade*

A salinidade afeta negativamente a atividade microbiana, principalmente se esta for realizada por fungos, pois eles resistem menos à salinidade elevada em comparação com as bactérias (Pereira-Jr. *et al.*, 2009).

Formação de Resíduos de Ligação

São também chamados de *Bound-residues*, ocorrem quando as frações do poluente dissolvidas em solo ficam aderidas aos nanosporos presentes nos minerais de argila e na matéria orgânica. Estes resíduos formam-se principalmente devido às interações físicas e químicas dos xenobióticos com a matéria orgânica natural (Kästner; Richnow, 2001). A matéria orgânica constitui uma dos componentes do solo mais complexos, pois é resultante da ação de micro-organismos e reações químicas envolvendo plantas e animais em decomposição. Sua composição não é fixa e depende do clima, da natureza e da quantidade de material em decomposição no solo. É essa grande diversidade da matéria orgânica, que faz com que os xenobióticos sofram reações químicas além das que normalmente ele sofreria através da atenuação natural e tornam-se tão aderidos à matéria orgânica que ficam praticamente indistinguíveis (Barraclough *et al.*, 2005).

A aderência dos resíduos ligantes pode ser considerada benéfica ou não, pois caso o material poluente fique aderido e com isso torne-se atóxico ou imobilizado, esta terá um efeito benéfico. Porém caso este resíduo que irá se ligar ao solo for tóxico, além de se fixar no solo, sua remoção será muito difícil, portanto o impacto ambiental dos resíduos ligantes depende diretamente da sua toxicidade e da forma que eles apresentam após a aderência (Barraclough *et al.*, 2005).

Segundo Wang *et al.*, (2009), a formação dos resíduos ligantes e a ocorrência simultânea da mineralização está diretamente relacionada com o tipo de solo a ser empregado, relacionando-se com o tempo de incubação e com o potencial hidrogeniônico.

De acordo com Seabra (2008), os principais fatores que influenciam na formação dos resíduos de ligação são:

- Reatividade química das substâncias antropogênicas;
- Reatividade do substrato ligante (matriz macromolecular);
- Processos de transformação microbiana;
- Presença de agentes catalisadores como enzimas, minerais de argila, oxigênio e compostos de manganês e ferro.

Presença de Matéria Orgânica em Ambiente Impactado

A matéria orgânica, segundo Pereira-Jr. *et al.*, (2009), pode indicar a presença de elementos alternativos que aumentam a taxa de biodegradação realizando dessa forma, o cometabolismo. Desse modo, o processo de biodegradação pode ser otimizado ou retardado em virtude dos elementos que estão presentes no ambiente impactado, das características dos mesmos e dos metabólitos resultantes da biodegradação, que podem gerar subprodutos mais ou menos tóxicos que os constituintes originais.

Disponibilidade de Oxigênio, Nitrogênio e Fósforo

As condições nutricionais estão diretamente relacionadas com a otimização do processo de biorremediação, que em condições aeróbicas, ela ocorre de modo mais rápido em oposição às condições com pouco ou nenhum oxigênio (Pereira-Jr. *et al.*, 2009). De acordo com Douglas (2005), em sedimentos ou em águas profundas, onde há ausência de luz e pouco ou nenhum oxigênio, a biorremediação ocorre mais lentamente.

Os compostos orgânicos quando oxidados perdem elétrons para um aceptor final de elétrons, o oxigênio geralmente é esse receptor que sofre redução e é indicador da biorremediação natural de locais contaminados (Mariano, 2006; Mazzeo, 2009). Existem outros aceptores finais de elétrons que facilitam o processo de biorremediação, seu potencial de oxidação varia de acordo com o tipo de aceptor, sendo mais alta para os aceptores com potencial de oxidação mais alto. A sequência dos principais aceptores de elétrons é: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água (Mariano, 2006).

Ainda de acordo com Mariano (2006), o nitrogênio é o segundo aceptor de elétrons mais utilizado, empregado geralmente em condições anaeróbicas, sendo utilizados principalmente por bactérias anaeróbicas facultativas. A relação carbono/ nitrogênio têm sido muito utilizada visando a otimização da biorremediação através da variação desta relação.

De acordo com Lin (2010), a biorremediação pode ser otimizada com a adição de nitrogênio e fósforo num processo chamado bioestimulação. O fósforo tem sido utilizado pelos micro-organismos em pequenas dosagens, entretanto, de acordo com Fernandes (1994), a adição de pequenas frações faz com que a degradação de petroderivados em água do mar, por exemplo, ocorra mais rapidamente.

2.4 Ecotoxicidade como parâmetro para avaliação da biorremediação

A toxicologia relaciona-se a determinadas substâncias químicas manufaturadas e de outros materiais, antropogênicos ou naturais, causadoras de alterações fisiológicas e bioquímicas aos organismos vivos, que entram em contato direta ou indiretamente com a mesma. A toxicidade seria apenas um sintoma, uma resposta biológica às alterações das condições ambientais iniciais, e é considerada grave quando afeta o ecossistema ou seus componentes, de modo a inibir sua capacidade de regeneração natural (Chapman, 2002). Os principais efeitos adversos dessas substâncias incluem letalidade a curto e longo prazo, e efeitos subletais, como alterações comportamentais, reprodutivas, de crescimento e alimentação (Souza, 2002).

A ecotoxicologia é mais complexa e leva em consideração a toxicologia e a ecologia, pois visa avaliar e determinar os efeitos das substâncias tóxicas de forma qualitativa, os efeitos adversos das substâncias químicas, considerando suas inter-relações no ecossistema além da atuação nos organismos (Chapman, 2002; Azevedo; Chasin, 2003) figura 10.

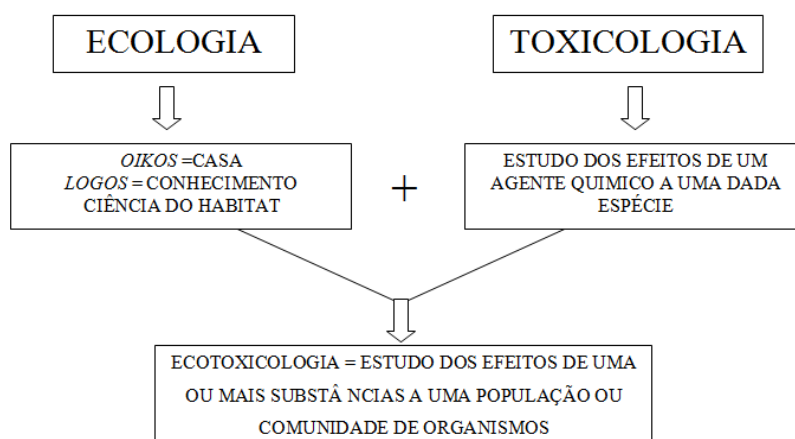


Figura 10. Conceito da ecotoxicologia segundo Blaise, 1984 in Zagatto; Bertoletti (2006).

Segundo Zagatto e Bertoletti (2006), o estudo ecotoxicológico necessita da avaliação dos riscos indiretos provenientes da bioacumulação, biomagnificação e transformações que ocorrem com o poluente, que podem afetar a flora e a fauna incluindo também o homem. As propriedades ecotoxicológicas dos agentes químicos como os hidrocarbonetos, por exemplo, determinam o efeito específico num alvo como órgãos, indivíduos, populações e comunidades. Os parâmetros utilizados para se quantificar os efeitos adversos dos poluentes sobre a biota são variados como número de organismos

vivos ou mortos, taxa de reprodução, comprimento e massa corpórea, presença e quantificação de anomalias ou tumores, alterações fisiológicas, densidade, diversidade de espécies em uma comunidade, entre outros (Zagatto; Bertoletti, 2006).

O estudo sobre os efeitos de poluentes no ecossistema como um todo é extremamente complexo e por vezes, inviável devido a diversos fatores tais como custos, disponibilidade de tempo, extensão das áreas sob impacto e diversidade das espécies envolvidas. Para que se possa estimar os efeitos deletérios de materiais tóxicos sobre o meio ambiente é necessário realizar testes de toxicidade. O índice que expressa a toxicidade aguda (CL50) é um valor estatisticamente obtido que representa a melhor estimativa necessária para ocasionar a morte em 50% dos organismos (Chasin e Azevedo, 2003).

Os testes de toxicidade aguda são ferramentas importantes e confiáveis para estimar as concentrações, nas quais um determinado produto tóxico provoca efeitos deletérios em uma população de organismos previamente selecionada (Capuzzo *et al.*, 1988; EPA, 2002). Estes testes simulam a situação ambiental na qual o organismo é exposto, a manifestação de um efeito é observada em um curto espaço de tempo após administração de uma concentração única e elevada de uma substância. O índice que expressa a toxicidade aguda (CL50) é um valor virtual estatisticamente obtido que representa a melhor estimativa da concentração necessária para provocar letalidade em 50% dos organismos e é, portanto, sempre acompanhada de meios de estimar seu erro. O ensaio de toxicidade aguda permite: estabelecer uma relação entre a concentração de exposição e a intensidade de efeitos adversos observados; calcular a CL50; estabelecer uma comparação da toxicidade de uma substância com outras substâncias na qual a toxicidade é conhecida (Azevedo; Chasin, 2003).

Os critérios para escolha do organismo-teste devem levar em consideração sua representatividade em relação a um determinado grupo de importância ecológica; a facilidade de manutenção em laboratório; sua estabilidade genética (populações uniformes); e sua pertinência como membro de uma família que pertença à cadeia alimentar do homem. Deve se considerar, ainda, o conhecimento sobre o toxicante em termos de suas propriedades físico-químicas: hidrólise, oxidação, estrutura molecular, solubilidade, volatilidade, bem como os fatores biológicos, os quais determinam como agentes potencialmente tóxicos agem no ambiente e como o ambiente atua no agente para que se possa estimar o potencial de exposição dos toxicantes (Rand *et al.*, 1995).

No Brasil a padronização de ensaios ecotoxicológicos foi criada a partir de 1971 com testes realizados por Rocha *et al.*, (1971), descritos no relatório técnico da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo –CETESB. Com o passar do tempo, a Associação Brasileira de Normas Técnicas –ABNT estabeleceu normas relativas a testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos, sendo adotados em todo território nacional como requisito para emissão de resíduos no ambiente.

2.5 O POTENCIAL DOS FUNGOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE LOCAIS IMPACTADOS

2.5.1 Características Gerais dos Fungos

Os fungos são seres eucarióticos quimiorganotróficos, apresentando-se na forma filamentosa (multicelular) ou levedura (unicelular). Eles constituem um grupo bastante diversificado tanto em relação às suas características morfológicas quanto a sua capacidade metabólica (Tavares, 2006)

Fungos filamentosos apresentam seus núcleos dispersos em um micélio que pode ser contínuo ou septado. Não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos e absorvem os nutrientes do ambiente. Possuem caráter sapróbio, podendo ser parasitas facultativos ou biotróficos. Além disso, são bastante heterógenos podendo apresentar diferentes formas estruturais de acordo com o ciclo de vida (Tavares, 2006).

A estrutura vegetativa dos fungos filamentosos apresenta-se constituída por um filamento tubular (hifa), que se origina principalmente a partir de um único esporo reprodutivo. As colônias de fungos filamentosos apresentam-se em forma de rede tridimensional ramificada de hifas conectadas. Estas hifas espalham-se aumentando a área de superfície relativa e facilitam a absorção, segregação e excreção de substâncias. Em culturas submersas, sob agitação, os fungos filamentosos apresentam-se morfolologicamente diferentes formando massas miceliares agregadas de forma esférica ou elipsoidal, denominadas de “*pellets*”. Quando cultivados de modo estático estes espalham-se na superfície estando dispostos horizontalmente (Esposito; Azevedo, 2004).

Em relação ao nível trófico, os fungos são decompositores e desempenham, portanto um papel muito importante na manutenção ambiental. Produzem enzimas intra ou extracelulares, não específicas, e estas os permitem utilizar como fonte de carbono e energia uma ampla gama de substratos inclusive poluentes complexos (Esposito; Azevedo, 2004).

Dentro do grupo dos fungos filamentosos reconhece-se quatro filos: Basidiomycota, são os fungos superiores que produzem enzimas digestivas extracelulares constituídos por hifas septadas, com poros do tipo doliporo, formam corpos frutíferos nas espécies mais evoluídas e basídios e basidiósporos. Assim como os Basidiomycota, os Ascomycota podem apresentar-se na forma de levedura ou micelial. Os Ascomycota apresentam o micélio septado e os poros simples reproduzem-se por gemação, fissão, fragmentação do micélio, formação de clamidósporos, formando na reprodução assexuada ascos e ascósporos. Os Zygomycota compreendem fungos com micélio cenocítico, salvo exceções com micélio septado na base da estrutura reprodutiva. Formam esporangióforos, esporangiosporos, esporângios e conídios. Por fim, tem-se os Chytridiomycota que contém fungos flagelados, apresentando esporângios, eles podem reproduzir-se por copulação planogamética e somatogamia (Esposito; Azevedo, 2004).

Na natureza, os fungos podem ocupar diversos nichos ecológicos: parasitas, sapróbios, alimentando-se de uma grande diversidade de substâncias orgânicas não-vivas e podem ainda estabelecer relações simbióticas como líquens e micorrizas. Independente do modo de nutrição, a condição de absórtrofos dos fungos permite que eles possam absorver os nutrientes necessários para seu crescimento a partir dos substratos disponíveis (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Os fungos mostram um requerimento indispensável de determinados elementos presentes no meio de cultivo, sem os quais não poderiam crescer; são os elementos essenciais. A essencialidade de um elemento pode ser determinada através de dois tipos de enfoque: pela presença do elemento na composição elementar química da biomassa do fungo ou ainda pela avaliação do crescimento do fungo em um meio de composição definida. Os meios de cultivo apresentam em sua composição elementos importantes para o crescimento dos micro-organismos em laboratório. Estes meios podem ser classificados em naturais, de composição qualitativa desconhecida, como os produtos naturais ou seus derivados de origem animal ou vegetal; ou sintéticos onde seus componentes qualitativos e quantitativos são conhecidos e ainda os semi-sintéticos, onde seus componentes são derivados de produtos naturais (Esposito; Azevedo, 2004).

Na composição química dos meios de cultivo, são encontrados macronutrientes, que são necessários em maiores concentrações no meio, e os micronutrientes que são requeridos na faixa mili ou micromolar. Dentre os macronutrientes, os presentes na composição elementar da célula fúngica são: carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio, sendo os elementos mais importantes. O carbono tem uma alta porcentagem na

composição da biomassa o que faz com que seja o macroelemento mais importante quantitativamente em um meio de cultivo. A glicose é a fonte de carbono mais utilizada, pois na natureza é o açúcar mais comum em função de sua participação na composição de celulose, amido e outros açúcares (Putzke J; Putzke M, 2002). No entanto, os fungos são capazes de utilizar os mais diferentes substratos como fonte de carbono, como por exemplo, os hidrocarbonetos do petróleo (Batista-Filho *et al.*, 2003).

O nitrogênio entra principalmente com dois tipos de macromoléculas muito importantes: proteínas e ácidos nucleicos. Existem três formas principais de assimilação do nitrogênio pelos fungos: nitrato, amônia e nitrogênio orgânico (Batista-Filho *et al.*, 2003). Segundo Wainwright, (1988), a capacidade dos fungos em fixar diretamente nitrogênio é nula, estando esta capacidade estrita aos organismos procariontes.

Ainda que o nitrogênio seja requerido para a síntese de proteínas e outros compostos celulares, o carbono é imprescindível como fonte de energia. Um meio ideal deve, portanto, conter 10 vezes mais de carbono que nitrogênio. Uma relação C:N igual ou superior a 10 garantirá um alto conteúdo protéico. Em contrapartida, o excesso da relação C:N irá provocar o acúmulo de álcool e metabólitos secundários.

O oxigênio, além de outros compostos gasosos, pode ser obtido da atmosfera por absorção e o catabolismo produz aproximadamente 12 metabólitos percussores comuns em organismos diferentes, com os quais, por anabolismo sintetizará os compostos essenciais para a produção de biomassa pelo fungo em crescimento (Esposito; Azevedo, 2004).

O hidrogênio, segundo Büyüksönmez *et al.*, (1998), é um dos elementos mais importantes para a sobrevivência dos fungos além de facilitar o processo de biodegradação microbiana em ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

Outros macroelementos que são utilizados para a sobrevivência da célula fúngica são o fósforo e o enxofre. O primeiro pode ser absorvido sob a forma de ânion monovalente, a partir de sais inorgânicos ou de fontes orgânicas. O enxofre, por sua vez, é absorvido pelos fungos na forma de sulfatos, sulfitos e tiosulfatos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

É ampla a gama de nutrientes que são essenciais para um bom funcionamento e reprodução das células fúngicas. Esposito e Azevedo (2004) estabeleceram a relação elemento químico essencial, fonte onde o elemento é encontrado e sua relação com a importância para manutenção das funções metabólicas (tabela 10).

Fungos são indicados para a aplicação em sistemas de biorremediação, pois são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, as quais geralmente limitam o

crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos (induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico), por meio do alongamento e da ramificação das hifas, permite a colonização de grandes áreas, otimizando o contato do micro-organismo com o contaminante, uma vez que aumenta sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, biodegradação (Tavares, 2006).

Tabela 10. Fontes e função metabólica dos principais elementos essenciais para os fungos

Elementos	Fontes	Função Metabólica
Carbono	Compostos orgânicos	Principal constituinte do material celular
Oxigênio	O ₂ , H ₂ O, compostos orgânicos	Principal constituinte do material celular
Hidrogênio	H ₂ , H ₂ O, compostos orgânicos	Principal constituinte do material celular
Nitrogênio	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , compostos orgânicos	Principal constituinte do material celular
Enxofre	SO ₄ ²⁺ , SO ₃ ²⁻ , enxofre orgânico	Constituinte de aminoácidos e vitaminas
Fósforo	HPO ₄ ²⁺	Constituinte de ácidos nucleicos, fosfolípidos e nucleotídeos.
Potássio	K ⁺	Principal íon inorgânico na célula, co-fator de algumas enzimas.
Magnésio	Mg ²⁺	Co-fator de numerosas enzimas
Cálcio	Ca ²⁺	Co-fator de muitas enzimas
Ferro	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Complexos de ferro	Co-fator enzimático
Sódio	Na ⁺	Envolvido em processos de transporte
Cloro	Cl ⁻	Principal ânion inorgânico das células

Fonte: Esposito; Azevedo, 2004.

Em processos de biodegradação é essencial que o período de destoxificação do contaminante pelo fungo ocorra de modo rápido e para que isto ocorra muitos autores relatam que a aclimação exerce grande influência neste processo. Em contato com o poluente, as células microbianas vão exibir uma resposta fisiológica diferente da que estariam habituadas. Este processo desencadeia a produção de metabólitos que podem ser de grande interesse biotecnológico como, por exemplo, a produção de enzimas induzidas como as do sistema lignolítico e os biossurfactantes (Oliveira, 2010). A aclimação fúngica a poluentes pode ser acelerada ou otimizada quando este é capaz de crescer em contato com o petroderivado e utiliza-o como fonte de carbono para produção de biomassa. Maciel et al. (2010) observou produção de biomassa de, pelo menos, 10g/L por espécies de *Penicillium* sp. em contato com até 24% de querosene de aviação.

2.5.1.1 O gênero *Curvularia*

O gênero *Curvularia* foi descrito inicialmente com a espécie *C.lunata* (Wakker) Boedijn. Nele encontram-se espécies da família Dematiaceae que apresentam conidióforos macronematosos, mononematosos, direitos ou flexuosos, frequentemente geniculados e algumas vezes nodosos. Estas espécies apresentam ainda células conidiogênicas politétricas, integradas, terminais e simpodiais, fragmoconídios solitários, acropleurógenos por proliferação subterminal do conidióforo. Este apresenta-se cor oliva a castanho, tem formato elipsóide, cilíndrico, obovóide ou piriforme, com três ou mais septos transversais. Os conídios são muitas vezes desigualmente curvos devido ao alargamento de uma ou duas células centrais, que apresentam septos rígidos e hilo truncado ou protuberante (ELIS, 1971). O gênero é composto atualmente por mais de 40 taxons que se distinguem pela morfologia dos conídios, principalmente número de septos, e das colônias (Zhang-Meng *et al.*, 2004; Chung, 2005).

De acordo com o Banco de Culturas da Associação de Micologia Internacional, existem 108 registros de espécies agrupadas no Gênero *Curvularia*, todas consideradas Dematiáceas devido à coloração escura de hifas e conídios, devido à presença de melanina na parede celular. A ocorrência de melanina têm demonstrado ação antioxidante, neutralização da descarga oxidativa dos neutrófilos nos tecidos do hospedeiros, além de maior resistência à agentes xenobióticos (Mycobank, 2010; Ferreira, 2010).

A variabilidade morfológica observada nos fungos deste gênero permitiu a organização deste em três grupos principais: “geniculata”, com a espécie *C. geniculata* (Tracy e Earle) Boedijn, “lunata”, com a espécie *C.lunata* (Tracy e Earle) Boedijn e “maculans” com a espécie *C.maculans* (Tracy e Earle) Boedijn. A principal diferença entre estas espécies é a forma dos conídios e o número de septos (Corbetta 1964). Nos grupos “lunata” e “maculans” encontram-se espécies com conídios 3-septados e no “geniculata” os conídios 4-septados ou mais. A principal diferença entre as espécies “lunata” e “maculans” é a curvatura mais pronunciada do conídio em *C.lunata*, além do volume maior da célula mediana e da presença de estroma em cultura.

A espécie *Curvularia lunata* apresenta como sinonímia [*Helminthosporium curvulum*](#) Sacc. 1916 [LEG; MB152356]. A morfologia da colônia é caracterizada pela expansão da colônia de cor preta e micélio, quando presente, possui coloração esbranquiçada. A microscopia óptica revela conidióforos eretos, ramificados septados e com uma leve flexão na região apical (Figura 11). São visualizadas ainda cicatrizes marrom escuras. Os conídios apresentam paredes lisas verde-escuro a marrom. Conídios obovoidais clavados e curvados, podendo atingir as dimensões de 21-31 x 8,5-12µm

(Mycobank, 2010). A fase teleomórfica só é visualizada em laboratório: *Cochliobolus lunatus* (Nelson & Haasis) (Ascomicota, Euascomiceto, Pleosporales e Pleosporaceae). Duas variações da espécie *C. lunata* foram relatadas: var. *aeria*, isolada do ar em Recife, Pernambuco, Brasil e var. *lunata*, isolada do solo na forma de esclerócios em diversos países da região tropical (Mycobank, 2010).

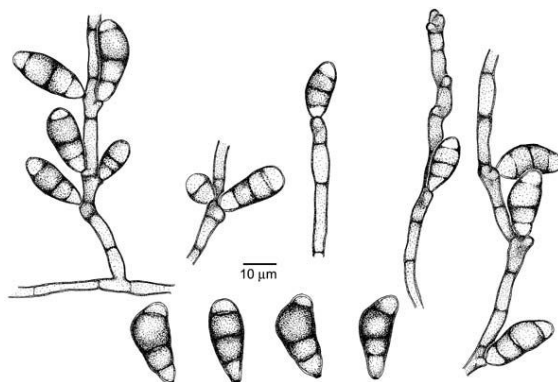


Figura 11. Representação esquemática do aspecto morfológico das estruturas reprodutivas microscópicas de espécies do gênero *Curvularia lunata*. Fonte: Mycobank, 2010.

Os fungos do gênero *Curvularia* são saprofitas do solo, amplamente espalhados pelo mundo e encontrados normalmente em ambientes despoluídos, entretanto existem relatos da presença de espécies de *Curvularia* em ambientes impactados por metais pesados e por petroderivados (Paraszkiewicz *et al.*, 2009). Além disso, espécies de *Curvularia* têm sido isolados de diversas partes de vegetais superiores sendo considerados endofíticos. Quando capazes de sobreviver ao sistema de defesa vegetal são considerados fitopatogênicos (Mycobank, 2010). Estes micro-organismos podem ter seu potencial direcionado para a produção de metabólitos secundários visando a inibição de agentes patogênicos, anti-helmínticos e inseticidas de grande importância agrícola (Ferreira, 2010). É crescente o número de relatos na literatura a respeito dos metabólitos produzidos pelas espécies do gênero *Curvularia* e que são de grande interesse industrial e biotecnológico.

2.5.2 Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos

Enzimas são proteínas globulares que vão atuar como catalizadoras de reações bioquímicas ao nível celular. Estas apresentam em sua estrutura cadeias de centenas de aminoácidos dispostos em uma complexa estrutura tri-dimensional que facilita sua ação.

Uma única molécula de enzima é capaz de converter muitas moléculas de substrato durante o seu tempo de vida, a essa capacidade, denomina-se atividade enzimática. De acordo com a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) as enzimas são classificadas de acordo com o número “EC” que as classifica através de sua classe e com a reação que catalisa (Tavares, 2006).

A diversidade de enzimas microbianas úteis é quase sem limite e pode trazer um futuro bastante promissor. O desenvolvimento dos métodos de fermentação para produção de enzimas por micro-organismos não tem assegurado um suprimento potencialmente ilimitado, mas tornou possível a gênese de novos sistemas enzimáticos que não puderam ser obtidos das fontes animais e vegetais. As enzimas são amplamente utilizadas na indústria, como por exemplo, as amilases na produção de xaropes a partir do amido de milho, na produção de papéis (um revestimento para lisura) e na produção de glicoses de amido. Os fungos eram utilizados como parte de um processo básico para o preparado enzimático conhecido como koji (fluorescência do mofo) usado na fermentação de produtos a base de soja (Moreira Neto, 2006).

O grande desenvolvimento dos processos biotecnológicos aumentou significativamente a importância das enzimas de origem microbiana, onde em vários casos substituem as de origem animal e vegetal apresentando vantagens como o curto tempo de produção, a contínua produção independente da época do ano, o processo fermentativo não demanda muito espaço e a possível utilização de substratos de baixo custo (Maldonado, 2002).

Dentro do grupo dos fungos degradadores de polímeros complexos, temos os lignolíticos e os não lignolíticos. Muitas das transformações realizadas pelos fungos, inclusive a degradação de poluentes, são realizadas pelo sistema enzimático intracelular citocromo P-450 monoxigenase. Os produtos dessas enzimas são solúveis em água e menos tóxicos, levando por isso à destoxificação (Van Den Brink *et al.*, 1998).

O fungo não lignolítico mais estudado quanto à capacidade degradadora de macromoléculas é *Cunninghamella elegans*. Existem muitos estudos que comprovam sua versatilidade fisiológica para degradar diferentes poluentes como o petróleo e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Cerniglia, 1997). Assim como em seres humanos, o citocromo P450 realiza a monoxigenação inicial do fenantreno em óxidos arenos (epóxidos), que, através das enzimas epóxido hidrolases, são transformados em trans-diidrodióis, ou um dos anéis pode ser rearranjado não-enzimaticamente a fenol e ser conjugado, originando compostos como o-glicosídeos e o-glicoronídeos. Os trans-

diidrodióis são transformados por desidratação em fenantróis, que podem então ser convertidos em 9-fenantril-beta-Dglicopiranosídeo, que se acredita ser um dos produtos finais da via de degradação dos fungos não-lignolíticos (Biocatalysis/Biodegradation, 2005).

Além do sistema citocromo P-450 monoxigenase, os fungos utilizam enzimas extracelulares lignolíticas, que conferem uma maior tolerância aos poluentes em concentrações que seriam tóxicas para outros organismos. A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias à degradação de material lignocelulósicos pertence aos grupos *Basidiomycota*, *Ascomycota* e alguns *Deuteromycota*.

Vários parâmetros de cultivo afetam a produção e a atividade das enzimas lignolíticas por fungos: disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura (Van Der Merwe, 2002).

O sistema enzimático fenoloxidase, está amplamente distribuído entre os seres vivos, neste sistema estão as maiores famílias de enzimas fúngicas ligninolíticas como lacases, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP (D'Souza *et al.*, 1999). Os micro-organismos mais estudados como biodegradadores de lignina na natureza são os fungos da podridão branca, pertencentes aos basidiomicetos e o mais estudado no que se refere à degradação de poluentes de um modo geral, é o *Phanerochaete chrysosporium* (tabela 11).

A maioria produz fenoloxidasas extracelulares com importante papel na degradação da lignina. Estas enzimas são utilizadas principalmente na indústria de biopolpação da madeira, aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para ração animal, degradação de xenobióticos e biorremediação (Valmaseda *et al.*, 1990; Matheus, Okino, 1998; D'Souza *et al.*, 1999).

O sistema de ação da degradação microbiana por fungos lignolíticos tem sido amplamente estudado e a respeito da estrutura irregular da lignina, os fungos filamentosos podem produzir enzimas extracelulares que apresentam pouca especificidade. Isto faz com que eles sejam capazes de biodegradar compostos diferentes. Experimentos com estas enzimas purificadas provaram que são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como HPA, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação das enzimas extracelulares (Cajthaml *et al.*, 2001; Clemente; Durrant, 2002; Bonugli-Santos *et al.*, 2010).

Tabela 11. Fungos envolvidos na recuperação de ambientes contaminados por diferentes poluentes.

Poluentes	Principais micro-organismos	Referências
Metais	<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporium</i> , <i>Trichoderma polysporium</i> , <i>Scytalidium thermophyllum</i> e <i>Penicillium miczynski</i>	Barclay <i>et al.</i> , (1998).
Pesticidas e organoclorados (Pentaclorofenol – PCP)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Esposito; Azevedo (2004)
Plásticos (Polietileno e poliestireno)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Esposito; Azevedo (2004)
Explosivos (TNT)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Cladosporium resinae</i> e <i>Cunninghamella echinulata</i> var. <i>elegans</i> .	Bayman; Radkar (1997).
Hidrocarbonetos	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Cephalosporium acremonium</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Torulopsis</i> sp., <i>Rhodotorula</i> sp., <i>Sporobolomyces</i> sp., <i>Beauveria bassiana</i> , <i>chrysosporium</i> sp., <i>Mortiella</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp.	Cerniglia; Perry (1973);
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPA)	<i>Penicillium janthinellum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida rugosa</i> , <i>Rhodotorula munita</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>Irpex lactus</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Torulopsis</i> sp., <i>Sporobolomyces</i> sp., <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Chrysosporium</i> sp., <i>Mortiella</i> sp.; <i>Penicillium</i> spp.; <i>Aspergillus</i> sp.	Sack <i>et al.</i> , (1997); Chaîneau <i>et al.</i> , (1999) Boonchan <i>et al.</i> , (2000).

Fonte: Esposito; Azevedo (2004).

A degradação destes compostos pelas enzimas degradadoras da lignina ocorrem pelo fato delas não serem substrato-específicas. Dessa forma elas podem oxidar outros compostos com estruturas aromáticas similares à da lignina como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos orgânicos clorados, substratos sintéticos e polímeros (Winquist *et al.*, 2008).

Alguns fungos têm a capacidade de metabolizar hidrocarbonetos do petróleo. Um dos primeiros estudos de biorremediação por fungos relatou que os gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium* e *Cunninghamella* isolados de ambiente estuarino, foram capazes de utilizar exclusivamente petróleo como fonte de carbono e energia (Cerniglia; Perry, 1973). Em outros estudos, vários fungos filamentosos e leveduras, apresentaram capacidade de utilizar petróleo e seus derivados para a produção de biomassa. De solo contaminado por petróleo e/ou seus derivados, por exemplo, foram isoladas espécies de leveduras como *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Torulopsis* e de fungos filamentosos *Aspergillus*, *Beauveria bassiana*, *Chrysosporium*, *Mortiella* e *Penicillium* (Chaîneau *et al.*, 1999).

Segundo Soriano *et al.*, (2007), a biodegradação de alcanos por micro-organismos ocorre em etapas sucessivas de oxidação promovidas por enzimas do tipo monoxigenase e desoxigenase. Inicialmente pela ação das enzimas formam-se alcoóis, que logo são oxidados a aldeídos e em seguida a ácidos graxos que são oxidados novamente a propionato e acetato. O principal fator que vai variar nesse processo configurando um tempo maior é a capacidade dos micro-organismos de biodegradar cadeias de tamanhos diferentes.

Para degradação das frações aromáticas, é requerido um aparato enzimático mais complexo, pois precisa haver a quebra do anel aromático para que as cadeias fiquem disponíveis em seguida. As enzimas envolvidas são as dioxigenases que catalizam reações de dihidroxilação resultando em um *cis*-diidrodiol, após nova oxidação há a formação de catecóis, que sofrendo ação enzimática novamente ocasiona a ruptura do anel aromático (Rosenberg *et al.*, 1992; Soriano *et al.*, 2007).

As enzimas extracelulares microbianas lignolíticas são um meio efetivo de degradação de poluentes, sendo relatadas na literatura principalmente a produção por basidiomicetos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus* e espécies do gênero *Pleurotus* (Balan, 2001; Kamida et al., 2005; Machado et al., 2006; Jacques et al., 2007).

A importância de enzimas lignolíticas extracelulares está no seu caráter não específico, que confere a degradação de uma variedade de compostos poluentes como fenóis, pesticidas, explosivos (Ferreira, 2009).

2.5.2.1 Manganês Peroxidase (MnP) e aplicações

A MnP é uma enzima extracelular glicosilada, do tipo glicoproteína com ferro protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de peróxido de hidrogênio para sua atividade. A oxidação da lignina depende diretamente da disponibilidade de íons manganês (Fasanella, 2008).

O processo de degradação por esta enzima tem início com ligação de peróxido de hidrogênio com o ferro nativo da enzima (complexo ferro-peróxido). Em seguida, ocorre a ruptura da ligação O-O do peróxido, que necessita da transferência de dois elétrons do grupo heme da enzima. Esta quebra resulta na formação do radical Fe^{4+} -oxo porfirina (MnP-I). A quebra da ligação entre os oxigênios do peróxido libera uma molécula de água. Em seguida ocorre uma redução formando MnP-II (Fe^{4+} -oxo porfirina não radicalar. Um elétron é doado (Mn^{2+}) a este complexo intermediário e ocorre a oxidação à Mn^{3+} e há

novamente a liberação de uma molécula de água. Esta nova molécula formada é estabilizada por ácidos orgânicos e age como um agente oxi redutor difuso que ataca as moléculas orgânicas inespecificamente subtraindo um elétron (Gold; Alic, 1993; Fasanella, 2008).

A utilização de fungos no tratamento dos mais diversos tipos de resíduos tem sido alvo de inúmeros estudos, especialmente por sua capacidade de produzir enzimas extracelulares tais como a manganês peroxidase (MnP). Esta enzima atua sob compostos poluentes recalcitrantes, removendo-os ou transformando-os em outros produtos menos tóxicos (Karam; Nicel, 1997; Silva; Esposito; Azevedo, 2004). Está entre as enzimas mais comuns que apresentam o maior potencial para aplicações industriais. Nestas enzimas faltam à especificidade pelo substrato e, com isso, são capazes de degradar uma ampla faixa de xenobióticos incluindo efluentes corados (De Souza; Peralta, 2003).

MnP é uma enzima bastante produzida pelos fungos ligninolíticos, agindo conjuntamente com LiP, com a LaC ou com ambas na biodegradação da lignina ou de compostos relacionados a ela (Raghukumar *et al.* 2001). No entanto, há relatos de espécies fúngicas em que a MnP não é detectada mesmo sob condições de cultivo ligninolíticos (Souza *et al.* 2008).

Dentre os fungos produtores de MnP pode-se citar *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Ceriporopsis subvermispora*, *Nematoloma frowardii*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Bjerkandera adusta* (Coelho, 2007).

Segundo Fasanella (2008), descobertas recentes a respeito do papel da MnP na degradação, permite a adoção dos conceitos de Kirk e Farrell (1987), em que a degradação da lignina constitui um processo de combustão enzimática extracelular. Este conceito tem sido adotado para facilitar a descrição da despolimerização de lignina de alta massa molecular pela atuação inespecífica de enzimas lignolíticas. Existe um registro de patente para a utilização desta enzima produzida por *Pleurotus sajor-caju* com aplicação industrial e/ou ambiental na remoção de fenóis potencialmente tóxicos, sob o número de patente: PI0702645-5A2 (Patentes on line, 2010).

2.5.2.2 Lignina Peroxidase (LiP) e aplicações

Depois da celulose, a lignina é o segundo biopolímero terrestre mais abundante, sendo encontrado como parte integrante da parede celular de vegetais, emaranhada em uma matriz de celulose e hemicelulose. A lignina é uma glicoproteína que apresenta em sua estrutura anéis aromáticos (figura 12). Contém ferro-protoporfirina IX (heme) como grupo

prosteico e necessita assim como MnP, de peróxido de hidrogênio para realizar sua atividade catalítica (Esposito; Azevedo, 2004).

A enzima MnP oxida a lignina e outros compostos derivados da mesma, assim como a enzima LiP, que também oxida compostos não fenólicos por retirada de elétron de um núcleo aromático, criando um radical instável que passa por numerosas transformações levando à decomposição do substrato. O álcool veratrílico é o redutor preferido pela enzima LiP, sendo produzido pelo fungo após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool a veratrílico, reação esta comum em ensaios de atividade da LiP (Melo; Azevedo, 1997).

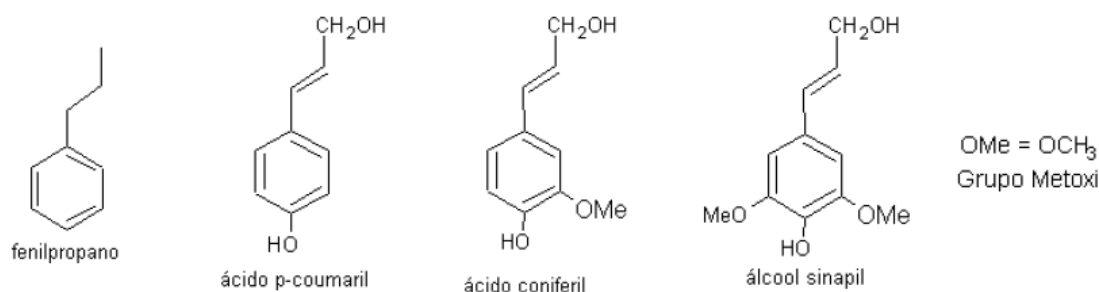


Figura 12. Unidade de fenilpropano e monômeros da lignina, onde é possível visualizar os anéis aromáticos de sua estrutura. Fonte: Aguiar-Filho, 2008.

A biosíntese da lignina é um campo de pesquisa bastante promissor principalmente devido à sua relevância econômica (Aguiar-Filho, 2008). O uso de enzimas tem sido explorado, pelo ser humano há milhares de anos, e hoje é considerado um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração pode ser de forma direta através de preparações enzimáticas brutas animal e vegetal, ou indiretamente pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (Neidleman, 1991 apud Colen, 2006)

As enzimas microbianas produzidas comercialmente são provenientes de bactérias e fungos (filamentosos e leveduras), sendo a sua maioria extracelular, da classe das hidrolases. A diversidade das enzimas microbianas é enorme, tendo aumentado a cada dia, devido à descoberta de novas enzimas e novas aplicações (Jaeger; Reetz, 1998).

A LiP é uma glicoproteína hémica que catalisa uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos, hidratos de carbono aromáticos e outros compostos mais resistentes ao ataque microbiano. Estas enzimas precisam de peróxido de hidrogênio como

cofator e a reação enzimática ocorre através da oxidação de elétrons seguida de reações não enzimáticas. As ligninases têm sido consideradas como uma promissora alternativa biotecnológica para a remoção de compostos tóxicos do ambiente. Um dos principais exemplos tem sido na indústria têxtil, onde existe um vasto consumo de água e componentes químicos durante o processo de tingimento, o que resulta em efluentes altamente complexos e recalcitrantes. Algumas classes de corantes que são considerados carcinogênicos e ou mutagênicos, além de que hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) são compostos que podem ser degradados pelas enzimas LiP e a Manganês Peroxidase (Kunz *et al.*, 2002).

Dentre os micro-organismos degradadores de lignina, observa-se destaque para algumas espécies que atuam na degradação de madeira, sendo chamados fungos de degradação branca, marrom e mole (tabela 12).

Tabela 12. Principais organismos degradadores da lignina.

Organismo	Filos	Degradação da Lignina	Ambiente	Gêneros
Fungo da degradação branca	Basidiomycota e Ascomycota	Mineralização, deslignificação seletiva e não-seletiva	Parte mais rígida da madeira	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> <i>Trametes</i>
Fungo da degradação marrom	Basidiomycota	Modificação da lignina	Parte mais macia da madeira	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungo da degradação mole	Ascomycota e Deteromycota	Degradação limitada da lignina	Madeira com químicos,	<i>Chaetomium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Paecilomyces</i>

Fonte: Esposito, Azevedo, 2004-adaptado.

A lignina peroxidase tem sido utilizada na deslignificação de material lignocelulósicos para a industrial de polpa a papel, sob número de patente: PI9002953-4 (Patentes on line, 2010).

3.5.2.1 Lacase (Lac) e aplicações

As LaCs são enzimas do tipo fenoloxidasas produzidas por fungos, plantas superiores, insetos e bactérias (Claus, 2004). Estas enzimas pertencem segundo Fasanella (2008) à família de proteínas globulares multi-cobres que incluem ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases e contém entre 10 e 25% de carboidrato *n*-ligado, podendo ainda apresentar estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, dependendo da espécie ou da isoforma.

Lacases catalizam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas que atuam nas reações não catalíticas como o acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Estas reações geram a polimerização, quebra alqui-arílicas e desmetilações (Ferreira, 2009).

As LaCs participam de eventos lignolíticos de grande importância, que primeiramente foram atribuídos a outras enzimas do sistema lignolítico. Esses eventos são: oxidação de unidades não-fenólicas de lignina, geração de peróxido de hidrogênio, formação de radicais hidroxilas e produção de Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} (Gonzales *et al.*, 2002).

Capazes de catalizar diferentes substratos de fenóis a compostos aromáticos, as LaCs fúngicas têm tido destaque na aplicação na indústria de deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras de madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos e medicinais e remediação de solos e águas contaminadas, além da utilização na descontaminação de efluentes de celulose e petroquímicos, na biodegradação de pesticidas e compostos fenólicos e em biosensores de nanopartículas, (Fasanella, 2008; Couto; Herrera, 2006; Durán *et al.*, 2000).

Além da degradação dos compostos supracitados, acredita-se que as LaCs produzidas por fungos, influenciam na esporulação, produção de pigmentos além de estarem relacionadas com a defesa de plantas contra patógenos. Em muitas espécies de fungos, a presença de LaCs, indutivas ou constitutivas, têm sido descrita como originadas no citoplasma, mas muitos exemplos de secreção desta enzima têm sido descritos, apesar da pouca atenção dada à localização sub-celular desta enzima e ao mecanismo de secreção (Ferreira, 2009).

A produção de LaC é mediada por diversos genes, havendo vários tipos de LaC, que vão depender dos compostos aromáticos como toluidina, ácido vanílico, ácido *p*-hidrobenzóico e anilina. Fungos lignolíticos codificam isoenzimas da LaC com alta similaridade na estrutura primária, mas com diferentes características físico-químicas e a produção de algumas das LaCs sofre influência da adição de $CuSO_4$. A atividade de LaCs *in vivo* ou através da utilização de enzimas purificadas é determinada por testes espectrofotométricos, utilizando substratos fenólicos ou não fenólicos, seguido do monitoramento da coloração dos produtos de oxidação. A maioria dos testes utiliza guaiacol, 2,6-dimetoxifenol, siringaldazina ou o ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico). A principal vantagem do ABTS é que pode ser

oxidado por reações não-enzimáticas e promove a oxidação de modelos de lignina não fenólicos (Fasanella, 2008).

A lacase produzida por *Coriolus versicolor* tem sido utilizada comercialmente sob número de patente: PI9206013-7 para o descoloramento enzimático do papel, para o tratamento de águas residuais de fabricação de papel e de fabricação de celulose (Patentes on line, 2010). São necessários muitos estudos com a LaC, principalmente produzida por uma variedade maior de micro-organismos, para que se entenda sua importância fisiológica e se amplie o seu potencial de aplicação em processos biotecnológicos (Claus, 2004).

2.5.3 Produção de Biossurfactantes

Os surfactantes são compostos com propriedades tenso-ativas capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, formando microemulsões com os hidrocarbonetos. Esta classe de compostos se caracteriza por apresentar moléculas anfipáticas constituídas por porções hidrofóbicas e hidrofílicas com diferentes graus de polaridade (Desai; Bannat, 1997). A porção hidrofóbica é formada por uma cadeia de hidrocarbonetos de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica que é constituída por um grupo éster, hidroxí, fosfato, carboidrato, carboxilato, aminoácido ou álcool de lipídeos neutros (Desai; Banat, 1997; Cameotra *et al.*, 1998; Bognolo, 1999; Nitschke; Pastore 2002; Mulligan *et al.*, 2001). Segundo Desai e Banat (1997), as moléculas anfipáticas se localizam preferencialmente na interface entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade. Elas reduzem a tensão superficial e interfacial e ainda formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água ou a própria água pode solubilizar hidrocarbonetos (Cunha *et al.*, 2004).

São utilizados para emulsificação de substâncias oleosas, detergentes, solubilização e umidificação. O mercado mundial dos surfactantes corresponde a gastos em torno de US\$ 9,4 bilhões por ano e a demanda tem aumentado cerca de 35% ao ano (Kim *et al.*, 2000).

Os surfactantes químicos são obtidos por síntese química a partir de derivados do petróleo. Foram muito utilizados na indústria petrolífera para auxiliar na limpeza de tanques, na recuperação de petroderivados nos reservatórios e nos derramamentos de óleos causados por diversos desastres ecológicos. Entretanto, sua aplicação e utilização podem

causar impacto ambiental, e inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas na busca de surfactantes naturais, como alternativa aos produtos sintéticos (Desai; Banat, 1997).

Os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza do seu grupamento polar (Desai; Banat, 1997). Segundo Mulligan (2001), estes compostos apresentam baixa toxicidade para o homem, mas são altamente tóxicos para os animais e plantas. Além disso, características como lenta degradação e incompatibilidade no ambiente fizeram com que fossem substituídos pelos surfactantes naturais ou biossurfactantes (Nitschke; Pastore 2002; Rahman *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002).

Os biossurfactantes são produtos do metabolismo secundário de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A função fisiológica exata dos biossurfactantes ainda não foi totalmente esclarecida, no entanto, algumas funções têm sido atribuídas a esses compostos como emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água facilitando o crescimento de micro-organismos em substratos hidrofóbicos, aderência ou liberação da célula devido à necessidade dos micro-organismos em aderir ou se desligar a um substrato de acordo com sua exigência e disponibilidade nutricional, e a atividade antibiótica demonstrada por vários biossurfactantes principalmente os da classe lipopeptideo e glicopeptideo. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os micro-organismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (Rosenberg; Ron, 1999; Nitschke; Pastore, 2002).

Os surfactantes biológicos apresentam propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos, tendo como característica principal, a capacidade de formar lamelas, vesículas e principalmente micelas (Figura 13). As micelas são definidas como agregados moleculares com regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que espontaneamente se associam em meio aquoso a partir de uma determinada concentração (Concentração Micelar Crítica - CMC). Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma monomérica. Desta forma, a intensidade de adsorção do biossurfactante à superfície depende de sua concentração, ocasionando uma variação na ordenação destas moléculas sobre a superfície. Em concentrações muito baixas de biossurfactantes, o mesmo se distribui na superfície e tende a se orientar paralelamente a esta. Quando ocorre um aumento da concentração de biossurfactante, observa-se uma diminuição da área disponível para as moléculas iniciando o processo de ordenação das mesmas à superfície (Santos *et.al.*, 2007).

Eles acumulam-se em interfaces com diferentes polaridades: água/óleo, ar/água e água/sólido, agindo como agentes umectantes. O processo dinâmico que ocorre baseia-se

na redução da tensão superficial que ocorre através do rearranjo molecular através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando dessa forma as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial e com isso promovendo a biodisponibilidade e a biodegradabilidade do composto oleoso (Barathi; Vasudevan, 2001; Champion *et al.*, 1995).

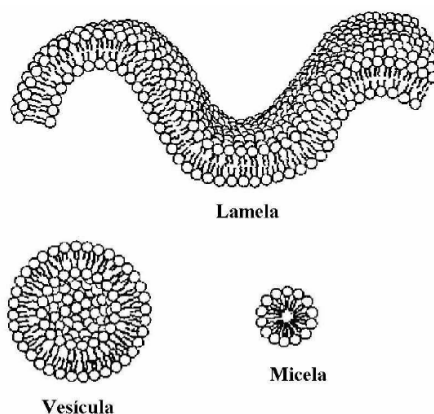


Figura 13. Representação esquemática das principais estruturas formadas por biossurfactantes. Fonte: Champion *et al.*, 1995.

A tensão superficial é a força de atração entre moléculas dos líquidos e diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, havendo formação de micelas. A concentração destas micelas forma a Concentração Micelar Crítica-CMC, que corresponde á mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Rufino, 2006).

A determinação da tensão superficial é uma análise que permite avaliar a produção de tensoativos através da medida da redução da tensão superficial em relação a tensão superficial da água (70mN/m). Quando um micro-organismo promove a redução da tensão superficial da água para valores entre 35mN/m e 40mN/m, este é considerado promissor na produção de biossurfactantes e quando esta fica abaixo de 35mN/m, indica um eficiente produtor (Silva, 2002).

De acordo com Lima *et. al.* (2007), os biossurfactantes podem apresentar baixo pesos molecular sendo neste caso considerados eficientes na redução da tensão superficial ou podem ter alto peso molecular, apresentando maior eficiência em estabilizar emulsões entre líquidos com diferentes graus de polaridade.

Os biossurfactantes são compostos biodegradáveis e baixa toxicidade, o que tem levado ao desenvolvimento de várias pesquisas na busca de surfactantes naturais, como alternativa aos produtos sintéticos visando principalmente na recuperação de ambientes

contaminados por óleos (Lin *et al.*, 1996; Desai; Banat, 1997; Ron; Rosenberg, 2002). As diferenças entre surfactantes químicos e biossurfactantes estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13. Diferenças entre surfactantes químicos e biossurfactantes.

Surfactantes Químicos	Biossurfactantes	Referências
Não resiste a alterações no ambiente	Atua em pH, Temperatura e salinidades variadas.	Bognolo, 1999.
Elevada instabilidade	Elevada Estabilidade	Ron e Rosenberg, 2002.
Incompatível com o meio ambiente	Compatível com o meio ambiente	Banat et al., 2000.
Elevada toxicidade	Não são tóxicos	Banat et al., 2000.
Lenta degradação no ambiente	Biodegradáveis	Banat et al., 2000.
Reduzida seletividade Não há ampla diversidade	Seletividade, Especificidade e Ampla diversidade	Banat et al., 2000.
Produção em larga escala Com alto custo	Produção em larga escala com baixo custo	Rahman et al., 2002.

As principais propriedades dos biossurfactantes são sua versatilidade. Eles podem ser iônicos ou não-iônicos. Dentre os surfactantes iônicos utilizados comercialmente destacam-se os ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônicos). Além disso, apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial devido à formação de um filme molecular e formam macro e micro emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou água em hidrocarbonetos. Estas emulsões consistem na formação duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade ocorrendo a dispersão de um líquido em outro. Os biossurfactantes ainda proporcionam formação de micelas onde, em solução as moléculas de surfactantes tendem a se agregar umas com as outras, implicando na redução da tensão superficial até atingir a Concentração Micelar Crítica (CMC). Por fim, alguns biossurfactantes apresentam propriedades antimicrobianas, resultando na destruição de micro-organismos pela lise de suas membranas celulares. No microambiente, esta propriedade é importante para evitar competição com outros micro-organismos por nutrientes (Lima *et al.*, 2007).

Uma grande variedade de micro-organismos é capaz de produzir biossurfactantes, e o seu tipo, a quantidade e a qualidade vão depender da genética do micro-organismo, da natureza do substrato, das concentrações dos íons (Fe^+ , O_2 , Mg, N, P) nos meios de cultivo e ainda das condições de cultivo, uma vez que, na maioria das vezes estes micro-

organismos são anaeróbios (Nitschke; Pastore 2000; Mulligan *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2002; Bento, 2005) (Tabela 14).

Tabela 14. Diversidade de Biossurfactantes e os micro-organismos produtores.

Tipo de Biossurfactante	Micro-organismo produtor
Glicolipídeos: Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e Lipoproteínas:	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos Graxos, Lipídios neutros e Fosfolipídios:	
Ácidos Graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos:	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Cândida lipolytica</i>
Carboidrato-Lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-Lipídio-proteína	<i>Cândida tropicalis</i>
Surfactantes Particulados:	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: Nitschke; Pastore, 2002.

Os principais tipos de biossurfactantes podem ser divididos em glicolipídios, fosfolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros. Os glicolipídios em geral estão envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por micro-organismos. Os fosfolipídios estão presentes em todos os micro-organismos sendo produzidos na maioria dos casos intracelularmente. Dentre os lipopeptídios, a surfactina é o biossurfactante mais utilizado e dentre os ácidos graxos e os lipídios neutros, os principais são ácido ustilágico, ácido corinomicólicos, ácidos lipoteicóico e proteínas hidrofóbicas (Mulligan *et al.*, 2001), tabela 14.

A produção de biossurfactante pelos diversos micro-organismos está relacionada com o pH e a temperatura do meio de cultivo, com a composição dos nutrientes e com a natureza do substrato que pode ser, por exemplo constituída por hidrocarbonetos. Dessa forma, os micro-organismos vão utilizar os compostos insolúveis como hidrocarbonetos em meio aquoso, impedindo que ocorra a sua oxidação e assimilação (Colla; Costa, 2003).

A vida microbiana sofre influência direta do processo interfacial, sendo mais freqüente nas interfaces como nos biofilmes microbianos, nos filmes de superfície e nos agregados. A produção dos biossurfactantes consiste no mecanismo pelo qual os fungos lidam com os desafios interfaciais como o transporte de nutrientes, excretas e moléculas sinalizadoras, além dos processos de patogênese. Em presença de compostos oleosos, os biossurfactantes produzidos pelos fungos vão auxiliá-los na mobilidade e comunicação celular, no acesso aos nutrientes, na competição célula-célula e na proteção contra a patogênese. Desde já está consolidado na literatura que os biossurfactantes facilitam muitas funções celulares, bioquímicas e fisiológicas (Peixoto, 2008).

A compreensão dos biossurfactantes produzidos por fungos é mais limitada, quando em comparação com os biossurfactantes bacterianos. Isto ocorre, principalmente, pelo fato dos estudos que envolvem esses compostos, serem desenvolvidos com um pequeno número de biossurfactantes já caracterizados, aliado a falta de esforços em bioprospecção de novos biossurfactantes e de micro-organismos produtores desses (Peixoto, 2008).

A literatura aponta uma grande diversidade de fontes de carbono que podem exercer influência na produção de biossurfactante por diferentes cepas de micro-organismos. Meio de cultura contendo *n*-alcano é favorável para a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*, porem quando cultivada em meio contendo glicose esta levedura não produz nenhum biossurfactante (Pareilleux, 1979). Estudos utilizando substratos solúveis como glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool revelaram baixa biossíntese de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, entretanto esta produção foi otimizada em meios contendo óleo cru e alcanos (C10-C18) (Zinjarde e Pant, 2002). Já Sarubbo et al., (2001) obteve produção de um importante bioemulsificante produzido por *C.lipolytica* IA 1055 utilizando glicose como substrato. Em decorrência destes dados, é sabido que a produção de biossurfactantes ocorre na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, porém as maiores produções são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (Hommel et al., 1994).

A utilização de substratos hidrofóbicos por parte dos microrganismos é quase que exclusiva para produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante. O estudo do metabolismo microbiano na produção de biossurfactante depende diretamente da natureza da fonte de carbono. Quando o hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono o metabolismo microbiano é direcionado para a via lipolítica e à formação de glicose, podendo, ainda produzir ácidos graxos ou sacarídeos (Weber et al., 1992).

A síntese microbiana de biossurfactante em presença de compostos hidrofílicos é influenciada diretamente pelo comprimento da cadeia do *n*-alcano utilizado como fonte de carbono. A produção de biossurfactante por *Candida antarctica* é otimizada quando esta encontra-se em meio contendo *n*-alcanos de C12 a C18, não havendo produção deste em presença de *n*-alcanos de C1 a C11 e nem carbono maiores que 19 (Kitamoto et al. 2001).

O nitrogênio também constitui um elemento essencial para o crescimento celular, sendo de grande importância para a síntese de proteínas e enzimas. Para a produção de biossurfactantes são utilizadas várias fontes de nitrogênio como licor de milho, milhocina, uréia, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, dentre outros (Bednarski et al., 2004; Santana et al., 2005; Thanomsub et al., 2004; Vance-Harrop et al., 2003).

As fontes de nitrogênio cloreto de amônio, nitrato de amônio e extrato de levedura foram eficientes para a produção de biossurfactante por *T. bombicola* em frascos agitados, enquanto que o nitrato não favoreceu a produção devido a baixa produção de biomassa (Coopper e Paddock, 1984).

As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas são fatores que influenciam diretamente nas características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos, assim como pela presença de microelementos como fósforo, ferro, manganês, cobre e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (Banat, 1995). Para obtenção de grande quantidade de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo.

A espécie *C. lunata*, é descrita como capaz de crescer em substratos contendo compostos oleosos e esta habilidade já foi comprovada pela produção de enzimas lignolíticas e de agentes tensativos, entretanto este ainda não foi caracterizado (Maciel et al., 2011; Maciel, 2008; Paraszkievicz et al., 2002).

2.5.3.1 Aplicações dos biossurfactantes

A aplicabilidade dos biossurfactantes relaciona-se com suas propriedades funcionais como emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, desemulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial (Mulligan et al., 2001).

A principal aplicação dos biossurfactantes é na indústria petrolífera, pois estes compostos aumentam a solubilidade dos componentes do petróleo e dessa forma, são utilizados para a remoção das frações pesadas de óleos de difícil remoção e que se formam nos tanques de combustível. Além disso, é grande a preocupação com o destino das águas de lavagem e a perda econômica agregada, sendo utilizadas emulsões concentradas de óleo em água através de biossurfactantes, com posterior bombeamento e quebra da emulsão formada, seguida do recolhimento do óleo. Dentre os bioemulsificantes mais utilizados, destaca-se o “emulsan” produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* (Bognolo, 1999).

Os biossurfactantes podem ser utilizados ainda no preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e na dispersão de óleos em tratamentos de ecossistemas aquáticos (Lima, 1996). No Alaska o petroleiro *Exxon Valdez* contaminou toda a costa pelo derramamento de óleo e para limpeza de cascalhos impregnados pelo óleo, utilizou-se o biossurfactante raminolipídico (glicolipídio) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* SB30. Houve melhoria quantitativa na remoção e baixa toxicidade do biossurfactante à biota (Harvey *et al.*, 1990).

A recuperação terciária de petróleo consiste em um método promissor de aplicabilidade dos biossurfactantes, pois eles são injetados em água ou vapor nos poços petrolíferos não produtores de petróleo e promovem a possibilidade de remoção do óleo de difícil remoção. A recuperação melhorada de petróleo (RMP) também é uma alternativa promissora, pois a microbiota do reservatório petrolífero é estimulada a produzir biossurfactantes e polímeros que vão auxiliar na redução da tensão interfacial óleo-rocha, facilitando dessa forma, a movimentação do óleo através dos poros das rochas (Colla; Costa, 2003).

Além da aplicação na indústria petrolífera, alguns biossurfactantes podem ser utilizados na remoção de metais como zinco e cobre, pelo seu caráter aniônico, podem ser aplicados na agricultura, na construção civil e nas indústrias alimentícias, de papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (Mulligan, *et al.*, 2001), tabela 15.

Foi previsto em 2006, na Bio-Conferência em Nova Iorque, 2003 que o mercado iria se voltar para a indústria da biotecnologia até 2010, principalmente na área de química fina. A velocidade deste processo esteve relacionada com os preços do petróleo e de produtos oriundos da agricultura, desenvolvimento tecnológico e força política voltada para as novas tecnologias (Rufino, 2006)

Nos últimos 10 anos foi previsto um aumento no interesse pelos surfactantes biológicos que apresentaram o custo similar ao do surfactante derivado de petróleo. Até 2010, os surfactantes corresponderiam a cerca de 10% do mercado de surfactantes, chegando a US\$ 200 milhões em vendas (Rufino, 2006).

Tabela 15. Principais aplicações industriais para os surfactantes químicos e biológicos

Indústria	Aplicação	Papel do surfactante
Petrolífera	RMP	Melhorar a drenagem de óleo na rocha matriz, estimular a liberação de óleo em tubulações, umedecimento de superfícies sólidas, redução da viscosidade do óleo e do ponto de fluidez, diminuição da tensão interfacial, dissolução do óleo.
	Desemulsificação	Desemulsificação de emulsões de óleos, solubilização do óleo, redução de viscosidade, agente umectante.
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos, diminuição da tensão interfacial, seqüestro de metais.
	Remediação de solos	Emulsificação por aderência de hidrocarbonetos, dispersão, agente espumante e detergente.
Alimentícia	Emulsificação e Desemulsificação	Emulsificante, solubilizante, desemulsificante, lubrificante, espumante, desespumante, umectante.
	Ingrediente Funcional	Interage com lipídios, proteínas, carboidratos e como agente protetor.
Biológica	Microbiológica	Comportamento fisiológico como mobilidade e comunicação celular, acesso a nutrientes, competição célula-célula, patogênese de plantas e animais.
	Farmacêutica e Terapêutica	Antibacteriano, antifúngico, antiviral, agentes adesivos, moléculas imunomodulatórias, vacinas, terapia gênica.
Agrícola	Biocontrole	Facilitação de mecanismos de biocontrole de micro-organismos como parasitismo, antibiose, competição, resistência sistêmica induzida e hipovirulência.
Bioprocessamento	Processos de Recuperação de produtos	Biocatálise em sistemas aquosos bifásicos e microemulsões, biotransformações, recuperação de produtos intracelulares, estímulo de produção de enzimas extracelulares e produtos de fermentação.
Cosméticos	Produtos de saúde e beleza	Emulsificantes e agentes espumantes, solubilizantes, agentes umectantes, cremes de limpeza, agentes antimicrobianos, mediadores de ação enzimática.

Fonte: Singh *et al.*, 2007

Capítulo 3. Primeiro Artigo

Trabalho aceito para publicação como Maciel, C.C.S.; Sousa, M.A.; Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, “in press”, 2011.

3. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados¹

RESUMO

Fungos isolados de locais impactados por petróleo foram investigados quanto à produção de enzimas lignolíticas, utilizando óleo diesel como substrato. A produção de polifenoloxidasas foi verificada utilizando-se ácido gálico(0,5%). Os fungos selecionados foram inoculados em solução de Manachini e óleo diesel-1%, incubados a 30°C por 72 horas, avaliando-se produção de biomassa, pH e a quantificação de lacase-LaC, lignina-LiP e manganês peroxidase-MnP, através da oxidação de ABTS, álcool veratrílico e vermelho fenol, respectivamente. A produção de biomassa variou entre 10,21g/L a 1g/L, e o pH entre 6,0 e 6,8. A maior produção de LiP ocorreu pela estirpe F25 (144 U/L). A maior atividade para MnP foi observada pelas estirpes F4, F11 e F25 (correspondendo a 56U/L, 51U/L e 60U/L, respectivamente), e a maior atividade da LaC foi para F33 e F4, respectivamente (290U/L e 210U/L). As estirpes selecionadas demonstraram ser indicadas para o processo de otimização da produção de enzimas lignolíticas, com posterior aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Lacase, Lignina Peroxidase, Manganês peroxidase, óleo diesel, fungos filamentosos.

3.1 INTRODUÇÃO

A poluição provocada por acidentes envolvendo petróleo e derivados constitui um problema de escala mundial devido aos impactos causados ao meio ambiente. Por outro lado, a cada ano o acúmulo dos rejeitos emitidos por indústrias de diversos ramos, aumenta consideravelmente (Nitschke; Pastore, 2002). No Brasil, os principais grupos contaminantes são os solventes aromáticos, combustíveis e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, todos provenientes da indústria petrolífera (CETESB, 2008). Diante dessa problemática são empregadas estratégias físico-químicas e biológicas quando associadas permitem a remoção desses poluentes e conseqüente remediação do ambiente.

¹ Trabalho aceito para publicação como Maciel, C.C.S.; Sousa, M.A.; Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M. 2010. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*, *in press*, 2011.

A biorremediação tem sido apontada como uma alternativa viável na descontaminação de locais impactados, pois direciona o potencial fisiológico de micro-organismos na degradação enzimática dos hidrocarbonetos, devido à utilização como fonte de carbono (Rahman *et al.*, 2003). A utilização de fungos e bactérias isolados de locais impactados visando aplicação em processos biotecnológicos tem recebido destaque, sendo estes micro-organismos amplamente utilizados na remediação de poluentes e locais impactados (Gomes *et al.*, 2010).

Dentro do grupo dos fungos degradadores de xenobióticos, destacam-se os lignolíticos que utilizam o citocromo P-450 monoxigenase e 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 literatura destaca como as maiores famílias de enzimas fúngicas ligninolíticas: lacases (LaC), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) (D'Souza *et al.*, 1999). Nestas enzimas falta à especificidade pelo substrato e, com isso, as mesmas são empregadas na degradação de diversos xenobióticos, com aplicação na indústria química, alimentícia, agrícola, de papel, têxtil, além de setores da indústria de cosméticos (Bonugli-Santos *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2009; De Souza; Peralta, 2003).

A expressão da produção das enzimas lignolíticas por fungos vem sendo detectada através do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, conhecido como ácido gálico, que, sob ação das fenoloxidasas, forma quinonas indicativas da oxidação, resultando em um halo de cor âmbar em torno da colônia, conhecido como "reação de Bavendamm" (Conceição *et al.*, 2005). Para quantificação das enzimas lignolíticas, verifica-se a oxidação de diferentes substratos, principalmente de vermelho fenol para manganês peroxidase, álcool veratrílico para LiP e 2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina –ABTS para a LaC (Arora; Gill, 2001; Bonugli-Santos *et al.*, 2010).

O uso de enzimas vem sendo considerado na atualidade, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração vem sendo feita da forma bruta, a partir de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (Colen, 2006). Desta forma, os fungos são considerados maiores produtores das enzimas lignolíticas destacando-se *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Cunninghamella elegans*, *Candida* spp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* sp., *Aspergillus sclerotium* CBMAI84 e *Mucor racemosus* CBMAI847 (Boonchan *et al.*, 2000; Bonugli-Santos *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar fungos filamentosos produtores de polifenoloxidasas, além avaliar quantitativamente a produção de LaC, LiP e manganês peroxidase, utilizando óleo diesel como substrato, com a finalidade de propor aplicação futura dessas enzimas na remoção de petroderivados.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATERIAIS

Micro-organismos- Foram utilizados para realização deste trabalho, 34 fungos filamentosos isolados de ambientes poluídos por petroderivados no Nordeste do Brasil e que se encontram preservados em óleo mineral na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

Meio de cultura - Para ensaio qualitativo para produção de polifenoloxidase, foi utilizado o meio Agar Malte [(g/L⁻¹) extrato de malte 15g; Agar 15g; água destilada 1000 mL; pH 7,0] e acrescido de ácido gálico 0,5% em frasco separado de modo a evitar a hidrólise do ágar. Para a quantificação das polifenoloxidasas, foi utilizado inicialmente o meio Batata Dextrose Agar [(g/L) 500mL de infusão de batata; 10g de dextrose; Agar 20g; água destilada 1000mL; pH 7,0] em seguida utilizou-se solução de Manachini [(g/l) KH₂PO₄ 2g; (NH₄)₂SO₄ 1g; MgSO₄7H₂O 0,1g; Na₂HPO₄ 2H₂O 0,9g; Extrato de Levedura 1g; água destilada 1000 mL; pH 6,0].

Óleo diesel - As amostras de óleo diesel foram cedidas pela TRANSPETRO S.A.

3.2.2 MÉTODOS

Seleção de fungos com capacidade de produzir polifenoloxidase

Para verificação da produção da enzima polifenoloxidase foi utilizado o meio de Ágar Malte acrescido de ácido gálico 0,5%. Após 5 dias, foi observada a formação do halo de cor âmbar, característico da "Reação de Bavendamm" (Valiev *et al.*, 2009).

Ensaio em meio líquido para quantificação de polifenoloxidase

Para quantificação da produção das enzimas do grupo polifenoloxidase, os fungos selecionados previamente, foram cultivados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose-Ágar por 7 dias a 28°C_{±1}, sendo então removidos 3 discos (6mm diâmetro) de

cada fungo.

Os discos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 49,5mL de solução de Manachini pH-6,0 e, como substrato indutor, utilizou-se óleo diesel (1%) como substrato (Souza *et al.*, 2008). Os frascos foram cultivados a 140rpm, 30°C por 72 horas. Após esse período, o material foi filtrado com papel de filtro Waltman, 10 e, a partir da massa micelial retida. A partir da massa micelial, foi realizada a quantificação de biomassa, determinada por gravimetria, lavagem da biomassa com água destilada, para remoção de resíduos de extrato enzimático, seguida de posterior secagem (60°C/24horas). A partir do líquido filtrado, foram analisados o potencial Hidrogeniônico, obtido com um pHmetro e foi determinada a produção das enzimas LaC, MnP e LiP. Uma unidade de atividade (U) é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1µmol de substrato ou a formação de 1µmol de produto por minuto.

Determinação da produção de lacase

Para a quantificação da LaC, foi utilizada a metodologia descrita por Arora e Gill (2001). Utilizou-se 2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina -ABTS (0,03% v/v), 0,1mL de tampão acetato de sódio e 0,1mL do extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi verificada através de espectrofotômetro (Spectronic/genesis5), pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420nm.

Determinação da produção de Manganês Peroxidase

Para quantificação de manganês peroxidase, foi verificada a oxidação do vermelho-fenol (0,01% v/v), acrescido de 500µL do extrato enzimático, lactato de sódio (0,25M), albumina bovina (0,5% p/v), MnSO₄ (2mM) e H₂O₂ em tampão fosfato citrato (20mM, pH 4,5). A leitura foi feita a 610nm de absorbância (Bonugli-Santos *et al.*, 2010).

Determinação da produção de Lignina Peroxidase

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

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Seleção de Fungos Produtores de Polifenoloxidasas

Dentre os 34 fungos testados, 12 estirpes foram capazes de expressar halos indicativos da produção de polifenoloxidasas, sendo selecionadas, portanto para ensaios subseqüentes de quantificação das enzimas (Tabela 1).

3.2 Produção de biomassa pelos fungos selecionados

A produção de biomassa pelos 12 fungos selecionados no ensaio de produção da enzima polifenoloxidase revelou maior formação de biomassa para a amostra F9 que produziu $10,21\text{g/L} \pm 0,2$, seguido de F29 ($7,95\text{ g/L} \pm 0,4$) (figura 1). Resultados inferiores foram obtidos por Quarantino et al., (2008), que demonstraram uma produção de biomassa de $1,8\text{g/L}$ em ensaios de produção de LaC por *Panus tigrinus*. Téllez-Téllez (2008) observou 55 g/L de biomassa utilizando glicose como fonte de carbono para a produção de LaC por *Pleurotus ostreatus*.

Tabela1. Micro-organismos produtores de polifenoloxidasas e sua identificação

Identificação	Identificação	Local de Isolamento
F1	<i>Aspergillus tamarii</i>	Lagoa da Barra, Suape-PE, Brasil
F3	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lagoa da Barra, Suape-PE, Brasil
F4	<i>Curvularia lunata</i>	Lagoa da Barra, Suape-PE, Brasil
F9	<i>Aspergillus</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F10	<i>Aspergillus</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F11	<i>Paecilomyces</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F16	<i>Penicillium</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F21	<i>Penicillium</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F24	<i>Penicillium</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F25	<i>Penicillium</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F29	<i>Penicillium</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil
F33	<i>Penicillium</i> sp.	Mangue Branco-BA, Brasil

O pH dos meios apresentaram um discreto aumento variando de 6,0 a 6,8, o que caracteriza um potencial hidrogeniônico próximo da neutralidade (Figura 1). Os fungos filamentosos são mais tolerantes as condições ácidas, os valores de pH podem variar de $6,0 \pm 0,08$ e $8,0 \pm 0,05$, sendo os mais favoráveis à ação degradadora de hidrocarbonetos. Neste pH observa-se um maior crescimento dos micro-organismos, aumento da velocidade de degradação, e de acordo com vários autores, a acidez do meio em processo de degradação é indicativa da produção de ácidos intermediários, como o ácido oxálico (Cerniglia; Sutherland, 2001; Alexander, 1999; Leahy; Colwell, 1990).

A quantificação das enzimas está apresentada na figura 2. Observou-se que a produção de LaC pelos fungos F33-*Penicillium* sp. ($290\text{U/L} \pm 28$) e F4-*Curvularia lunata* ($210\text{U/L} \pm 17$), destacando-se estatisticamente em comparação à produção da mesma

enzima pelos demais fungos. Segundo Kim *et al.* (1998), quando foram utilizados fenantreno e antraceno como substratos ocorreu a produção de LiP por *Phanerochaete chrysosporium* e *P. ostreatus*, respectivamente. Resultados similares foram observados utilizando óleo diesel. Para Quarantino *et al.*, (2008) a produção de LaC por *Panus trigrinus* (linhagem 577.79) variou de 0,024 U/mL e 2,04 U/mL, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Téllez-Téllez *et al.*, (2008) em ensaios de produção de LaC por *Pleurotus ostreatus* obteve 162U/mg de proteína. A melhor produção de LaC em atividade específica foi produzida por F10, 193,9 U/mg de proteína, contudo os resultados aqui descritos foram superiores (Tabela 2).

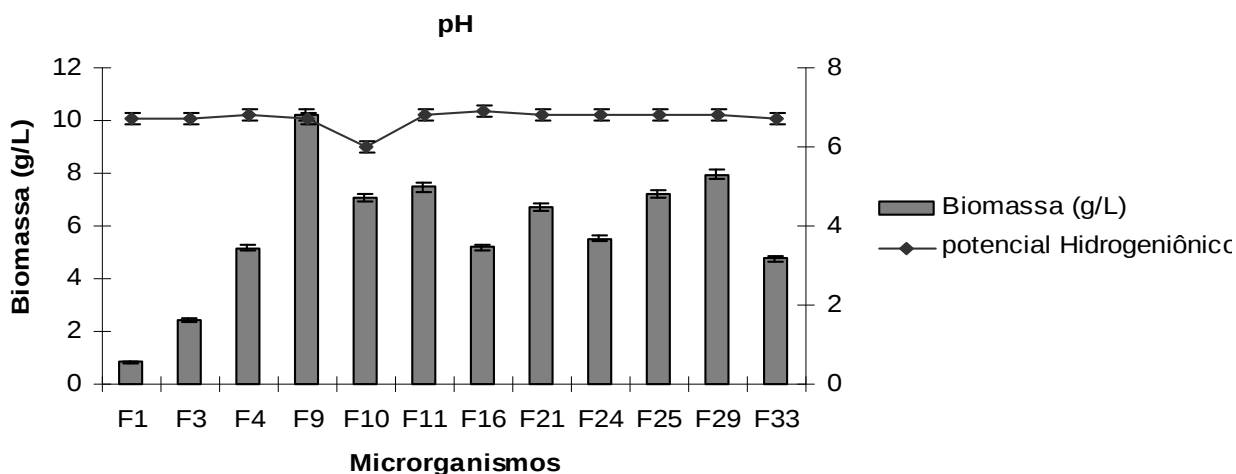


Figura 1. Quantificação de biomassa (g/L) e pH produzidos por fungos filamentosos utilizando óleo diesel como substrato, após 72 horas de incubação. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

O destaque na produção de manganês peroxidase foi: 60U/L $\pm$ 8 produzidos por F25-*Penicillium* sp., cerca de 56U/L $\pm$ 6 produzidos por F4-*Curvularia lunata* e 51 U/L $\pm$ 4 para F11- *Paecilomyces* sp.. Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes *et al.*, (2009), realizando descoloração de corantes utilizando arroz como substrato, obtiveram 0,6 U/mL de manganês peroxidase. Contudo, resultados superiores foram observados por Anastasi *et al.*, (2009) em testes de degradação utilizando basidiomicetos obtiveram produção de MnP em torno de 124 U/L.

Os resultados semelhantes estatisticamente para produção de LiP foram os seguintes: F4- *Curvularia lunata* (92U/L $\pm$ 2) F11 -*Paecilomyces* sp. (94 U/L $\pm$ 9), F21- *Penicillium* sp. (100 U/L $\pm$ 22), F24-*Aspergillus* sp. (100 U/L $\pm$ 14) e F25-*Penicillium* sp.

(144 U/L $\pm$ 13). Gomes *et al.*, (2009) em processos de descoloração de corantes, obtiveram 9 U/mL de lignina peroxidase após 5 semanas de incubação. Anastasi *et al.*, (2009) obtiveram produção de LiP por basidiomicetos em torno de 19 U/L. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho para *Penicillium* sp. (F25), *Penicillium* sp (F21) e *Aspergillus* sp (F24) demonstraram ser superiores aos da literatura.

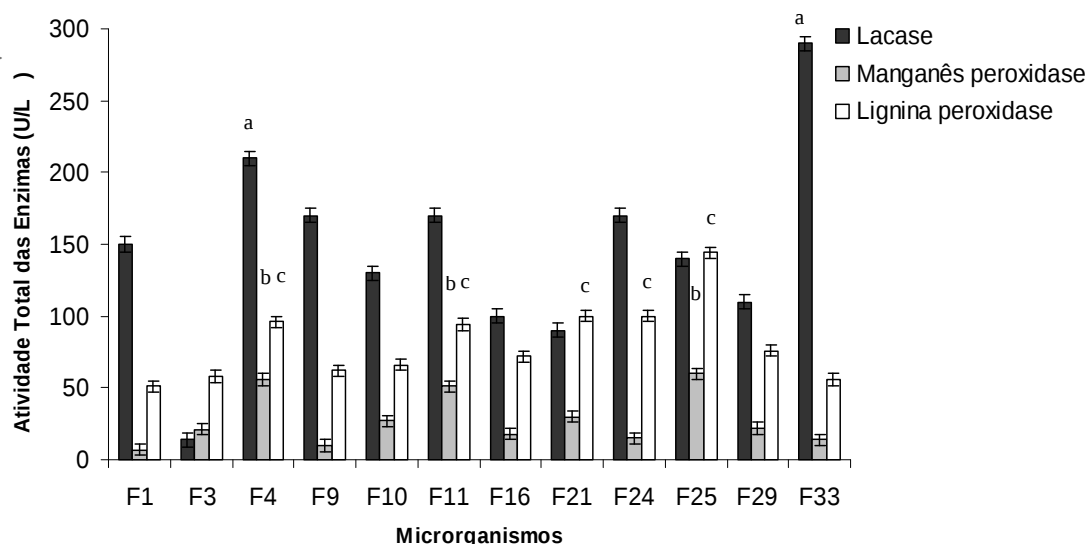


Figura 2. Atividade total (U/L^{-1}) de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase produzidas pelos fungos filamentosos. Valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Anova de Friedman, sendo a, b, c = $p < 0.05$

Tabela 2. Produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelos fungos selecionados, isolados de ambientes impactados por petroderivados

Micro-organismos	Atividade Total (U/L)			Atividade Específica (U/mg proteína)		
	Lacase	Lignina Peroxidase	Manganês peroxidase	Lacase	Lignina Peroxidase	Manganês peroxidase
F1	150	66	7	20.2	12.9	0.9
F4	210	92	56	62.2	18.3	16.6
F11	170	94	51	36	19.8	10.7
F21	90	100	30	14.8	16.4	4.9
F24	170	100	15	22.8	13.4	2
F25	140	144	60	12.4	12.8	5.3
F33	290	56	14	36.3	7	1.7

Os resultados obtidos são comparáveis ou superiores aos encontrados por Narkhede e Vidhale (2005) que observaram produção de polifenoloxidasas por *Curvularia lunata* LW6 isolada de efluente industrial. Espécies de *Paecilomyces* têm sido relatadas na

literatura como degradadoras de substratos lignolíticos havendo produção de polifenoloxidase (Kluczek-Turpeinem *et al.*, 2003). De acordo com Kluczek-Turpeinem *et al.*, (2007), a secreção de enzimas degradadores de lignina constitui uma etapa central no metabolismo do carbono por *Paecilomyces* spp., representando um potencial importante para detecção dos níveis de expressão destas enzimas.

3.4 CONCLUSÕES

Os fungos isolados de área contaminada por petroderivados com maior potencial biotecnológico para a produção de enzimas do sistema lignolítico foram *Aspergillus* sp., *Curvularia lunata*, *Paecilomyces* sp., e *Penicillium* sp., considerando a produção de enzimas do sistema lignolíticos. Por sua vez, ressalta-se o potencial biotecnológico mediado pela presença de xenobióticos aos fungos filamentosos isolados, confirmando que a indução de enzimas degradativas mediante adaptação a ambientes contaminados por petroderivados.

3.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Capítulo 4. Segundo Artigo

Trabalho submetido para publicação na revista World Journal of Microbiology and Biotechnology, como Maciel, C.C.S.; Sousa, M.A.; Santana, E.C.; Monte, K.R.; Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M. 2010. Produção e caracterização de enzimas lignolíticas de *Curvularia lunata* - UFPEDA 885, utilizando óleo diesel como substrato.

4. Produção e Caracterização de Enzimas Lignolíticas de *Curvularia lunata* -UFPEDA 885, Utilizando Óleo Diesel como Substrato ²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi produzir enzimas lignolíticas por *Curvularia lunata* – UFPEDA885, utilizando óleo diesel como substrato e realizar a caracterização destas enzimas quanto a estabilidade e efeito do pH e temperatura. Foi realizado um planejamento fatorial completo 3²: pH (4.0, 6.0 e 8.0) e temperatura (30°C, 35°C e 40°C). *Curvularia lunata*-UFPEDA 885 foi cultivado em solução de Manachini com óleo diesel (2%) por até 3 dias, sendo analisados a biomassa, o pH, e a quantificação de enzimas lignolíticas, que posteriormente foram caracterizadas. O fungo produziu biomassa em todas as condições e o pH final esteve entre 5,7 a 7,2. Ocorreu produção de lacase: 1940U/L $\pm$ 4 que, apesar de instável, foi melhor produzida pelo fungo em pH 3,4 e temperatura de 65°C. Houve produção otimizada de lignina peroxidase: 1480U/L $\pm$ 6, que permaneceu estável, com pH e temperatura ideais de 6,2 e 65°C. A maior produção de manganês peroxidase por *C. lunata* ocorreu após 48 horas (820U/L $\pm$ 3,5) que, estável apresentou pH ideal de produção 3,4 a 50°C. *C. lunata*-UFPEDA 885 é indicada para produção de lignina e manganês peroxidase utilizando óleo diesel como substrato visando aplicação industrial e na biorremediação.

Palavras-chave: Biorremediação, *Curvularia lunata*, Fungo filamentoso, polifenoloxidasas.

4.1 INTRODUÇÃO

O óleo diesel é constituído por hidrocarbonetos como: alcanos, parafinas, oleofinas, nafta, compostos fenólicos, aromáticos e policíclicos aromáticos (HPA) (Adebusoye *et al.*, 2010). A utilização de petroderivados como fonte de carbono para o crescimento microbiano e indução da produção enzimática, é eficaz e ocasiona a otimização da síntese enzimática com aplicação em processos industriais e na biorremediação (Feng *et al.*, 2009).

Alguns fungos ascomicetos como *Curvularia lunata*, durante o metabolismo secundário, são produtores de enzimas oxidativas extracelulares: lacase-LaC e peroxidases

² Trabalho submetido para publicação na revista World Journal of Microbiology and Biotechnology, como Maciel, C.C.S.; Sousa, M.A.; Santana, E.C.; Monte, K.R.;Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M. 2010. Produção e caracterização de enzimas lignolíticas de *Curvularia lunata* -UFPEDA 885, utilizando óleo diesel.

(Narkhede e Vidhale 2005; Alexopoulos *et al.*, 1996). As LaCs oxidam compostos fenólicos e não-fenólicos, sendo utilizada na descontaminação de efluentes de celulose e petroquímicos, na biodegradação de pesticidas e compostos fenólicos e em biosensores de nanopartículas (Couto e Herrera, 2006). Da mesma forma, lignina-LiP e manganês peroxidases-MnP oxidam compostos fenólicos e não fenólicos, sendo empregadas na biodegradação de HPA, organoclorados, corantes, nanotecnologia e em “kits” de diagnósticos laboratoriais (Hamid e Rehman 2009; Husain *et al.* 2009).

A capacidade microbiana de produzir enzimas relaciona-se com as condições de cultivo e nutrientes, além da natureza do substrato (Bonugli-Santos *et al.* 2010; Reddy e D’Souza 1994). Existe grande interesse na indução, otimização e estabilização de enzimas lignolíticas, principalmente com base em planejamentos experimentais, pois estes constituem uma ferramenta eficiente na determinação das melhores condições, visando aplicação em bioprocessos industriais, sendo uma alternativa mais vantajosa economicamente, de baixo risco, além de ser mais compatível com o meio ambiente (Narkhede e Vidhale 2005). O presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de enzimas lignolíticas quanto a estabilidade e efeito do pH e temperatura, produzidas por *C. lunata* –UFPEDA885, utilizando óleo diesel como substrato.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Foi utilizado o fungo *Curvularia lunata*- UFPEDA885, proveniente da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, na Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco-Brasil.

Planejamento fatorial completo 3²

Foi realizado um planejamento fatorial completo 3², com duas variáveis: pH e temperatura (tabela 1). O software Statistica® 6.0 foi utilizado e, a partir dos resultados obtidos, foram verificados os efeitos das variáveis utilizadas através da análise dos parâmetros lineares, quadráticos e de interação.

Três discos de gelose com crescimento (6mm ϕ) de *C. lunata*-UFPEDA885 previamente cultivado em meio mineral Bushnell Haas acrescido de óleo diesel 1% (7dias/ $\pm$ 30°C) foram transferidos para frascos de Erlenmeyer-250mL, contendo solução de Manachini [(g/l) KH₂PO₄ 2g; (NH₄)₂SO₄ 1g; MgSO₄7H₂O 0,1g; Na₂HPO₄ 2H₂O 0,9g;

Extrato de Levedura 1g; água destilada 1000 mL; pH 6,0], e 2% de óleo diesel (cedido pela TRANSPETRO S.A.) (Teixeira et al. 2000).

Após incubação estática por 48, 72 e 96 horas, o material foi filtrado e a massa micelial foi lavada com água destilada e seca (40°C), para quantificação da biomassa. Do líquido metabólico livre de células, considerado como extrato enzimático, foi verificado o pH, através de potenciômetro, e a quantificação das enzimas lignolíticas.

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial com valores codificados e reais, entre parênteses, para as variáveis independentes pH (X1) e temperatura (X2).

Ensaio	pH (X1)	Temperatura (X2)
1	0 (6)	1 (40°C)
2	1 (8)	0 (35°C)
3	-1 (4)	-1 (30°C)
4	-1 (4)	0 (35°C)
5	1 (8)	1 (40°C)
6	0 (6)	-1 (30°C)
7	1 (8)	-1 (30°C)
8	-1 (4)	1 (40°C)
9	0 (6)	0 (35°C)

Quantificação de enzimas lignolíticas

A LaC foi determinada por espectrofotometria a 420nm de absorbância, a partir da oxidação do 2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina –ABTS. A mistura reativa continha 0,8mL de ABTS (0,03% v/v), 0,1mL de tampão acetato de sódio (0,1M/pH5.0) e 0,1mL do extrato enzimático (Arora; Gill, 2001-adaptada). Para LiP, verificou-se a oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico, a 310 nm. Utilizou-se 1mL de tampão fosfato citrato (125mM/pH3.0), 500µL de extrato enzimático e 500µL de H₂O₂ (2mM) (Arora; Gil, 2001-adaptada). Por fim, para manganês peroxidase, verificou-se a 610nm, a oxidação de 100 µL de vermelho-fenol (0,01% v/v), acrescido de 500µL do extrato enzimático, 100µL de lactato de sódio (25mM), 200µL de albumina bovina (0,5% p/v), 50µL de MnSO₄ (2mM) e H₂O₂ em tampão fosfato citrato (0,1M/ pH 4,5) (Kuwahara et al. 1984-adaptada). Para a quantificação enzimática uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1µmol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades por grama de proteína e os valores apresentados foram médias de

três repetições. Uma unidade de atividade (U) é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato ou a formação de 1 μ mol de produto por minuto.

Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

Para caracterização do efeito do pH sobre a atividade enzimática, foram utilizados diferentes valores de pH inicial, mantidos em triplicata, através dos tampões: KCl/HCl 0,1M (pH1.0, 1.4, 1.8, 2.2), citrato-fosfato 0,1M (pH2.6, 3, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6, 5, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6) e fosfato 0,1M (pH7, 7.5, 8). Para a verificação da estabilidade da enzima ao pH, a enzima foi incubada à temperatura ambiente ($28\pm1^{\circ}\text{C}$), durante duas horas em solução tampão citrato-fosfato pH 2,6; 3,4; 5,0 e 6,2 e em seguida foi determinada a atividade residual em triplicatas (Yadav et al., 2009).

Para detecção da temperatura ótima, a velocidade no estado estacionário da enzima que catalizou as reações, foi determinada em triplicatas nas temperaturas: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80°C e a relação entre a velocidade de reação versus temperatura foi avaliada. Para a termoestabilidade das enzimas, após incubação em banho-maria por duas horas, nas temperaturas de 28°C , 50°C , 60°C e 80°C , foi verificada a atividade enzimática residual em triplicata (Yadav et al., 2009).

4.3 RESULTADOS

C. lunata, UFPEDA885 produziu biomassa utilizando óleo diesel como exclusiva fonte de carbono, destacando-se com 10,74g/L de biomassa, no experimento: pH inicial 6.0 e 40°C , por 96 horas de incubação, seguido de 8,05g/L no experimento com pH inicial 4.0 e 40°C por 96 horas. Em todos os experimentos houve mudança do pH inicial que esteve entre 5.7 a 7.2. O pH mais ácido foi observado no experimento de pH 6.0/ 30°C , após 96 horas de incubação.

Os resultados foram analisados e revelaram que a produção de Lacase- LaC (Y) variou em função do pH (X_1) e em relação a interação pH e temperatura (X_2), como mostra o modelo reparametrizado da equação de regressão: Y (atividade de LaC, U/L)= $611+360X_1 - 335X_1X_2$. Devido à grande variabilidade inerente à bioprocessos envolvendo enzimas microbianas, os parâmetros significativos foram considerados quando menores que 10% ($p>0,1$). Para determinar a adequação do planejamento utilizado, obteve-se o coeficiente de regressão R^2 . Este coeficiente foi obtido para os resultados onde se verificou efeito entre as variáveis e a produção enzimática. Em relação aos resultados obtidos para a produção de LaC, o R^2 foi de 87%, indicando confiabilidade do modelo utilizado. Através

da análise de variância, observou-se que as maiores quantificações de LaC ocorreram após 72 horas, em pH 4.0 e 40°C (1940U/L), pH 6.0 e 40°C (1600U/L) e pH 6.0 e 30°C (1850U/L), Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios da produção de enzimas ligninolíticas produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885, após 48, 72 e 96 horas.

Experimentos	Fatores e níveis		Quantificação Enzimática (U/L)								
	X1 ^a	X2 ^b	Lacase			Lignina Peroxidase			Manganês Peroxidase		
			48h	72h	96h	48h	72h	96h	48h	72h	96h
1	0	+1	110	1600*	43	60	1104	70	380	530	580
2	+1	0	180	700	1400*	70	150	230	630	670	790*
3	-1	-1	800*	230	520	10	820	370	550	600	140
4	-1	0	300	1020	1100*	30	90	620	650	420	140
5	+1	+1	700	1050	710	130*	190	20	600	630	380
6	0	-1	160	1850*	260	30	10	30	580	600	820*
7	+1	-1	1300*	1010	210	340*	20	10	700	610	620
8	-1	+1	1300*	1940*	20	10	1480*	40	520	320	620
9	0	0	650	700	680	40	10	1120*	380	600	560

a: X1 = pH (-1= 4,0; 0=6,0; +1=8,0)

b: X2 = temperature (-1=30°C, 0=35°C, +1=40°C)

*: Anova of Kruskal-Wallis/Student-Newman-Keuls, $p < 0.05$

N

A melhor produção de LiP, ocorreu em pH4.0/40°C, após 72 horas: 1480U/L ± 6 , com atividade específica de 434.83 U/mg proteína. Não foi detectado efeito entre as variáveis e a produção desta enzima.

No que se refere a manganês peroxidase-MnP, a melhor produção foi em pH8.0/35°C e pH6.0/30°C, ambos após 96 horas, respectivamente: 790U/L $\pm 1,5$ 820U/L $\pm 3,5$ (Tabela 1), com atividade específica de 234,17 U/mg proteína e 250.07 U/mg proteína, respectivamente. A produção desta enzima variou em função da interação entre pH e temperatura, com $p > 0,1$ segundo o modelo reparametrizado da equação de regressão: Y (atividade de MnP, U/L)=638-122,5X₁X₂, com R² de 85%.

Quanto ao efeito do pH na atividade enzimática, a maior atividade de lignina peroxidase foi verificada em pH de 5 a 7, enquanto que com excessão da temperatura de 25°C, as demais não exerceram efeito sobre a atividade desta enzima. Para manganês peroxidase, as variações no pH não influenciaram na atividade enzimática, enquanto que a

temperatura ideal para atividade foi até 65°C. Para LaC, os valores de pH ótimo são 3,4 e 7, enquanto que a temperatura onde ocorreu maior atividade enzimática foi 65°C. (Figura 1 e Figura 2). Em relação à estabilidade, LiP e manganês peroxidase apresentaram-se estáveis em todas as condições de pH e temperatura testados, com exceção da temperatura de 80°C para MnP. A LaC foi termoinstável e não houve detecção de atividade nos valores de pH testados (Tabela 3).

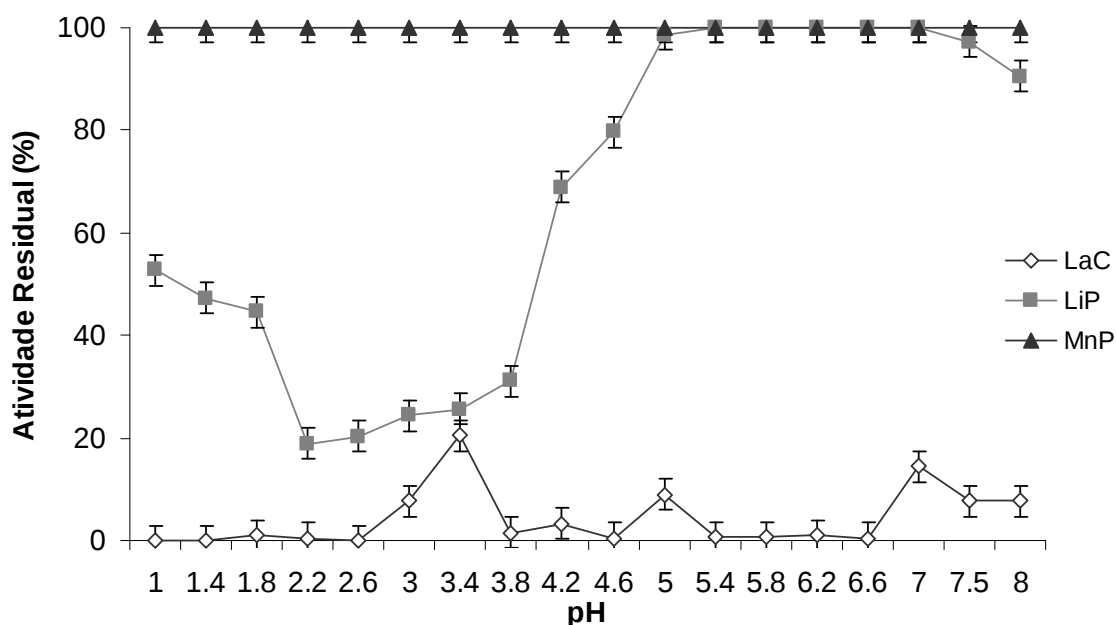


Figura 1. Efeito do pH na atividade residual (%) das enzimas lacase-LaC, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885.

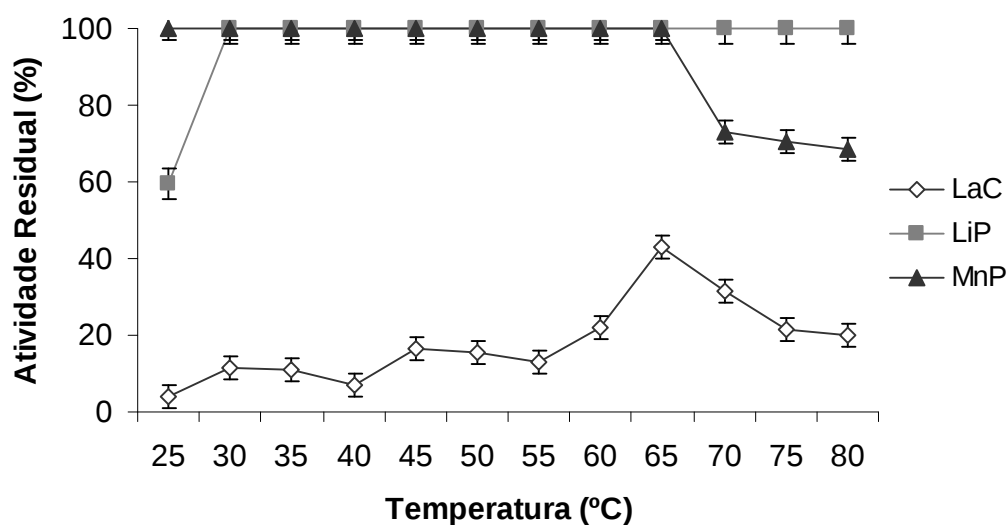


Figura 1. Efeito da temperatura na atividade residual (%) das enzimas lacase-LaC, lignina peroxidase-LiP e manganês peroxidase-MnP produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885.

Tabela 3. Estabilidade termica e de pH das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase produzidas por *Curvularia lunata*-UFPEDA885.

Enzimas	Atividade enzimática residual (%)							
	pH				Temperatura			
	2.6	3.4	5	6.2	28°C	50°C	60°C	80°C
Lacase	0	0	0	0	0	0	0	0
Lignina Peroxidase	100	100	100	100	100	100	99	95
Manganês Peroxidase	100	100	100	100	100	100	100	0

4.4 DISCUSSÃO

Ocorreu produção de biomassa fúngica e acidificação do pH inicial em todos os experimentos, o que revela a capacidade de *C. lunata*, UFPEDA885 de utilizar óleo diesel como fonte de carbono e produzir biomassa. Em um processo fermentativo de biorremediação, a produção de biomassa indica a adaptabilidade do micro-organismo ao substrato e a transformação do composto original, enquanto que a acidificação é justificada geralmente pela produção de ácidos orgânicos, indicadores indiretos de biodegradação (Rao 2005; Gaad 2001).

C. lunata-UFPEDA 885 apresentou-se como produtor das três enzimas do complexo lignolítico, assim como: *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI84 e *Mucor racemosus* CBMAI847 que foram relatados recentemente como produtores das três enzimas em meio de malte acrescido de NaCl (Bonugli-Santos et al., 2010).

Para a maioria das enzimas, a desnaturação tem início entre 45 e 50°C, porém sua estabilidade varia de acordo com o pH do meio e da combinação de pH e temperatura, que podem diferir significativamente de acordo com o tipo de enzima (Pelczar et al. 2004). A produção de LaC pelo gênero *Curvularia* foi relatada por Du; Sun (2010) para *C. trifolii*

com valores duas vezes menor (1000U/L) do que os obtidos neste trabalho, em pH 3.5 e 40°C e utilizando-se corante como substrato. Alguns autores relatam que o pH ótimo para a produção de LaC está entre 3.0 e 5.7, o que corrobora com os resultados obtidos (Bollag e Leonowicz 1984). De acordo com Claus (2004), a LaC é expressa por uma família de genes e esta pode ser acentuada em condições de cultivo apropriadas como variações de pH, temperatura e nutrientes.

A produção LiP por *C. lunata* foi descrita anteriormente pela estipe *C.lunata* LW6 que produziu LiP: 6.120 U/L e atividade específica de 3,31 U/mg proteína utilizando-se o principal substrato para esta enzima: bagaço de cana de açúcar suplementado com glicose (Narked e Vidhale 2005). A produção de LiP utilizando substratos xenobióticos foi relatada por Kim et al. (1998) que obtiveram 129U/L de LiP por *Phanerochaete chrysosporium* utilizando fenantreno a 37°C e pH4.8 e nestas mesmas condições, para *Pleurotus ostreatus* utilizando antraceno como substrato, obteve 1.027U/L. Estes resultados são um pouco inferiores aos obtidos neste trabalho utilizando óleo diesel como substrato. Em relação a estabilidade da LiP, esta foi maior quando o pH está ácido, geralmente até 3.0, isto ocorre pois o pH neutro promove a desestabilização da H₂O₂ e perda de seu potencial de oxidação (Lee e Moon 2003).

Cerca de 200U/L de MnP foram produzidos por *P. chrysosporium* em presença de corante Poly R-478 a pH 4.5 e 30°C, de acordo com o autor, para este fungo, a condição ideal de cultivo para produção da enzima foi pH4.5 a 32°C (Couto et al. 2006). Eibes et al. (2005) obtiveram valores entre 60U/L e 240U/L de MnP utilizando antraceno como principal componente em uma mistura de substratos orgânicos.

C. lunata é produtor de enzimas lignolíticas e, a produção de LaC esteve relacionada com o pH e com a interação entre pH e temperatura. O mesmo aconteceu com a produção de MnP sofreu influência da interação entre pH e temperatura. A produção de

LiP por *C. lunata* UFPEDA885 não é influenciada por alterações de pH e temperatura. A habilidade de *C. lunata* em produzir as três enzimas lignolíticas deve ser explorada, principalmente em relação à enzima LiP e a MnP que foram estáveis em todas as condições de pH e temperatura testadas, não sofrendo influencia na atividade dessas enzimas. Bonugli-Santos et al. (2010) observaram a produção das 3 enzimas lignolíticas por *M. racemosus* CBMAI847 utilizando corante (RBBR) como substrato e este fungo foi indicado para produção destas enzimas visando aplicação na descoloração deste corante. *C.lunata* UFPEDA 885 é indicada para produção destas enzimas visando aplicação industrial e na biorremediação.

4.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro dos órgãos de fomento: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Capítulo 5. Terceiro Artigo

Trabalho a ser submetido para publicação na revista Colloids and Surface B, como Carla do Couto Soares Maciel, Rosileide Fontenele da Silva Andrade; Norma Buarque de Gusmão; Galba Maria de Campos Takaki 2010. Produção Amigável de Biossurfactante de *Curvularia lunata*-UFPEDA 885 a partir de óleo diesel.

5. Produção amigável do biossurfactante de *Curvularia lunata*-UFPEDA 885 a partir de óleo diesel³

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a produção de biossurfactante por *Curvularia lunata*- UFPEDA885 a partir de óleo diesel. Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional-DCCR- 2⁴ com as variáveis independentes: tamanho do inóculo, concentração de NH₄NO₃, MnSO₄H₂O e CuSO₄H₂O. O fungo foi inoculado em meio mineral Bushnell Haas-modificado acrescido de 2% de óleo diesel, sendo cultivado por 72 horas a 40°C de modo estático e a 150rpm sob as mesmas condições. Foram avaliadas a tensão superficial e a atividade emulsificante com diferentes fontes oleosas, além da toxicidade do biossurfactante frente sementes de *Pepino caipira* (*Cucumis sativus*), ao microcrustáceo *Artemia salina* e a biorremoção de óleo automotivo em solo pelo biossurfactante. Por fim, foi avaliada a estabilidade da emulsão e os efeitos do pH, temperatura e NaCl na atividade emulsificante. *Curvularia lunata* (UFPEDA 885) é produtor de biossurfactante, reduzindo a tensão superficial até 32,9 mN/m na condição estática. A redução da tensão superficial foi otimizada com inóculo, nitrogênio e manganês nas concentrações de 30 discos, 2g/L e 0,1g/L, respectivamente, enquanto que para o cobre a melhor concentração para redução da tensão foi de 0,1g/L. Além disso, este fungo produz um bioemulsificante capaz de promover a emulsificação de até 98% de óleo automotivo, com elevada estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e salinidade. O biossurfactante produzido por *C. lunata* UFPEDA 885 apresenta 0,02% de proteínas, 6,5% de açúcares e 87% de lipídios totais. Houve remoção de 93,5% de óleo automotivo contaminando solo arenoso e baixa fitotoxicidade frente à sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus*). Para *Artemia salina* a toxicidade ocorreu em concentrações do extrato bruto do biossurfactante a partir de 25%. *C.lunata* é considerado promissor para a produção de biossurfactante com aplicação em processos de biorremediação.

Palavras-chave: fungo filamentoso, tensão superficial, índice de emulsificação, ecotoxicidade.

³ Trabalho a ser submetido para publicação na revista Colloids and Surface B, como Carla do Couto Soares Maciel, Rosileide Fontenele da Silva Andrade; Norma Buarque de Gusmão; Galba Maria de Campos Takaki 2010. Produção amigável de biossurfactante de *Curvularia lunata*-UFPEDA 885 a partir de óleo diesel.

5.1 INTRODUÇÃO

O óleo diesel é petroderivado mais utilizado no mundo sendo elevados os riscos de contaminação ambiental e graves os impactos causados aos ecossistemas. O impacto ambiental da indústria petrolífera tem reduzido com o desenvolvimento de tecnologias capazes de combater a poluição. Dentre estas estratégias, a biorremediação tem sido considerada compatível com o ambiente por preservar a estrutura do solo, requerer pouca energia e por envolver a completa destruição ou imobilização dos contaminantes (Benincasa, 2007).

A principal limitação da biorremediação é a baixa solubilidade em água por parte dos poluentes oleosos (Sabaté et al., 2004). Uma das alternativas para o aumento desta solubilidade é o uso de biossurfactantes. Eles são produtos do metabolismo secundário de bactérias e fungos, constituídos de moléculas anfipáticas com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Eles atuam reduzindo a tensão superficial e interfacial entre água-óleo, óleo-água e de sistemas oleosos, podendo ser aplicados na Recuperação Melhorada de Petróleo, na remoção e limpeza de óleo em tanques de combustíveis, na recuperação terciária de petróleo, além da indústria farmacêutica, química, alimentícia e de cosméticos (Cunha et al., 2004). A principal vantagem da utilização de biossurfactantes em comparação aos surfactantes sintéticos ocorre pela baixa toxicidade e alta biodegradabilidade que estes produtos oferecem, sendo mais compatíveis com o meio ambiente (Gautam; Tyagi, 2006).

Vários micro-organismos apresentam a capacidade de produzir biossurfactantes, no entanto, a produção destes compostos bioativos, especificamente por fungos tem sido pouco relatada na literatura. Dentre os fungos desta classe, *Curvularia lunata* tem sido descrito como capaz de crescer em substratos contendo compostos oleosos, podendo ser destacada sua ação produtora de agentes tensoativos, entretanto estes ainda não foram caracterizados (Paraszkiewicz et al., 2002). Diante deste fato, o objetivo do presente trabalho foi verificar a produção do biossurfactante de *C. lunata*- UFPEDA885, cultivado em óleo diesel como fonte de carbono e estudar o biossurfactante para verificar uma possível aplicação na indústria ambiental.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Foi utilizado o fungo *Curvularia lunata*- UFPEDA885, proveniente da Coleção de

Culturas do Departamento de Antibióticos, na Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco-Brasil. As culturas foram mantidas em meio Bushnell Haas Sólido acrescido de 2% de óleo diesel e conservadas a 4°C (ATLAS, 1995).

Planejamento Experimental para Produção do Biossurfactante

Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR 2⁴, com quatro variáveis independentes: X1- tamanho do inóculo (em blocos de gelose de 0,6cm ϕ); X2- concentração de NH₄NO₃ (g/L); X3- concentração de MnSO₄H₂O (g/L) e X4- concentração de CuSO₄H₂O (g/L). Os fatores foram distribuídos em 5 níveis, a partir dos quais obteve-se 27 experimentos que incluíram 16 nos pontos fatoriais (-1 e +1), 8 nos pontos axiais (-2 e +2) e 3 repetições nos pontos centrais (nível 0). Na tabela 1 podem ser visualizados os valores reais das variáveis independentes e os valores codificados (entre parênteses), cujos experimentos foram conduzidos para estimar a variável dependente: tensão superficial na condição estática (Y1) e sob agitação (Y2).

Para a melhor resposta obtida, no que se refere à redução da tensão superficial, foi desenvolvido um modelo de regressão empírico relacionado com as respostas das quatro variáveis envolvidas no processo, visando a determinação das condições otimizadas. A Análise de Variância (ANOVA) para o modelo foi desenvolvida com base na significância estatística de acordo com a equação polinomial e pelo *F*-valor (variação de Fisher) ao nível de significância de 95%. Os coeficientes de regressão foram utilizados para conduzir cálculos estatísticos e para a construção dos modelos de regressão lineares, quadráticos e os efeitos de interação. A ANOVA e as superfícies resposta foram realizados através do programa Statistic[®] 6.0.

O fungo foi inoculado em frascos de Erlenmeyer-250mL contendo meio mineral Bushnell Haas- modificado, acrescido de 2% de óleo diesel (cedido pela TRANSPETRO S.A.), sendo cultivado de modo estático (CE) e sob agitação de 150rpm (CA). O pH foi ajustado para 4.0 e o material incubado por 72 horas a 40°C de acordo com estudos prévios (Maciel et al., 2011). Após o período de cultivo, o material foi filtrado e foi verificada a redução da tensão superficial para detecção de produção de biossurfactante e a atividade emulsificante para detecção da produção de um bioemulsificante.

Tensão Superficial- A tensão superficial foi verificada pela leitura em tensiômetro de acordo com o método de Du-Noy's (Kuyukina *et al.*, 2001). Em todo aferimento, utilizou-se água destilada como controle. Os resultados foram analisados através do software Statistica[®] 6.0.

Índice de Emulsificação - Foi verificada de acordo com Paraszkievicz et al., (2002) frente às fontes oleosas: óleo de canola, óleo mineral, óleo de soja, óleo de soja após fritura, óleo automotivo e óleo diesel. O filtrado celular obtido no planejamento experimental foi homogeneizado com as fontes oleosas (1:1v/v) por 2 minutos em vórtex a 700min^{-1} . Após 24 horas a altura da proporção de óleo emulsificado foi comparada com a altura do volume total de óleo adicionado (E_{24}).

Tabela 1. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2^4 , com valores reais e codificados das variáveis independentes

Condições Experimentais	X1 Quantidade de Inoculo	Variáveis Independentes		
		X2 NH_4NO_3 (g/L)	X3 $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	X4 $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (g/L)
1	20 (-1)	1 (-1)	0,05 (-1)	0,1 (-1)
2	20 (-1)	1 (-1)	0,05 (-1)	0,3 (1)
3	20 (-1)	1 (-1)	0,15 (1)	0,1 (-1)
4	20 (-1)	1 (-1)	0,15 (1)	0,3 (1)
5	20 (-1)	3 (1)	0,05 (-1)	0,1 (-1)
6	20 (-1)	3 (1)	0,05 (-1)	0,3 (1)
7	20 (-1)	3 (1)	0,15 (1)	0,1 (-1)
8	20 (-1)	3 (1)	0,15 (1)	0,3 (1)
9	40 (1)	1 (-1)	0,05 (-1)	0,1 (-1)
10	40 (1)	1 (-1)	0,05 (-1)	0,3 (1)
11	40 (1)	1 (-1)	0,15 (1)	0,1 (-1)
12	40 (1)	1 (-1)	0,15 (1)	0,3 (1)
13	40 (1)	3 (1)	0,05 (-1)	0,1 (-1)
14	40 (1)	3 (1)	0,05 (-1)	0,3 (1)
15	40 (1)	3 (1)	0,15 (1)	0,1 (-1)
16	40 (1)	3 (1)	0,15 (1)	0,3 (1)
17	10 (-2)	2 (0)	0,1 (0)	0,2 (0)
18	50 (2)	2 (0)	0,1 (0)	0,2 (0)
19	30 (0)	0 (-2)	0,1 (0)	0,2 (0)
20	30 (0)	4 (2)	0,1 (0)	0,2 (0)
21	30 (0)	2 (0)	0 (-2)	0,2 (0)
22	30 (0)	2 (0)	0,2 (2)	0,2 (0)
23	30 (0)	2 (0)	0,1 (0)	0 (-2)
24	30 (0)	2 (0)	0,1 (0)	0,4 (2)
25	30 (0)	2 (0)	0,1 (0)	0,2 (0)
26	30 (0)	2 (0)	0,1 (0)	0,2 (0)
27	30 (0)	2 (0)	0,1 (0)	0,2 (0)

Efeito do pH, temperatura e salinidade na atividade e estabilidade do bioemulsificante -

Para verificação da estabilidade do bioemulsificante, o material filtrado livre de células foi incubado a diferentes valores de pHs (2, 4, 6, 8, 10 e 12), temperaturas (20, 50, 75, 100 e 125°C) por 15 minutos e concentrações distintas de NaCl (5, 10, 15, 20 e 25%). Após incubação, foi verificada a atividade emulsificante visando a caracterização do efeito do

pH, da temperatura e da salinidade na estabilidade da emulsão (Liu *et al.*, 2010). Para detecção do pH, temperatura e salinidade ideais para a atividade emulsificante, foram verificadas as mesmas condições citadas porém, o extrato bruto do biossurfactante permaneceu por duas horas nestas condições para posterior análise da atividade emulsificante (Liu *et al.*, 2010).

Isolamento e Caracterização do Biossurfactante

Isolamento- O líquido metabólico livre de células obtido na melhor condição do planejamento fatorial foi centrifugado a 2000 x *g* por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, um volume de acetona foi adicionado cuidadosamente a um volume do líquido metabólico e em seguida o material foi centrifugado 2000 x *g* por 15 minutos. O precipitado branco foi coletado, seco e pesado (Paraszkiewicz *et al.*, 2002).

Composição Química- o biossurfactante isolado teve índice de proteínas determinado pelo “Kit” de proteínas totais Labtest® onde o teor de proteínas totais é detectado pela especificidade da reação de biureto. Para a quantificação dos carboidratos foi utilizado o “Kit” para quantificação de glicose Labtest®, onde a glicose é detectada após reação com peróxido de hidrogênio. Os lipídios foram determinados após a extração com clorofórmio e metanol (Manocha *et al.*, 1980).

Teste de toxicidade- Para análise da fitotoxicidade do biossurfactante foram utilizadas sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus*). As sementes foram desinfetadas e em seguida transferidas (10 unidades) para placas de Petri previamente forradas com papel de filtro duplo embebido em 2 mL do líquido metabólico livre de células, este procedimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas ($\pm$ 28°C) por 5 dias. Foram utilizados dois controles, um com água destilada e outro com diesel. Após o período de incubação, foram calculados o percentual de crescimento da raiz e o percentual de germinação visando obtenção do índice de germinação: % germinação X % crescimento das raízes/ 100 (Tiquia *et al.*, 1996). A toxicidade frente o microcrustáceo *Artemia salina* foi verificada após a eclosão dos cistos após 24 horas em solução de sal marinho sintético (32 g/L), com aeração e a $\pm$ 30°C (Matthews, 1995). Após a eclosão, dez larvas do microcrustáceo foram selecionadas e incubadas, em tubos de penicilina contendo as concentrações do biossurfactante de 1% a 100% por 24 horas para observação da mortalidade. Controles negativos foram utilizados paralelamente com solução de sal marinho sintético. Após o período de incubação, foi feita a contagem do número de larvas mortas. Todos os testes de toxicidade foram conduzidos em quintuplicatas.

Aplicação do biossurfactante na remoção de óleo - Foi adicionado 10g de solo arenoso coletado na Praia de Suape-PE, Brasil (Tabela 2) e impregnado por 5mL de óleo automotivo e 75mL do líquido livre de células, obtido na melhor condição e como controle utilizou-se água destilada esterilizada em substituição ao líquido livre de células. O material foi incubado por 48 horas a 150 rpm e em seguida o sobrenadante foi removido por centrifugação, o solo foi lavado e seco para detecção do percentual de remoção do óleo do solo de acordo com Luna et al., (2009).

Tabela 2. Caracterização físico-química do solo arenoso do Cabo de Santo Agostinho, PE, Brasil.

Parâmetros	Resultados
pH	8
Umidade	8,7%
Nitrogênio	7,9g/Kg
Matéria orgânica	1,65g/Kg
Carbono orgânico	0,96g/Kg

Análises estatísticas – Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do software Statistica® 6.0 e BioStat® 5.0.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

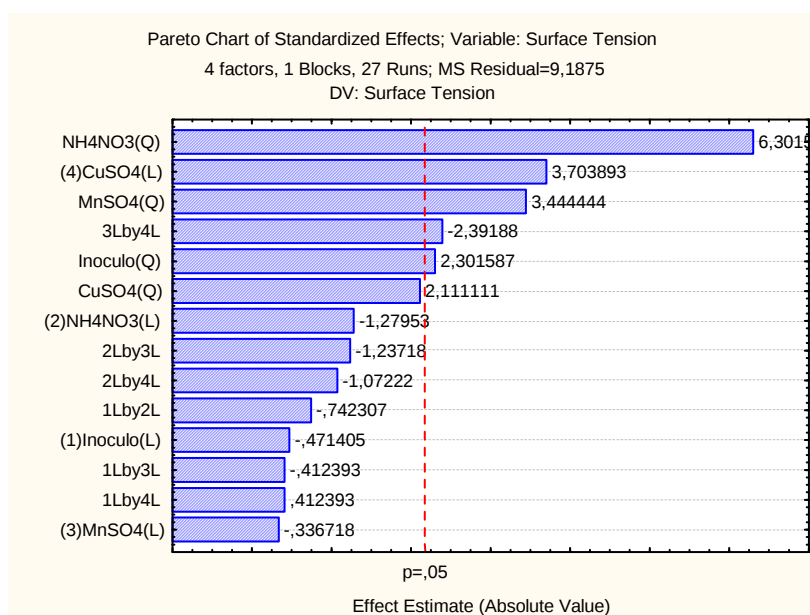
Os valores de tensão superficial variaram de 32mN/m a 60,6mN/m, o que mostra a influência das variáveis escolhidas na resposta. Os menores valores ocorreram nas condições do ponto central, tanto no cultivo estático quanto no cultivo sob agitação, que apresentaram uma pequena variação, indicando repetibilidade do processo (tabela 3). De acordo com Paraszkievicz et al., 2002, há poucos relatos na literatura de fungos filamentosos capazes de converter esteróides na síntese de agentes biosurfactes.

Os resultados obtidos no cultivo estático foram mais promissores, sendo selecionados para análise através do software Statistica® 6.0. As variáveis isoladas exerceram influência na redução da tensão superficial: X1²- Inóculo, X2²- NH₄NO₃, X3²- MnSO₄H₂O e X4- CuSO₄H₂O ao nível de significância de 95%, bem como a interação linear entre MnSO₄H₂O (X3) e CuSO₄H₂O (X4) que promoveu um efeito negativo na redução da tensão superficial, de acordo com o gráfico de pareto, enquanto que a fonte de nitrogênio (NH₄NO₃) foi a variável que exerceu maior influência no processo (Figura 1).

Tabela 3. Atividade Emulsificante e Tensão Superficial observadas nas 27 condições experimentais de *Curvularia lunata* UFPEDA885 em óleo diesel.

Condições Experimentais	Tensão Superficial (mN/m) Estática – Y1	Tensão Superficial (mN/m) Agitação – Y2	E24(%) para as fontes oleosas					
			Óleo de Soja	Óleo de soja queimado	Óleo de canola	Óleo mineral	Óleo diesel	Óleo de motor
1	34,8	54,86	75	33	55	50	33	75
2	48,5	60,63	75	53	40	67	33	50
3	41,5	55,56	45	33	48	60	35	50
4	40,7	56,39	45	27	40	50	29	60
5	40,1	53,9	50	47	48	40	29	40
6	46,2	53,53	45	20	45	37	29	95
7	40,7	56,52	45	33	50	55	35	56
8	41	56,67	45	40	45	60	29	83
9	38,7	40,91	45	55	45	55	29	71
10	48,5	57,41	50	27	55	50	23	88
11	41,2	52,26	40	40	45	60	27	68
12	46	58,41	45	33	50	50	29	98
13	40,8	52,95	50	30	45	48	23	75
14	48,4	50,12	25	40	70	50	23	90
15	37,6	53,08	45	20	50	45	24	75
16	40,1	53,98	40	20	50	45	14	60
17	44	55,05	50	27	60	53	14	90
18	37,3	52,31	45	33	45	53	25	74
19	55,5	50,19	50	33	50	48	24	98
20	47	50,36	50	25	50	50	30	98
21	40,8	51,44	45	35	50	50	18	78
22	46,5	50,67	45	25	50	50	24	88
23	45,5	51,08	50	27	50	50	24	75
24	43,2	52,09	50	33	45	47	24	70
25	34,3	44,17	73	47	60	60	33	98
26	34,4	43,76	75	46	60	60	33	98
27	32,9	44,01	75	47	60	58	33	97

E24(%) é o índice de emulsificação.

Figura 1. Gráfico de Pareto indicando as variáveis que apresentaram maior influência na redução da tensão superficial por *Curvularia lunata* (UFPEDA 885) em cultivo estático, ao nível de significância de 95%.

Realizou-se ainda o ajuste através da ANOVA, visando verificar a qualidade do modelo adotado através do Coeficiente de Determinação (R^2), que fornece uma medida da proporção da variação (pela equação de regressão) e o teste t, que avalia a significância da regressão (tabela 4).

Tabela 4. Análise de Variância (ANOVA) do modelo quadrático de regressão.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
Regressão	522,3	3	174,1	19,8	0,04
Resíduos	202,2	23	8,8	-	-
Total	724,5	26	-	-	-

$$R^2 = 0,72.$$

O modelo utilizado foi considerado válido pois o F calculado (19,8) foi superior ao F crítico (3,03), o que possibilitou a realização de curvas de superfícies resposta para as variáveis significantes em função da tensão superficial. Estes gráficos foram construídos com base no modelo reparametrizado da equação de regressão: **Y1 (Tensão Superficial) = 35,8 + 1 X1² + 3,7 X2² + 1,8 X3² + 2,3 X4 - 1,8 X3X4**. As curvas revelaram uma tendência de otimização do processo com as variáveis nas condições do ponto central, com a exceção do CuSO₄H₂O cuja concentração ótima quando interagindo com as demais variáveis foi de 0,1g/L (Figura 2). De acordo com Banat (1995), o nitrogênio e o manganês exercem importante influência na produção de biossurfactantes, sendo necessário que se estabeleça níveis ótimos de produção visando a otimização de processo.

O biossurfactante foi isolado na concentração de 2,2g/L. Após análises químicas este biossurfactante foi caracterizado como um polímero composto por proteínas (0,02%), polissacarídeos 6,5% e ácidos gráxos (87%), tabela 5. Paraszkievicz et al., (2002) obtiveram 2,6g/L de biossurfactante produzido por *C. Lunata* IM2901 após 47 horas de incubação em meio PL2, utilizando um substrato hidrofóbico. Este biossurfactante apresentou em sua composição 48% de carboidratos, 25% de proteínas e nenhum ácido graxo. A natureza do substrato, as concentrações de íons como fósforo, nitrogênio, magnésio, manganês, oxigênio e ferro no meio de cultivo, além das condições de cultivo são fatores que influenciam no tipo, na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzidos (Georgiou et al., 1992).

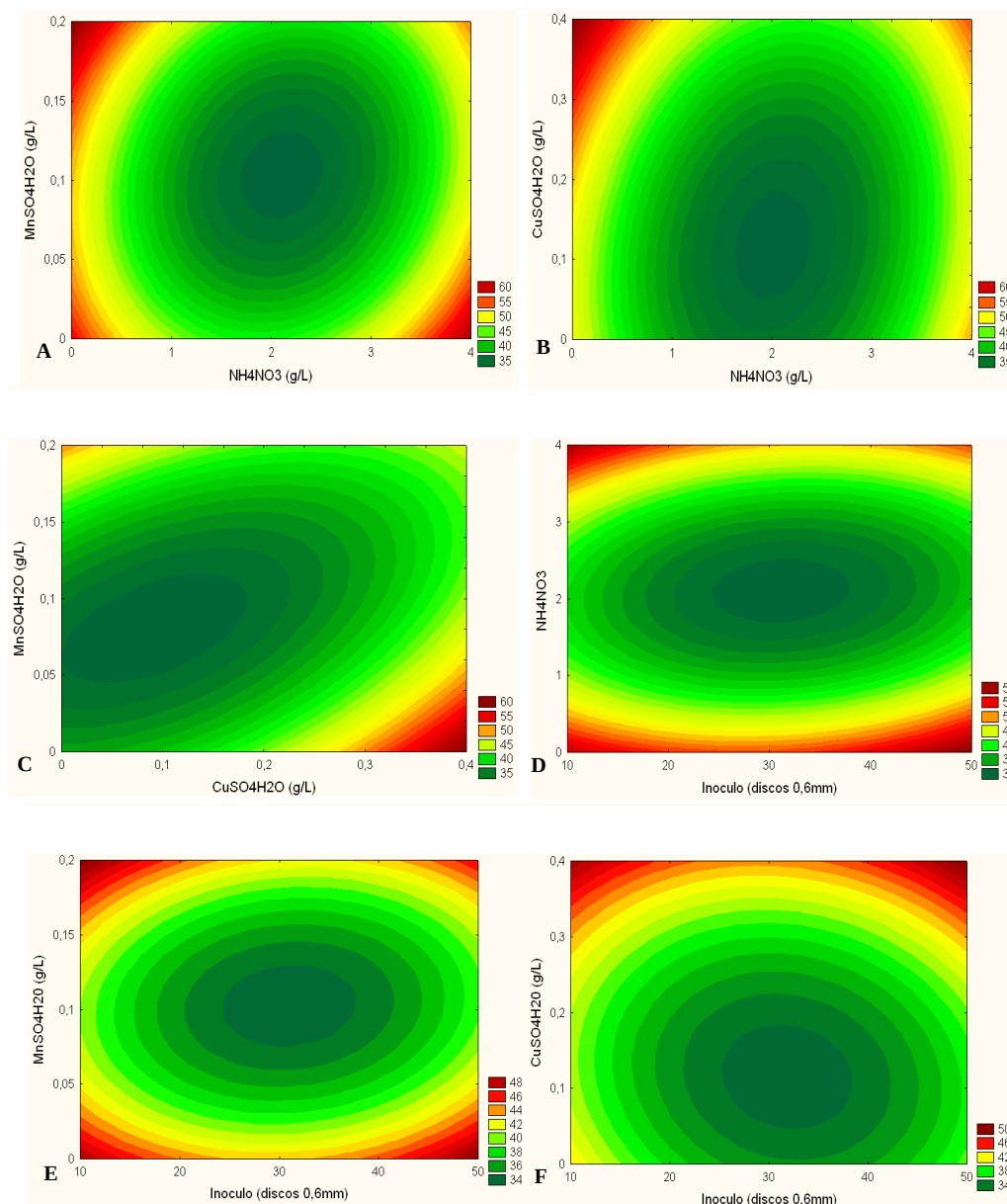


Figura 2. Superfícies de respostas em função da tensão superficial, para a razão $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ versus NH_4NO_3 (A), $\text{CuSO}_4 \text{H}_2\text{O}$ versus NH_4NO_3 (B), $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ versus $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (C), inoculo versus NH_4NO_3 (D), inoculo versus $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (E) e inoculo versus $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ (F).

Em relação à fitotoxicidade do extrato bruto do biossurfactante, o índice de germinação das sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus*) foi de 90,8. Considera-se que quando o índice de germinação é superior a 80 não há toxicidade sendo este um dos mais importantes critérios usados pelas agências ambientais do mundo (Tiquia *et al.* 1996). A toxicidade dos hidrocarbonetos pode provocar inibição da germinação e a redução no crescimento da raiz de sementes vegetais (Rivera-Cruz e Trijillo-Narcía, 2004).

Para *Artemia salina* o extrato bruto do biossurfactante nas concentrações de 25% e 30% promoveram a letalidade de, respectivamente 50% da população testada-CL50 e 100% da população. Em ensaios semelhantes, Silva et al., (2010) obtiveram CL50 em 52% do extrato bruto do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

O biossurfactante produzido por *C. Lunata* (UFPEDA 885) removeu 93,5% do óleo automotivo que impregnou o solo por 48 horas (figura 3). Pacheco et al., (2010) utilizando o biossurfactante produzido, durante um mês, por *Rhodococcus erythropolis* na biorremoção de óleo cru em solo, obteve remoção de 97 a 99% pelo biossurfactante produzido. Makkar e Cameotra (1999) observaram remoção de 56% de óleo adsorvido em areia pelo biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.



Figura 3. Aspecto do solo arenoso antes da contaminação, após contaminação por óleo automotivo e após biorremoção de 93,5% do óleo pelo biossurfactante produzido por *C.lunata*.

Ainda de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, houve a formação de emulsão em presença de todas as fontes oleosas testadas, indicando que *C.lunata* UFPEDA885 é produtor de um bioemulsificante cuja atividade máxima ocorreu com o óleo automotivo (98%) (Tabela 2). Com base neste resultado, o óleo lubrificante automotivo foi selecionado para caracterização de efeito e estabilidade da emulsão. Paraszkievicz *et al.*, (2002) em ensaios utilizando *C. lunata* obteve 100% de atividade emulsificante frente a óleo mineral e 95% após contato do biossurfactante com óleo vegetal e querosene, estes foram os óleos selecionados pelo autor para avaliar a estabilidade da emulsão.

Fatores ambientais como salinidade, pH e temperatura afetam a atividade do biossurfactante. De acordo com as temperaturas avaliadas, não houve redução significativa na atividade do bioemulsificante produzido por *C.lunata* em 4, 20, 50 e 100°C. Na temperatura de 125°C a atividade emulsificante diminuiu 80%. Apesar desta redução na atividade do bioemulsificante, este percentual de emulsificação é considerado pela literatura como um eficaz bioemulsificante (Ilori et al., 2005). Kim et al., (1997),

avaliando o surfactante sintético SDS a temperaturas acima de 70°C, encontraram diminuição na atividade emulsificante chegando até 20% de atividade a 100°C.

O pH 2,0 foi a única condição onde a atividade emulsificante diferiu significativamente estando abaixo de 95%. Nas demais condições de pH (4 a 12) esta atividade esteve entre 95% e 100%. Sarubbo *et al.*, (2007) detectou estabilidade emulsificante de surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, entre pH 3 e 11, com redução na atividade nos valores de pH fora desta faixa.

Por fim, o efeito da força iônica na atividade do bioemulsificante, ocorreu em todas as concentrações de NaCl testadas estando a atividade emulsificante entre 45% e 75% (Tabela 5). Méndez-Vilas (2007) observaram índice de emulsificação entre 50% e 40% para o bioemulsificante produzido por *Pseudomonas fluorescens* em concentrações de 5 a 30% de cloreto de sódio.

Tabela 5. Caracterização de efeito e estabilidade da emulsão produzida por *Curvularia lunata* UFPEDA885.

Caracterização do Biossurfactante		Condições															
		pH						Temperatura (°C)						NaCl (%)			
		2	4	6	8	10	12	4	20	50	100	125	5	10	15	20	25
Atividade	Efeito	73 ^a	100	100	95	100	95	87	95	100	100	80 ^a	60 ^a	75	60 ^a	83	50 ^a
Emulsificante (%)	Estabilidade	73 ^a	100	95	95	95	95	85	90	100	100	80 ^a	60 ^a	75	50 ^a	60 ^a	45 ^a

Análise de variância de Kruskal-Wallis, Student Newman-Keuls = p<0,5

5.4 CONCLUSÕES

Curvularia lunata (UFPEDA 885) é produtor de biossurfactante, reduzindo a tensão superficial até 32,9 mN/m na condição estática. A redução da tensão superficial foi otimizada com inóculo, nitrogênio e manganês nas concentrações de 30 discos, 2g/L e 0,1g/L, respectivamente, enquanto que para o cobre a melhor concentração para redução da tensão foi de 0,1g/L. O biossurfactante isolado composto por proteínas, carboidratos e ácidos graxos removeu 93,5% de óleo automotivo contaminando solo arenoso e ofereceu baixa fitotoxicidade frente à sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus*) e para *Artemia salina* a CL50 ocorreu a partir de 25% do extrato bruto do biossurfactante. Além disso, este fungo produz um bioemulsificante capaz de promover a emulsificação de até 98% de óleo automotivo, com elevada estabilidade em diferentes valores de pH, e temperatura. *C.lunata* é considerado promissor produção de biossurfactante e bioemulsificante visando aplicação em processos de biorremediação.

5.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Capítulo 6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões do Artigo 1

- ✓ *Paecilomyces* sp. (F11) e *Penicillium* sp. (F25) destacaram-se como produtores de manganês peroxidase e lignina peroxidase;
- ✓ *Penicillium* sp. (F33) destacou-se como melhor produtor de lacase e os estipes *Penicillium* sp. (F21) e *Penicillium* sp. (F24) foram bons produtores de lignina peroxidase.
- ✓ *Curvularia lunata*-UFPEDA885 (F4) foi selecionado pela produção simultânea de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase;

6.2 Conclusões do Artigo 2

- ✓ No planejamento fatorial, a variação de pH e temperatura promoveu um aumento de 9 vezes na produção de lacase inicial, com relação à produção de lignina peroxidase, o aumento foi de 24 vezes e, por fim, para produção de manganês peroxidase, o aumento foi de 15 vezes;
- ✓ A produção de lacase é influenciada com o aumento do pH e varia também de acordo com a interação entre pH e temperatura. A maior produção desta enzima foi em pH 4 e 40°C;
- ✓ O pH e a temperatura não afetaram diretamente a produção de lignina peroxidase por *C. lunata*, a maior produção desta enzima ocorreu em pH 4 e 40°C após 72 horas de incubação;
- ✓ A produção de Manganês Peroxidase variou em função da interação do pH e da temperatura. A maior produção desta enzima ocorreu em pH 3.4 e 65°C.
- ✓ A lacase produzida por *C. lunata* tem baixa estabilidade e o pH ideal para a atividade enzimática é em torno de 3.4. A temperatura ideal é por volta de 65°C após 72 horas de incubação;
- ✓ A lignina peroxidase produzida por *C. lunata* é estável em valores de pH entre 1 a 8 e 25°C a 80°C. Como pH e temperatura ideais para atividade desta enzima tem-se respectivamente 6.2 e 65°C;
- ✓ A manganês peroxidase produzida por *C. lunata* é uma enzima estável, que apresenta pH e temperatura ótimos para atividade por volta de 3.4 e 50°C;

6.3 Conclusões do Artigo 3

- ✓ *C. lunata* é produtor de biossurfactante reduzindo a tensão superficial da água de 70mN/m para até 32,9mN/m;
- ✓ No planejamento fatorial, observou-se que as condições no ponto central: concentração do inóculo de *C.lunata* (30 discos de gelose de 0,6mm), o nitrato de Amônio (2g/L) e o sulfato de manganês (0,2g/L) influenciaram na otimização da produção do biossurfactante;
- ✓ O sulfato de cobre utilizado $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ promoveu maior redução da tensão superficial somente quando utilizado na concentração de 0,1g/L;
- ✓ O biossurfactante isolado é composto de proteínas, carboidratos e ácidos graxos;
- ✓ O extrato bruto do biossurfactante não ofereceu toxicidade frente às sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus*) de testadas;
- ✓ O biossurfactante removeu 93,5% de óleo automotivo lubrificante presente em solo arenoso;
- ✓ *C. lunata* é produtor de um importante bioemulsificante, promovendo a emulsificação de 98% de óleo lubrificante automotivo;
- ✓ A emulsão formada foi estável em pH de 2 a 12, emulsificando de 73% a 100% de óleo automotivo;
- ✓ Em relação à temperatura, a emulsão foi estável, capaz de emulsificar o óleo automotivo entre 80 e 100% em 4°C a 125°C;
- ✓ Por fim, a salinidade influenciou mais na estabilidade da emulsão, promovendo a emulsificação do óleo automotivo entre 45% e 75%.

Capítulo 7. Referências

7. REFERÊNCIAS

- Abdanur, A. 2005. *Remediação de solo e água subterrânea contaminados por hidrocarbonetos de petróleo: Estudo de caso a Refinaria Duque de Caxias/RJ*. 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.
- Abouseoud, M., Maach, R., Amrane, A. 2007. Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Trends in Applied Microbiology* p. 340-347.
- Adbusoye, S.A., Ilori, M.O., Obayori, O.S., Oyetibo, G.O., Akindele, K.A., Amund, O.O. 2010. Efficiency of cassava steep liquor for bioremediation of diesel oil-contaminated tropical agricultural soil. *Environmentalist*, 30: 24-34.
- Aguiar-Filho, J.M.M. 2008. *Análise enzimática de fungos lignocelulósicos cultivados em vinhaça e bagaço*. 80f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo.
- Albert, L.J., Smith, E., Waller, N., Stewart, R., Weber, J. 2010. Bioavailability of residual polycyclic aromatic hydrocarbons following enhanced natural attenuation of creosote-contaminated soil. *Environmental Pollution* 158: 585-591.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwel, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4 ed, p. 26-60. New York, John Wiley.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwel, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4 ed, p. 26-60. New York, John Wiley.
- Almeida, K.C.S. 2006. *Avaliação da contaminação da água do mar por benzeno, tolueno, xileno na região de Ubatuba, litoral norte (SP) e estudo da degradação destes compostos por radiação ionizante*. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANP, Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e Gás Natural, 2007. *Agência Nacional do Petróleo*, Rio de Janeiro, 2007; Disponível em: <http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2007.asp#secao_2 S> Acessado em 09 fev 2008.
- Arora, D.S., Gill, P.K. 2001. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 602-605.
- ATLAS, R. M., 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Bioremediation & Biodegradation*. 317 – 327.
- Azevedo, F.A., Chasin, A.A.M. 2003. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Paulo, RiMa Editora. 340p.
- Baird, C. 2002. *Química Ambiental*, 2ed. Porto Alegre, E. Bookman. 622p.
- Balan, D.S.L. 2001. Descoloração de corantes e efluentes têxteis. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.

Banat, I. M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresour. Technol.* 51, 1-12.

Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 495-508.

Barathi, S. Vasudevan, N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* 26: 413-416.

Barclay, M., Hart, A., Knowles, C.J.; Meeussen, J.C.L., Tett, V.A. 1998. Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 223-231.

Barracough, D., Kearney, T., Croxford, A. 2005. Bound residues: Environmental solution or future problem? *Environmental Pollution* 133: 85-90.

Batista-Filho, A., Almeida, J.E.M., Franklin, C., Leite, L.G., Alves, L.F.A. 2003. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de *sporothrix insectorum* em fermentação líquida aeróbica. *Arquivos do Instituto Biológico*. 70(4):491-496.

Bayman, P., Radkar, G.V. 1997. Transformation and tolerance of TNT (2,4,6-trinitrofluorene) by fungi. *International Biodeterioration. & Biodegradation*. 39: 45-53.

Beaudete, L.A., Davies, S., Fedorak, P.M., Ward, O.P., Pickard, M. A. 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Apply Environ. Microbiol* 62: 2554-59.

Bednarski, W.; Adamczak, M.; Tomasik, J.; Płaszczek, M. 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresour. Technol.* 95, 15-18.

Benincasa, M. 2007. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. *Curr. Microbiol.* 54:445- 449.

Bento, D.M. 2005. *Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos* 112f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

BETANCUR, G.J.V. 2005. *Avancos em Biotecnologia de Hemicelulose para Produção de Etanol por Pichia stipitis*. 109f. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Biocatalysis/Biodegradation. 2005. Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways primarily for enobiotic, chemical compounds. *THE UNIVERSITY OF MINNESOTA*, Minnesota. Disponível em <http://umbbd.ahc.umn.edu/pha2/pha2_image_map.html>. Acesso em: 25 mai 2009.

Biodieselbr. *Diesel combustível*. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/diesel/diesel-combustivel.htm>>. Acesso em: 25 jan 2010.

- Blaise, C. 1982. Introduction to ecotoxicological concepts. Proceedings of Biological testing and hazard assessment. Environmental Canada, 11-47. In: Zagatto, P.A., Bertolotti, E. 2006. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. RIMA. 478p.
- Bognolo, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces* 152: 41-52.
- Bollag, J. M., Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 849-854.
- Bonugli-Santos R.C, Durrant, L.R., Silva, M., Sette, L.D. 2010. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbial Technology*,. 46:32-37.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterium cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1007-1019.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74:63-67.
- Bragato, M. 2006. *Tratamento “in situ” de solo contaminado por derivado de petróleo e metais*. 194f. Tese (Doutorado no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Büyüksönmez, F., Hess, T.F., Crawford, R.L., Watts, R.J. 1998. Toxic effects of modified fenton reagents on *Xanthobacter flavus* FB71. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (10): 3759 – 3764.
- Cajthaml, T. Pacakova, V. Sasek, V. 2001. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemické. Listy*. 95: 404.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50:520-529.
- Cameron, D.R., Cooper, D.G., Neufeld, R.J., 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1420-1425.
- Capuzzo, J.M., Moore, M.N., Widdows, J. 1988. Effects of toxic chemicals in the marine environment: predictions of impacts from laboratory studies. *Aquatic Toxicology*. 11:303-311.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351-368.
- Cerniglia, C.E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19: 324-333.
- Cerniglia, C.E., Perry, J.J. 1973. Crude oil degradation by microorganisms isolated from the marine environment. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 13:299-306.

CETESB, 2008. *Gerenciamento de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo*. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont>. Acesso em: 12 Jan 2010

CETESB, GTZ. 2001. *Manual de gerenciamento de áreas contaminadas*, 2 ed. São Paulo, CETESB. 389p.

Chagas-Spinelli, A.C. 2007. *Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel*. Tese (Doutorado) -Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

Chaîneau, C.H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., Oudot, J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperature agricultural soil. *The science of the total environment*, 227: 237-247.

Champion, J.T., Gilkey, J.C., Lamparski, H., Retterer, J., Miller, R. M. 1995. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science*, n. 170, p. 569-574.

Chapman, P.M., Ho, T.K., Munns, Jr.W.R., Solomon, K., Weinstein, M.P. 2002. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin* 44:271-278.

Chung, W.H. 2005. A new species of *Curvularia* from Japan. *Mycotaxon* 91:49-54.

Claus, H. 2004. Laccases: structure, reaction, distribution. *Micron*, New York, 35:93-96.

Clemente, A.R., Durrant, L.R. 2002. *Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pro fungos*. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

Coelho, G.D. 2007. Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB 444 durante crescimento em solo. 101f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

Colen, G. 2006. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. 122f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)- Faculdade de Farmácia (UFMG), Belo Horizonte, MG.

Colla, L.M., Costa, J.A.V. 2003. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, 13:85-103.

Cooper, D. G.; Paddock, D. A. 1984. *Torulopsis petrophilium* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1426-1429.

Corbetta, G., 19964. Rassegna der specie Del genere *Curvularia*. *Riso* 4:3-23.

Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, A., Haddad, R., Eberlin M.N., Contiero, J. 2006. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils, *Process Biochemistry* 41: 483–488.

- Cotta, J.A.O. Aplicação de vermicompostagem para a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, Tese (doutorado), 199p., 2008.
- Couto, S.R., Herrera, J.L.T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccase: a review. *Biotechnology advances* 24(5): 500-513.
- Couto, S.R., Moldes, D., Sanromán, A. 2006. Optimum stability condictiones of pH and temperature for ligninase and manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Application to *in vitro* decolorization of Poly R478 by MnP. *World J. Microb. Biotechnol.*, 22: 607-612.
- Crapez, M.A.C., Borges, A.L.N., Bispo, M.G.S., Pereira, D.C. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje* 30:32-37.
- Cunha, C.D., Rosário, M., Rosado, A.S., Leite, S.G.F. 2004. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry* 39: 2277-2282.
- De Souza, C.G., Peralta, R.M. 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal Basic Microbiology* 43: 278-286.
- Delhomme, P., Chappé, J., Grenier, K., Pinto, M., Martha, C. 2010. [Reducing air-pollution: A new argument for getting drivers to abide by the speed limit?](#) *Accident Analysis & Prevention* 42(1):327-338.
- Delle Site, A. 2001. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbent/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *Journal Physical and Chemical Reference Data* 30:187-439.
- Desai, A. J., Banat, I. M. 19997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:47-64.
- Dietrich, D., Hickey, W.J., Lamar, R. 1995. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenil, and 2,2', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenil by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3904-3909.
- Diplock, E.E., Mardlin, D.P., Killham, K.S., Paton, G.I., 2009. Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. *Environmental Pollution* 157: 1831-1840.
- Douglas, M.B. 2005. Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos-Rio Grande/RS. 119f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia física, química e geológica) – Universidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- D'Souza, T.M, Merrit, C.S., Reddy, C.A. 1999. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12):5307-13.
- Du, Z., Sun, X.B. 2010. Purification and characterization of laccase from *Curvularia trifol*. *Advanced material research*, 113-114: 2215-2219.

Durán, N., Rosa, M.A., D'annibale, A., Gianfreda, L. 2000. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidasas) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 31(7):907-931.

Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. England. Commonwealth Mycological Institute.

EPA (United States Environmental Protection Agency) 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 ed. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oilspill/index.htm>>. Acesso em: 20 mai 2010.

Esposito, E.; Azevedo, J.L. 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Ed. EDUCS, 520p.

Fasanella, C.C. 2008. *Ação das enzimas lignolíticas produzidas por Aspergillus Níger e Penicillium sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente*. 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo.

Feng, Q.X., Ma, X.P., Zhou, L.H., Shao, D.B., Wang, X.L., Qin, B.Y. 2009. EOR pilot tests with modified enzyme. *SPE Reservoir Evaluation and Engineering*, 12(1): 79-87.

Fernandes, M. 1994. *Efeito da 9,10-fenatrenoquinona na fotodegradação do petróleo*. 83f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Ferreira, L.F.R. 2009. *Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos*. 135f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ferreira, L.G.J. 2002. *Saúde pública*. 198f. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Ferreira, L.S. 2010. *Caracterização de isolados de Curvularia SP. Endofíticos de milho (Zea mays L.) por parâmetros morfológicos e moleculares*. 119f. Dissertação (Mestrado)- Pós-graduação em genética da Universidade Federal do Paraná, Paraná.

Ferreira, W.A. 2007. *Avaliação preliminar de indicadores de qualidade de água da bacia hidrográfica formadora do Rio Guandu*. Dissertação (mestrado) em química ambiental na Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Fingas, M. 1994. Evaporation os oil spills. *Journal of the ASCE*, 1-8. Agência Nacional do Petróleo. Anuário Estatístico 2007. Seção 3 - Comercialização. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/conheca/anuario_2007.asp>. Acesso em: 14 abr 2008.

Folha UOL, 2010. Disponível em:

<<http://www1.folha.uol.com.br/folha/ambiente/ult10007u728877.shtml>>. Acesso em: 15 mar 2010

Gadd, G.M. 2001. Fungi in bioremediation. 496p. Ed. Cambridge University Press, United kingdom.

Gautam, K.K., Tyagi, V.K. 2006. Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science* 55:155-166.

Georgiou, G., Lin, S.C., Sharma, M.M. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, 10:60-65.

Godoi, E.L. 2008. *Monitoramento de água superficial densamente poluída- o córrego Pirajuçara, Região Metropolitana de São Paulo, Brasil*. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

Gold, M.H., Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degradating basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57(3):605-622.

Gomes, E.; Aguiar, A.P.; Carvalho, C.C.; Bonfá, M.R.B.; Silva, R.; Boscolo, M. 2009. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of syntetic dyes. *Brazilian Journal of microbiology* 40:31-39.

Gomes, E.B. 2004. *Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo terminal portuário de Suape-PE*. 109f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Química de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

Gomes, E.B., Silva, R.F., Rosado, S., Pereira-JR, N. 2010. Biotreatment of diesel waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR). *International Biodeterioration & Biodegradation*, doi: 10.1016/j.ibiod.2010.04.003.

Gomes, E.B., Soriano, A.U., Miranda, R.C.M., Sousa, M.F.V.Q., Pereira-Jr., N. 2009. Biodegradation of stored Jet fuel by a *Nocardia* sp. isolated from contaminated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(5):1279-84.

Gonzales, L., Hernández, J.R., Perestelo, F., Carnicero, A., Falcón, M.A. 2002. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by lacase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 474-481.

Guiguer, N. 2000. Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento. *Waterloo Hydrogeolic*. 356p.

Gunther, H. Poluição dos solos. In: Philippi JR.A., Pelicioni, M.C. 2005. *Educação Ambiental e sustentabilidade*. São Paulo, Manole, pp.191.

Gusmão, N.B.; Silva, R.; Maciel, C.C.S.; Souza, C.S.; Vance-Harrop, M.H.; Nascimento, A.F.; Souza, M.F.V.Q. 2008. Biosurfactant production by fungi, In: Latin American Biodeterioration Society Meeting Abstracts, *International Biodeterioration & Biodegradation* 62:2-20.

Hamid, M., Rehman, K,U. 2009. Potential applications of peroxidases. *Food chemistry*, 115: 1177-1186.

Hanson, K. G., Desai, D., Desai, A. J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques* 7:745-748.

- Harvey, S., Elashvilli, I., Valdes, J. J., Kamely, D., Chakrabarty, M. 1990. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. *Biotechnology* 8:228-230.
- Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454-466.
- Hommel, R.K., Weber, L., Weiss, A., Himmelreich, U., Rike, O., Kleber, H.P., 1994. Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *J. Biotechnology*, 33, 147-155.
- Husain, Q., Husain, M., Kulshrestha, Y. 2009. Remediation and treatment of organopollutants mediated by peroxidases: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2): 94-119.
- Ilori, M. O., Amobi, A.C., Odocha, A.C. 2005. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, 61:985-992.
- Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência. Rural* 37(4): 1192-1201.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 16:396 – 403.
- Kamida, H.M., Durrant, L.R., Monteiro, R.T.R., Armas, E.D. 2005. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. *Química Nova* 28(4):629-632.
- Kanayama N, Suzuki T, Kawai K, (2002) Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. *J. Biosci Bioeng*. 93(4):405-410.
- Karan, J., Nicell, J.A. 1997. Potential applications of enzymes in wastes treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 69:141 – 153.
- Kästner, M., Richnow, H.H., 2001. Formation of Residues of Organic Pollutants Within the Soil Matrix – Mechanisms and Stability”. In: Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (eds), *Treatment of Contaminated Soil*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 219-251.
- Kim, H., Yoon, B., Lee, C., Suh, H., Oh, H., Katsuragi, T., Tani, Y. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84: 41-46.
- Kim, Mi-Sun, Huh, E.J., Kim, H-K., Moon, K.W. 1998. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by selectec white-rot fungi and the influence of lignin peroxidase. *Journal Microbiology and Biotechnology*, 8(2):129-133.
- Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, S., O., Lee, J. D., Lee, T. H. 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnology Applied Biochemistry* 31:249-253.

- Kiran, G.S., Hema, T.A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T.A., Rajeetha Ravji T., Natarajaseenivasan, K. 2009. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2): 250-256.
- Kirk, T.K., Farrel, R.L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41:465-505.
- Kitamoto, D.; Ikegami, T.; Suzuki, G. T.; Sasaki, A.; Tkeyama, Y.; Idemoto, Y.; Koura, Y.; Yanagishita, H. 2001. Microbial conversion of nalkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)* *Biotechnol. Lett.* 23, 1709-1714.
- Koh, C.H., Khim, J.S., Kannan, K., Villeneuve, D.L., Senthilkumar, K., Giesy, J.P. 2004. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-TCDD equivalents (TEQs) in sediment from the Hyeongsan River, Korea. *Environmental Pollution* 132: 489-501.
- Kunz, A., Zamora-Peralta, P., Moraes, G.A.S., Durán, N. 2002. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Química Nova* 25: 78-82. 2002.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M. I. 2001. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods* 46: 109-120
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54(3): 305-315.
- Lee, K, Moon, S-H, 2003. Eletroenzimatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, 102: 261-268
- Lima, A. S. 1996. *Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por Saccharomyces lipolytica*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Lin, T.C., Pan, P.T., Cheng, S.S. 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials* 176:27-34.
- Liu, Z.F., Zeng, G.M., Zhong, H., Fu, H.Y., Liu, X.I. 2010. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. *Journal of Central South University of Technology*. 17:516-521.
- Lopes, W.A., Andrade, J.B. 1996. Fonte, formação, reatividade e quantificação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) na atmosfera. *Química Nova* 19(5):497-516.
- Lunstedt, S. 2003. Analysis to PAHs and transformation products in contaminated soil and remedial processes. 56f. Tese (doutorado) -Faculty of Science and Technology, Department of Chemistry, Umea University, Sweden. Disponível em: <www.divaportal.org/umu/theses/abstract.xsql?dbid=57>. Acesso em: 29 abr 2010.

- Ma, J., Ding, Z., Wei, G., Zhao, H., Huang, T., 2009. Sources of water pollution and evolution of water quality in the wuwei basin of Shiyang river, Northwest China. *Journal of Environmental Management* 90(2):1168-77.
- Machado, K.M.G., Matheus, D.R.. 2006. Biodegradation of remazol brilliant blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal Of Microbiology* 37: 468-473.
- Maciel, C.C.S. 2008. *Biodegradação de querosene de aviação por fungos filamentosos*. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungo) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.
- Maciel, C.C.S., Souza, C.S., Silva, R., Villela, A.L.S., Queiroz, M.F.V.S., Gusmão, N.B. 2010. Degradação de querosene de aviação por *Penicillium* spp. *Diálogos e Ciência* 8(3): 69-75.
- Maciel, C.C.S.; Sousa, M.A.; Gusmão, N.B.; Campos-Takaki, G.M. 2010. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*, in press, 2011.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 1999. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactantes and Detergents* 2: 237-241.
- Maldonado, R.R., Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I. 2002. Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados utilizando meio industrial. Paraná, 2002. Disponível em: <www.engq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t028.doc>. Acesso em: 11mar 2010.
- Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vazquez, R., Saucedo-Castañeda, G., Barrera-Cortés, J. 2008. Bioremediation of na aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61: 151-160.
- Manocha, M. S., San- Blas. G., Centeno. 1980. Lipid composition of paracciodioids brasilienses: possible correlation witer virulence of different strains. *Journal of General Microbioly* 177:147-154
- Mariano, A.P. 2006. *Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel*. 162f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- Mariano, J. B. 2005. Impactos Ambientais do Refino de Petróleo. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 230 p.
- Martins, V. G. 2005. *Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação*. 156f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- Matheus, D. C.; Okino, L. K. 1998. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: Bononi, V. L. R.; Grandi, R. A. P. (Eds.). *Zigomicetos, Basidiomicetos*

e *Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo: Instituto de Botânica, p. 107-139.

Mazzeo, S.E.C. 2009. *Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por micro-organismos, utilizando os sistemas teste de Allium cepa e cultura de células de mamíferos*. 144f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

Mazzuco, L. Maria. 2004. *Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados com Óleo Diesel*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

Melo, I. S., Azevedo, J. L. 1997. *Microbiologia Ambiental*, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. p. 269-292.

Melo, I.S.; Azevedo, J.L. 2008. *Microbiologia ambiental*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 647p.

Méndez-Vilas, A., 2007. Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 340-347.

Milani, E.J., Brandão, J.A.S.L., Zalán, P.V., Gamboa, L.A.P. 2000. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. *Brazilian Journal of Geophysics* 18(3): 351-395.

Ministério da Ciência E Tecnologia, 2002. Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases do efeito estufa, Relatório de Referência. Emissão de gases do efeito estufa de queima de biomassa no cerrado não antrópico utilizando dados orbitais, 53p.

Moreira Neto, S. L. 2006. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. São Paulo. Disponível em: <www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses_dissert/sergio2006.pdf>. Acesso em: 23 fev 2010.

Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* 60:371-380.

Mycobank, 2010. Disponível em: <http://www.mycobank.org/BioloMICSServer.aspx?Link=T&Rec=265873>, acesso: 06/12/10.

Narkhede, K.P., Vidhale, N.N. 2005. Biopulping studies using an effluent isolate *Curvularia lunata* LW6. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 385-388.

Neidleman, S. L. 1991. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology* 45: 88 – 91. apud Colen, G. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

Nerurkar, A.S., Hingurao, K.S., Suthar, H.G. 2009. Bioemulsifiers from marine microorganisms. *Journal of Scientific & Industrial Research* 68: 273-277.

Netto, A.D.P., Moreira, J.C., Dias, A.E.X.O., Arbilla, G., Ferreira, L.F.V., Oliveira, A.S., Barek, J. 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. *Química Nova* 23(6): 765-773.

Nikakhtari, H., Wanning, S., Kumar, P., Nemati, M., Hill, G.A. 2010. Scale up of diesel oil biodegradation in a baffled roller bioreactor. *Chemosphere* 79:1010-1016.

Nitschke, M., Pastore, G.M. 2002. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova* 25:772-776.

Nunes, G.L. 2006. *Diversidade e estrutura de comunidades de Bactéria e Archaea em solo de mangue contaminado com hidrocarbonetos do petróleo*. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.

Odum, E. 1997. *Fundamentos de Ecologia*. 5ª Edição. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. 88p.

Oliveira, 2010. *Avaliação da aclimação de Pichia stipitis ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores Celulares*. Dissertação (Mestrado) em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 143 f

Pacheco, G.J., Ciapina, E.M.P., Gomes, E.B., Pereira-Jr, N. 2010. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. *Brazilian journal of microbiology* 41(3): 685-693.

Paoletti, E., Schaub, M., Matyssek, R., Wieser, G., Augustaitis, A., Bastrup-Birk, A.M., Bytnerowicz, A., Günthardt-Goerg, M.S., Müller-Starck, G., Serengil, Y. 2010. [Advances of air pollution science: From forest decline to multiple-stress effects on forest ecosystem services](#), *Environmental Pollution* 158(6):1986-1989.

Paraszkiewicz, K., Kanwal, A., Dlugonski, J., 2002. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology* 92: 287-294.

Paraszkiewicz, K., Przemyslaw, b., Dlugonski, J. 2009. Effect of nickel, copper, and zinc on emulsifier production and saturation of cellular fatty acids in the filamentous fungus *Curvularia lunata*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:100-105.

Pareilleux, A. 1979. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant: effects on respiratory activity and growth. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8, 91-101.

Patentes on line 2010, disponível em: www.patentesonline.com.br , acesso em 08/11/2010.

Pavanelli, L.C. 2007. *Diagnóstico ambiental das áreas susceptíveis a contaminação por metais no pólo industrial de fundição em Loanda, Paraná*. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peixoto, R.M. 2008. *Bioprospecção de micro-organismos do gênero Pseudomonas produtores de biossurfactantes*. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pelczar Jr MJ, Chan ECS, Krieg NR. 2004. *Microbiology: Concepts and Applications*. 6th edition, McGraw-Hill Companies.

Pereira Jr. N., Gomes, E.B., Soryano, A.U. 2009. *Biodegradação de Hidrocarbonetos*. Rio de Janeiro: Escola de Química, UFRJ; FAPERJ; CNPq; PETROBRAS, 75p.

Petrobras. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: < <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-tecnologia/fontes-de-energia/petroleo/>>. Acesso em: 20 dez 2009.

Ponte, F Jr. 2008. Atividade petrolífera no Brasil: impactos ambientais. *Revista Tecnologia* 29: 54-60.

Putzke, J., Putzke, M.T.L. 2002. *Os reinos dos fungos*. Ed. Edunisc-Rio Grande do Sul. 2: 629-638.

Qin, X.S., Huang, G.H., Le, L. 2009. Simulation and optimization technologies for petroleum waste management and remediation process control. *Journal Environmental Management* 90:54-76.

Quarantino, D., Ciaffi, M., Federici, E. and D'annibale, A., 2008. Response surface methodology study on laccase production in *Panus tigrinus* liquid culture. *Biochemical Engineering Journal* 39: 236-245.

Raghukumar, C., Rivoncar, G. 2001. Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 55(4):510 – 514.

Rahman, K.S., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., Banat, I.M. 2003. Enhanced biorremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 90:159-168.

Rahman, K.S., Rahman, T.J., Marchant, R., Banat, L.M. 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low - cost raw materials. *Biotechnology Program* 18:1277-1281.

Rand, G.M., Wells, P.G., McCarty, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environment fate, and risk assessment*. Florida, 2.ed. Taylor & Francis, p.3-66.

Rao, K.R., Rashmi, K., Latha, J.N.L., Mohan, P.M., 2005. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. *Indical Journal of Biotechnology*, 3: 139-143.

Reddy, C.A., D'Souza, T.M., 1994. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:137–152.

Rivera-Cruz, M.C. & Trujillo-Narcía, A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleo nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29(7): 369-376.

Rodrigues, S., Duarte, A.C. 2003. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: Castro, A., Duarte, A., Santos, T. *O ambiente e a Saúde*. Lisboa, Instituto Piaget, p.136-176.

Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 249-252.

Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., Ron, E.Z. 1992. Petroleum bioremediation – A multiphase problem. *Biodegradation* 3: 337-350.

Rosenberg, E., Ron, E.Z., 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:154– 162.

Rufino, R.D. 2006. *Produção de biosurfactante por Cândida lipolytica*. 107f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

Sabaté, J., Vinas, M., Solanas, A.M. 2004. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54:19-25.

Sack, U., Heinze, T.M., Deek, J., Cerniglia, C.E., Martens, R., Zadrazil, F., Fristsche, W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3919-3925.

Sagers, M.J. 1994. Oil spill in Russian arctic. *Polar Geography and Geology*, 18(2): 95-102, 1994.

Sanches, V.L. 2009. Remediação de solos da formação São Paulo contaminados por vapores de gasolina. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Freire, D.M.G. 2002. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19:159-166.

Santana, W. J.; Rufino, R. D.; Neto, B. B.; Porto, A. L.; Campos–Takaki, G. M.; *Resumo do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Santos, Brasil, 2005, disponível em: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/> acesso em 10/12/10.

Santos, F.K.G.S., Alves, J.V.A., Dantas, T.N.C. 2007. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. In: 4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás (PDPETRO).

Sarubbo L.A., Farias C.B.B., Campos-Takaki G.M., 2007. Co-utilization of Canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology* 54: 68–73.

Sarubbo, L. A.; Marçal, M. C.; Neves, M. L. C.; Silva, M. P. C.; Porto, A. L. F.; Campos–Takaki, G. M. 2001. Bioemulsifier production in batch cul- ture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95: 59-67.

Seabra, P.N.C. 2005. *Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo*. 183p. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Seabra, P.N.C. 2008. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia ambiental*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna: 647p.

Secondary Energy Infobook, 2007. Disponível em: <http://www.need.org/needpdf/infobook_activities/SecInfo/PetroS.pdf>. Acessado em: 08 jan 2008.

Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., 2001. Impact of contamination strategies on the treatment os soils contaminated with organic pollutants. *Review Environmental Pollution*, 112:269-283.

Serviços de Relações Públicas da Petrobras. 1975. *O mundo fabuloso do petróleo*. Rio de Janeiro, Ed. Petrobrás, 48p.

Shah, S. 2004. *Crude The Storie of oil*. Ed. L&PM, 242p.

Silva, M., Esposito, E. 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul, Educs.

Silva, P. R. 2004. Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: estrutura e implicações ambientais.148f. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Ciências e Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A. 2010. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 79:174-183.

Silva, W.O.; Tapia, Y.I.P., 2002. Produção de biossurfactantes, Desenvolvimento de bioprocessos, DEB, EQ, UFRJ, 2002.

Simpson, A.C. 1968. *The Torrey Canyon disaster and fisheries*. Ministry of agriculture, fisheries and food 18: 1-41.

Singh, A., Vaan Hamme, J.D., Ward, O.P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Advances*, 25:99-121.

- Soriano, A.U., Liberator, L.B., Martins, J.V.B., Pereira-JR, N. 2007. Tecnologias de remediação na indústria de petróleo/petroquímica. 125-145 In: Antunes, A. *Setores da Indústria Química Orgânica*. Rio de Janeiro: E-papers, 242p.
- Souza, C.S., Miranda, R.C.M., De Sena, K.X.F.R., Araújo, J.M., Chiappeta, A.A., Sousa, M.F.V.Q. 2010. Isolamento e seleção de micro-organismos degradadores de derivados de petróleo. 3º Congresso Brasileiro de Petróleo e Gás, 2004. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0444_05.pdf>. Acesso em: 21 set 2010.
- Souza, E.C.P.M. 2010. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. In: Nascimento, IA; Souza, E.C.P.M., NIPPER, M. 2002. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha*. São Paulo, Ed. Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 9-14.
- Souza, H. Q.; Oliveira, L. A., Andrade, J. S. 2008. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28:116-124.
- Suape. 2010. *Complexo Industrial Portuário*. Disponível em: <www.suape.pe.gov.br>. Acesso em: 20 set 2010.
- Tavares, A.P.M., Coelho, M.A.Z., Agapito, M.S.M., Coutinho, J.A.P., Xavier, A.M.R.B. 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 134: 233–248.
- Teixeira, M.F.S., Filho, J.L.L., Durán, N. 2000. Carbon source effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 286-290.
- Thanomsub, B.; Watcharachaipong, T.; Chotelersak, K.; Arunrattiyakorn, P.; Nitoda, T.; Kanzaki, H. 2004. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 588- 592.
- Tiquia, S.M., Tam, N.F., Hodgkiss, I.J. 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution* 93(3):249-256.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* 41:1-17.
- Valiev, A., Ogel, Z.B., Klepzig, K.D. 2009. Analysis of cellulase and polyphenol oxidase production by southern pine beetle associated fungi. *Symbiosis* 49(1): 37-42.
- Valmaseda, M., Almendros, G., Martínez, A. T. 1990. Substrate-dependent degradation patterns in the decay of wheat straw and beech wood by ligninolytic fungi. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 33:481-484.
- Van Den Brink, H.J.M., Van Gorcom, R.F.M., Van Den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetic and Biology* 23:1-17.

- Van Der Merwe, J.J. 2002. *Production of laccase by the white-rot fungus Pycnoporus sanguineus*. 125f. Dissertação (Mestrado), University of the Free State, Bloemfontein.
- Van Der Zee, F.O., Villaverde, S. 2005. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes-azo dyes. A short review of reactor studies. *Water Res.* 39: 1425-1440.
- Vance - Harrop, M. H. V.; Gusmão, N. B.; Takaki, G. M. C. 2003. New biomulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D- lucise and babassu oil as carbon source. *Br. J. Microbiol.* 34, 120-123.
- Wainwright, M. 1988. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil. A review. *Transaction of the British Mycological Society* 90:159-70.
- Wang, H., Ye, Q., Yue, L., Yu, Z., Han, A., Yang, Z., Lu, L. 2009. Kinetics of extractable residue, bound residue and mineralization of a novel herbicide, ZJ0273, in anaerobic soils. *Chemosphere*, 76:1036-1040.
- Weber, L.; Doge, C., Haufe, G. 1992. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. *Biocatalysis*, 5, 267-272.
- Weinhagen, J.C. 2006. Price transformation: from crude petroleum to plastics products. *Monthly Labor Review* 46-55.
- Winkist, E., Moilanen, U., Mettala, Q., Leisola, M., Hatakka, A. 2008. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochemical Engineering Journal* 42:128-132.
- Yadav, M., Yadav, P., Yadav, D.S. 2009. Purification, characterization, and coal depolymerizing activity of lignin peroxidase from *Gloeophyllum sepiarium* MTCC-1170. *Biochemistry*, 74(10):1125-1131.
- Yogev-Baggio, T., Bibi, H., Dubnov, J., Or-Hen, K., Carel, R., Portnov, B.A. 2010. Who is affected more by air pollution—Sick or healthy? Some evidence from a health survey of schoolchildren living in the vicinity of a coal-fired power plant in Northern Israel. *Health & Place* 16(2):399-408.
- Zagatto, P.A., Bertoletti, E. 2006. Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações, RIMA, 478p.
- Zanardi, E. 1996. *Hidrocarbonetos no canal São Sebastião e na plataforma interna adjacente-influência do derrame de maio de 1994*. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Zhang-Meng, Zhang-Tian, Y., Wu-Yue, M. 2004. A new name and a new variety in *Curvularia*. *Mycosystema* 23:177-178.
- Zhu, L., Chen, B., Wang, J., Shen, H. 2004. Pollution survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water of Hangzhou, China. *Chemosphere* 56:1085-1095.
- Zinjarde, S. S.; Pant, A. 2002. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM. 3589. *J. Basic Microbiol.* 42, 67-73.

Capítulo 8. Anexos

8. ANEXOS

8.1 Caracterização físico-química do óleo diesel

PETROBRAS TRANSPORTE S.A.
TRANSPETRO

Número: 0261 - 10 T

CERTIFICADO DE ENSAIO

CÓPIA

Produto: OLEO DIESEL A S1800		Código: 65S		
Local de amostragem: TQ 330631303 Data/hora Amostragem: 10/03/2010 17:30 Data/hora Recebimento: 10/03/2010 17:40		Laboratório: Transpetro/Lab Suape Endereço: Comp. Ind. Porto Suape Rod PE060 Ipojuca - PE CEP 55590-000 Telefone: (81) 3527-6338 Fax: (81) 3527-6338		
Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
ASPECTO	VIS 000	PASS (1)	PASS	
COR	VIS 000	INAM (2)	INAM	
COR ASTM	D 1500	3,0 max.	L2,0	
ENXOFRE TOTAL	D 4294	1800 max.	1540,0	mg/kg
10% RECUPERADOS	D 86	Anotar	185,1	grau C
50% RECUPERADOS	D 86	245,0 a 310,0	278,0	grau C
85% RECUPERADOS	D 86	370,0 max.	358,4	grau C
90% RECUPERADOS	D 86	Anotar	378,5	grau C
MASSA ESPECIFICA A 20 GC	D 4052	820 a 880	841,1	kg/m3
AGUA E SEDIMENTOS	D 2709	0,05 max.	0,000	% volume
PONTO DE FULGOR	D 93	38,0 min.	47,0	grau C
Notas: (1) PASS(PASSA)=Limpido e isento de impurezas. (2) Incolor a amarelada, podendo apresentar-se ligeiramente alterada para as tonalidades marrom e alaranjada. - Todos os limites especificados são valores absolutos de acordo com a norma ASTM E 29. - Cor Vermelha - Corante adicionado na entrega do Produto. - Atende a Resolução ANP Nº42, de 16 de Dezembro de 2009; Regulamento Técnico ANP Nº 8/2009. Resolução nº 6 do CNPE, de 16 de setembro de 2009. - APÓS DESLOCAMENTO DE LINHA DO NT PIQUETE VGM 532 CT. Tipo de Amostragem: AMOSTRA CORRIDA Tipo de Operação: Descarga de navio				

Data de Emissão: 10/03/2010 20:16:29 Página 1 de 1

Os resultados deste Certificado de Ensaio referem-se à amostra acima especificada.
Este certificado só pode ser reproduzido integralmente com a autorização do responsável pelo seu conteúdo.

Original Assinado Por:

Responsável:

Luciana Vilarim Fernandes Epitacio
CRQ: 1404182

Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados

Production of lignolytic system enzymes by filamentous fungi isolated from oil derivatives impacted sites

Carla do Couto Soares Maciel

Bolsista de Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE (Brasil)
maciel.carla@gmail.com

Mirrelli Albuquerque de Souza

Bolsista de Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE (Brasil)
mirrellisouza@yahoo.com.br

Norma Buarque de Gusmão

Professora Docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos e Professora Colaboradora do Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE (Brasil)
nbg@ufpe.br

Galba Maria de Campos-Takaki

Professora Colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e Professora Adjunta IV do Núcleo de Pesquisa e Clínica Ambiental, Centro de Ciências e Tecnologia – Universidade Católica de Pernambuco – UCCAP, Recife, PE (Brasil)
galba_takaki@yahoo.com.br

Fungos isolados de locais impactados por petróleo foram investigados quanto à produção de enzimas lignolíticas, utilizando óleo diesel como substrato. A produção de polifenoloxidases foi verificada utilizando-se ácido gálico (0,5%). Os fungos selecionados foram inoculados em solução de Manachini e óleo diesel (1%), incubados a 30°C por 72 horas, avaliando-se produção de biomassa, pH e quantificação de laccase•LaC, lignina•LiP e manganês peroxidase•MnP, por meio da oxidação de ABTS, álcool veratrílico e vermelho fenol, respectivamente. A produção de biomassa variou entre 19,21 g/L a 1 g/L, e o pH entre 6,9 e 6,8. A maior produção de LiP ocorreu pela estirpe F25 (144 U/L). A maior atividade para MnP foi observada pelas estirpes F4, F11 e F25 (correspondendo a 56U/L, 51U/L e 64U/L, nessa ordem), e a maior atividade da LaC foi para F13 e F4 (respectivamente, 296U/L e 216U/L). As estirpes selecionadas demonstraram ser indicativas para o processo de otimização de enzimas lignolíticas, com posterior aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Laccase. Lignina peroxidase. Manganês peroxidase. Óleo diesel.

Fungal strains isolated from impacted sites by oil were investigated for the production of lignolytic enzymes using diesel oil as substrate. The production of polyphenoloxidase was detected using gallic acid (0.5%). The selected fungi were inoculated in Manachini solution added with diesel (1%), incubated at 30°C for 72 hours, to evaluate biomass production, pH and of laccase•Lac, lignin•LiP and manganese peroxidase•MnP by ABTS oxidation, veratryl alcohol and red phenol, respectively. The biomass production ranged from 19.21 g/L to 1 g/L, and pH between 6.9 to 6.8. The higher production of LiP was observed by the strain F25 (144 U/L). The highest MnP activity was observed for the strains F4, F11 and F25 (corresponding to 56U/L, 51U/L and 64U/L, respectively), and the highest activity of LAC was to F13 and F4, respectively (296U/L and 216U/L). The selected strains showed to be indicative for the optimization lignolytic enzymes process and subsequent biotechnological applications.

Key words: Filamentous fungi. Laccase. Lignin peroxidase. Manganese peroxidase. Diesel oil.

1 Introdução

A poluição provocada por acidentes envolvendo petróleo e derivados constitui um problema de escala mundial devido aos impactos causados ao meio ambiente. Por outro lado, a cada ano o acúmulo dos rejeitos emitidos por indústrias de diversos ramos, aumenta consideravelmente (NITSCHKE; PASTORE, 2002). No Brasil, os principais grupos contaminantes são os solventes aromáticos, combustíveis e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, todos provenientes da indústria petrolífera (CETESB, 2008). Diante dessa problemática, são empregadas estratégias físico-químicas e biológicas que, quando associadas, permitem a remoção desses poluentes e consequente remediação do ambiente.

A biorremediação tem sido apontada como uma alternativa viável na descontaminação de locais impactados, pois direciona o potencial fisiológico de micro-organismos na degradação enzimática dos hidrocarbonetos, devido à utilização como fonte de carbono (RAHMAN et al., 2003). A utilização de fungos e bactérias isolados de locais impactados, visando aplicação em processos biotecnológicos, tem recebido destaque, sendo esses micro-organismos amplamente utilizados na remediação de poluentes e locais impactados (GOMES et al., 2010).

Dentro do grupo dos fungos degradadores de xenobióticos, destacam-se os lignolíticos que utilizam o citocromo P-450 monooxigenase e 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 literatura destaca como as maiores famílias de enzimas fúngicas ligninolíticas, os seguintes tipos: lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase (D'SOUZA et al., 1999). Nessas enzimas falta a especificidade pelo sub-

trato e, com isso, elas são empregadas na degradação de diversos xenobióticos, com aplicação na indústria química, alimentícia, agrícola, de papel, têxtil, além de setores da indústria de cosméticos (BONUGLI-SANTOS et al., 2010; GOMES, E. et al., 2009; DE SOUZA; PERALTA, 2003).

A expressão da produção das enzimas lignolíticas por fungos vem sendo detectada por meio do ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, conhecido como ácido gálico, que, sob ação das fenoloxidasas, forma quinonas indicativas da oxidação, resultando em um halo de cor âmbar em torno da colônia, comumente chamado de "Reação de Ravendamm" (CONCEIÇÃO et al., 2005). Para quantificação das enzimas lignolíticas, verifica-se a oxidação de diferentes substratos, principalmente de vermelho fenol para manganês peroxidase, álcool veratrílico para lignina peroxidase e 2,2-azino-bis-ethylbenthiazolina-ABTS para a lacase (ARORA; GILL, 2001; BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

O uso de enzimas é considerado na atualidade, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. A exploração vem sendo feita da forma bruta, a partir de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006). Dessa forma, os fungos são considerados maiores produtores das enzimas lignolíticas, destacando-se *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Cunninghamella elegans*, *Candida* spp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* sp., *Aspergillus sclerotium* CBMA184 e *Mucor racemosus* CBMA1847 (BOONCHAN et al., 2000; BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

Neste trabalho, teve-se como objetivo selecionar fungos filamentosos produtores de polifenolexidasas, além de avaliar quantitativamente a produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, utilizando óleo diesel como sub-

trato, com a finalidade de propor aplicação futura dessas enzimas na remoção de petroderivados.

2 Materiais e métodos

2.1 Materials

Micro-organismos — foram utilizados para realização desse trabalho, 34 fungos filamentosos isolados de ambientes poluídos por petroderivados no Nordeste do Brasil e que se encontram preservados em óleo mineral na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco.

Meio de cultura – para ensaio qualitativo para produção de polifenoxidase, foi utilizado o meio Agar Malte [(g/L) extrato de malte 15 g; Agar 15 g; água destilada 1000 mL; pH 7,0] e acrescido de ácido gálico 0,5% em frasco separado de modo a evitar a hidrólise do ágar. Para a quantificação das polifenoxidases, foi utilizado inicialmente o meio Batata Dextrose Agar [(g/L) 500 mL de infusão de batata; 10 g de dextrose; Agar 20 g; água destilada 1000 mL; pH 7,0], em seguida, utilizou-se solução de Manachini [(g/l) KH_2PO_4 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000 mL; pH 6,0].

Óleo diesel – as amostras de óleo diesel foram cedidas pela Transpetro S. A.

2.2 Métodos

Seleção de fungos com capacidade de produzir polifenoloxidação

Para verificação da produção da enzima polifenoloxidase foi utilizado o meio de Ágar Malte acrescido de ácido gálico 0,5%. Após cinco dias, foi observada a formação do halo de cor âmbar, característico da "Reação de Bavendamm" (VALIEV et al., 2009).

Ensaio em meio líquido para quantificação de polifenol oxidase

Para quantificação da produção das enzimas do grupo polifenoloxidase, os fungos selecionados, previamente, foram cultivados em placas de Petri, contendo meio Batata Dextrose-Agar, por sete dias, a 28°C $\pm$ 1, sendo então removidos três discos (0,6 mm diâmetro) de cada fungo.

Os discos foram transferidos para frascos de Erlenmeyer, contendo 49,5 mL de solução de Manachini pH-6,0 e, como substrato indutor, utilizou-se óleo diesel (1%) como substrato (SOUZA et al., 2008). Os frascos foram cultivados a 140 rpm, 30°C, por 72 horas. Após esse período, o material foi filtrado com papel de filtro Whatman, 10 e, a partir da massa micelial retida, com a qual, posteriormente, foi realizada a quantificação de biomassa, determinada por gravimetria, lavagem da biomassa com água destilada, para remoção de resíduos de extrato enzimático, seguida de posterior secagem (60°C/24horas). Utilizando-se o líquido filtrado, foi analisado o potencial hidrogeniônico, obtido com um pHmetro, sendo determinada a produção das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina.

Determinação da produção de lactose

Para a quantificação da lacase, foi utilizada a metodologia descrita por Arora e Gil (2001). Utilizou-se 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazolina)-ABTS (0,03% w/v), 0,1 mL de tampão acetato de sódio e 0,1 mL do extrato enzimático. A oxidação de ABTS foi verificada por meio de espectrofotômetro (Spectronic/genesis5), pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm.

Determinação da produção de manganês peroxidase

Para quantificação de manganês peroxidase, foi verificada a oxidação do vermelho-fenol

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

Determinação da produção de lignina peroxidase

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 de extrato enzimático, sendo a oxidação observada a 310 nm (ARORA; GILL, 2001).

3 Resultados e discussão

3.1 Seleção de fungos produtores de polifenoloxidasas

Dentre os 34 fungos testados, 12 estirpes foram capazes de expressar halos indicativos da produção de polifenoloxidasas, sendo selecionadas, portanto para ensaios subsequentes de quantificação das enzimas (Tabela 1).

Tabela 1: Micro-organismos produtores de polifenoloxidasas e sua identificação		
Identificação	Identificação	Local de isolamento
F1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Lagoa da Barra, Suape (PE)
F3	<i>Penicillium aurantogriseum</i>	
F4	<i>Curvularia lunata</i>	
F9	<i>Aspergillus</i> sp.	
F10	<i>Aspergillus</i> sp.	Mangue Branco (BA)
F11	<i>Paeclomyces</i> sp.	
F14	<i>Penicillium</i> sp.	
F21	<i>Penicillium</i> sp.	
F24	<i>Penicillium</i> sp.	
F25	<i>Penicillium</i> sp.	
F29	<i>Penicillium</i> sp.	
F33	<i>Penicillium</i> sp.	

Fonte: os autores.

3.2 Produção de biomassa pelos fungos selecionados

A produção de biomassa pelos 12 fungos selecionados no ensaio de produção da enzima polifenoloxidase revelou maior formação de biomassa para a amostra F9 que produziu 10,21 g/L $\pm$ 0,2, seguida de F29 (7,95 g/L $\pm$ 0,4) (Figura 1). Resultados inferiores foram obtidos por Quarantino et al. (2008), que demonstraram uma produção de biomassa de 1,8 g/L em ensaios de produção de lacase por *Fomes tigrinus*. Téllez-Téllez (2008) observou 55 g/L de biomassa, utilizando glicose como fonte de carbono para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*.

O pH dos meios apresentou um discreto aumento variando de 6,0 a 6,8, o que caracteriza um potencial hidrogeniônico próximo da neutralidade (Figura 1). Os fungos filamentosos são mais tolerantes as condições ácidas, os valores de pH podem variar de 6,0 $\pm$ 0,08 e 8,0 $\pm$ 0,05, sendo os mais favoráveis à ação degradadora de hidrocarbonetos. Nesse pH, observa-se um maior crescimento dos microrganismos, aumento da velocidade de degradação e, de acordo com vários autores, a acidez do meio em processo de degra-

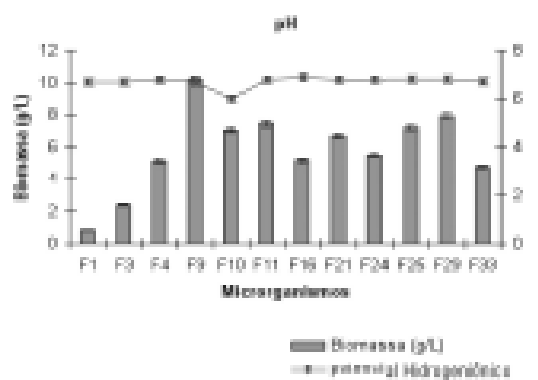


Figura 1: Biomassa (g/L) produzida por fungos filamentosos e pH quando crescidos em óleo diesel como uma única fonte de carbono, por 72 horas. Valores expressos em média + desvio-padrão
Fonte: os autores.

dação é indicativa da produção de ácidos intermediários, como o ácido oxálico (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001; ALEXANDER, 1999; LEAHY; COLWELL, 1990).

A quantificação das enzimas está apresentada na Figura 2. Observou-se que a produção de lacase pelos fungos F33-*Penicillium* sp. ($290\text{U/L} \pm 28$) e F4-*Curvularia lunata* ($210\text{U/L} \pm 17$), destacando-se estatisticamente em comparação à produção da mesma enzima pelos demais fungos. Segundo Kim et al. (1998), quando foram utilizados fenantreno e antraceno como substratos ocorreu a produção de lignina peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium* e *P. ostreatus*, respectivamente. Resultados similares foram observados utilizando óleo diesel. Para Quarantine et al. (2008), a produção de lacase por *Pauna trigrinus* (linhagem 577.79) variou de 0,024 U/mL e 2,04 U/mL, corroborando resultados obtidos neste trabalho. Téllez-Téllez et al. (2008), em ensaios de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, obteve 162U/mg de proteína. A melhor produção de lacase em atividade específica foi produzida por F10, 193,9 U/mg de proteína, contudo os resultados aqui descritos foram superiores (Tabela 2).

O destaque na produção de manganês peroxidase foi: $60\text{U/L} \pm 8$ produzidos por F25-*Penicillium* sp., cerca de $56\text{U/L} \pm 6$ gerados por F4-*Curvularia lunata* e $51\text{U/L} \pm 4$ por F11-*Paeecilomyces* sp.

Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes et al. (2009), realizando descoloração de corantes, utilizando atrox como substrato, obtiveram 0,6 U/mL de manganês peroxidase. Contudo, resultados superiores foram observados por Anastasi et al. (2009) em testes de degradação usando basidiomicetos em que houve produção de MnP em torno de 124 U/L.

Os resultados obtidos, estatisticamente semelhantes para produção de lignina peroxidase, foram os seguintes: F11-*Paeecilomyces* sp. ($94\text{U/L} \pm 9$), F21-*Penicillium* sp. ($100\text{U/L} \pm 22$), F24-*Aspergillus* sp. ($100\text{U/L} \pm 14$) e F25-*Penicillium* sp.

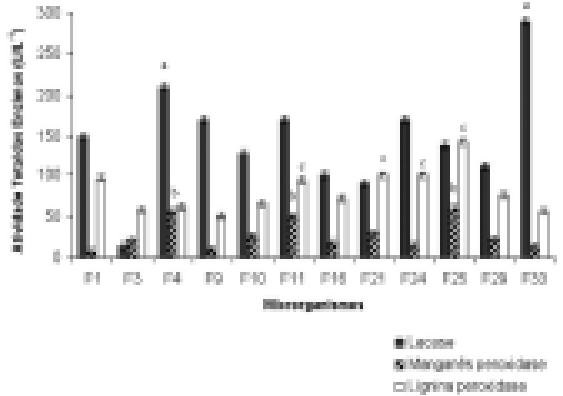


Figura 2: Atividade total (U/L) de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase produzidas pelos fungos filamentosos. Valores foram expressos em média + desvio-padrão. Fonte: os autores.

Tabela 2: Produção das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelos fungos selecionados, isolados de ambientes impactados por petróleo/derivados

Micro-organismos selecionados	Atividade total (U/L)			Atividade específica (U/mg proteína)		
	Lacase	Lignina peroxidase	Manganês peroxidase	Lacase	Lignina peroxidase	Manganês peroxidase
<i>Aspergillus fumigatus</i> (F1)	150	96	7	20,2	12,9	0,9
<i>Curvularia lunata</i> (F4)	210	62	56	62,2	18,3	16,6
<i>Paeecilomyces</i> sp. (F11)	170	94	51	36	19,8	10,7
<i>Penicillium</i> sp. (F21)	90	100	30	14,8	16,4	4,9
<i>Aspergillus</i> sp. (F24)	170	100	16	22,8	13,4	2
<i>Penicillium</i> sp. (F25)	140	144	60	12,4	12,8	6,8
<i>Penicillium</i> sp. (F33)	290	56	14	36,3	7	1,7

Fonte: os autores.

(144 U/L $\pm$ 13). Gomes et al. (2009), em processos de descoloração de corantes, obtiveram 9 U/mL de lignina peroxidase, após cinco semanas de incubação. Anastasi et al. (2009), em seu estudo, observaram uma produção de LiP por *Basidiomycetes* em torno de 19 U/L. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho para *Penicillium* sp. (F25), *Penicillium* sp (F21) e *Aspergillus* sp (F24) demonstraram ser superiores aos da literatura.

Os resultados obtidos são comparáveis ou superiores aos encontrados por Narkhede e Vidhale (2005) que observaram produção de polifenoloxidasas por *Curvularia lunata* LW6 isolada de efluente industrial. Espécies de *Paecilomyces* têm sido relatadas na literatura como degradadoras de substratos lignolíticos, havendo produção de polifenoloxidase (KLUCZEK-TURPEINEM et al., 2003). De acordo com Kluczek-Turpeinem et al. (2007), a secreção de enzimas degradadores de lignina constitui uma etapa central no metabolismo do carbono por *Paecilomyces* spp., representando um potencial importante para detecção dos níveis de expressão dessas enzimas.

4 Conclusões

Os fungos isolados de área contaminada por petroderivados com maior potencial biotecnológico foram *Aspergillus* sp., *Curvularia lunata*, *Paecilomyces* sp., e *Penicillium* sp., considerando a produção de enzimas do sistema lignolítico. Dentre as enzimas estudadas, destacam-se as estirpes *Curvularia lunata*, *Paecilomyces*, considerando a maior atividade específica para lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, sugerindo grande potencial para aplicação em processos de biorremediação. Nesse contexto, sugere-se ainda, que o potencial biotecnológico foi mediado pela presença de xenobióticos, induzindo a expressão das enzimas do sistema lignolítico por fungos fila-

mentosos adaptados a ambiente contaminado por petroderivado.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Referências

- ALEXANDER, M. *Acclimation, biodegradation and bioremediation*. California: Academic Press, 1999. cap. 3, p. 17-38.
- ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V.; VARESE, G. C. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, p. 1229-1233, 2009.
- ARORA, D. S.; GILL, F. K., Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microbiol Technology*, v.28, p. 602-605, 2001.
- 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.
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M.L.; STANLEY, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterium cocultures. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1007-1019, 2000.
- CETESB, 2008. Gerenciamento de Áreas Contaminadas no Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solu/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_08.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2010.
- COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Minas Gerais: UFMG, 2006. 206 p. Tese (Doutorado)—Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais, 2006.

MACIEL, C. de C. S. et al.

Artigo

- CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDCIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Arribaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arg. Inst. Biol.*, v. 72, n. 1, p. 99-104, 2005.
- DE SOUZA, C. G.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal Basic Microbiology*, v. 43, p. 278-286, 2003.
- D'SOUZA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental Microbiology*, v. 65, n. 12, p. 5007-5013, 1999.
- CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In: GADD, G. M. *Fungi in bioremediation*. United Kingdom: Cambridge University Press, 2001, p. 136-147.
- GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONEFÁ, M. R. B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on ligno-cellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 40, p. 31-39, 2009.
- GOMES, E. B.; SILVA, R.; ROSADO, A. S.; PEREIRA JR., N. Bioreatment of diesel waste by sequencing batch bioreactor operation mode (SBR). *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 64, n. 5, p. 1-5, 2010.
- KLUCZEK-TURPEINEM, B.; MAIJALA, P.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA A. Degradation and enzymatic activities of three *Puccinomyces inflatus* strains grown on diverse ligno-cellulosic substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 55, p. 283-291, 2007.
- KLUCZEK-TURPEINEN, B.; TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M.; Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Puccinomyces inflatus*. *Applied Microbiological Biotechnology*, v. 61, p. 374-379, 2003.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- NARXHEDE, K. P.; VIDHALE, N. N. Biopulping studies using an effluent isolate *Curvularia lunata* LW6. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 385-388, 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.
- QUARANTINO, D.; CLAFFI, M.; FEDERICI, E.; D'ANNIBALE, A.; Response surface methodology study of laccase production in *Pennisia tigrina* liquid culture. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 236-245, 2008.
- RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresources Technology*, v. 90, p. 159-168, 2003.
- SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S., Screening of basidiomycetes from Amazonia for the production of biotechnological interest enzymes. *Giência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 28 (Supl.), p. 116-124, 2008.
- TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; FERNÁNDEZ, F. J.; MONTIEL-GONZÁLES, A. M.; SÁNCHEZ, C.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 675-679, 2008.
- VALIEV, A.; OGEL, Z. B.; KLEPZIG, K. D. Analysis of cellulase and polyphenol oxidase production by southern pine beetle associated fungi. *Symbiosis*, v. 49, n. 1, p. 37-42, 2009.
- VAN DEN KRINK, 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.

Recebido em 13 jun. 2010 / aprovado em 5 nov. 2010

Para referenciar este texto

MACIEL, C. de C. S. et al. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Revista*, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.