



**MARTA CRISTINA DE FREITAS DA SILVA**

**METABOLISMO DO FENANTRENO POR  
*CUNNINGHAMELLA ELEGANS* UCP 542 ASSOCIADO AOS  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIS E NA  
PRODUÇÃO DE QUITINA E DE QUITOSANA**

**RECIFE**

**Novembro/2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**  
**DOCTORADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**METABOLISMO DO FENANTRENO POR**  
***CUNNINGHAMELLA ELEGANS* UCP 542 ASSOCIADO AOS ASPECTOS**  
**MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIS E NA PRODUÇÃO DE QUITINA E**  
**DE QUITOSANA**

**MARTA CRISTINA DE FREITAS DA SILVA**

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 em Biologia de Fungos.

Área de Concentração. Microbiologia Aplicada.

Orientador Prof<sup>ª</sup> Galba Maria de Campos-Takaki

**RECIFE**

**Novembro/2009**

**METABOLISMO DO FENANTRENO POR *CUNNINGHAMELLA ELEGANS* UCP 542  
ASSOCIADO AOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIIS, NA  
PRODUÇÃO DE QUITINA E DE QUITOSANA**

***MARTA CRISTINA DE FREITAS DA SILVA***

**Data da Defesa: 06/11/2009**

---

Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki- Orientadora

Universidade Católica de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Resende

Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Kaoru Okada

Universidade Católica de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia de Figueiredo Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUPLENTES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Thayza Christina Montenegro Stamford-UFPB

Universidade Federal da Paraíba

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Cavalcanti -UFPE

Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Cezar Bernardino Moreira, Raimunda de Freitas Moreira e aos meus irmãos Julius Cezar de Freitas Moreira e Marcus Antonio de Freitas Moreira, que em todos os momentos de minha vida acreditaram na minha vitória.

À minha filha Clara e meu marido Sérgio, que teimam em me amar, mesmo nas minhas ausências.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me dar a vida e sempre me dizer o que fazer sem usar palavras.

À Profª Drª. Galba Maria de Campos Takaki, todo o meu respeito, admiração, e gratidão por tanta dedicação, profissionalismo e competência.

Ao Drº Francisco Cordeiro Neto *in memoriam* pelo apoio, amizade e por ter sido o caminho que me fez chegar até a Drª. Galba.

À Drª Pedrina Cunha de Oliveira que me guiou nos meus primeiros passos na Micologia, assim como, todos aqueles do Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/ RJ.

Ao Prof. Drª. Aline Elesbão do Nascimento, pelo apoio e ensinamentos tão oportunos.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S. J., pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB para a realização deste trabalho.

Ao LIKA-UFPE, na pessoa do Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pelo uso das dependências durante o desenvolvimento desta Tese.

Ao ITEP, em especial a Dra. Sônia Valéria Pereira e Dr. Antônio Hélder Parente, pelo apoio e uso das dependências do LABTAM.

A toda a equipe que faz parte do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais- NPCIAMB Ricardo Kenji, Petrusk Homero, Patrícia de Souza, Marcos Moraes, Raquel Rufino, Juliana Luna, Alicia Jara, Anabelle Camarotti- Batista, Carlos Eduardo Vasconcelos, Raquel Berger, Clarissa I. Matos Lins, Ednaldo Ramos, Antonio Cardoso, Aline Barbosa, Hélvia Casullo e, em especial Adriana Antunes pela presença marcante principalmente, na última fase experimental da tese.

À Thayza Stamford pela forma de ajudar, ensinar, incentivar e fazer valer uma amizade sincera.

A todos os professores do NPCIAMB, em especial a Drª Kaoru Okada e o Dr Carlos Alberto A. da Silva, pelos incentivos e conselhos.

À Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais -

NPCIAMB, pela atenção e amizade dispensadas.

Aos técnicos André Felipe dos Santos e Severino Humberto de Almeida pela colaboração e amizade durante a fase experimental desta pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa como suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Às coordenadoras Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leonor da Costa Maia e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine Malosso e professores do programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelo apoio e conhecimentos transmitidos durante o curso, especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti, um dos alicerces da Micologia.

À secretária Giovanna Guterrez do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelos abraços apertados, pela atenção e pelo carinho.

À toda minha turma do Doutorado pelos momentos de descontração e troca de conhecimentos.

E todos os amigos que torcem por mim e que me ajudaram, nesta caminhada, com uma palavra de conforto e incentivo.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
<b>1. Introdução</b> .....	15
<b>2. Objetivos</b> .....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos.....	17
<b>3. Fundamentação Teórica</b> .....	17
3.1 Petróleo .....	17
3.2 A História dos HAPs.....	21
3.3 HAPs no meio ambiente .....	22
3.4 Efeitos Toxicológicos dos HAPs .....	25
3.5 Impacto Ambiental dos HAPs.....	26
3.6 Fenômeno de bio sorção.....	28
3.7 Biorremediação microbiana. dos HAP'S.....	29
3.8 Zigomicetes.....	34
<b>4. Primeiro Artigo “Efeito do NaCl e toxicidade do fenantreno na germinação, crescimento e comportamento ultraestrutural de <i>Cunninghamella elegans</i> UCP 542”</b> .....	41
<b>5. Segundo Artigo “Effect of Phenanthrene on the Germination, Radial Growth and Chitin and Chitosan production by <i>Cunninghamella elegans</i> Lendner“</b> .....	58
<b>6. Terceiro Artigo “Influência do fenantreno e da glicose na produção e da quitina e da quitosana em <i>Cunninghamella elegans</i>”</b> .....	68
<b>7. Quarto Artigo “Remoção do fenantreno pelas biomassas viva e inativada de <i>Cunninghamella elegans</i>”</b> .....	88
<b>8. Considerações Finais</b> .....	105
<b>9. Referências Bibliográficas</b> .....	108

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Diferenças entre os hidrocarbonetos alifáticos e os aromáticos.....	18
<b>Figura 2:</b> Estrutura Molecular do <i>n</i> -hexeno.....	19
<b>Figura 3:</b> Exemplos de estruturas moleculares de alguns hidrocarbonetos aromáticos.....	21
<b>Figura 4:</b> Vias metabólicas utilizadas pelos fungos para degradar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	26
<b>Figura 5:</b> Fórmula estrutural da quitina (A) e quitosana (B).....	39

*Primeiro Artigo*

<b>Figura 1</b> Germinação dos esporângios de <i>C. elegans</i> em meio Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,01mM ou 0,02mM), por 6 h a 28°C com 150 rpm de agitação.....	53
<b>Figura 2</b> Germinação dos esporângios de <i>Cunninghamella elegans</i> em meio Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,01mM ou 0,02mM) com 2h ( <b>Fig. 2a</b> ) e 4h ( <b>Fig. 2b</b> ) de incubação a 28°C, sob agitação de 150 rpm. <b>Aa</b> – Controle; <b>Ba</b> - cloreto de sódio a 4%; <b>Ca</b> – cloreto de sódio a 4% e Fenantreno 0,01mM; <b>Da</b> - fenantreno a 0,01mM ; <b>E</b> – 4% cloreto de sódio e fenantreno a 0,02 mM; <b>Fa</b> - fenantreno a 0,02mM. <b>Ab</b> – Controle ; <b>Bb</b> - 4% cloreto de sódio; <b>Cb</b> - 4% cloreto de sódio e fenantreno a 0,01 mM ; <b>Db</b> – fenantreno a 0,01mM; <b>Eb</b> – 4% cloreto de sódio e fenantreno a 0,02 mM ; <b>Fb</b> - fenantreno a 0,02 mM.....	54
<b>Figura 3</b> Crescimento Radial de <i>C. elegans</i> em meio solidificado Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,01mM ou 0,02mM), por 96 h a 28°C.....	55
<b>Figura 4</b> Curva de Crescimento de <i>C. elegans</i> em meio Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,01mM ou 0,02mM), por 96 h a 28°C, em 150 rpm de agitação.....	56

## Segundo Artigo

**Figura 1** Germination of esporangioles by *C. elegans* medium H&A control or treated glucose, sucrose, NaCl and phenanthrene.....64

**Figura 2** Radial Growth de *C. elegans* in medium H&A control or treated glucose, sucrose, NaCl and phenanthrene.....64

**Figura 3** Chitin and Chitosan produced by *C. elegans* UCP 542 and grown for 96 hours after the pré-inoculum, in medium H&A, varying the glucose, sucrose, NaCl and phenanthrene(0.5mg/mL).....65

## Terceiro Artigo

**Figura 1-A** Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de glicose e fenantreno de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.....81

**Figura 1-B** Diagrama de Pareto relacionando o crescimento de *C. elegans* (UCP 542), no meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de glicose e fenantreno de acordo com o planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.....82

**Figura 2** Consumo de açucares redutores totais por *C. elegans* (UCP 542), em meio Hesseltine e Anderson, na concentração E1 de acordo com o planejamento fatorial.....83

**Figura 3** Quitina e Quitosana produzidas por *C. elegans* UCP 542 e crescidas durante 96 horas após o pré-inóculo, em meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de icose, e fenantreno de acordo com o planejamento fatorial.....84

**Figura 4** Espectroscopia de Infravermelho de quitina (A) e quitosana (B) extraídos de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) crescido em meio Hesseltine e Anderson de acordo com a condição E1 do planejamento fatorial.....85

**Figura 5** Eletronmicrografia das microfibrilas de quitina isolada de *Cunninghamella elegans* (em destaque *Fenantreno*). **A.** Controle do meio de cultura; **B.** Controle (glicose 0,6%); **C.** Glicose 0,6% + fenantreno 0,2mM; **D.** Glicose 6%); **E.** Glicose 6% + fenantreno 0,2Mm); **F.** Ponto central dos experimentos (glicose 3,3% + fenantreno 0,1mM).....86

**Figura 6** Eletromicrografia de microscopia eletrônica de varredura da quitosana isolada de *Cunninghamella elegans* ligada à moléculas de fenantreno 0,2mM .....87

#### *Quarto Artigo*

**Figura 1.** Cinética de remoção do fenantreno (0,2mM e 0,1mM) pela biomassa de *Cunninghamella elegans* , tendo como substrato glicose 0,6 , 6,0 e 3,3%.....103

**Figura 2.** Integrações entre as condições do planejamento fatorial completo de  $2^2$  para expressar a relação às biomassas inativada (A) e viva (B) de *Cunninghamella elegans*, na remoção de fenantreno (%) tendo glicose 0,6 e 6%, como co-susbttrato.....104

### **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas de alguns HAPs .....	24
<b>Tabela 2:</b> Concentração de HAPs em solos contaminados .....	24
<b>Tabela 3:</b> Exemplo de Bactérias e Fungos Degradadores de Petróleo.....	32
 <i>Primeiro Artigo</i>	
<b>Tabela 1:</b> Teste de Toxicidade utilizando <i>Artemia salina</i> .....	57
 <i>Terceiro Artigo</i>	
<b>Tabela 1:</b> Matriz do planejamento fatorial que estuda a influência de 2 fatores na produção de quitina e quitosana por <i>C. elegans</i> . As condições 5 a 8 referem-se ao ponto central, que equivale às médias dos dois níveis extremos. ....	80
 <i>Quarto Artigo</i>	
<b>Tabela 1:</b> Matriz do planejamento fatorial que estuda a influência de 2 fatores na remoção de fenantreno por <i>Cunninghamella elegans</i> . As condições 5 a 8 referem-se ao ponto central, que equivale às médias dos dois níveis extremos.....	101
<b>Tabela 2:</b> Porcentagem de remoção do fenantreno pela biomassa inativada de <i>Cunninghamella elegans</i> , de acordo com as condições do planejamento fatorial.....	102
<b>Tabela 3:</b> Porcentagem de remoção do fenantreno pela biomassa viva de <i>Cunninghamella elegans</i> , de acordo com as condições do planejamento fatorial.....	103

## RESUMO

O fenantreno é um hidrocarboneto aromático policíclico (HAP), constituído por três anéis de benzeno, com características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, podendo ser degradado por microorganismos. Neste trabalho foi avaliado o metabolismo do fenantreno por *Cunninghamella elegans* UCP 542, associado ou não a salinidade. O processo de germinação, crescimento e morfologia de *C. elegans* e produção de quitina e quitosana foram avaliados no meio de cultivo sintético para Mucorales, tendo como controle e tratado as concentrações de 0,1 e 0,2mM de fenantreno. Cerca de 93,75% dos esporangióolos foram capazes de germinar com fenantreno a 0,1mM, como única fonte de carbono. Contudo, os resultados indicaram que o crescimento radial com o fenantreno 0,1mM, apenas retarda o desenvolvimento da colônia. No entanto, fenantreno a 0,2mM inibiu totalmente a germinação e o crescimento, devido à alta toxicidade, confirmado pelo microcrustáceo *Artemia salina*. Eletrondensidade e entumescimento aumentados foram mediados pelo fenantreno durante a germinação dos esporangióolos. *C. elegans* demonstrou ser um fungo halofílico. Com fenantreno a 0,1mM observou-se uma biomassa de 4,6g/L, comparável ao controle (5,77g/L). Os resultados inéditos obtidos sugerem que fenantreno a 0,1mM influencia a produção de quitina e quitosana por *C. elegans*, contudo, quando associado à glicose o fenantreno atuou positivamente, como condição mais favorável para os processos de remoção do fenantreno.

**Palavras chave:** Fenantreno, *Cunninghamella elegans*, Germinação, Crescimento, Quitina, Quitosana, Cloreto de sódio.

## ABSTRACT

The phenanthrene is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), consisting of three benzene rings, with features toxic, mutagenic and carcinogenic, and can be degraded by microorganisms. This study was evaluated the metabolism of phenanthrene by *Cunninghamella elegans* UCP 542, with or without salinity. The process of germination, growth and morphology of *C. elegans* and production of chitin and chitosan were evaluated using the culture synthetic medium for Mucorales, with the control and treated concentrations of 0.1 and 0.2 mM phenanthrene. About 93.75% of sporangioles were able to germinate with a 0.1 mM phenanthrene as sole carbon source. However, the results indicated the radial growth with 0.1 mM phenanthrene, only delays the development of the colony. However, phenanthrene at 0.2 mM completely inhibited the germination and growth, due to high toxicity, confirmed by microcrustaceous *Artemia salina*. Electrodense and stiffness were mediated by increased of the phenanthrene concentration during the germination of the sporangioles. *C. elegans* proved to be halophilic fungus. The treatment with 0.1 mM of phenanthrene showed a biomass of 4.6 g / L, comparable to control (5.77g/L). The new results suggest that the 0.1 mM phenanthrene influences the production of chitin and chitosan by *C. elegans*, however, when associated with glucose phenanthrene acted positively in increasing of the condition most favorable to the removal processes.

Keywords: Phenanthrene, *Cunninghamella elegans*, Germination, Growth, Chitin, Chitosan, Sodium chlorid.

## 1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental é derivada de diversas atividades petroquímicas, portuárias, principalmente de refinarias e industriais, implicando em um problema mundial, pois, diminui a qualidade de vida. A contaminação por substâncias recalcitrantes como os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's), tem preocupado estudiosos do mundo inteiro, nas cidades industrializadas, há 150 anos, considerando o aumento da concentração de HAP's no ambiente (Allen et al., 2002, Cornelissen et al., 2005).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos encontram-se em vários setores ambientais e apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, além de outros efeitos tóxicos aos seres vivos, como a capacidade de bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares, causando problemas à saúde humana e ao ambiente (Allen et al., 2002; Leys et al., 2004; Stokes et al., 2005; Sabate et al., 2006).

Por conseguinte, existe um interesse crescente para se investigar e entender as formas de remover estes compostos poluentes derivados do petróleo. Neste sentido, a degradação microbiana representa a principal via para a recuperação ecológica de locais contaminados por HAP's (Boonchan et al., 2000).

Entre os microrganismos, os fungos apresentam maior habilidade de transformação e degradação dos HAP's, não como fonte de carbono exclusiva, porém transformando-as cometabolicamente (Sasek et al., 2003).

Particularmente, os fungos da podridão branca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* apresentam enzimas lignolíticas extracelulares, com alta capacidade de degradação de HAP's presentes em solos e sedimentos (Wu et al., 2005 e Valentín et al., 2006).

Os fungos considerados não lignolíticos, como *Cunninghamella elegans*, *Penicillium janthinellum* e *Syncephalastrum sp*, durante o processo de biodegradação do petróleo, podem gerar vários tipos de HAP's, como: pireno, criseno, fenantreno, antraceno e benzo[a]pireno (Tavares et al., 2005).

Portanto, a biodegradação por microrganismos representa um dos meios mais vantajosos, pelo qual o petróleo e outros hidrocarbonetos poluentes são eliminados do ambiente (Sood e Lal, 2009). Assim, metodologias de baixo custo utilizando fungos e

bactérias têm revelado o grande potencial desses microrganismos no processo de recuperação de ambientes poluídos (Bonnet et al., 2005).

Particularmente, os Zygomycetes, têm se destacado pelo grande potencial em biotransformar e biodegradar diversos compostos poluentes, incluindo os HAP's com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, produzindo metabólitos com menor toxicidade (Cerniglia et al., 1992; Boonchan et al., 2000; Juhasz, 2000).

Além da capacidade que muitos fungos apresentam em biotransformar e até mesmo mineralizar compostos tóxicos, outras propriedades podem ocorrer em função dos constituintes de parede celular, como mecanismo de sorção, e consequente remoção de poluentes tóxicos. O mecanismo de adsorção pela biomassa dos fungos tem sido sugerido pela constituição da superfície celular da parede carregadas eletricamente, cuja vantagem é a capacidade de interagir e reter substâncias e íons (Franco et al., 2005; Campos-Takaki, 2005; Freitas Silva et al., 2007).

Portanto, vários esforços têm sido empregados na busca de linhagens microbianas mais versáteis, com maior potencial de adsorção e/ou biodegradação de compostos recalcitrantes, em especial, o petróleo e derivados (Michizoe, 2005). Neste sentido, pesquisas indicam a utilização de microrganismos isolados de áreas contaminadas para estudos de biodegradação por apresentarem maior potencial biológico de remoção (Guha, 1999; Phillips, 2000; Woo, 2001). Assim, o processo de biorremediação, utilizando micélio vivo ou inativado tem superado outras técnicas de remediação por apresentar uma metodologia ecologicamente correta e por não causar desequilíbrio nos ecossistemas, podendo assim, amenizar os impactos ambientais causados por compostos tóxicos sem agredir a natureza (Bouchez, 1996; Boonchan et al. 2000; Yong-Hak, 2005; Zhang, 2005).

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1 Geral**

Investigar o potencial biotecnológico de *Cunninghamella elegans* na remoção de HAP - fenantreno, em condições otimizadas previamente, utilizando processos bioquímicos.

## 2.2 Específicos

- Analisar o efeito do fenantreno e do cloreto de sódio na germinação de esporangiólos e no crescimento radial de *C. elegans*;
- Acompanhar as alterações morfológicas de *C. elegans* mediadas pelo tratamento com fenantreno;
- Avaliar o efeito do fenantreno na produção de quitina e quitosana por *C. elegans*;
- Isolar e caracterizar os polissacarídeos quitina e quitosana presentes nas paredes celulares de *C. elegans*;
- Investigar o efeito do fenantreno no arranjo microfibrilar da quitina nas paredes celulares de *C. elegans*;
- Investigar o potencial de biorremocão do fenantreno pela biomassa viva e inativada de *C. elegans*;
- Validar estatisticamente o efeito de biorremocão do fenantreno por *C. elegans*.

## 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 Petróleo

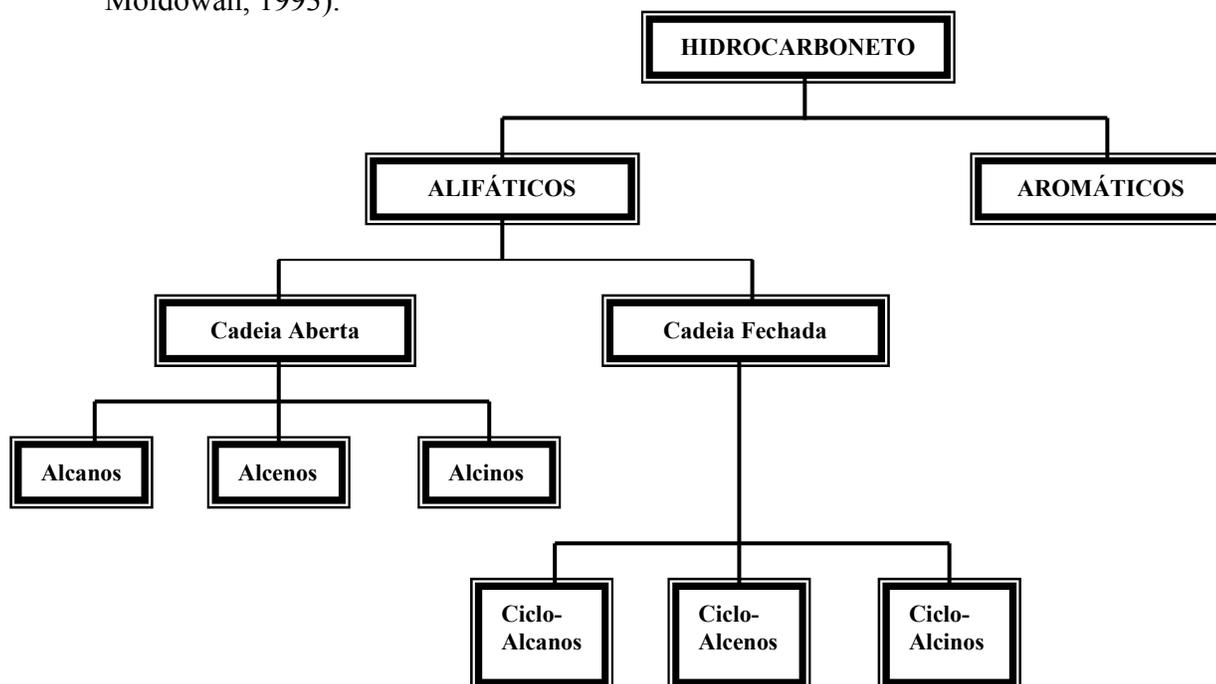
O petróleo é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e de cor variando entre o negro e o castanho escuro. Embora objeto de muitas discussões no passado, hoje tem-se como certa a sua origem orgânica, sendo uma combinação de moléculas de carbono e hidrogênio (Ang et al, 2005).

A contaminação do ambiente marinho por petróleo pode ser proveniente de fontes naturais e/ou antropogênicas. As naturais referem-se à produtos de degradação por organismos vegetais, animais marinhos, erosão dos sedimentos continentais, produção

microbiana e química, a partir de precursores como os esteróides. E as antropogênicas, com relação ao petróleo, referem-se às atividades de produção, transporte, estocagem e refino de óleo, queima de gás natural, carvão, derivados de petróleo e madeira para geração de energia e aquecimento, combustão, movimentação de embarcações, veículos terrestres e aeronaves, atividades industriais que utilizam derivados de petróleo como matéria-prima, especialmente os processos pirolíticos e as queimadas (Figueiredo, 1999).

### 3.1.1 Composição Química do Petróleo

O petróleo é composto por moléculas orgânicas, as quais podem ser separadas em classes distintas em função da sua estrutura molecular, destacando-se: hidrocarbonetos alifáticos (saturados e insaturados) e hidrocarbonetos aromáticos (Figura 1) (Peters e Moldowan, 1993).



**Figura 1.** Diferenças entre os hidrocarbonetos alifáticos e os aromáticos

#### 3.1.1.1 Hidrocarbonetos Saturados

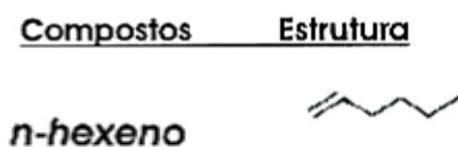
Os hidrocarbonetos saturados possuem ligações simples entre seus átomos de carbono, sendo os compostos mais abundantes no petróleo. Podem ser classificados em alcanos normais, ramificados e cíclicos (Tissot e Welte, 1984).

Os alcanos normais ou *n*-alcanos ( $C_nH_{2n+2}$ ) são moléculas com cadeias de carbono lineares e sem ramificações. Possui de um a quarenta átomos de carbono, sendo raramente encontradas moléculas de maior peso molecular ou com um número de carbono acima de 40. Os *n*-alcanos com mais de vinte átomos de carbono são conhecidos como alcanos de alto peso molecular e, os menores como alcanos de baixo peso molecular (Tissot e Welte, 1984; Blanc e Connan, 1994). Os isoalcanos possuem a mesma estrutura molecular dos *n*-alcanos distinguindo-se dos mesmos por ramificações no segundo carbono da sua cadeia estrutural. Isoprenóides são compostos formados a partir da reunião de isoprenos (estruturas básicas compostas de cinco átomos de carbono). São isoalcanos constituídos de nove a vinte e cinco átomos de carbono. Os isoprenóides mais abundantes são pristano (2, 6, 10, 14 tetrametilpentadecano - C19) e fitano (2, 6, 10, 14 tetrametilhexadecano - C20) (Eisenreich et al., 2004).

Os alcanos cíclicos (cicloalcanos) ou naftênicos ( $C_nH_{2n}$ ) possuem cadeias de carbono fechadas, constituídas de cinco ou seis átomos de carbono denominados ciclopentano e ciclohexano, respectivamente. Existem, ainda, moléculas policíclicas constituídas de 10 a 35 átomos de carbono (C10 a C35), entre as quais são mais conhecidas os hopanos e esteranos (Tissot e Welte, 1984).

### 3.1.1.2 Hidrocarbonetos Insaturados

Os hidrocarbonetos insaturados contêm um número menor de hidrogênio por átomos de carbono, quando comparado aos *n*-alcanos. Possuem ligações duplas ou triplas entre seus átomos de carbono e são quimicamente instáveis, podendo ser encontrados no petróleo, por exemplo, na forma de *n*-hexeno (Figura 2), *n*-hepteno e *n*-octeno (Blanc e Connan, 1994).



**Figura 2.** Estrutura Molecular do *n*-hexeno  
(Tissot e Welte, 1978)

### 3.1.1.3 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

As moléculas dos hidrocarbonetos aromáticos são formadas por uma estrutura fechada na forma de anel com seis átomos de carbono, possuindo ligações simples e duplas intermitentes entre seus átomos de carbono. O benzeno ( $C_6H_6$ ) apresenta sua estrutura molecular sob forma de um ciclo com ligações simples intercaladas por ligações duplas sendo o hidrocarboneto aromático mais simples da classe. No petróleo são encontrados hidrocarbonetos aromáticos formados pela fusão de dois ou mais anéis benzênicos denominados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). No petróleo, compostos com até quatro anéis benzênicos são os mais abundantes, sendo conhecidos como: naftaleno (2 anéis); fenantreno, antraceno, fluoreno e dibenzotiofeno (3 anéis); pireno, benzo(a)antraceno e criseno (4 anéis) (Figura 3) (Speight, 1991)

Existe uma imensa variedade de HAP's no meio ambiente, grande parte deles possuindo características estruturais e propriedades muito similares, sendo comum à existência de isômeros. Muitas vezes certos isômeros são mais carcinogênicos ou mutagênicos do que outros (Grisolia, 2000). As propriedades químicas e físico químicas dos HAP são em grande parte determinadas por seus sistemas de duplas ligações conjugadas, que variam com o número de anéis e, portanto, com sua massa molecular (Paje, 1998).

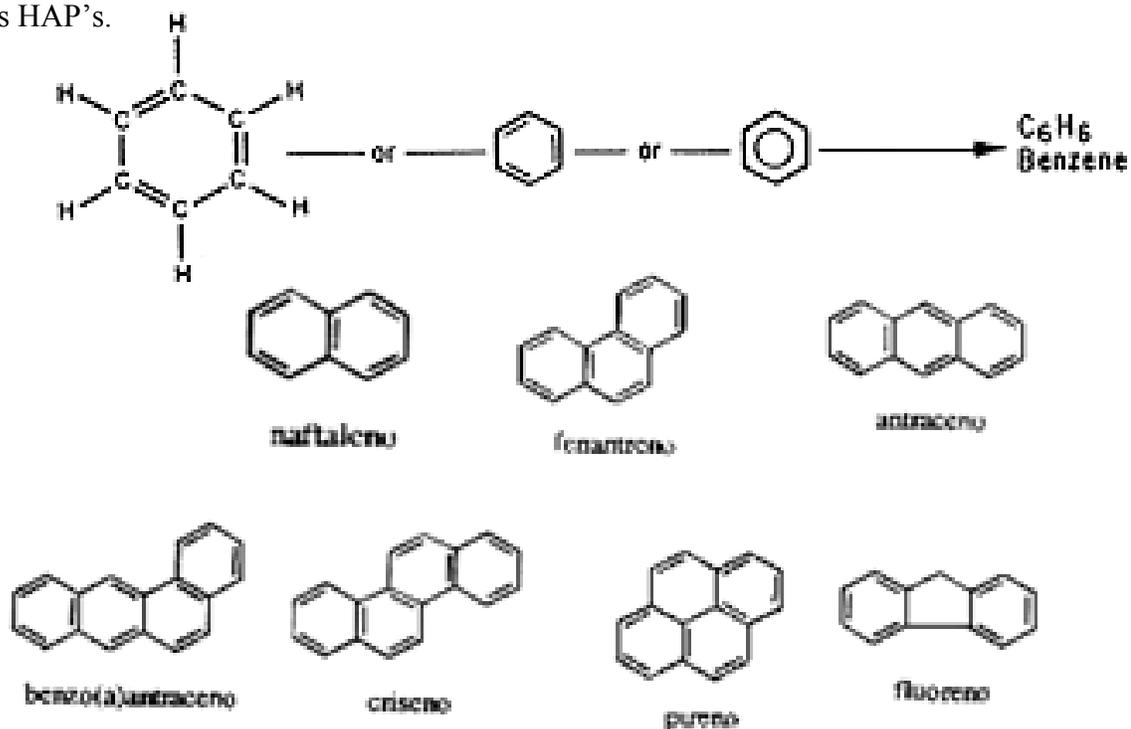
Os HAP's são compostos relativamente inertes e suas reações mais comuns são as reações de substituição ou de adição eletrofílica. As reações de adição destroem a aromaticidade do sistema conjugado, diminuindo assim a estabilidade da molécula. Muitas vezes, elas são acompanhadas por reações de eliminação, que regeneram o sistema aromático e dão origem a um produto final de substituição (Paje, 1998).

Os compostos aromáticos apresentam maior toxicidade do que outros (Banjoo, 2005) e a gravidade da intoxicação depende da natureza do composto aromático, da quantidade ingerida ou inalada e do tempo de exposição. Os HAP's podem apresentar ainda em sua estrutura átomos de oxigênio e nitrogênio, formando um complexo que podem ser identificadas em segmentos ambientais variados.

Os HAP's são resistentes à degradação ambiental por isso, podem acumular-se no meio ambiente atingindo concentrações que podem prejudicar a saúde. O caso mais conhecido é o benzopireno, presente na queima de combustíveis fósseis e no tabaco do

cigarro. O efeito carcinogênico comprovado se dá pela interação com o DNA das células provocando mutações, e conseqüentemente, câncer (Gill et al., 1994; Giacomazzi; Cochet 2004). O fenantreno é um HAP que não atinge diretamente a saúde humana, porém, apresenta alta toxicidade para peixes e algas contaminando o homem de forma indireta (Pino et al., 2000). Uma variedade de espécies bacterianas tem a habilidade para utilizar o fenantreno como fonte de carbono e energia (Guha, 1999).

Singleton et al. (2005) identificaram bactérias capazes de degradar o naftaleno e fenantreno utilizando um bioreator e também pesquisaram as alterações genéticas causadas pelos HAP's.



**Figura 3.** Exemplos de estruturas moleculares de alguns hidrocarbonetos aromáticos (Peters e Moldowan, 1993).

### 3.2 Histórico dos HAP's

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando foi observada uma maior incidência de cânceres em limpadores de chaminés (Pott, 1775). A atividade carcinogênica atribuída ao benzo[a]pireno (BaP) foi a partir do isolamento em carvão, em 1931. No entanto, a identificação como uma nova substância química foi em 1933, permitindo demonstrar que o

BaP é um forte agente cancerígeno em animais (Finlayson-Pitts e Pitts JR., 1997; Pino et al., 2000).

As primeiras provas dos riscos ocupacionais e ambientais dos HAP's foram obtidas em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram cancerígenos para animais. O BaP foi identificado em produtos de combustão doméstica e posteriormente em material extraído do meio ambiente. Em 1970 o BaP (e outros HAP's) foram caracterizados como agentes cancerígenos de fácil inalação e como constituinte de aerossóis urbanos (Noll e Toledo, 1997).

Nos anos 70 o excesso de carcinogenicidade em partículas atmosféricas foi estudado e demonstrado que a atividade cancerígena está associada à outras substâncias orgânicas ainda desconhecidas. Estas estão presentes, também, no material orgânico policíclico (MPO) de fontes de emissão primárias (Finlayson-Pitts e Pitts JR., 1997). Também nos anos 70 foi introduzido um método muito sensível e eficaz para a determinação da mutagenicidade de substâncias químicas, por meio de bactérias do gênero *Salmonella*, conhecido como ensaio de mutagenicidade ou "Teste de Ames - *Salmonella*", em homenagem a seus autores (Ames et al., 1973). A partir desta época muita atenção tem sido dada a avaliação de HAP's em matrizes ambientais e biológicas.

### **3.3 HAP's no meio ambiente**

Os HAP's podem ser encontrados em diversos setores ambientais tais como solo, atmosfera, sedimento e por bioacumulação pode também estar incorporado aos organismos vegetais e animais. Os HAP's em amostras de solo encontram-se geralmente adsorvidos no material particulado constituinte. Sua deposição nas camadas superiores de solo ocorre por ação da gravidade (Phillips, 2000). Segundo Mitra et al (2002) a camada cinza é proveniente da combustão de matérias orgânicas e a poluição do ar através de veículos motores podem contribuir para a presença de HAP's em áreas urbanas. Os níveis de HAP total no solo estão relacionados com as operações na agricultura e queima de biomassa (Sabate, 2006). Os HAP's também podem ser facilmente encontrados em sedimentos marinhos ou de rios apresentando concentrações altas ou baixas dependendo das propriedades de sedimentação.

O acúmulo de substâncias no sedimento torna-os disponíveis à biota, podendo ocasionar a bioacumulação nestes organismos (Gogou et al 2000). Isto ocorre com maior frequência por meio dos compostos de baixo peso molecular que são mais solúveis, por serem leves e as águas costeiras tendem a movimentá-los. HAP's são produzidos por reações de alta temperatura tais como a combustão incompleta ou o pirólise de materiais orgânicos (Walker et al., 2000). São emitidos principalmente como gases durante estes processos, mas os HAP's rapidamente se condensam ou adsorvem em partículas existentes no ar. Conseqüentemente, as partículas de HAP's possuem diâmetro em escala micrômica. Estas pequenas partículas podem penetrar no aparelho respiratório onde se depositam podendo comprometer a saúde devido suas características cancerígenas e mutagênicas (PINO et al 2000).

### **3.3.1 Rota dos HAP's no Ambiente**

Os veículos motorizados também contribuem para o aumento da poluição atmosférica pelos HAP's, provenientes do processo de combustão (Feam, 2004). Os poluentes são emitidos em maior ou menor quantidade em função do combustível utilizado, do tipo de motor, da sua regulagem, da manutenção e modo de dirigir. Os veículos podem poluir mesmo sem estar em funcionamento, pois com o motor desligado ocorre evaporação de combustível pelo suspiro do tanque e no sistema de carburação do motor, sendo grande parte desses vapores lançada para a atmosfera. Apesar de, individualmente, esse tipo de emissão ser aparentemente insignificante, ao se analisar o número de veículos existentes nas grandes cidades, verifica-se a geração de toneladas de poluentes por dia (Faiz et al, 1996). Os HAP's são caracterizados pela baixa solubilidade em água (Tabela 1). Devido a essa hidrofobicidade natural, os HAP's se acumulam nas partículas finas e na matéria orgânica do sedimento marinho, tornando-o assim, um reservatório de HAP's. Esse acúmulo nos sedimentos marinhos pode ser proveniente da deposição atmosférica, transporte de petróleo e lançamento de esgoto. A concentração de HAP's nos sedimentos marinhos varia dependendo da proximidade de áreas industriais, correntes marítimas e águas servidas. A concentração de HAP's em solos contaminados de áreas industriais varia em função da atividade, do tipo de solo, constituintes do solo e grau de saturação do local (Tabela 2).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas de alguns HAPs

HAP	Anéis aromáticos	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Solubilidade (mg/L)	Pressão de Vapor (Pa a 20 °C)
<b>Fenantreno</b>	3	101	340	1,29	0,0853
<b>Antraceno</b>	3	216	340	0,07	0,0267
<b>Fluoranteno</b>	4	11	250	0,26	8,0x10 <sup>-4</sup>
<b>Benzo[a]antraceno</b>	4	158	400	0,014	6,6 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Pireno</b>	4	149	360	0,14	9,1 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Criseno</b>	4	255	488	0,002	8,4 - 10 <sup>-5</sup>
<b>Benzo[a]pireno</b>	5	179	496	0,0038	6,7 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Dibenzo[a,h]antraceno</b>	5	262	524	0,0005	1,3x10 <sup>-8</sup>
<b>Benzo[g,h,i]perileno</b>	6	222		0,0003	1,3 x 10 <sup>-8</sup>
<b>Indeno[1,2,3-c,d]pireno</b>	6	163	536	0,062	1,3 x 10 <sup>-8</sup>

Fonte: IPCS (1998)

**Tabela 2.** Concentração de HAP's em solos contaminados.

HAP	Concentração de HAP no solo (mg/kg) das Indústrias				
	Produção de Creosoto	Preservação de Madeira	Fábrica de Gás	Petroquímica	Produção de Gás (EUA)
<b>Naftaleno</b>	1131	3925	-	186	97
<b>Acenaftileno</b>	33	49	-	-	28
<b>Acenafteno</b>	-	1368	2	43	49
<b>Fluoreno</b>	650	1792	225	87	14
<b>Fenantreno</b>	1595	4434	379	156	26
<b>Antraceno</b>	334	3307	156	53	11
<b>Fluoranteno</b>	682	1629	2174	137	73
<b>Pireno</b>	642	1303	491	99	47
<b>Criseno</b>	614	481	345	-	15
<b>Benzo[a]antraceno</b>	-	171	317	33	16
<b>Benzo[a]pireno</b>	-	82	92	15	14
<b>Dibenzo[a,h]antraceno</b>	-	-	2451	12	33

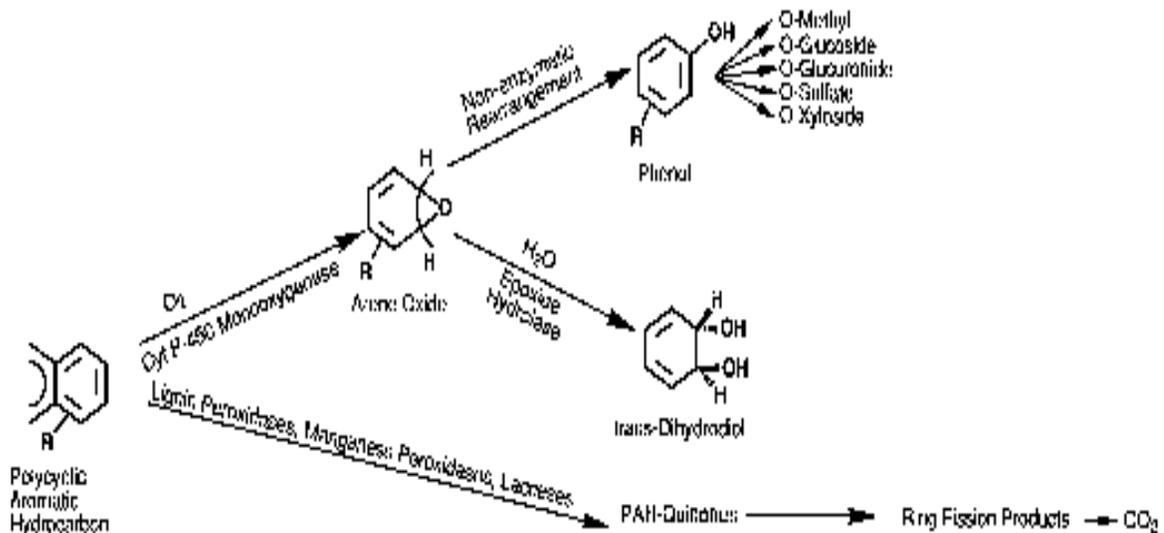
Fonte: (Scherrer e Miller, 1989)

A concentração de HAP's no solo de países industrializados revelou um aumento desde meados de 1800, com um pico entre 1950 e 1960. Estudos em solos mostraram aumento na concentração de HAP's próximo aos centros urbanos, mas a combustão antropogênica de combustíveis fósseis e o longo alcance do transporte atmosférico contribuíram para a dispersão de HAP's no ambiente. A entrada de HAP's em organismos marinhos está ligada à biodisponibilidade (ex.: partição entre sedimento, água e alimento), e à fisiologia do organismo, sendo influenciada pelo tamanho do organismo, taxa de ingestão, taxa de crescimento, permeabilidade da membrana, taxa de ventilação, tempo de residência no intestino e regulação osmótica. Os HAP's podem ser eliminados dos organismos por difusão passiva ou por excreção de substâncias polares, produzidos em algum processo metabólico. A presença de HAP's em plantas pode expor indiretamente o homem através da cadeia alimentar (Bodzek *et al.*, 1997; Jung, 2008).

### **3.4 Efeitos toxicológicos dos HAP's**

Os HAP's podem causar doenças após longo e curto tempo de exposição ou causar efeitos nocivos à pele. O metabolismo dos HAP's nos mamíferos pode ser observado em muitos tecidos como fígado, pulmão, rins, placenta, trato intestinal, e pele via citocromo P450. Monoxigenases dependentes do citocromo P450 são responsáveis pela oxidação enzimática dos HAP's. Elas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou a nível da região angular da molécula do HAP formando óxidos de arenos (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação das epóxido hidrolases, produzirem di-hidrodióis vicinais. Destes fenóis, alguns são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação levando à formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolépóxidos). O carbono benzílico dos di-hidrodiolépóxidos é capaz de reagir com as bases do DNA, nomeadamente a guanina e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico. Reações semelhantes são observadas com outras macromoléculas tais como a albumina e a hemoglobina. Os di-hidrodiolépóxidos são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolisados a tetraois, cuja formação pode ser utilizada como bioindicador da formação de diolépóxidos (Cerniglia, 1992; Sutherland et al 1993). Os fenóis, as quinonas e os di-hidrofenóis podem sofrer conjugação formando sulfatos e

glucuronatos. Os óxidos de arenos, as quinonas e os diolepóxidos também reagem com o glutathiona e podem ser eliminados através da urina sob a forma de tioéteres. As principais enzimas de destoxificação que conjugam metabolitos dos HAP's são glutathiona S-transferase e a uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferases e sulfotransferases (Figura 4).



**Figura 4.** Vias metabólicas utilizadas pelos fungos para degradar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Cerniglia, 1992).

Algumas pessoas que respiraram ou manusearam misturas de HAP's por longos períodos de tempo desenvolveram câncer. Animais de laboratório desenvolveram diversos tipos de câncer quando em contato com HAP's por via respiratória, por ingestão ou quando aplicados sobre a pele. O departamento americano de Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (OSHA) estipulou um limite máximo de 0,2 mg de HAP's por metro cúbico de ar em ambiente de trabalho. O limite de exposição permissível para óleo mineral contendo HAP's é de 5 mg/m<sup>3</sup> em um período médio de exposição de 8 horas (Agency For Toxic Substances And Disease Registry, 1996).

### 3.5 Impacto Ambiental dos HAP's

Atualmente, com a quantidade de agentes tóxicos, principalmente, dispersos no ar por atividades industriais, aumenta os riscos de contaminação aos ecossistemas. Certamente, compreender os impactos dos contaminadores no ambiente, a necessidade para

a proteção dos recursos naturais no ambiente e o uso mais apropriado deles traz a necessidade e a importância de focalizar mais atenção ao assunto (Fairbrother, 2001).

Tanto a água como o solo e os ambientes marinhos contêm sistemas complexos. Cada um destes sistemas contém sua própria biota, que pode ser representada por milhares de animais, plantas, microrganismos e até mesmo o homem. Além disto, estes sistemas interagem com as condições físico-químicas do ambiente e do clima (Okoro e Amund, 2002).

Assim, se a saúde total do ambiente deve ser avaliada e compreendida corretamente, o impacto dos produtos químicos nas interações entre organismos e seus respectivos ambientes deve ser avaliado além de seus efeitos individuais. O solo, por exemplo, é exposto freqüentemente a uma variedade de agentes tóxicos que na maioria dos casos resultam das atividades agrícolas (Walker et al., 2000).

Os HAP's possuem propriedades físico-químicas importantes como: solubilidade em água e lipofilicidade, adsorção no solo e vaporização. Contaminantes altamente solúveis são transportados em grandes quantidades através da água e assim encontram-se distribuídos extensamente a grandes distâncias de seus pontos de introdução no meio ambiente, podendo ser adsorvidos pelo solo ou sedimento. Alguns compostos poluentes estão sujeitos à ação metabólica de microorganismos que transformam produtos orgânicos complexos em substâncias inorgânicas, estas transformações também podem ser provocadas pela ação da luz ou por substâncias químicas. Alguns compostos, entretanto, não podem ser degradados totalmente (Giacomazzi e Cochet, 2004) e, persistem no meio ambiente como é o caso de certos HAP's. As exposições de animais, vegetais e do homem a esses intermediários também devem ser avaliadas. Alguns produtos metabólicos poderiam ser mais tóxicos do que os produtos químicos originais (por exemplo, HAP). Determinados contaminantes tendem a acumular-se em organismos aquáticos, com sua concentração movimentando-se pela cadeia alimentar gerando efeitos tóxicos em outros organismos que não tiveram nenhum contato direto ao contaminante químico (Giacomazzi e Cochet, 2004). Após várias pesquisas relacionadas ao estudo do impacto ambiental podemos concluir que o meio ambiente é muito sensível a determinado composto químico e que sua ação em certos setores ambientais pode ser altamente prejudicial aos animais e vegetais. Porém, a identificação do contaminante e sua fonte são as etapas mais críticas no processo de análise do impacto ambiental, o que nos faz entender a importância de considerarmos o meio

ambiente como sujeito ativo e diretamente responsável pela manutenção e melhoramento da qualidade de vida em nossa comunidade (Morgan e Watkinson, 1994; Atlas, 1995; King et al., 1997).

### **3.6 Fenômeno da Biossorção**

A biossorção compreende a ligação de compostos à biomassa por um processo que não envolva energia metabólica ou transporte, embora tais processos possam ocorrer simultaneamente quando a biomassa viva for usada, pois a biossorção pode ocorrer com biomassa viva ou morta (Boonchan et al., 2000).

Embora, células vivas e mortas sejam capazes de acumular compostos, pode haver diferenças nos mecanismos envolvidos em cada caso, dependendo da extensão a dependência metabólica (Allen-King et al., 2002).

A capacidade de certos microrganismos concentrarem metais pesados é bem conhecida. Entretanto, somente durante as duas últimas décadas é que os microrganismos estão sendo usados como uma alternativa para a remoção e recuperação de compostos tóxicos (Boonchan et al., 2000).

A biossorção desses compostos não é baseada num único mecanismo, observa-se que ocorrem vários mecanismos que quantitativa e qualitativamente diferem de acordo com as espécies usadas. A biossorção segue mecanismos complexos, principalmente troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e o aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e espaços da rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular e membranas (Stokes et al., 2005).

Desde a década de 80 que a capacidade de alguns microrganismos concentrarem componentes tóxicos a partir de soluções aquosas, tem sido explorada no sentido de se desenvolver sistemas de tratamento de águas residuais (Barra et al., 2005).

Dentro das novas tecnologias de remediação ambiental, de baixo custo e fácil implementação, aparece recentemente a biossorção que tem revelado ser bastante promissora na fixação de poluentes. De acordo com Barra (2005) a vantagem dos tratamentos biológicos é a eliminação do poluente e não a simples mudança de fase, onde vários microrganismos aeróbicos têm sido descritos como degradadores de poluentes altamente recalcitrantes. Diversos microrganismos têm sido testados no sentido de se

aprofundar os conhecimentos dos mecanismos que contribuem ou estão na origem do processo de bio sorção. Há vários grupos químicos que poderiam atrair e reter compostos na biomassa, como grupos acetamido de polissacarídeos estruturais, como quitina, grupos amino e fosfato presentes em ácidos nucleicos, amido, sulfidril e carboxila em proteínas, grupo hidroxilas em polissacarídeos, e principalmente carboxila e sulfatos em polissacarídeos de algas marinhas. Entretanto, a presença de alguns grupos funcionais não garante o mecanismo de sorção de poluentes, os quais podem estar presentes nas paredes celulares de bactérias, algas e fungos, sendo considerados como eficientes bio sorbentes (Cerniglia, 1992).

### **3.7 Biorremediação Microbiana dos HAP'S**

A biodegradação é um processo natural em que microrganismos podem degradar os compostos orgânicos contidos no petróleo. Esse processo pode correr tanto sob condições anaeróbicas como aeróbicas, sendo a última mais expressiva (Cerqueira e Costa, 2009). Para que as bactérias possam consumir os hidrocarbonetos presentes no petróleo, como fonte de energia e carbono, é necessário obedecer a algumas exigências relacionadas às propriedades microbianas e às condições físicas químicas do ambiente (Morgan e Watkinson, 1994; Atlas, 1995; King et al., 1997).

Assim, existem alguns parâmetros que controlam esse processo, dentre os quais destacam-se os de controles bióticos e abióticos. Os parâmetros de controle biótico são referentes às necessidades intrínsecas da flora microbiana envolvida, para que o processo de biodegradação se torne viável (Cerqueira e Costa, 2009).

Dentre estes parâmetros destacam-se: microrganismos que degradam os compostos orgânicos responsáveis pela contaminação e material que possa ser utilizado pelos microrganismos como fonte de energia e carbono. Os parâmetros de controle abiótico referem-se às propriedades físico-químicas ideais para que o ambiente suporte a microflora e não que iniba a produção de enzimas (Baker e Herson, 1994; Cookson, 1995), dentre os quais se destacam:

- *Temperatura*: altera as reações químicas que controlam os processos de crescimento microbiano, determinando o ritmo e o desenvolvimento do organismo e seus processos

metabólicos. Cada microrganismo cresce sob temperaturas situadas em faixas características: Psicrófilas (5 a 20°C); Mesófilas (25 a 40°C); e Termófilas (40 a 60° C);

- Materiais tóxicos: a presença de materiais tóxicos pode afetar diretamente os microrganismos responsáveis pela degradação. Dentre os principais contaminantes tóxicos que podem afetar a biodegradação destacam-se os metais pesados e os HAP's;

- *pH*: a maioria dos microrganismos desenvolvem-se no intervalo de pH entre 6 e 8, havendo poucos, capazes de se desenvolverem fora deste limite;

- *Disponibilidade de Água*: o desenvolvimento e a reprodução dos microrganismos ocorrem na presença de água disponível no ambiente;

- *Foto-oxidação*: este processo atua nos compostos orgânicos gerando produtos mais polares, tornando-os mais solúveis em água e mais facilmente biodegradados;

- *Solubilidade*: trata-se de um parâmetro importante, pois quanto maior for a solubilidade do contaminante em água, maior será a biodegradação;

- *Nutrientes*: o desenvolvimento microbiano limita-se à presença de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, os quais auxiliam na síntese da matéria orgânica pela comunidade microbiana. Geralmente, utiliza-se a razão C:N:P = 120 : 10 : 1 como sendo a quantidade mínima para o desenvolvimento da flora microbiana.

Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos são amplamente distribuídos na natureza e, entre eles, destacam-se as bactérias e os fungos (Tabela 3). As bactérias são os microrganismos mais comuns, existindo muitas espécies distintas, das quais, as mais conhecidas pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Passos et al., 2009).

Considerando que o petróleo representa uma mistura complexa de substâncias orgânicas, deve-se considerar que para ocorrer sua biodegradação faz-se necessário uma associação de microrganismos capazes de degradar todos os compostos contidos no mesmo (Passos et al., 2009).

A degradação do petróleo por microrganismos é bastante conhecida, podendo ser comprovada pela ocorrência de reservatórios de óleos biodegradados, resultantes do contato do óleo com água enriquecida em microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (Morgan e Watkinson, 1994).

Em certas circunstâncias, como nos tanques de armazenamento de óleo, a presença de microrganismos degradadores de óleo pode ser indesejável. Entretanto, em outras situações, como derrames de óleo em ambientes costeiros ou marinhos, a utilização da biodegradação não só é desejável como deve ser estimulada através do processo da biorremediação (Atlas, 1981).

A degradação microbiana é representada por uma rota principal responsável pela recuperação ecológica de locais contaminados por HAP'S (Guha, 1999), porém, o sucesso da biorremediação está limitado ao alto peso molecular (Mahony et al., 2002), dificultando o processo de degradação microbiana. Estudos indicam que os HAP's com alto peso molecular como o pireno e criseno podem ser mineralizados por bactérias e assim, desintoxicar solos poluídos. Fungos não lignolíticos, como *Cunninghamella elegans*, *Penicillium janthinellum* e *Syncephalastrum sp* podem transformar uma variedade de HAP's, inclusive pireno, criseno, e benzo[a]pireno, para metabólitos secundários, cujo processo de mineralização pode também ocorrer por bactérias. No entanto, o catabolismo dos fungos isolado e ou em consórcio até o processo de mineralização do benzo[a]pireno, pode ocorrer pela utilização do derivado de petróleo como exclusiva fonte de carbono, e consequentemente, o fornecimento de energia (Cerniglia e Gibson, 1979).

**Tabela 3** - Exemplo de Bactérias e Fungos Degradadores de Petróleo

Bactérias	Fungos	
	Leveduriformes	Filamentosos
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Aureobasidium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Beauveria</i>
<i>Arthrobacter</i>		<i>Botrytis</i>
<i>Bacillus</i>		<i>Colorospora</i>
<i>Brevibacterium</i>		<i>Cylindrocarpon</i>
<i>Corynebacterium</i>		<i>Dendryphiella</i>
<i>Cytiphaga</i>		<i>Fusarium</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Geotrichum</i>
<i>Micrococcus</i>		<i>Glicocladium</i>
<i>Mycobacterium</i>		<i>Gongronella</i>
<i>Nocardia</i>		<i>Graphium</i>
<i>Proteus</i>		<i>Humicola</i>
<i>Pseudomonas</i>		<i>Paecilomyces</i>
<i>Rhocococcus</i>		<i>Penicillium</i>
<i>Sarcina</i>		<i>Phoma</i>
<i>Serratia</i>		<i>Scolecobasidium</i>
<i>Spirillum</i>		<i>Sprotrichum</i>
<i>Streptomyces</i>		<i>Verticillium</i>
<i>Vibrio</i>		
<i>Xanthomonas</i>		
<i>Chromobacterium</i>		

Fonte: Fonte: Ururahy (1998) *apud* Del'Arco (1999) BARTHA (1996)

A exposição humana (e de outros animais) a HAP's ocorre por diferentes vias. As mais importantes são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou de água contaminada. No caso de seres humanos, outros importantes modos de exposição a HAP's são o hábito (ou vício) de fumar, a inalação (passiva) de fumaça de cigarros e a exposição ocupacional em atividades e processos envolvendo a produção ou manuseio de matérias-primas que contenham estes compostos (Cerniglia, 1992; 1997). A biotransformação de HAP's em organismos vivos está bem estudada (Langwaldt e Puhakka, 2000) e pode representar uma forma de redução dos níveis ambientais destas substâncias, mas a

metabolização pode ter dois papéis antagônicos nestes organismos: a) pode levar à formação de substâncias mais tóxicas; b) pode servir como mecanismo de detoxificação. Um exemplo é a presença de conjugados de 1-hidroxipireno com  $\beta$ -O-glicosídeos e  $\beta$ -O-glicorínídeos em plantas (Nakajima et al., 1996). A procura de bioindicadores confiáveis para o estudo da exposição humana aos HAP's e seus derivados constitui ainda matéria para muita pesquisa. Alguns indicadores específicos, como por exemplo, o 1-hidroxipireno, têm sido propostos e utilizados com sucesso nos estudos da exposição humana a determinados HAP's.

A técnica de biorremediação é aplicada através da bioaugmentação e da bioestimulação (Lindstrom et al., 1991). A bioaugmentação ocorre pela adição de microrganismos específicos em regiões impactadas, adaptados em laboratório às condições ambientais. Ao usar essa técnica, faz-se a avaliação dos microrganismos presentes no ambiente, identificando-se os degradadores de óleo. Em seguida, através de bioreatores estimula-se em laboratório, o crescimento microbiano das espécies de interesse e, posteriormente, injeta-se o "pool" de microrganismos no local contaminado com o objetivo de aumentar a população microbiana, responsável pela degradação do óleo (Venosa et al., 1991 *apud* Hoff, 1993). Entretanto, a aplicação do método na descontaminação de ambientes costeiros não se mostrou suficientemente eficaz, visto que há constante atuação de processos intempéricos, correntes marinhas, ventos, ondas, chuvas e competições microbianas, que limitam a utilização dessa técnica (Atlas, 1981).

A bioestimulação é a aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas, pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado (Hoff, 1993; Atlas, 1995; Bartha, 1996; Cerqueira e Costa, 2009).

Tanto a adição de água como a oxigenação do ambiente contaminado favorece a atuação da biodegradação. Já a aplicação de nutrientes ricos em nitrogênio e fósforo, tem sido amplamente estudada, principalmente quando a concentração dessas substâncias é limitada, como ocorre nos ambientes costeiros localizados em regiões de clima tropical (Lindstrom et al., 1991; Furnas, 1992; Hoff, 1993; Bragg, 1992; Rytkonen et al., 1997).

A aplicação da técnica de biorremediação exige a avaliação prévia dos poluentes, ou seja, deve-se analisar o impacto da contaminação no ambiente, a tendência de degradação de cada composto e as condições necessárias para a biodegradação (Passos et al., 2009). Por

exemplo, vários compostos orgânicos que foram considerados tóxicos e recalcitrantes, sabe-se hoje que podem ser biodegradados.

Entretanto, esses compostos persistem como poluentes por longos períodos, em função das condições ambientais não serem propícias ao desenvolvimento da atividade microbiana, que resultaria na degradação bioquímica. Todavia, existem compostos não biodegradáveis e/ou seus produtos metabólicos intermediários serem mais tóxicos que os próprios compostos originais (Passos et al., 2009).

O desenvolvimento do projeto de retirada de óleo em ambientes costeiros, através do uso da biorremediação, requer conhecimento nas áreas de bioquímica, microbiologia, geoquímica, hidrogeologia e geologia (Cookson, 1995). Na aplicabilidade da biorremediação deve considerar a natureza, concentração e distribuição dos contaminantes no ambiente, propriedades químicas da água, caracterização do solo, análise quantitativa dos nutrientes, fatores ecológicos, danos à saúde e tempo de exposição da contaminação àquele determinado local (Crawford e Crawford, 1996; Passos et al., 2009).

### **3.8 Zygomycetes**

A Classe dos Zygomycetes possui representantes em vários ambientes como: solo, água, fezes, grãos estocados, frutos, folhas, vegetais vivos, outros fungos e animais vertebrados e invertebrados (Alexopoulos et al., 1996) e têm como características principais hifas cenocíticas com septos apenas para diferenciar as estruturas reprodutivas, esporângios ou gametângios, rizóides que fixam o fungo ao substrato e estolões. A reprodução dos Zygomycetes ocorre assexuada ou sexuadamente, pela produção de esporangiosporos no interior de esporângios ou por copulação gametangial, respectivamente. Algumas espécies produzem clamidiosporos, podendo ser sapróbias, outras simbiotes como as micorrizas e parasitas de outros fungos, animais e plantas (Alexopoulos et al., 1996). Os Zygomycetes são fungos que podem produzir esporos de resistência, de parede celular rígida, chamado de zigosporo cujo desenvolvimento se dá no interior de zigosporângios após a fusão completa entre dois gametângios que em alguns casos surgem do mesmo micélio.

Nessa classe estão compreendidas cerca de 770 espécies de fungos terrestres. Apesar da maioria delas serem sapróbias existem muitas espécies parasitas, formadoras de micorrizas e outras de grande interesse biotecnológico (Alexopoulos et al., 1996). Espécies

dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus* são sapróbias em alimentos estocados. *Rhizopus stolonifer* e *Mucor racemosus* são espécies que promovem a deterioração de frutas e vegetais e também de cereais armazenados em silos. Algumas espécies pertencentes a esses gêneros podem ainda ser parasitas do homem causando várias doenças graves.

O gênero *Cunninghamella* pertence à classe dos Zygomycetes cujo, o habitat dessas espécies é geralmente o solo e outros substratos orgânicos. Os representantes exibem colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporângios. O micélio quando jovem não exibe septo. A septação está associada à idade da cultura (Freitas Silva et al., 2007).

Os esporos podem ser globosos ou ovais com paredes lisas ou com espículas, geralmente unicelulares. As espécies podem formar zigósporos globosos, escuros e tuberculados que são formados entre células suspensoras, geralmente heterotálicas, clamidósporos podem ocasionalmente ser formados (Tortora et al., 2000).

De modo geral, os aspectos morfológicos correspondem a elementos fundamentais na identificação dos fungos. Do ponto de vista taxonômico, espécies de *Cunninghamella* podem ser identificadas por sua habilidade em responder a variações no meio de cultivo. Contudo, a separação das espécies é complexa e alguns estudos foram realizados para identificar caracteres de valor taxonômico como, exemplo, a forma do esporângio analisada por microscopia óptica (O'Donnel, 1979; Shipton e Lunn, 1980; Alexopoulos et al., 1996).

Domsch et al. (1980) descrevem que os esporangióforos podem atingir até 20,0 µm em comprimento e que as vesículas terminais podem chegar à 40,0 µm de diâmetro e as laterais de 10-30 µm. Shipton e Lunn (1980) reportaram que os esporângios de vários isolados de *C. elegans* apresentaram formas globosas, subglobosas e raramente elipsoidais.

### **3.8.1 Composição bioquímica de parede celular**

A principal característica da parede celular dos fungos é apresentar na sua composição os co-polímeros quitina e quitosana (Bartnicki-Garcia, 1968; Campos-Takaki, 2005; Magnelli et al., 2005; Nimrichter et al., 2005; Perez e Ribas, 2004).

Quitina é o segundo polímero natural mais abundante do planeta, isolado pela primeira vez a partir de fungos, por Frenchman Braconnot, em 1811. É obtida principalmente do exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos. Cerca de 50-80% dos compostos orgânicos da carapaça de crustáceos e insetos consistem de quitina. Sua estrutura, formada por unidades  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoses, assemelha-se à celulose, com exceção do grupo hidroxila do C2 que são substituídos por grupos acetamida na quitina (Figura 5A). A similaridade reflete na função que exercem na natureza, ambos atuando como material estrutural e protetor (Andrade et al., 2000). A quitina é insolúvel em água, ácidos diluídos, álcalis e na maioria dos solventes orgânicos. É solúvel em exafluorisopropanol, hexafluoroacetona, cloroálcoois em conjugação com solução aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (LiCl). Ácidos minerais concentrados dissolvem com simultânea degradação o polímero em sacarídeos menores (Amorim et al., 2005). A produção industrial da quitina é realizada basicamente através do tratamento de carapaças de camarão e caranguejo, com NaOH diluído para desproteínização, seguido de tratamento em meio ácido (HCl diluído) para desmineralização.

Nos últimos anos tem crescido o interesse em investigar o potencial de quitina em diversas áreas. Dentre as aplicações da quitina podemos citar: tratamento de águas residuárias industriais (Benguella e Benaissa, 2002) medicamentos antiinflamatórios (Tharanathan e Kittur, 2003) e bactericidas (Je, 2006), fabricação de fibras e tecidos (AMORIM, et al., 2005). Na área de tratamento de água, muitas pesquisas envolvendo quitina estão sendo desenvolvidas. Sua capacidade de formar filme, pode ser aplicada em sistemas filtrantes. Recentemente, Yusof et al. (2003), produziram um filme de quitina com potencial de uso como membrana em sistemas de osmose reversa. Quitina também pode ser aplicada na remoção de metais pesados (Franco et al., 2005), compostos orgânicos (Amorim et al., 2005) e corantes de efluentes têxteis (Synowiecki et al, 2003).

Quitosana  $\beta(1 \rightarrow 4)$ -2-amido-2-desoxi-D-glicopiranoses, constitui o principal derivado da quitina (Figura 5B). Este biopolímero foi descoberto por Rouget, em 1859, através da desacetilação da quitina. Usando uma solução de hidróxido de potássio (KOH). Durante a reação, parte das ligações N-acetil da quitina são rompidas, formando unidades de D-glicosamina, o qual possuem um grupo amínico livre. A Figura 5B representa a estrutura da quitosana que é insolúvel em água, álcool, acetona, mas se dissolve em

soluções aquosas de ácidos orgânicos, tais como ácido acético, fórmico e cítrico, além de ácidos minerais diluídos, produzindo uma solução viscosa. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) na cadeia polimérica.

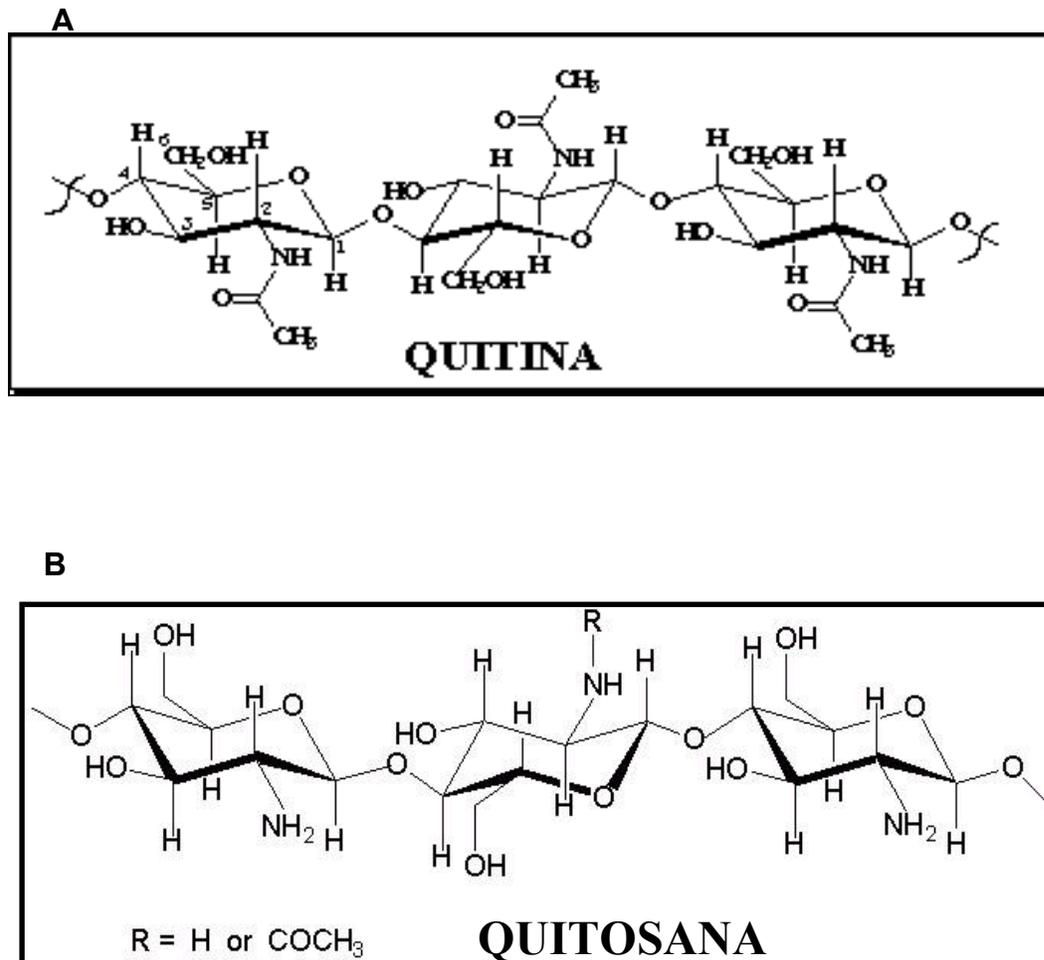
As propriedades e aplicações da quitosana dependem fundamentalmente da massa molar e do grau de desacetilação, número de grupos amino em relação aos grupos acetamina da cadeia polimérica. A massa molar da quitosana comercial geralmente varia entre 100.000 a 1.200.000 g/mol e o grau de desacetilação de 70 a 95%. Porém, dependendo do método utilizado, é possível obter quitosana com uma larga variedade na distribuição do peso molecular e do grau de desacetilação (Dos Santos et al., 2003; Stamford et al., 2007). A disponibilidade de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) na estrutura da quitosana torna muito eficiente sua capacidade de absorver substâncias com grupamentos ácidos tais como taninos, flavonóides, proteínas e fenóis, além de poder interagir com moléculas como colesterol, ácidos graxos e íons metálicos.

Com relação à interação com íons metálicos a quitosana atua de uma maneira diferente. O nitrogênio do grupo amino age com doador de elétrons, geralmente em pH elevado, formando um complexo com o íon metálico. Recentemente foi relatado por Shigemasa e Minami (1996) o potencial da quitosana em diversas áreas, podendo ser utilizada na forma de flocos, gel, membranas ou fibras. Nestes estudos foram citadas aplicações de quitosana na produção de cosméticos, drogas e medicamentos para redução de peso, confecção de lentes de contato, tratamento de regeneração da pele, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis, no desenvolvimento de biomateriais, tratamento de água, indústria fotográfica e de papel. Uma das aplicações mais conhecidas da quitosana é sua utilização com cápsulas para emagrecimento. Na área biomédica já foram citados sua atuação na coagulação sanguínea (Dos Santos et al., 2003), analgésicos, bactericidas e cicatrizantes (Murugan e Ramakrishna, 2004). Algumas pesquisas têm sugerido a aplicação de quitosana como pele artificial (Shigemasa e Minami, 1996).

Pesquisas voltadas para a aplicação da quitosana no tratamento de água e efluentes têm gerado maior interesse. Alguns tipos de membranas de quitosana estão sendo desenvolvidos para clarificação e purificação de água com boas propriedades semipermeáveis (Shigemasa e Minami, 1996).

A quitosana pode atuar como agente floculante, devido à alta densidade de carga dos grupos amino, capaz de interagir com substâncias carregadas negativamente. Amorim et al.

(2005) usaram quitosana como floculante para tratamento de água. Inúmeras pesquisas utilizam quitosana como adsorvente para a remoção de metais pesados, tais como chumbo, cobre, níquel, zinco e cádmio (Mahony et al., 2005) de águas residuárias industriais. A habilidade da quitosana pode ser aumentada através de modificações em sua estrutura, por reações cross-linkage e complexação com outros polímeros. O polímero é susceptível a mudanças estruturais, devido a grande quantidade de grupos reativos como as hidroxilas e principalmente os grupos aminos. Barros (2005) produziu em sua pesquisa esferas de quitosana ativas com ligante 8-hidroxiquinolina, para adsorção de íons metálicos de efluentes industriais. Seus experimentos foram conduzidos em sistemas de batelada e coluna, para avaliar a remoção dos íons  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . A capacidade de adsorção de íons metálicos por materiais quitinosos, tem sido muito reportada. No entanto, existem poucos relatos sobre adsorção de HAP's por esse tipo de material.



Fonte: Campos-Takaki (2005)

**Figura 5.** Fórmula estrutural da quitina (A) e quitosana (B).

### 3.8.2 Aspectos Ultraestruturais de Mucorales

Sob o ponto de vista estrutural, os fungos são organismos eucarióticos e, portanto exibem citologicamente, os caracteres comuns desse grupo de organismos, sendo de modo geral, caracterizados através da microscopia óptica. A introdução da microscopia eletrônica na década de 60 para análise estrutural de fungos gerou uma nova visão sobre esse tipo celular. Aspectos da morfologia e germinação dos esporos de espécies de *Rhizopus*, *Mucor rouxii*, *Gilbertella persicaria* e *Mycotypha* sp foram observados de maneira mais evidente (Grove, 1970; Bracker, 1968).

Desde o desenvolvimento da microscopia eletrônica em 1931, como método de estudo de células, uma série de metodologias, como por exemplo, a microscopia eletrônica de varredura nos anos 60, microanálise por Raios X e técnicas imunológicas foram aperfeiçoadas. A rápida evolução do surgimento de microscópios mais modernos, como o de transmissão de alta resolução e o de varredura permite atualmente, inclusive, o estudo de amostras frescas e o mínimo de manipulação possível durante o processamento (Collins et al., 1993).

A caracterização da ultraestrutura de fungos é fundamental para o entendimento de alguns aspectos do desenvolvimento celular, como por exemplo germinação esporos, interações hospedeiro-patógenos, comportamento nuclear, estudos de organelas e estudos sobre a organização celular. A avaliação ultraestrutural auxilia a taxonomia e consequentemente aumenta o conhecimento sobre processos de controle de disseminação, controle de patogenicidade (Mims, 2005).

Com os avanços da microscopia eletrônica foi possível elucidar alguns aspectos únicos da estrutura celular dos fungos parasitas de plantas, identificação de elementos estruturais para estudos taxonômicos e identificação dos aspectos de ultraestrutura fina de esporos (Mims, 2005). A citoquímica é um método que permite a geração de informações sobre a localização *in situ* de moléculas, o que permite uma correlação entre as diferentes atividades bioquímicas e fisiológicas.

### **3.8.3 Microfibrilas de Quitina**

As microfibrilas de quitina estão interiorizadas em uma matriz amorfa, produzindo uma armação que dá a morfologia da parede. Esta matriz é que contém as proteínas e os polissacarídeos tais como os glucanos ou mananos (Moore-Landecker, 1996). A parede de ascomicetos e basidiomicetos filamentosos consiste principalmente do complexo (1-3)/(1-6)βglucano-quitina, (1-3)α-glucano e de (glico) proteínas. Há evidências que todos os componentes são expelidos na área da parede como entidades separadas e subseqüentemente são modificados (Van Wetter et al., 2000).

**Primeiro Artigo**

**Efeito do NaCl e toxicidade do fenantreno na germinação,  
crescimento e comportamento ultraestrutural de  
*Cunninghamella elegans* UCP 542**

**Artigo a ser submetido para publicação no periódico**

Desalination

## **Efeito do NaCl e toxicidade do fenantreno na germinação, crescimento e comportamento ultraestrutural de *Cunninghamella elegans* UCP 542**

Marta Cristina de Freitas Silva<sup>1,4</sup>, Petrusk Homero Marinho<sup>2,4</sup>, Aécia Maria Andrade Torres Jara<sup>3,4</sup> Aline Elesbão do Nascimento<sup>4</sup>, Galba Maria Campos-Takaki<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Doutorado em Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas/UFPE-PE; <sup>2</sup>Doutorado em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas/UFPE-PE; <sup>3</sup>Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO - Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

<sup>4</sup>Centro de Ciências e Tecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP; <sup>5</sup>Departamento de Química; Universidade Católica de Pernambuco; 50050-590; Recife – PE – Brazil.

Os efeitos do NaCl e fenantreno foram investigados na germinação e no crescimento de *Cunninghamella elegans* (UCP542). *C. elegans* foi cultivado em meio sintético para Mucorales (HeA) controle ou tratado com fenantreno (0,1 e 0,2mM) e NaCl a 4%. A quantificação dos esporângios germinados foi acompanhada em intervalos de 1h em 1h até 6h e o crescimento radial de *C. elegans* até 96h, com medições diárias do diâmetro da colônia. Os resultados demonstraram que 93,75% dos esporângios germinaram na presença de fenantreno a 0,1mM, como única fonte de carbono após 96 h de cultivo. O crescimento radial demonstrou que o tratamento com 0,1mM de fenantreno retardou o desenvolvimento da colônia, contudo, o fenantreno a 0,2mM inibiu totalmente o crescimento de *C. elegans*. O cloreto de sódio não proporciona nenhuma alteração no crescimento. O pH subiu para faixa de 8,0 exceto o pH do meio controle que oscilou entre 4,0 e 5,0. No meio com fenantreno a 0,1 mM como única fonte de carbono, observou-se uma biomassa de 4,6g/L em relação ao meio controle (5,77g/L). No tratamento com 0,1mM de fenantreno observou-se um efeito sub-inibidor do fenantreno no teste de toxicidade com *Artemia salina*. Os resultados obtidos sugerem que *C. elegans* é tolerante a baixas concentrações de fenantreno e que o cloreto de sódio não altera o desenvolvimento do fungo.

Palavra-chave: Ultraestrutura, *Cunninghamella elegans*, fenantreno, cloreto de sódio

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's) são compostos carcinogênicos derivados do petróleo, gerados naturalmente e de forma contínua, pela queima incompleta de substâncias orgânicas, como madeira e matéria orgânica [26, 30, 31, 32, 34]. Contudo, a contaminação do solo apresenta-se como um típico efeito da atividade antropogênica, devido à produção ambiental dos HAP's nos distintos setores industriais, como, na fabricação de corantes, fibras sintéticas, nas substâncias químicas com habilidade de preservação, etc. Independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação dos HAP's, devido aos combustíveis, que podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis [5]. Além disso, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são também fontes geradoras de HAP's nas cidades. Considerando, estas atividades, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos HAP's, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água [1, 18].

Tendo em vista que o caráter recalcitrante dos HAP's, torna-se evidente no meio ambiente e que muitos deles apresentam natureza carcinogênica, mutagênica e teratogênica, além de efeitos tóxicos aos seres vivos [2, 7, 17, 25, 26, 33]. Faz-se necessário o emprego de metodologias utilizando microrganismos nos processos de descontaminação de áreas poluídas, considerando o custo relativamente baixo e resultados significativos, na remoção de compostos tóxicos do ambiente [2, 26]. Alguns fungos podem crescer bem em ambientes salinos, como água do mar e salmoura de indústria de conservantes. Assim, fungos que habitam ambientes salinos devem ser capazes de resistir a altas concentrações de sódio e cloreto no ambiente, sendo a pressão osmótica, destes fungos, dependente da absorção dos solutos do meio externo [3].

Vários ascomicetos e fungos imperfeitos são capazes de crescer em condições salinas. Entretanto, quando células fungicas são transferidas para um meio contendo alta concentração de cloreto de sódio, pode ocorrer uma elevação da fase "lag" de crescimento, como observado em *Debaryomyces hansenii* [18].

Nestas condições, um dos primeiros eventos que ocorrem na célula é a inibição do processo glicolítico. Isto parece ocorrer devido ao aumento do conteúdo celular de sódio e potássio; com redução na produção de glicerol e de etanol, e aumento na produção de trealose [3]. Neste trabalho foi investigado o efeito fisiológico do fenantreno e do cloreto de sódio sob a

germinação de esporangiólos, o crescimento radial, no perfil de crescimento e nos aspectos ultraestruturais de *C. elegans*, na presença do fenantreno a 0,1mM e 0,2mM, respectivamente, com a finalidade de estabelecer as respostas frente a toxicidade do HAP.

## **Material e Métodos**

**Microrganismo.** *Cunninghamella elegans* UCP 542, isolada de sedimento de mangue do município de Rio Formoso, Pernambuco, Brasil [12], integrante da coleção de culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco) e registrada na World Federations Culture Collection – WFCC, mantida no meio de cultura BDA à 5°C.

**Fenantreno.** O hidrocarboneto aromático policíclico fenantreno foi obtido da Sigma. A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o fenantreno em acetona a uma concentração de 10mM, filtrada em membrana de Millipore e armazenada em frasco âmbar, a temperatura de 5°C.

## **Condições de Cultivo**

**Germinação de esporangiólos de *Cunninghamella elegans*.** O pré-inóculo foi preparado a partir do crescimento de *C. elegans* em placas de Petri contendo o meio YMA (yeast extract 3g, malt extract 3g, glicose 10g, peptona 5g e ágar 15g por litro). Os esporangiólos foram coletados em salina tamponada, contados em câmara de hematocitômetro, transferidos  $10^7$  esporangiólos/mL para frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio Hesseltine e Anderson [17] (4% glicose) usado como controle e tratados com 4% de cloreto de sódio ou fenantreno a 0,1 e 0,2mM como única fonte de carbono. Em seguida os frascos foram incubados a 28°C sob agitação de 150 rpm, sendo retirada alíquotas de 40µL, a cada 60 minutos, durante 6h. A emissão do tubo germinativo foi visualizada ao microscópio óptico com a objetiva de 40x, sendo contado um total de 200 esporangiólos para cada amostra. Nos intervalos de 2 e 4 h foram retiradas amostras para fixação e posterior observação através de microscopia eletrônica de varredura. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

**Crescimento Radial.** *C. elegans* foi crescida por 48 h, em placas de Petri no meio de cultura YMA, onde foram removidos assepticamente discos (5mm de diâmetro). Os discos foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo 20 mL do meio Hesseltine e Anderson [17] controle (4% glicose) e tratados com 4% de cloreto de sódio ou fenantreno a 0,1 e 0,2mM como única fonte de carbono. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura de 28°C na ausência de luz. A avaliação do crescimento radial foi realizada através de medições diárias diametralmente opostas, com auxílio de uma régua milimetrada. As leituras foram realizadas em intervalos de 6h, até um período de 48h. A curva de crescimento foi construída com base nas médias dos valores obtidos.

**Curva de crescimento.** O pré-inóculo para a curva de crescimento foi realizado a partir de um cultivo prévio dos esporângios de *C. elegans* em milhocina a 6% por 48h, sob agitação orbital de 150 rpm, a 28°C. Após esse período esporângios foram contados em hematocítmetro para uma concentração de  $10^7$  esporângios/mL. Cerca de 100mL do inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 1000mL contendo 400mL do meio de cultura descrito por Hesseltine e Anderson adicionado de glicose (4,0%), como controle ou como tratado contendo fenantreno a 0,1 ou 0,2 mM e 4% de cloreto de sódio. Após o período de incubação a 28°C, sob agitação orbital de 150 rpm, alíquotas foram retiradas a cada 2 horas nas primeiras 12 horas e posteriormente, com intervalos de 12 horas até 72 horas. As culturas foram filtradas (filtro nylon silkscreen 120F) e, posteriormente, a biomassa foi colocada em frascos previamente tarados, submetida ao processo de liofilização mantida em dessecador a vácuo, à temperatura ambiente. A biomassa foi determinada por gravimetria e do líquido metabólico foi determinado o pH.

**Determinação do pH.** O acompanhamento do pH do líquido metabólico dos distintos ensaios foi determinado por potenciometria.

**Teste de Toxicidade.** O teste de toxicidade utilizando *Artemia salina* foi realizado segundo [30]. O teste foi realizado com amostras com o líquido metabólico em triplicata. As concentrações da solução filtrada foram 25%, 50%, 75%, sendo o volume final do teste de 4,5mL. Para a amostra de 10% de concentração foram utilizados 0,5 mL da amostra para 4,5mL de solução salina, e assim sucessivamente. Foram utilizados cistos do

microcrustáceo para eclosão a 28°C por 24h. Após eclosão deu-se início ao teste com 10 indivíduos em frascos de vidro de capacidade para 5mL. Após 24 horas de ensaio, a 28°C, foram realizadas as contagens dos organismos não viáveis, determinando a percentagem de toxicidade para a *Artemia salina*.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura [8]**

Amostras de *C. elegans* crescida em meio HeA controle e tratado com fenantreno 0,5 ou 1,0mM e 4% de cloreto de sódio foram coletadas nos intervalos de 60 minutos, durante 6h. Apenas os horários de 2 e 4h foram fotografados. As amostras foram lavadas duas vezes em PBS (solução salina tamponada) pH 7,2 durante 10 minutos. Em seguida, fixadas com glutaraldeído 2.5% em tampão fosfato, 0,1M, pH 7,4 durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a etapa de fixação, todas as amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato, duas vezes, durante 10 minutos. Seguindo-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1%, em tampão fosfato, durante 1 hora a temperatura ambiente, condições de escuridão. Em seguida, as amostras foram mais uma vez lavadas com tampão fosfato 0,1M, sendo posteriormente submetidas ao processo de desidratação. Para a desidratação das amostras foi utilizado álcool etílico, em proporções de 50%, 70%, 90% (5 minutos para cada troca) até a proporção de 100% (três vezes, 10 minutos cada troca). Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico para eliminação total da fase líquida, seguindo-se a montagem em suportes de alumínio e posterior metalização. Assim preparadas, as amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL LSM 5600 LV).

## **Resultados e Discussão**

### **Influência do cloreto de sódio e do fenantreno na germinação e na morfologia de *C. elegans* UCP542**

A germinação dos esporangiólos de *C. elegans* em meio de cultura Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,1mM ou 0,2mM), está representada na Fig. 1. Os esporangiólos de *C. elegans* iniciaram a emissão de tubos germinativos 2h após a inoculação nas diferentes condições de cultivo. Porém, na Fig. 2A observa-se um efeito retardado na emissão dos tubos germinativos para as condições

contendo fenantreno 0,2mM e/ou cloreto de sódio a 4% em relação ao controle que em 2h inicia o processo germinativo. O meio Hesseltine e Anderson tratado com cloreto de sódio a 4% causam um efeito halofílico a nível celular, porém é possível que ocorra um aumento da permeabilidade nesta concentração e com isso haja uma elevada produção de quitosana existente na parede celular dos fungos [4, 11, 31].

Quando o microrganismo foi submetido ao tratamento com fenantreno 0,1mM ocorreu germinação de 93,75%, em relação ao meio controle que apresentou 96% de germinação em 6h de incubação. Esses resultados sugerem que, provavelmente o fenantreno tenha promovido alterações na permeabilidade celular, modificando o mecanismo de germinação. Assim, os dados obtidos com *C. elegans* confirmam que a alteração na membrana plasmática seguida do acúmulo de substâncias como poliois e glicerol em fungos halotolerantes do gênero *Aspergillus*, no sentido de equilibrar com a pressão osmótica externa [35].

### **Influencia do cloreto de Sódio e fenantreno no crescimento de *C. elegans* UCP542**

A Fig. 3 apresenta crescimento radial com nível de inibição nos tratados com fenantreno (0,1mM e 0,2mM) como única fonte de carbono e nos tratados com fenantreno associado ao cloreto de sódio. Todos tiveram valores inferiores ao controle (7,34cm). Tam et al [32] relataram que, para um consórcio de bactérias, a salinidade não inibe acentuadamente seu crescimento e ainda favorece a biodegradação do fenantreno.

O perfil de crescimento de *C. elegans* está apresentado na Fig. 4, produção da biomassa (g/L) e determinação do pH no decorrer das 72 horas de fermentação. Os tratados com fenantreno 0,1 ou 0,2mM apresentaram uma menor produção de biomassa (3,6 e 2,8g/L, respectivamente) durante o período de incubação de 72 h em relação ao controle (5,77g/L). Os primeiros estudos com *Mycobacteria* revelam que as células absorvem os hidrocarbonetos e que podem usar o fenantreno (ou outro HAP's) como uma fonte exclusiva de carbono e energia [36]. Porém, alguns estudos relatam os efeitos da salinidade na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e relacionam a salinidade à mineralização do fenantreno e naftaleno em sedimentos de estuários [20,31,34,35].

Estudos demonstram que a evaporação em lagoas salinas diminui e a biodegradação de hidrocarbonetos com o aumento da salinidade devido à redução no metabolismo dos

microrganismos [20]. Essas pesquisas corroboram com os resultados aqui obtidos que demonstram que o cloreto de sódio associado ao fenantreno promove uma redução do crescimento (Fig.4) microbiano, provavelmente devido a um efeito na membrana citoplasmática causando permeabilidade celular. E outros estudos demonstram que o aumento da temperatura durante o cultivo inibe o crescimento de *Rhodococcus* na presença do pireno [34]. Os autores não incluíram informações sobre a temperatura na ausência do pireno.

O comportamento do pH no decorrer do período de 96 horas de cultivo demonstra discreta oscilação, apresentando valores aproximadamente constantes na faixa de 6,0 a 8,0 nas condições com os tratamentos isolados com fenantreno ou com o fenantreno associado ao cloreto de sódio. Esses resultados quando comparados ao controle (ausência de tratamentos) indicam que o crescimento de *C. elegans* no meio Hesseltine e Anderson sugere a utilização da fonte de carbono glicose na via glicolítica mantendo assim o pH 4,0. Estes resultados diferem dos encontrados por Freitas Silva [11] que observou oscilação de pH de 4 a 7. Por outro lado, Stamford et al [31] quando avaliaram o comportamento de pH durante o cultivo de *C. elegans*, relataram valores entre 5 e 7 após 96 horas de cultivo. Ambos os resultados são semelhantes aos deste estudo.

### **Viabilidade celular do microcrustáceo *Artemia salina* em meio com Fenantreno e ou Cloreto de sódio após fermentação na presença de *C. elegans***

A Tabela 1 apresenta a viabilidade celular de *Artemia salina* frente líquidos metabólicos obtidos do controle e dos tratamentos com fenantreno e cloreto. Os resultados obtidos demonstraram que o cloreto de sódio (4%) não produz metabólitos que interfiram com a viabilidade celular de *A. salina*. No entanto, o tratamento com fenantreno 0,1 e 0,2mM, quando comparados com o controle (ausência de tratamento) causaram 50% e 100%, respectivamente de morte do microcrustáceo. É provável que os metabólitos formados pelo tratamento com o fenantreno sejam altamente tóxicos e letais. O meio contendo cloreto de sódio associado ao fenantreno a 0,1mM, não ocorreu nenhuma alteração na viabilidade celular do microcrustáceo, demonstrando ser um ambiente favorável o desenvolvimento da *A. salina*. Contudo, a concentração de 0,2mM do fenantreno demonstra um efeito drástico no desenvolvimento de *A. salina*. Os estudos realizados sugerem que ocorreu a formação de

metabólitos tóxicos, com efeito “killer” sobre o desenvolvimento do microcrustáceo. Segundo, El- Naggat et al [10], Keating et al [21] e Weissenfels et al. [37] os HAP's apresentam efeitos tóxicos e genotóxicos dependendo das suas relações com o meio ambiente, podendo em concentrações subinibitórias não apresentar efeitos letais, contudo, os derivados dos hidrocarbonetos apresentam toxicidade superior. Essas informações apóiam os estudos realizados com *C. elegans* demonstrando que das concentrações utilizadas de fenantreno, apenas 0,2mM apresenta efeito altamente tóxico. No entanto, a concentração subinibitória não altera a viabilidade celular de *A. salina*. Estudos tem sido realizados no campo da ecotoxicologia sobre os efeitos dos compostos lipofílicos em microrganismos que estão presentes em ambientes poluídos [4, 5, 7, 21, 22, 23, 36]. Exemplos de microrganismos em ambientes contaminados com óleos [28, 30, 36], hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, solventes industriais [22, 28] e agroquímicos [28]. Os efeitos no crescimento, na respiração e na metagenese dos microrganismos estão ligados à toxicidade em vários ambientes poluídos [17, 31, 32, 35, 37]. Foram colhidos dados dos efeitos de compostos xenobióticos e junto com o conhecimento físico-químico destes compostos, para descrever o destino destes poluentes no meio ambiente [12, 13, 14, 15]. Essa relação tem sido usada com sucesso para pesquisar toxicidade em vários ambientes [21, 24].

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

Os esporângios de *C. elegans* cultivados em meio HeA controle e tratados com fenantreno 0,1mM e 0,2mM alteram a eletrodensidade, volume e textura. Com 2h de cultivo, observa-se no HeA controle ou tratado com fenatreno, esporos ornamentados, início da germinação, alta eletrodensidade, e superfície regularmente enrugada (Fig. 5 A, B, C). Com 4 h de cultivo, não houve o desenvolvimento de hifas, exceto no HeA controle (Fig. 6 A, B, C). A literatura revela inúmeros trabalhos associados a análise da ultraestrutura de fungos relacionados a forma e textura dos esporângios [6, 24] Microrganismos resistentes à presença de fenantreno são relatados, surgindo o fenômeno de acumulação deste HAP nas células [26]. O presente trabalho não relata apenas a habilidade da linhagem UCP 542 de *C. elegans* em crescer na presença de fenantreno como também demonstra o efeito inibidor do HAP sobre o desenvolvimento das culturas em altas concentrações. Com a microscopia eletrônica de varredura, observou-se diferenças

associadas ao padrão de desenvolvimento dos esporangíolos, sua eletrondensidade e entumescimento aumentados entre as amostras cultivadas na presença ou ausência de fenantreno. Estes são os primeiros estudos associados aos efeitos do fenantreno sobre a ultraestrutura de *C. elegans*. A utilização da microscopia eletrônica de varredura tornou-se possível à análise da estrutura fina de fungos relacionados à esporangiogênese e aspectos gerais dos esporos [9]. Contudo trabalhos associados aos efeitos de fenantreno sobre o micélio de fungos não são relatados.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES, CNPq e FINEP.

### **Referência Bibliográfica**

1. R. Barreiro, J. R. Pratt. *Water Environ. Res.* (1992) 64: 632–641.
2. D.M. Beckles, C.H. Ward., J.B. Hughes. *Environ. Toxicol. Chem.* (1998) 17: 1246-1251.
3. M. Edgley, A.D. Brown. *J. Gen. Microbiol.* (1983) 129: 3453-3463.
4. G. M. Campos-Takaki. *Chitin and Chitosan Opportunities & Challenges* (Ed.). SSM International Publication. Contai, Índia. (2005) pp. 59-94.
5. C.E. Cerniglia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* (1997) 19: 324-333.
6. N. Christofi, I.B. Ivshina. *Journal of Applied Microbiology.* (2002) 93:915-929
7. A.R. Collins, J.S. Duthie, L.V. Carcinogenesis. (1993)14:1733–1735.
8. T. Cserháti, Z. Ille's, S. Nemes-Ko'sa. *J. Appl. Bacteriol.* (1992)72: 523–528.
9. W. De Souza. *Manual Sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica.* (2000) 13(4): 21-47.
10. M.A. El- Naggar, S.A. El-aasar, K.L. Barakat. *Water Res.* (2004) 38: 4313-4322.
11. M.C. Freitas Silva. *Efeitos da Salinidade e de Fontes de Carbono no Crescimento de Cunninghamella elegans e na Produção de Quitina e Quitosana.* (2006) Tese de Mestrado 103p.

12. P.F. Gomes, A.E. Nascimento, K. Okada, A.S. Messias, A.E.N. Sharia, G.M. Campos-Takaki. (2000) Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and prospects. 82p.
13. B.Hamsch, C. Pelouin P. Vom Wasser. (1990) 74: 65–74.
14. C. Hansch, A. R. Liss. New York. (1989) 23–30.
15. C. Hansch. Structure-activity relationships of chemical mutagens and carcinogens. *Sci. Total Environ.* (1991) 17–29.
16. J. Hermens. *Sci. Total Environ.* (1991) 1–7.
17. C.W. Hesseltine, R.F. Anderson. *Mycologia.* (1957) 49: 449-452.
18. J. A. Hobot, D. H. Jennings. *Experimental Mycology.* (1981) 5: 217-228.
19. R. J. S. Jacques. *Cienc. Rural.* (2007) 37(4): 1192-1201.
20. R.A. Kanaly, S. Harayama. *Journal of Bacteriology.* (2000) 2059-2067.
21. K. Keating, P.B. Caffrey, B.C. Dagbusan. *Environ Toxicol Chem.* (1996) 15: 348-352.
22. R.P. Kerr, D.G. Capone. *Mar. Environ. Res.* (1988) 26: 181-198.
23. A. C. Kilroy, N. F. Gray. *Water Res.* (1992) 26: 887–892.
24. H. Könemann. *Toxicology.* (1981) 19: 209–221.
25. J. D. Moody, J. P. Freeman, C. E. Cerniglia. *Biodegradation.* (2005) 16: 513-523.
26. Y. Ohta, Y. Tomita, M. Oda, S. Watanabe, S. Murakami, Y. Ann Thorac Surg. (1999) 68: 1034-1038.
27. B. Preetha, T. Viruthagiri. *Journal of Hazardous Materials.* (2007) 143: 506–510.
28. C. Ravelet, S. Krivobok, L. Sage, R. Steiman. *Chemosphere.* (2000) 40: 557-563.
29. A. C. Singer, W. E. Huang, J. Helm. *Journal of Microbiological Methods.* (2005) 60: 417-422.
30. A.K. Singh, J. P. Gaur. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (1991) 21: 103–108.
31. T.C.M. Stamford, T.L.M. Stamford, N.P. Stamford, B.B., Neto, G.M. Campos-Takaki. *Electronic Journal of Biotechnology* (2007) 10(1): p1.
32. N.F.Y. Tam, C.L. Guo, W.Y. Yau. *Pollution Bulletin.* (2002) 45: 316–324.
33. P. van Beelen, A.K. Fleuren-Kemila, M.P.A. Huys, A. C. P. van Montfort, P. L.A. van Vlaardingen. *Environ. Toxicol. Chem.* (1991) 10: 775–789.

34. P. van Beelen, A.K. Fleuren-Kemila, M.P.A. Huys, A.C.H.A.M. van Milvan, P.L.A. Vlaardingen. (1990) 431–438.
35. J. D. van Hamme, A. Singh, O. P. Ward. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2003) 67:503-549.
36. U. Walter, M. Beyer, J. Klein, H.J. Rehm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1991) 34: 671–676.
37. W.D. Weissenfels, H.J. Klewer, J. Langhoff. *Applied Microbiology Biotechnol.* (1992) 36: 689-696.
38. M. D. Womack, D. A. Kendall, R. C. MacDonald. *Biochim. Biophys. Acta.* (1983) 733: 210–215.
39. C. Zhang. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (2005) 67(5): 600-618.
40. G. J. Zylstra, X. P. Wang, K. E. V. A. imDidolkar. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1994) 721: 386–398.

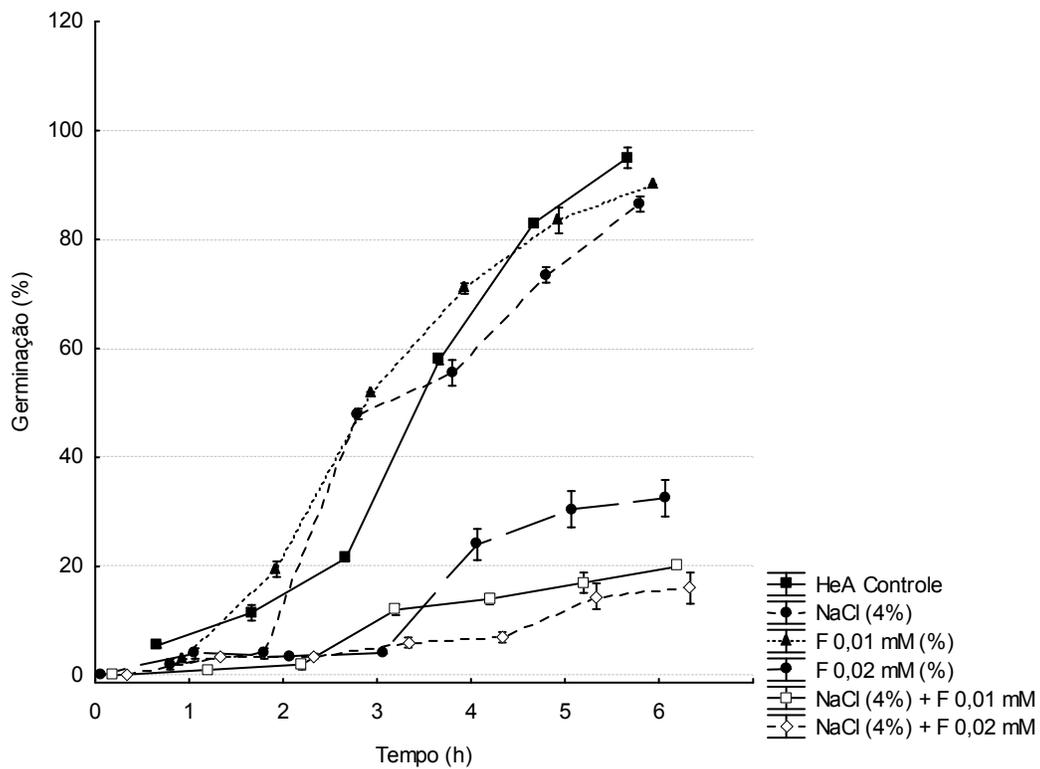


Figura 1: Germinação dos esporângios de *C. elegans* em meio Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,1mM ou 0,2mM), por 6 h a 28°C com 150 rpm de agitação.

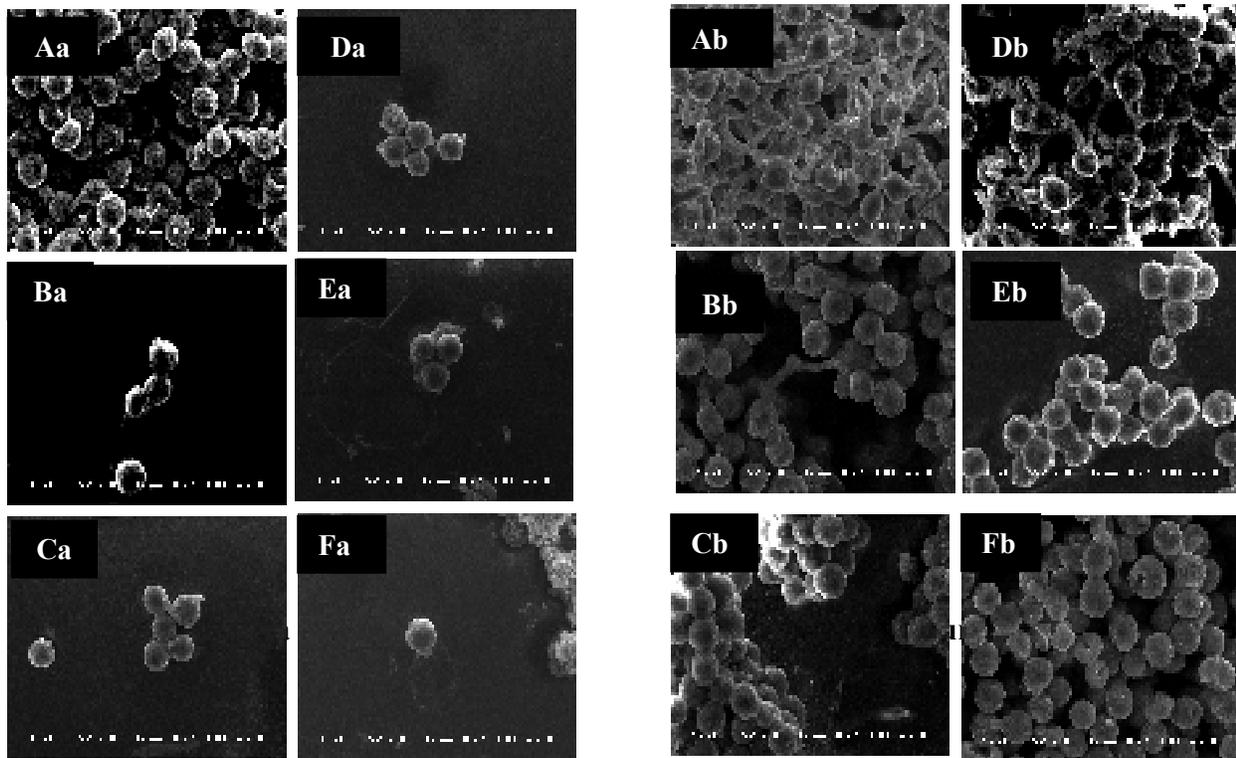


Figura 2: Germinação dos esporangiólos de *Cunninghamella elegans* em meio Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,1mM ou 0,2mM) com 2h (**Fig. 2a**) e 4h (**Fig. 2b**) de incubação a 28°C, sob agitação de 150 rpm. **Aa** – Controle; **Ba** - cloreto de sódio a 4%; **Ca**– cloreto de sódio a 4% e Fenatreno 0,1mM; **Da**- fenantreno a 0,1mM ; **E** – 4% cloreto de sódio e fenantreno a 0,2 mM; **Fa**- fenantreno a 0,2mM. **Ab**– Controle ; **Bb**- 4% cloreto de sódio; **Cb** - 4% cloreto de sódio e fenantreno a 0,1 mM ; **Db** – fenantreno a 0,1mM; **Eb** – 4% cloreto de sódio e fenantreno a 0,2 mM ; **Fb**- fenantreno a 0,2 mM.

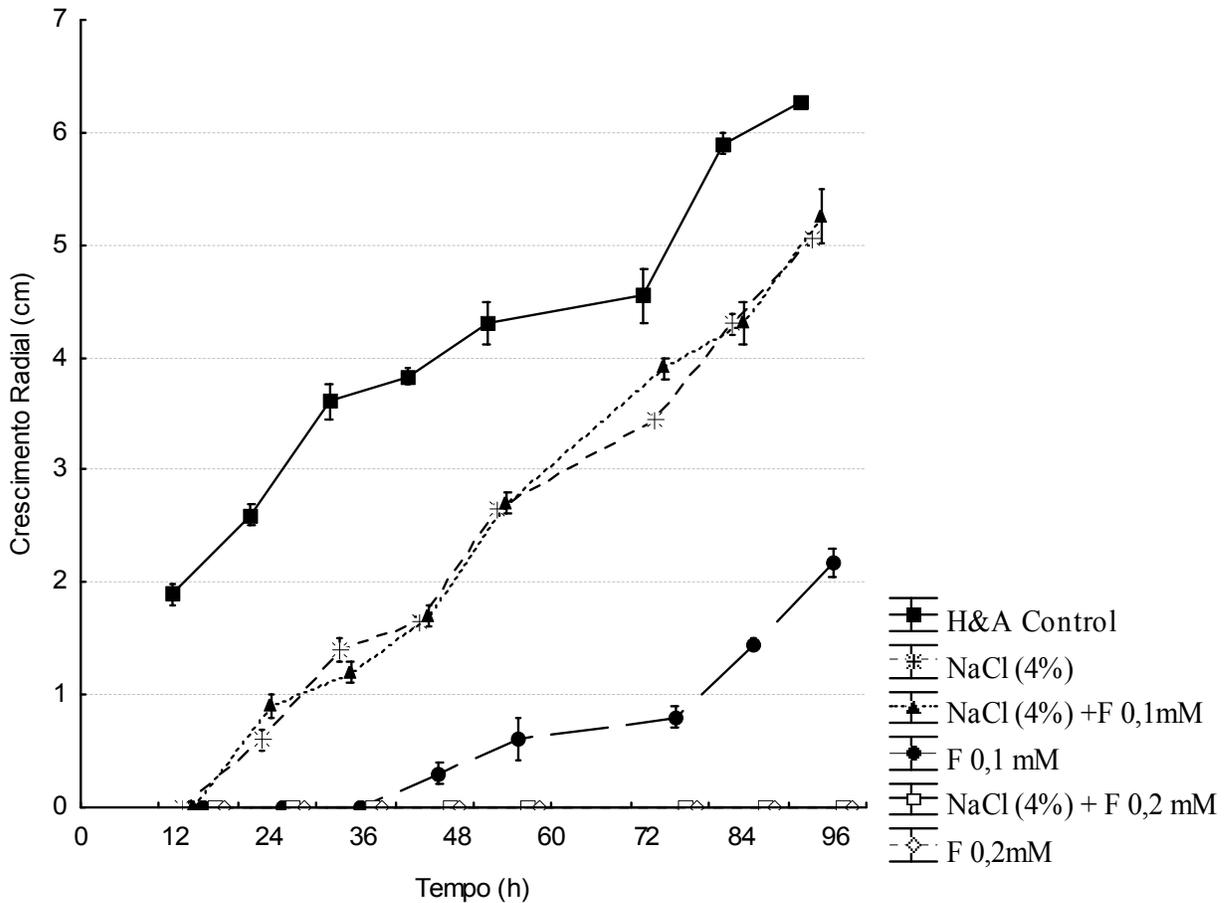


Figura 3: Crescimento Radial de *C. elegans* em meio solidificado Hesseltine e Anderson controlado (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,1mM ou 0,2mM), por 96 h a 28°C.

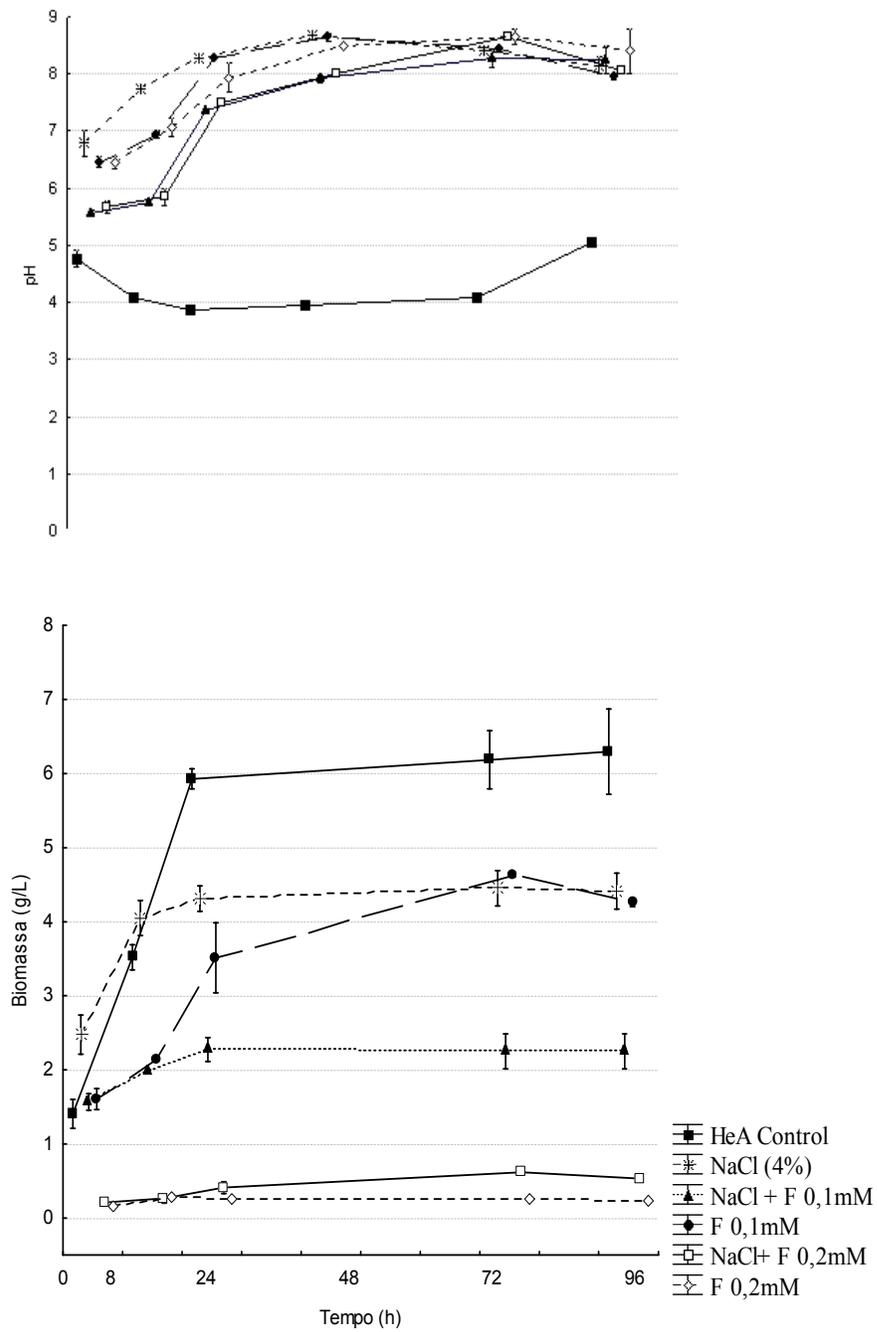


Figura 4: Curva de Crescimento de *C. elegans* em meio Hesseltine e Anderson controle (4% glicose) e tratado com 4% de cloreto de sódio e fenantreno (0,1mM ou 0,2mM), por 96 h a 28°C, em 150 rpm de agitação.

Tabela 1: Teste de Toxicidade utilizando *Artemia salina*

<b>AMOSTRAS</b>	<b>VIABILIDADE <i>Artemia salina</i></b>
HeA*	100%
NaCl (4%)	100%
Fen. 0,1 mM	50%
Fen. 0,2mM	0%
NaCl (4%) + Fen. 0,1mM	100%
NaCl (4%) + Fen. 0,2 mM	0%

\*HeA = glicose (40g); Asparagina(2g); tiamina(0,05g); fosfato de K monobásico(0,5g); Sulfato de Mg(0,25g)

\*Fen = Fenantreno

**Segundo Artigo**

**Effect of Phenanthrene on the Germination, Radial  
Growth and Chitin and Chitosan production by  
*Cunninghamella elegans* Lendner**

**Manuscrito publicado como capítulo de livro em:**

***Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology***

## Effect of Phenanthrene on the Germination, Radial Growth and Chitin and Chitosan production by *Cunninghamella elegans* Lendner

M.C.F. Silva<sup>1,6</sup>; M.Moraes Filho<sup>2,6</sup>; A.M.T. Jara<sup>4,6</sup>; A.C. Silva<sup>4,6</sup>; T.C.M.Stamford<sup>3,6</sup>; G.M. Campos-Takaki<sup>5,6,\*</sup>

<sup>1</sup> Post-graduation in Fungi Biology, Phone 51 81 92387606, [martacfs@yahoo.com.br](mailto:martacfs@yahoo.com.br);

<sup>2</sup> Post-graduation in Biologic Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil; Phone 51 81 91527620, [marcosamf@hotmail.com](mailto:marcosamf@hotmail.com);

<sup>3</sup> Integrated College of Patos-(FIP), Patos, PB, Brazil; Phone 5181 96573135; [thayzastamford@yahoo.com.br](mailto:thayzastamford@yahoo.com.br);

<sup>4</sup> Master Course in Development of Environmental Processes, Phone 51 81 21194012; [aliciamdpa@yahoo.com.br](mailto:aliciamdpa@yahoo.com.br), [antoniocardoso2000@yahoo.com.br](mailto:antoniocardoso2000@yahoo.com.br),

<sup>5</sup> Department of Chemistry and <sup>6</sup>Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; Phone: 51 81 21194017; galba [takaki@yahoo.com.br](mailto:takaki@yahoo.com.br)

\*Email: [galba\\_takaki@yahoo.com.br](mailto:galba_takaki@yahoo.com.br) or [gmctakaki@pesquisador.cnpq.br](mailto:gmctakaki@pesquisador.cnpq.br)

Our study investigated the effects of phenanthrene on the germination, radial growth, and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* (UCP542). Phenanthrene is a polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) recalcitrant and persistent substance present in petroleum refinery effluents. Chitin and chitosan are a structural component of the cell wall of Mucorales order. The chitin and chitosan have economic value as due to their versatile activities and applications. *C. elegans* was cultivated on synthetic medium for Mucorales, in the condition 2 (glucose 4%, sucrose 1% and sodium chloride 1%), and the condition 8 (glucose 4%, sucrose 2% and sodium chloride 4%), without (control), and with 0.5mg/mL of phenanthrene. The profile of germination of *C. elegans* was evaluated of the sporangioles germination during the intervals of 1 to 6 hours. The radial growth of *C. elegans* was measured the colony diameter during 12 to 96 hours. The chitin and chitosan were extracted by alkali-acid treatments. The results showed that sporangioles germination initiate after 2h of incubation. The higher germination percentage occurred in the conditions 2 and 8, corresponding to 75 % (control) and 61% (treated), respectively. Similar effect was obtained in the radial growth in the presence of phenanthrene. The chitin (53.5%) and chitosan (12.6%) were increased by phenanthrene (0.5mg/L), respectively. The results suggest that phenanthrene has a negative effect on the germination and radial growth, but influenced the production of chitin and chitosan by *C. elegans*.

**Keywords** Phenanthrene, *Cunninghamella elegans*, Germination, Growth, carbohydrates

## Introduction

Petroleum is a complex mixture of hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) represent an important class of toxic environmental pollutants [1]. The interest in exploiting petroleum-degrading organisms for environmental clean-up has become central to petroleum microbiology, which developing metabolic conditions to biotransformation, biodegradation, and bioremediation of these pollutants [1]. Phenanthrene is a PAHs recalcitrant and persistent substance in petroleum refinery effluents [2]. In the microbial world, hydrocarbons are widely used by bacteria, fungi and algae as a substrate from which to extract energy, and building blocks for cellular structures. The employment of methodologies using fungi to degradation of PAHs as phenanthrene, have been studied extensively. Innumerable fungi have ability to oxidize PAHs using alternative degradative mechanisms as co-metabolism and biodegradation for energy and growth. The capabilities of the microorganisms have resulted in the development of technologies for enhanced petroleum recovery, biorefining and petroleum waste management. Biodegradation is an environmental friendly, having relatively low cost and significant results [3].

On the other hand, innumerable studies have been carried out with microorganisms for to remove toxics compounds in the environment using mechanisms of biosorption [4]. Chitin, is insoluble linear  $\beta$ 1,4- linked homopolymer of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), and it is the second most abundant polysaccharide, after cellulose. Chitosan is a cationic amino polysaccharide, essentially constituted of  $\beta$ -1,4 D-glucosamine (GlcNAc) linked to N-acetyl-D-glucosamine residues, derived from de-N-acetylation of chitin [5]. These polysaccharides are found in a wide range of natural sources, such as crustaceans, insect's annelids, mollusks, coelenterates, and are a common constituent of fungal cell walls. These polysaccharides have great economic value as due to their versatile activities and applications, including as bioremediation and biodegradation [6]. Chitin and chitosan show peculiar properties, such as: biodegradability, biocompatibility, bioactivity, selective permeability, polieletronic action, chelation, ion exchange properties, antitumor and antimicrobial activity [6], and adsorption capacity [7,8]. The aims of this investigation were to study the effects of phenanthrene on the germination, radial growth, and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* (UCP542).

## **Materials and Methods**

### **Microorganisms**

*Cunninghamella elegans* UCP 542 (Culture Collection of Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil) isolated from mangrove sediment situated in Rio Formoso, PE, and Brazil. The strain was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) slants at 4°C.

### **Phenanthrene**

The solution was prepared dissolving phenanthrene on acetone in concentration of 2 g/L. The solution was filtrated using a Millipore membrane of 0,45µm and storage in a bottle ambar, at temperature of 5°C.

### **Culture Medium and Growth profile**

The sporangioles of *C. elegans* were harvested from cultures grown for seven days at 28°C on Petri dishes containing Yeast Malte Agar (YMA) medium. A suspension of cells was prepared and counted  $10^8$  sporangioles/mL in hemacytometer. For fungal submerge cultivation, 10mL sporangioles suspension ( $10^7$  sporangioles/mL) were inoculated in Erlenmeyer's flasks of 1000mL of capacity, containing 290mL of Hesseltine and Anderson (H&A) medium, modified [9]. Freitas Silva [9] was selected the conditions 2 and 8 from factorial design  $2^3$ , as: condition 2 (glucose 4%, sucrose 1% and sodium chloride 1%), and condition 8 (glucose 4%, sucrose 2% and sodium chloride 4%), in the presence or absence of phenanthrene (0,5 mg/mL). Controls were done using H&A medium containing glucose (4%) in absence of phenanthrene pr presence of phenanthrene. The flasks were incubated at 28°C, in an orbital shaker, at 150 rpm, during 96 hours. After this period the mycelia were harvested, washed twice in distilled and deionizer water, using silkscreen nylon membrane (120 F) for filtration, and were submitted to freeze dried process. The biomass was maintained in a vacuum dissector until constant weight.

### **Evaluation of Germination**

The germination was realized removing  $10^7$  cells/ml of sporangioles to Erlenmeyers of 250 mL of capacity, containing 50mL of H&A culture medium modified, and controls and treated with phenanthrene (0,5 mg/mL) were used. The Erlenmeyer's flasks were incubated

at orbital shaker (150 rpm) at 28°C. The experiments were realized in triplicate. Aliquots of 40 µl were removed per hour after inoculation and 200 sporangioles were counted, utilizing a light microscope. The quantification of germinated sporangioles was made estimating the proportion between germinated and non germinated cellules per hour.

### **Radial Growth Rate**

*C. elegans* was grown during 48h, in YMA medium, and aseptically was cut discs (5mm diameter) the periphery of the colony, and transferred to the center of Petri dishes containing 20 mL agar H&A medium, added or no of phenanthrene (0.5mg/mL. Petri dishes were incubated in the absence of lights. The radial growth was evaluated by measurement of colony diameter; express in millimeter each 6h, until 48h [10].

### **Chitin and Chitosan Extraction**

The extraction of chitin and chitosan involved deproteinization using 2% w/v sodium hydroxide solution (30:1 v/w, 90°C, 2 h), separation of alkali-insoluble fraction (AIF) by centrifugation (400g 15 min.), extraction of chitosan from AIF under reflux (10% v/v acetic acid 40:1 v/w, 60°C, 6 h). The separation of crude chitin was done by centrifugation (4000g 15 min.), and precipitation of chitosan by adjustment of pH 9.0. Crude chitin and chitosan were washed on a coarse sintered-glass funnel using distilled water, ethanol and acetone, and air-dried at 20°C [5,7,9,11].

### **Infrared Espectroscopy (Deacetylation Degree-DD%)**

The degree of deacetylation for microbial chitin and chitosan were determined using the infrared spectroscopy and using the absorbance ratio A1655/A3450 and calculated according to the following equation:

$$A (\%) = (A1655/A3450) \times 100 / 1.33$$

Two milligrams sample of fungal chitin and chitosan, which had been dried overnight at 60°C, under reduced pressure were thoroughly blended with 100mg of KBr, to produce 0.5mm thick disks. The disks were dried for 24h at 110°C under reduced pressure. Infrared spectrometer was recorded with a Bruker 66 Spectrometer, using a 100mg KBr disks for reference. The intensity of maximum absorption bands were determined by the baseline method.

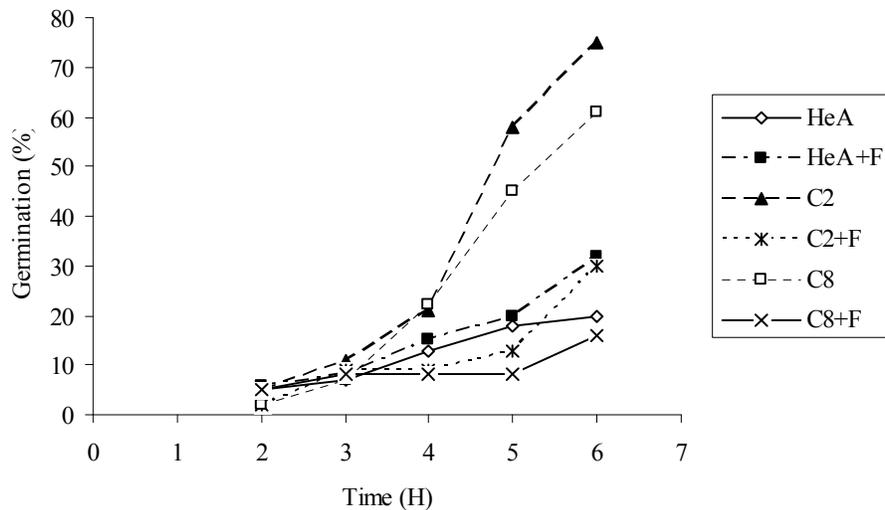
### Statistic Analysis

The data were analyzed for significance using the Student's t-test and chi-square test using STATISTICA program version 6.0 of Statsolt Inc., USA. All experiments were carried out in triplicate and the results are expressed as mean  $\pm$  S.D.

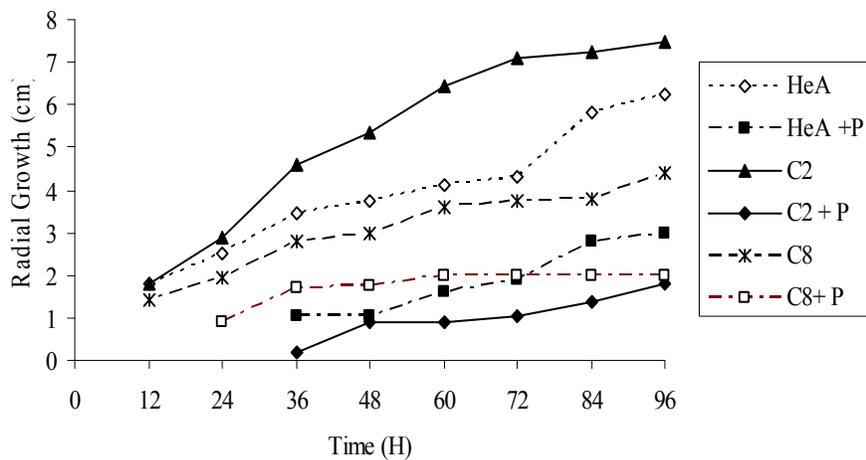
### Results and Discussion

The figure 1 showed the effects of sodium chloride, glucose, sucrose and phenanthrene on germination of *C. elegans* sporangioles. The tube germinative was formed at 6 hours of incubation for the experimental conditions 1 (glucose 4%, sucrose 1%, sodium chloride 1%) and 2 ( glucose 4%, sucrose 2%, sodium chloride 4%), in absence of phenanthrene (controls), corresponding to 60% of the germination. The results showed the inhibition of phenanthrene on the germination process of *C. elegans*. The effect of the polycyclic aromatic hydrocarbons-HAPs on the germination is not observed in the literature. The radial growth of *C. elegans* in presence or absence of phenanthrene in different concentration of sodium chloride, and added of glucose and sucrose is showed in figure 2. The growth in the controls and conditions 2 and 8 started after 12h of incubation. However, in the presence of phenanthrene it is a late process, only initiated after 24h of incubation.

However, we compared that effect of phenanthrene with the use of the pesticide 2,4-D, in concentration of 50.25 and 134% promoting the sporulation in *Cercospora rodmanii*. The authors were attributed this phenomenon, to a defense mechanism of the fungus [10]. Studies were observed in Micromycetes fungi grown in the presence of fluoranthene in 0.001, 0.01 and 0.1g/L concentrations, and decreased the mycelia growth, when increased the toxic concentration of the compound in the medium. The authors were observed the presence of sterile mycelia and discoloration of the colonies in some species by fluoranthene. Researches with anthracene in the concentration of 0.1g/L induced to 95% of the increase of the growth rate. On the other hand, the growth of *Doratomyces stemonitis* and *Cylindrocarpon destructans*, in presence of anthracene, were inhibited in concentration lower of 0.01g/L; *Sporormiella australis* and *Sporotrix cyanescens* were strongly inhibited by anthracene concentration of 0.1 and 1g/L [4].



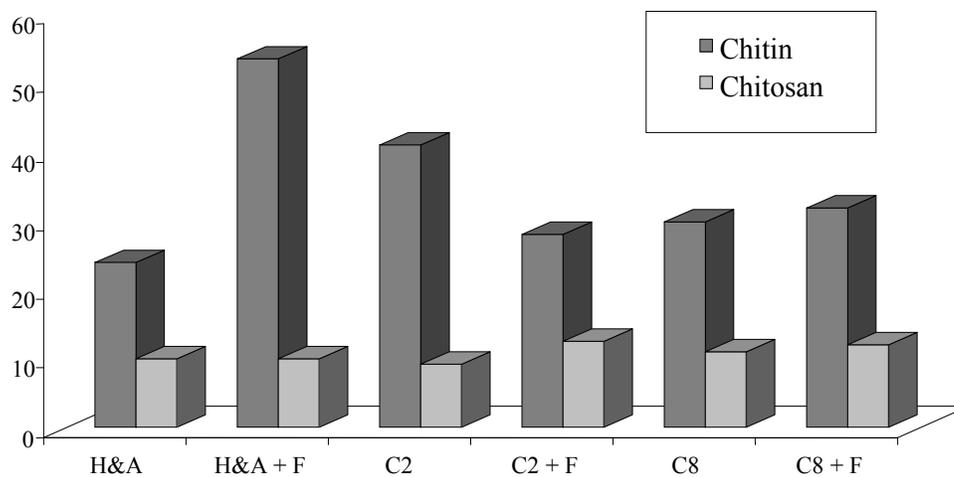
**Fig. 1** Germination of esporangioles by *C. elegans* medium H&A control or treated glucose, sucrose, NaCl and phenanthrene.



**Fig. 2** Radial Growth de *C. elegans* in medium H&A control or treated glucose, sucrose, NaCl and phenanthrene.

The figure 3 showed the percentage of chitin and chitosan extracted from *C. elegans* biomass in the different cultural conditions. The highest production of chitin (53.5%) was obtained in the presence of H&A medium control with 0.5mg/mL of phenanthrene. However, the chitosan increase of the percentage in the condition 2, when was treated with

0.5mg/mL of phenanthrene. The production of chitin and chitosan obtained in these studies showed superior results [7]. In the present study it was demonstrated that chitin and chitosan polysaccharides can be used as substrate in co-metabolic conditions for environmental contamination with PAH. Studies on relationship between the naphthalene mineralization rate and salinity in sediments showed dependence of salinity condition. Those results suggested the presence of sites exhibiting a lack or inhibition of the mineralization in the range of salinities, and preference of the microorganisms to the less saline percentage. In those studies with *C. elegans* the hyper saline condition showed that rates of hydrocarbon metabolism decreased when increasing the salinity range (3.3 to 28.4%), and the behavior of cytoplasmatic membrane. Those results were attributed to the increasing of the cytoplasmatic membrane permeability, reduction of enzymatic metabolism, and corroborated with the literature [12].



**Fig 3** Chitin and Chitosan produced by *C. elegans* UCP 542 and grown for 96 hours after the pré-inoculum, in medium H&A, varying the glucose, sucrose, NaCl and phenanthrene(0.5mg/mL).

Deacetylation degree (%DD) is an important parameter associated with the physical-chemical properties of chitosan cationic properties. In the present study chitin and chitosan obtained from *C. elegans* grown in the selected conditions (H & A and 2, both treated with phenanthrene) showed 10% DD and 80% DD, respectively. The results described by Franco

et al [7], Freitas Silva et al [9] and Stamford et al [11] reported as higher deacetylation degree of chitosan from fungi between 80 to 90%DD. New approaches developed here, we understanding of the diverse physiologies and metabolic tools of the *C. elegans* employ to access, degradation, internalize, and consumption of PAHs is initiated with cytoplasmatic membrane alteration of permeability. In addition, the varied approaches of that microorganism employ to mitigate potentially toxic effects on environment contaminated with PAHs [3].

**Acknowledgements** The authors are grateful to CAPES, CNPq, FINEP for the financial support, and UNICAP for the use of laboratories.

## References

- [1] Boonchan S., Britz, M.L., Stanley, G.A., Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol.*, **66**(3):1007-1019 (2000).
- [2] Harayama, S., Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**(3), 268-273 (1997).
- [3] Bamforth, S., Singleton, I., Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**(7), 723-736 (2005).
- [4] Barclay, C. D., Farquhar, G. F., and Legge, R. L., Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 958-963 (1995).
- [5] Andrade, V.S., Neto, B.B., Souza, W., Campos-Takaki, G. M., Factorial desing analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microb.*, **46**, 1042 (2000).
- [6] Campos-Takaki, G.M., 2005 *In: Chitin and chitosan opportunities and challenges*. Dutta, PK. (ed), SSM: International Publication, India.
- [7] Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M., Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isoleted from *Cunninghamella elegans* IFM 46109. *Rev. Analyt.*, **3**(10), 40(2005).

- [9] Freitas Silva, M. C., Barros Neto, B., Stamford, T. C. M., Campos-Takaki, G. M., Effect of Environmental Conditions on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* UCP 542 Using Factorial Design. *Asian Chitin J.*, **3**, 15-22 (2007).
- [10] Millner, P. D., Radial growth responses to temperature by 58 *Chaetomium* species, and some taxonomic relationships. *Mycologia*, **69**, 492-502 (1977).
- [11] Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Neto, B. B., Campos-Takaki, G. M., Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electron. J. Biotechnol.*, **10**(1), 61-68 (2007).

**Terceiro Artigo**

**Influência do fenantreno e da glicose na produção da quitina e da  
quitosana em *Cunninghamella elegans***

Manuscrito a ser submetido ao periódico:  
Journal Microbiology and Biotechnology

## **Influência do fenantreno e da glicose na produção e da quitina e da quitosana em *Cunninghamella elegans***

M.C. Freitas Silva<sup>1</sup>, L. R. Berger<sup>2</sup>, C. I. M. Lins<sup>3</sup>, A. Cardoso<sup>4</sup>, A. E. Nascimento<sup>5</sup>, G.M. Campos-Takaki<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Doutorado em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE- Cidade Universitária 50670-420 Recife-PE Brasil; <sup>2</sup>Mestrado em Agronomia - Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE; <sup>3</sup>Doutorado em Engenharia Química – UNICAMP, <sup>4</sup>Doutorado em Biotecnologia – Renorbio-Recife/PE; <sup>5</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB. Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. Boa Vista. Recife/ PECEP 50050-590 – \*Email: [martacfs@yahoo.com.br](mailto:martacfs@yahoo.com.br)

### **Resumo**

A influência do fenantreno e da glicose em *Cunninghamella elegans* (UCP 542) foi avaliada no meio sintético para Mucorales, utilizando um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com 4 pontos centrais para analisar os efeitos e interações da glicose associada ao fenantreno. A variável resposta foi o crescimento do fungo, a produção de quitina e quitosana e o arranjo das microfibrilas. A maior inibição do crescimento de *C. elegans* foi observada na presença de glicose a 0,6%. Contudo, quando a concentração de glicose foi aumentada para 6%, observou-se uma grande redução da inibição do crescimento, quando comparado ao controle (meio sem fenantreno). O maior rendimento de quitina e quitosana foi observado na condição E1 (0,6% de glicose), sem a presença do fenantreno, com valores de 26% e 20%, respectivamente. O diagrama de Pareto confirmou os efeitos positivos da glicose (0,6%). Os estudos ultraestruturais com quitina e quitosana demonstraram que o fenantreno aparentemente, não causa alterações na estrutura dos polissacarídeos. As microfibrilas de quitina não apresentaram quaisquer alterações, sugerindo que é um polissacarídeo inerte à ação do fenantreno, mesmo na concentração mais elevada (0,2mM). Contudo, observou-se cristais de fenantreno ligados à quitosana, sugerindo habilidade de remoção. Portanto, os dados obtidos com a influência do fenantreno demonstram o potencial do fungo *C. elegans*, favorecendo o seu emprego na biorremediação de ambientes contaminados por fenantreno.

Palavras-chave: *Cunninghamella elegans*, fenantreno, quitina e quitosana, microfibrilas

## **Introdução**

A quitina é um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza, constitui o exoesqueleto dos crustáceos, insetos e a parede celular dos fungos [1]. É um biopolímero composto de resíduos de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), em ligações  $\beta$  1,4. As microfibrilas de quitina estão interiorizadas em uma matriz amorfa, produzindo uma estrutura que dá rigidez à parede. Esta matriz é que contém as proteínas e os polissacarídeos tais como os glucanos ou mananos [10]. A quitosana é um polímero de cadeia linear  $\beta$  1,4 D-glicosamina, derivada da desacetilação natural da quitina que é considerada o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza depois da celulose. A quitosana pode ser encontrada na parede celular dos fungos, particularmente os Zygomycetes e apresenta uma cadeia natural hidrofílica com uma configuração tridimensional,  $\alpha$ -helical estabilizadas por pontes de nitrogênio [1]. A quitosana é policatiônica, atóxica, biodegradável, com funções antimicrobianas, com numerosas aplicações na agricultura, indústrias de alimentos e farmacêuticas, tais como na preservação dos alimentos [2–7], clarificação de sucos [8], remoção de metais pesados e corantes [9–11], e também nas indústrias de cosméticos. Porém, a eficiência da quitosana depende do peso molecular [14] e grau de desacetilação. Os avanços biotecnológicos para a síntese de quitosana através da parede celular dos fungos demonstram serem mais eficientes e menos agressivos ao meio ambiente [15–17]. Neste trabalho foi investigada a ação do fenantreno no teor de quitina e quitosana de *Cunninghamella elegans*, associado ou não a glicose, através de um planejamento fatorial completo.

## **Material e métodos**

### **Microrganismo**

*Cunninghamella elegans* (UCP542) isolado por GOMES [18] gentilmente cedido pelo Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP), registrados no World Federation Culture Collection – WFCC . O microrganismo está mantido no meio de Batata Dextrose Agar a 5°C.

### **Meio de Cultivo**

O meio base foi Hesseltine e Anderson (1957) e as modificações [1,7] de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$

### **Preparação do Inóculo para Fermentação**

Os esporangiólos de *C. elegans* cresceram durante sete dias a 28°C em placas de Petri contendo o meio Yeast Malt Agar (YMA). Utilizando-se uma cultura monospórica de *C. elegans*, foi realizada a padronização de inóculo através de contagem de esporangiólos em hematocítmetro para uma concentração final de  $10^7$  esporangiólos/mL. Cerca de 10mL do inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 1000mL contendo 250mL do meio de cultura descrito por Hesseltine e Anderson (1957), adicionado de concentrações distintas de glicose e fenantreno, segundo as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial, seguido de incubação a 28°C, 96 horas, sob agitação orbital de 150 rpm. Ao final do crescimento a biomassa foi coletada por filtração em membrana de fibra sintética de silkscreen (120 F), seguida de duas lavagens com água destilada gelada, submetida à liofilização e posterior determinação do peso seco por gravimetria.

### **Extração de Quitina e Quitosana**

O processo de extração da quitina e quitosana foi realizado de acordo com JIN – HU et al (1999). O processo constou de desproteíntização da biomassa pelo tratamento com uma solução de hidróxido de sódio a 1M (10:1 v/w, 121°C, 15min). Em seguida, separação da fração alcali-insolúvel (AIF), através de centrifugação (4500g, 15 min), e descarte do sobrenadante. Um novo tratamento foi submetido com uma solução a 2% v/v de ácido acético (100:1 v/w, por 100°C, 15 min). Após nova centrifugação, o resíduo gerado é a quitina e o sobrenadante (filtrado) é a quitosana que foi alcalinizada até o pH 10.0, com uma solução de NaOH a 4M. Ambos os polímeros foram lavados com água destilada gelada e secos a temperatura de 20°C.

### **Espectroscopia do Infravermelho**

Dois miligramas de amostras de quitina e quitosana que foram secas *overnight* a 60°C sob pressão reduzida foram completamente homogeneizadas com 100mg de KBr. Os discos de KBr preparados foram secos por 24h a 110°C, sob pressão reduzida. A espectroscopia ao

raio infravermelho foi realizada utilizando-se FTIR (*Fourier Transform InfraRed Spectrometry*), BRUKER Mod. IFS. Discos de KBr foram utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Cerca de 1 mg de quitina e quitosana foram aderidas a um suporte de metal, seguido de cobertura em ouro paládio em Fine Coat Ion Sputter (JFC) 1100 e, em seguida, analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL LSM 5600 LV).

### **Planejamento Fatorial**

Realizou-se um planejamento fatorial  $2^2$  com 4 pontos centrais para analisar os efeitos principais do fenantreno e glicose, sobre a produção de quitina e quitosana por *C. elegans* (UCP 542). A Tabela 1 apresenta as variáveis e os níveis estudados no referido planejamento. O erro experimental estimado foi calculado por quatro repetições do ponto central. Os cálculos de todos os testes foram realizados com a ajuda do programa STATISTICA versão 6.0 da Statsoft Inc., USA.

### **Resultados e Discussão**

O crescimento de *C. elegans* de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$  está representado na figura 1-A, evidenciando que a melhor condição E1 (glicose 0,6%) apresentou 7,12 g/L após 96h de cultivo. Nos demais experimentos foram observados inibição de 29,6 %, para E3, seguido de E4 (6% glicose + 0,2 mM fenantreno) apresentou uma inibição de 43,7 %, E2 (0,6 glicose + 0,2 fenantreno) com inibição de 67% . No diagrama de Pareto observa-se uma forte interação da glicose na redução do efeito inibidor do fenantreno, sendo mais efetivo na concentração de 6% (Figura 1-B).

A figura 2 A e B, mostram o diagrama de Pareto e o teor de quitina e de quitosana, os quais são influenciados negativamente pelo fenantreno, contudo a presença de glicose atua, provavelmente, restaurando as vias de biossíntese dos co-polímeros. Segundo Chatterjee [9] *Mucor rouxii* demonstrou rendimentos em biomassa em torno de 8,0 g/L, com 60 h. Utilizando o mesmo microrganismo, Synowieck e Al-Khateeb [31] encontraram valores em

torno de 4,0 g/L após 48 horas de crescimento; porém, Tan [16], obteve um peso seco inferior ao encontrado neste trabalho.

Andrade [3], realizou a otimização da produção de quitina em *C. elegans* encontrando altos rendimentos de biomassa, que variaram de 10,0 a 14,0 g/L, após 96 horas de cultivo. Contudo, os resultados aqui descritos com o mesmo meio de cultivo demonstrou que o pH varou entre 4 e 5, no decorrer do período de 96 horas de cultivo, sendo corroborado pelos resultados obtidos por Franco [10].

Os melhores rendimentos, com percentuais médios em produção de quitina e quitosana foram obtidos na ausência do fenantreno nas condições E1 e E3 (Figura 3). A quitina apresentou um rendimento de 26% e quitosana 4%, respectivamente. Esses dados estão de acordo com os resultados de Pochanavanich e Suntornsuk [28] e Nadarajah [25] que relatam sobre a produção de quitosana por fungos é dependente das condições de cultivo, principalmente, as fontes de carbono e que, na presença de um composto tóxico esse rendimento é reduzido.

E ainda, Andrade et al. [3] e Franco [10] propuseram que *C. elegans* é um microrganismo promissor com fonte de quitina e quitosana. Para Chung [9] o processo de produção de quitina e quitosana por via microbiológica confirma que o conteúdo destes polissacarídeos na parede celular de fungos é geralmente maior em Zygomycetes, sugerindo que os mesmos podem ser considerados como fonte microbiológica dos co-polímeros [7]. Synowiecki; Al-Khateeb [33], obtiveram rendimentos de quitosana a partir da biomassa de *Mucor rouxii*, em torno de 9 % e 7,3%, Pochanavanich e Suntornsuk [28] e Nadarajah [25], reportaram rendimentos de quitosana por *Rhizopus* sp em torno de 19%, seus resultados são superiores aos descritos neste trabalho.

Os resultados obtidos nesta pesquisa para rendimento de quitina e quitosana a partir de micélio de *C. elegans* (UCP 542) mostraram-se equivalentes quando comparados com experimentos conduzidos com outros microrganismos, como também, considerando as fontes tradicionais de quitina como os crustáceos [33; 34]. Contudo, não foram observadas na literatura consultada o conteúdo de quitina e quitosana, mediados pelo efeito do fenantreno.

A figura 4 mostra a caracterização pelo espectro infravermelho da quitina e quitosana obtidas por *C. elegans* em meio de cultivo próprio para Mucorales de acordo com a condição E1 do planejamento fatorial, foi similar àquelas registradas na literatura [16-18]. Os

resultados mais significativos nesta análise foram aqueles demonstrados pelas bandas amida, aproximadamente 1658, 1559 and 1378  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4), que pode ser apontado para o acoplamento com C=O, a deformação N-H no plano CONH e a ligação CN com deslocamento de  $\text{CH}_2$ . Do mesmo modo, a quitina de *C. elegans* mostra bandas amida na região II, que foram 1559 e 1558  $\text{cm}^{-1}$ .

Estes resultados são apoiados pelas pesquisas realizadas por Shigemasa e Minami [26], Andrade et al [2] e Franco et al [20], os quais registraram que a estrutura da quitina contém dois tipos de grupos amida e que ambos formam  $\text{C}=\text{O}\cdots\text{N}-\text{H}$  bandas intermoleculares ligadas, que são também receptores para o grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

Segundo Santos et al [32] a deacetilação e o processo de regeneração, causam disfunções no retículo cristalino da quitina, induzindo uma reordenação nas ligações de hidrogênio em quitosana. Isto pode ser observado na banda central aproximadamente 3483  $\text{cm}^{-1}$  e 3305  $\text{cm}^{-1}$ , na região de deformação axial de OH, que aparece sobrepondo às bandas de deformação axial de NH, indicando a formação da ligação de hidrogênio, e o deslocamento da alta frequência de banda indica um decréscimo na ordem estrutural. Estes dados estão de acordo com a literatura de Amorim et al, [3], Andrade et al, [4], Pochanavanich e Suntornsuk [28], Santos et al, [32], Franco et al, [10] quando comparados ambos polissacarídeos, quitina e quitosana, obtidas pelos métodos microbiológicos e caracterizados pelo espectro de infravermelho.

As figuras 5 e 6 apresentam as eletromicrografias das microfibrilas de quitina e quitosana, na presença e ausência de fenantreno. As figuras não apresentam aparentemente nenhuma alteração. Observou-se na quitosana sua ação sorbente sob os cristais do fenantreno. Contudo, a carência de informações na literatura consultada impede maiores comparações relacionando a ação do fenantreno nas microfibrilas de quitina. Assim, lacunas que poderão ser superadas em um futuro próximo relacionando o mecanismo de ação do fenantreno sob conteúdo quitina e quitosana, como também sob os aspectos ultraestruturais das microfibrilas. E ainda, os dados obtidos sugerem o potencial do fungo *C. elegans*, possibilitando o seu emprego nos processos de biorremediação de ambientes contaminados por fenantreno.

**Referências Bibliográficas**

1. Andrade, V.S. Neto, B.B. Souza, W. & Campos-Takaki, G. M. 2000 Factorial desing analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microb.*, **46**, 1042
2. Arciadiacono, S. & Kaplan, D.L. 1992 Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnol Bioeng* **39**, 282–6.
3. Bégin, A. & Calsteren, M.R.V. 1999 Antimicrobial films produced from chitosan. *Int J Biol Macromol.* **26**, 63–7.
4. Bhowal, J. Ghosh, S. Chatterjee, B.P. & Guha A.K. 1999 Nutritional influence on the development and specific production of extracellular hemagglutinin from the phytopathogenic fungus *Fusarium udum*. *Biochem Arch*, **15**, 75–80.
5. Bradford, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–54.
6. Campos-Takaki, G. M. ; Dietrich, S. M. ; Gordon W. Beakes. 1983 Electron microscopic X-ray microprobe and cytochemical study of isolated cell walls of Mucoralean fungi. *Mycol. Research.*, Inglaterra, **80**, 536-541
7. Campos-Takaki, G. M.; Aspectos bioquímicos e ultraestruturais das paredes celulares de fungos da ordem mucorales (Zygomycetes). Tese de Doutorado Universidade Federal de São Paulo. 1984, 210p.
8. Carlile, M.J. & Watkinson, S.C. 1996 *The Fungi*. Tokyo, *Academic Press*. p. 385.
9. Chatterjee, S. Talukdar, D. Chatterjee, B.P. & Guha, A.K. 2002 Heavy metal ion pollution in water: management by chitosan. In: Sukla LB, Mishra VN, editors.

- Proceedings of the National Seminar on mineral biotechnology. New Delhi: Allied Publishers p. 157– 60.
10. Chatterjee, S. Adhya, M. Guha, A. K. & Chatterjee B. P. 2005 Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry* **40**, 395-400.
  11. Chen, R.H. & Tsaih, M.L. 1998 Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution. *Int J Biol Macromol* **23**, 135–41.
  12. Ying-Chien, C. Ya-Ping, S.U. Chiing- Chang, C. Huey-Lan, J.G. & Wu, W. Gaston JC, Jaung-Geng L. 2004 Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* **25**(7), 932-936.
  13. Covas, C.P. Alvarez, L.W. & Argüelles-Monal, W. 1992 The adsorption of mercuric ions by chitosan. *J Appl Polymer Sci* **46**, 1147–50.
  14. Crestini, C. Kovac, B. & Sermanni, G.G. 1996 Production and isolation of chitosan from submerged and solid state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnol Bioeng* **50**, 207–10.
  15. Dubois, M. Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. & Smith, F. 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**, 350–6.
  16. Franco, L.O. Stamford, T.C.M. Stamford, N.P. & Campos-Takaki, G.M. 2005 Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* IFM 46109. *Rev. Analyt* **3**(10), 40
  17. Freitas Silva, M.C. Barros Neto, B. Stamford, T.C.M. & Campos-Takaki, G.M. 2007 Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. *Asian Chitin Journal* **3**, 15-22.

18. Gomes, P.F. Nascimento, A.E. Okada, K. Messias, A.S. Sharia, A.E.N. & Campos-Takaki, G.M. 2000 Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and prospects. p82.
19. Hesseltine, C.W. & Anderson, R.F. 1957 Microbiological production of carotenoids. *Mycologia*, **49**, 449-452
20. Imeri, A.G. Knorr, D. 1988 Effect of chitosan on yield and compositional data on carrot and apple juice. *J Food Sci* **53**, 1707-9.
21. Jeon, Y.J. & Kim, S.K. 2000 Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr Polym* **412**, 133-41.
22. Ke-Jin, H. Wok-Wing, Y. Kwok-Ping, H. Jin-Lian, H. 1999 Rapid extraction of high-quality chitosan from Mycelia of *Absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry* **23**, 187-196.
23. McGahren, W.J. Perkinson, G.A. Growich, J.A. Leese, R.A. Ellestad, G.A. 1984 Chitosan by fermentation. *Process Biochem* **19**, 88-90
24. Miller, G. L., 1959, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
25. Mitani, T. Moriyama, A. Ishi, H. 1992 Heavy metal uptake by swollen chitosan beads. *Biosci Biotech Biochem* **56**, 985.
26. Muzzarelli, R.A.A. Rochetti, R. Stanic, & V. Weckx, 1997 M. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. In: Muzzarelli RAA, Peter MG, editors. Chitin handbook. European Chitin Society p. 109-19.

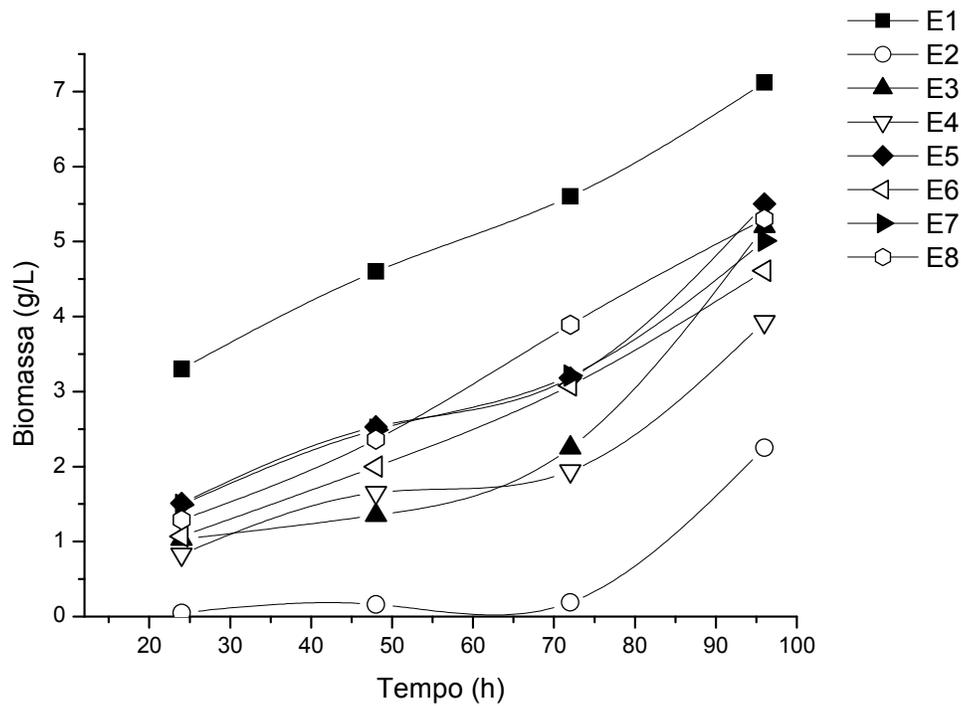
27. Nadarajah, K.; Kader, J.; Marmira, M.; Paul, D.C. 2001 Production of chitosan by fungi. *Pakist. J. Biolog. Sci.*, **4**(3), 263.
28. Ono, K. Saito, Y. Yura, H. Ishikawa, K. Kurita, A. & Akaike, T. et al. 2000 Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J Biomed Mater Res*; **49**,289–95.
29. Ouattara, B. Simard, R.E. Piette, G. Bégin, A. Holly, R.A. 2000 Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *J Food Sci* **65**, 768–73.
30. Pochanavanich, P. & Suntornsuk, W. 2002 Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microb.*, **35**, 17.
31. Pruden, J.F. Migel, P. Hanson, P. Friedrich, L. & Balassa, L. 1970 The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. *Am J Surg* **119**, 560–4.
32. Rane, K.D. & Hoover, D.G. 1993 Production of chitosan by fungi. *Food Biotech* **7**, 11–33.
33. Roller, S. & Covill, N. 1999 The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol* **47**, 67–77.
34. Santos, J.E. Soares, J.P. Dockal, E.R. Filho, S.C. Cavalheiro, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polím.: Ciên. Tecnol* **13** (4), 242. 2003.
35. Synowiecky, J. & Al-Khateeb, N.A.A.Q. 1997 Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. *F. Chem.* **60**: 435-440
36. Tan, S.C. Tan, T.K. Wong, S.M., & Khore, E. 1996 The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydr Polym* **30**, 239–42.

37. Tsai, G.J. Wu, Z.Y. & Su, W.H. 2000 Antibacterial activity of chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J Food Prot* **63**, 747–52.
38. Tasi, G.J. Su, W.H. 1999 Antibacterial activity of shrimp shell chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot* **62**, 239–43.
39. White, S.A. 1979 Farina PR, Fulton I. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 323–8.

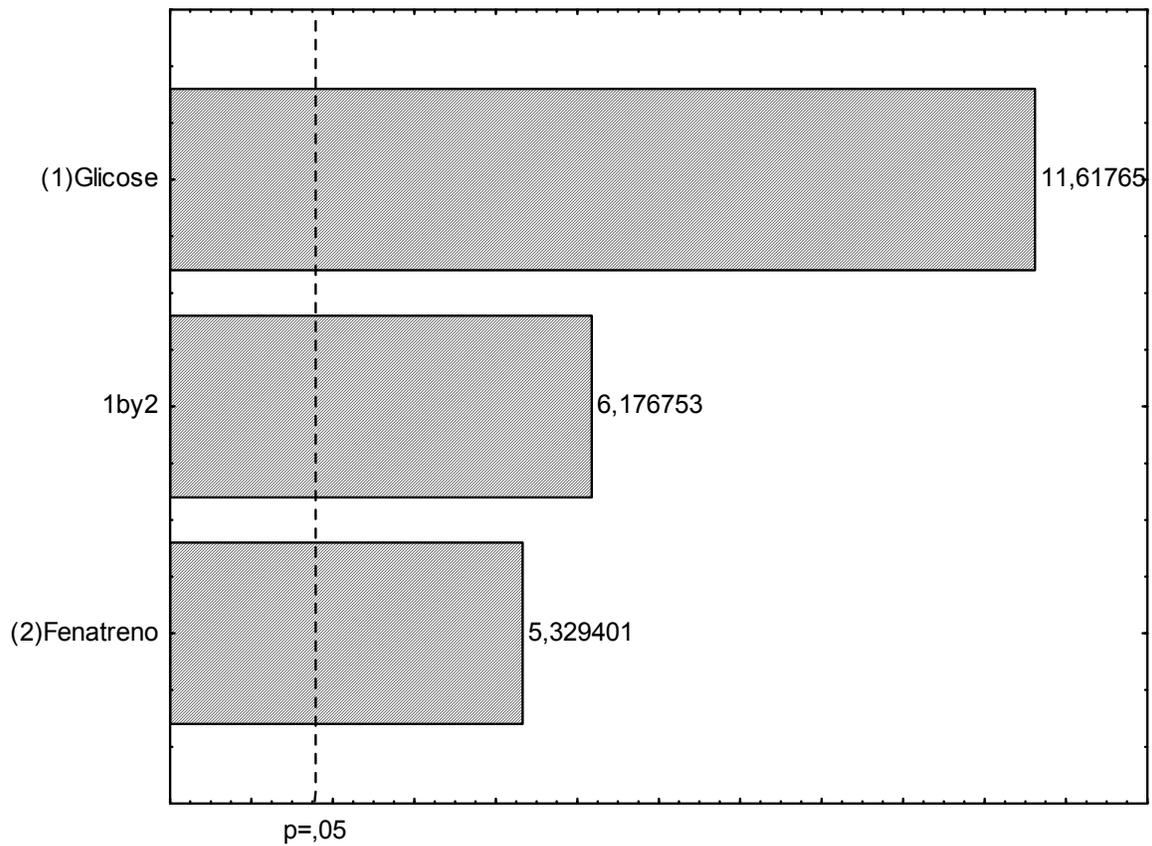
**Tab 1:** Matriz do planejamento fatorial que estuda a influência de 2 fatores na produção de quitina e quitosana por *C. elegans*. As condições 5 a 8 referem-se ao ponto central, que equivale às médias dos dois níveis extremos.

<i>Condições</i>	<i>Níveis</i>	
	<b>Glicose</b>	<b>Fenantreno</b>
E1	-1	-1
E2	+1	-1
E3	-1	+1
E4	+1	+1
E5 <sup>a</sup>	0	0
E6 <sup>a</sup>	0	0
E7 <sup>a</sup>	0	0
E8 <sup>a</sup>	0	0

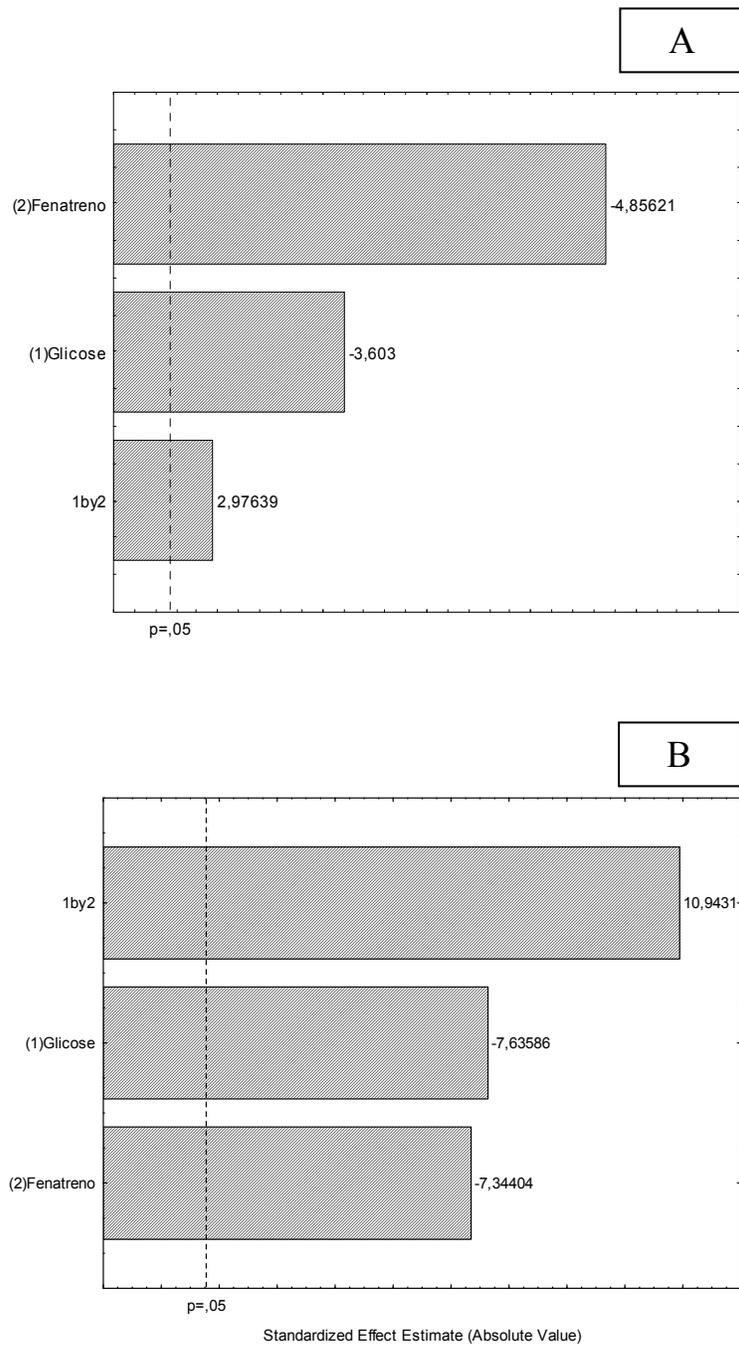
Concentração de glicose: 0,6% nível(-1); 3,3% nível (0); 6,0% nível (+1); Concentração de Fenantreno: 0 Mm nível (-1); 0,1 Mm nível (0); 0,2Mm nível (+1); <sup>a</sup>: Repetições.



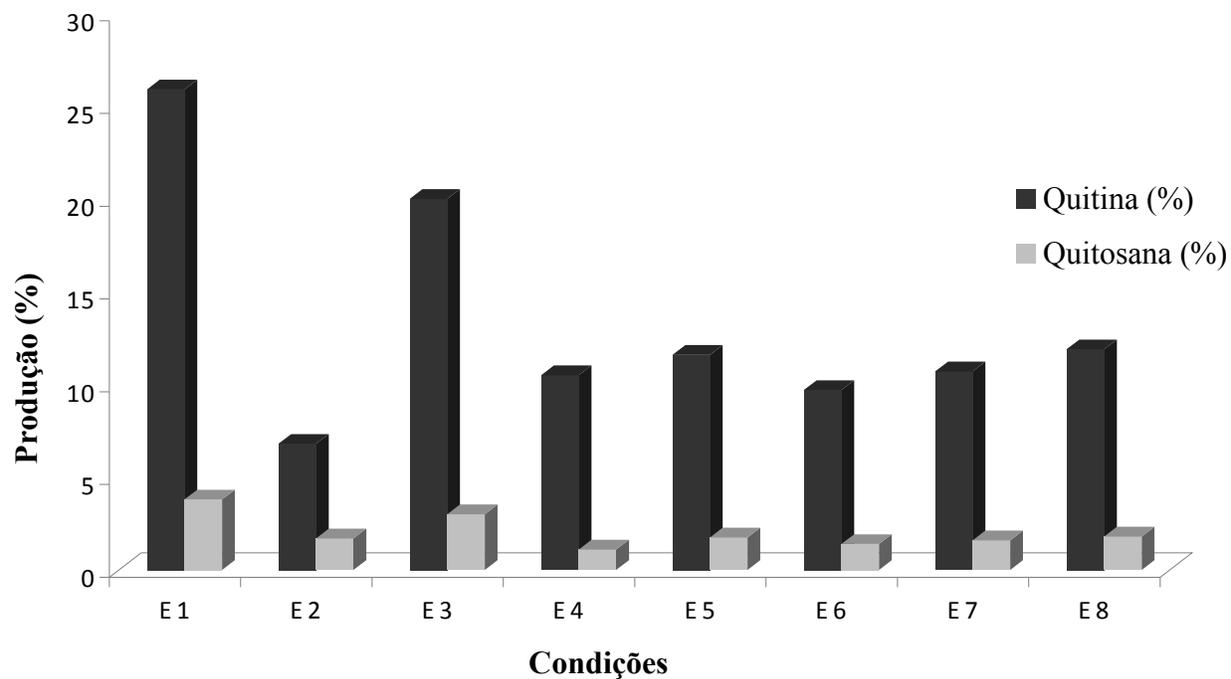
**Fig 1-A.** Curva de Crescimento de *C. elegans* (UCP 542), em meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de glicose e fenantreno de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$



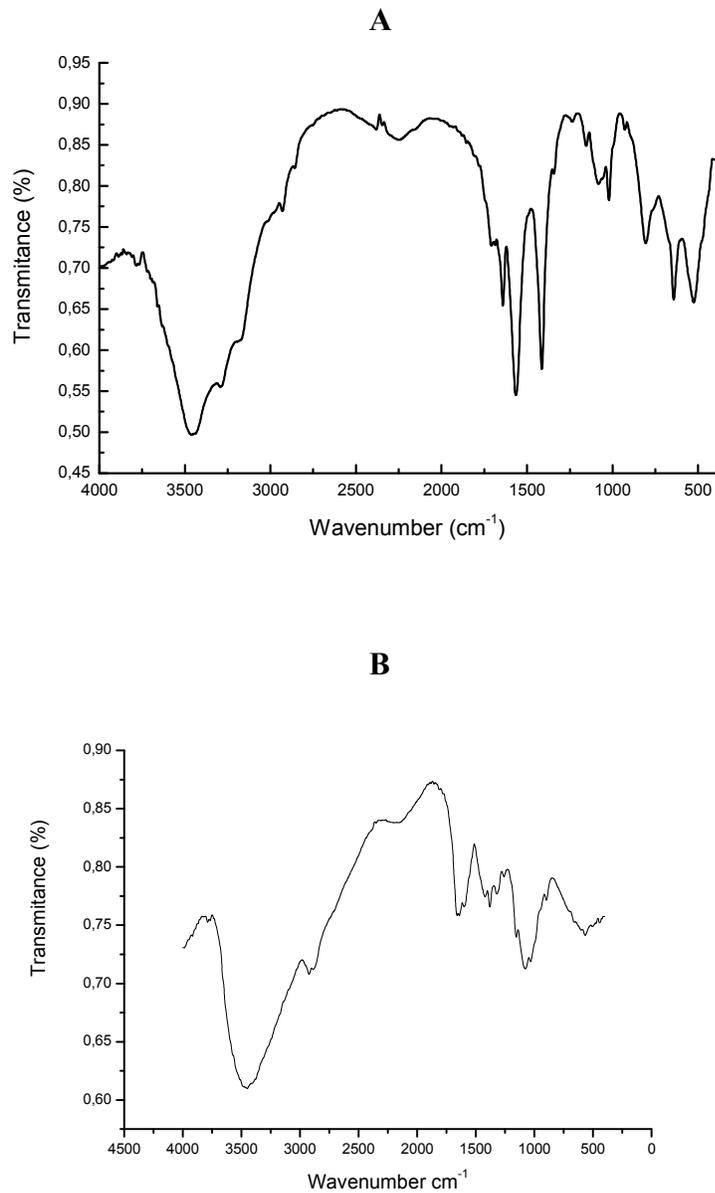
**Fig 1-B.** Diagrama de Pareto relacionando o crescimento de *C. elegans* (UCP 542), no meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de glicose e fenantreno de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$



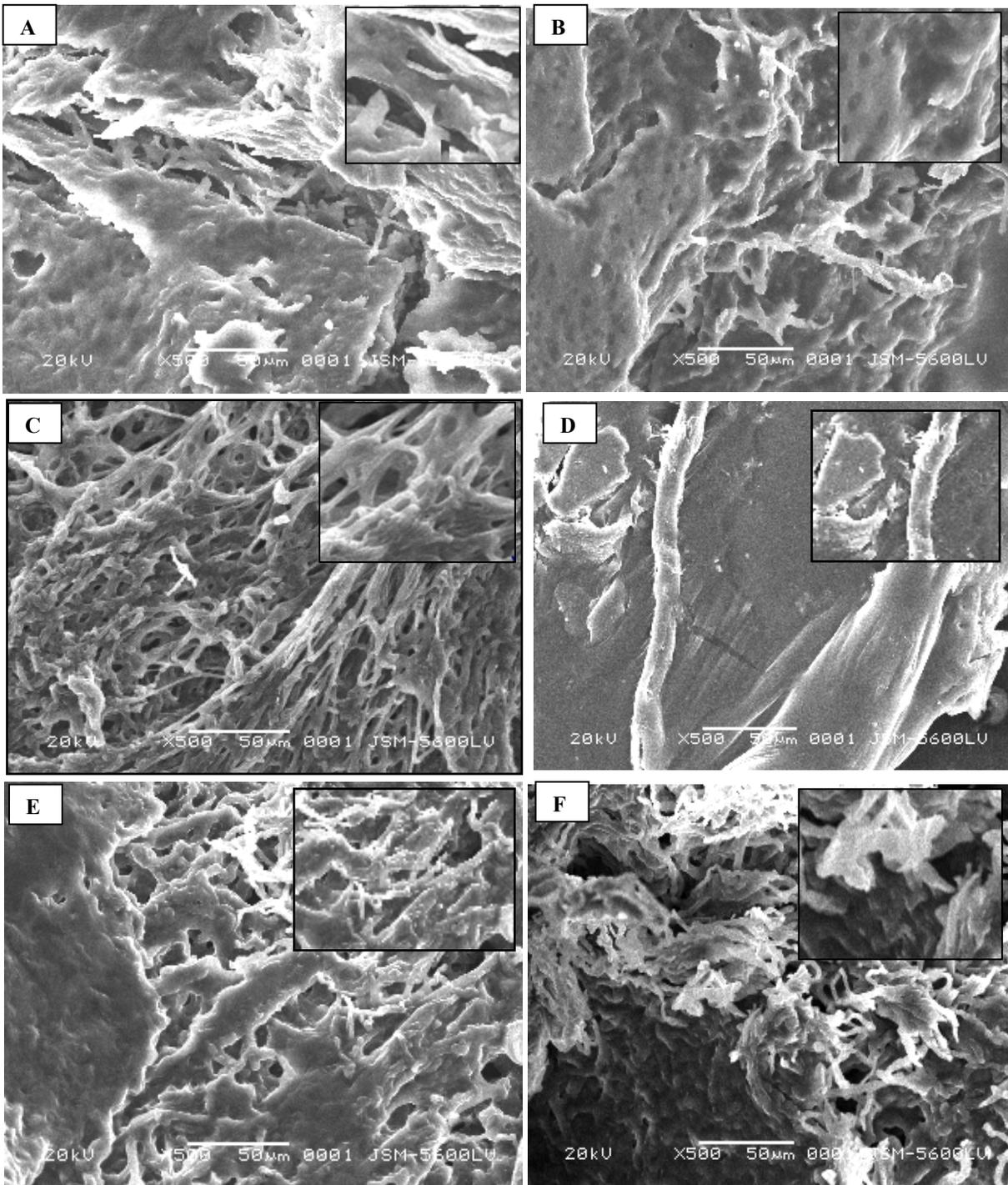
**Fig 2.** Diagrama de Pareto da Quitosana(A) e Quitina (B) produzidas por *C. elegans* UCP 542 na presença de de glicose (0,6%) e fenantreno 0,2mM, de acordo com o planejamento fatorial



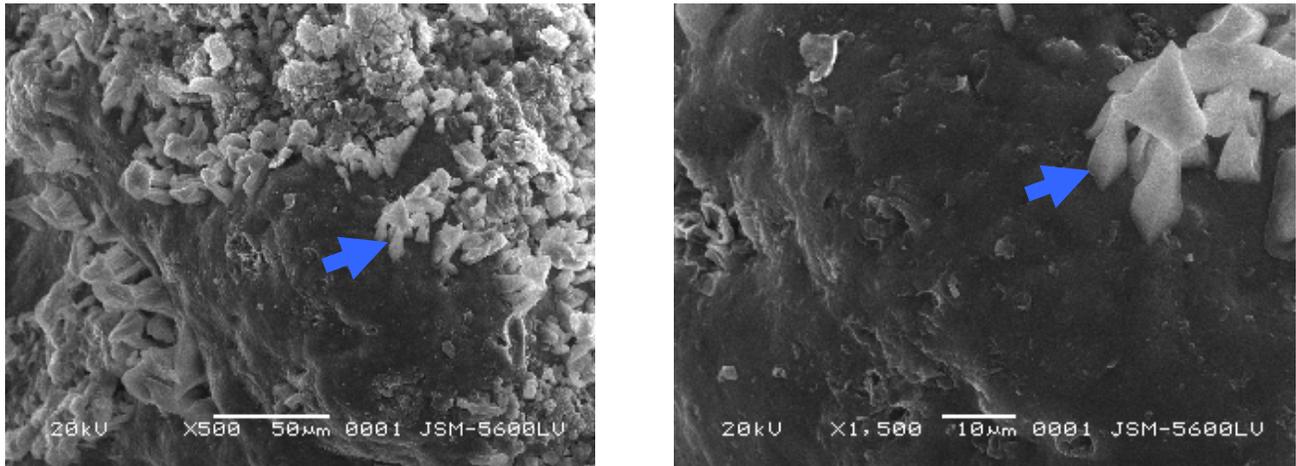
**Fig 3.** Quitina e Quitosana produzidas por *C. elegans* UCP 542 e crescidas durante 96 horas após o pré-inóculo, em meio Hesseltine e Anderson, variando a concentração de glicose, e fenantreno de acordo com o planejamento fatorial.



**Fig 4.** Espectroscopia de Infravermelho de quitina (A) e quitosana (B) extraídos de *Cunninghamella elegans* (UCP 542) crescido em meio Hesseltine e Anderson de acordo com a condição E1 do planejamento fatorial.



**Fig 5.** Eletronmicrografia das microfibrilas de quitina isolada de *Cunninghamella elegans* (em destaque *Fenantreno*). **A.** Controle do meio de cultura; **B.** Controle (glicose 0,6%); **C.** Glicose 0,6% + fenantreno 0,2mM; **D.** Glicose 6%); **E.** Glicose 6% + fenantreno 0,2Mm); **F.** Ponto central dos experimentos (glicose 3,3% + fenantreno 0,1mM)



**Fig 6.** Eletromicrografia de microscopia eletrônica de varredura da quitosana isolada de *Cunninghamella elegans* ligada à moléculas de fenantreno 0,2mM (em destaque cristais de fenantreno) .

**Quarto Artigo**

**Remoção do fenantreno pelas biomassas viva e inativada de  
*Cunninghamella elegans***

**Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico  
Environmental Research Letters**

## Remoção do fenantreno pelas biomassas viva e inativada de *Cunninghamella elegans*

M.C. Freitas Silva<sup>1</sup>, A. A. Antunes<sup>2</sup>, C. I. M. Lins<sup>3</sup>, A.H. Parente<sup>4</sup>, S.V. Pereira<sup>4</sup>, G.M. Campos-Takaki<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Doutorado em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE- Cidade Universitária 50670-420 Recife-PE Brasil; <sup>2</sup>Doutorado em Ciências Biológicas/ UFPE; <sup>3</sup>Doutorado em Engenharia Química – UNICAMP, Brasil; <sup>4</sup>Laboratório de Tecnologia Ambiental-LABTAM, Instituto Tecnológico de Pernambuco, Cidade Universitária Recife-PE, Brasil; <sup>5</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB. Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. Boa Vista. Recife/ CEP 50050-590

### RESUMO

Os efeitos da poluição sobre o meio ambiente, especialmente aqueles causados por várias atividades industriais, têm sido responsáveis pela aceleração dos fluxos de matéria orgânica e inorgânica na esfera. As substâncias xenobióticas, tais como fenol, compostos fenólicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP's), mesmo em baixas concentrações, podem ser tóxicos para os seres humanos. Estudos microbiológicos foram realizados avaliando o modo dual de ação de *Cunninghamella elegans* através dos processos de remoção por biomassa viva e inativada. A remoção do fenantreno pela biomassa viva e inativada foi acompanhada a cada 24 h por espectrofotometria. Para avaliar a remoção foi utilizado um planejamento fatorial completo, com três pontos centrais, tendo como variáveis a concentração de fenantreno e de glicose, e variável resposta teor de fenantreno removido. Os resultados obtidos indicaram que tanto a biomassa inativada como viva removeram respectivamente, 85%,0 e 90,0%, na concentração de 0,2mM de fenantreno, em condições de co-substrato com glicose, como melhores condições. Os dados obtidos com o fungo *C. elegans* removendo o composto xenobiótico fenantreno, com glicose em baixa concentração como co-substrato, demonstra potencial biotecnológico para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a biorremediação de poluentes, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

**Palavras-chave:** Fenantreno, *Cunninghamella elegans*, biomassa, remoção.

## INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP's) são poluentes amplamente distribuídos no meio ambiente quando resultam da queima de combustíveis fósseis e de atividades industriais (Cerniglia, Gibson, 1979; De'zie'l et al. 1996; Cerniglia et al. 1980; Cerniglia 1992; 1997; Cerniglia et al. 2001). Estes estão presentes como poluentes orgânicos, com propriedades cancerígenas e tóxicas (Sakay et al, 1985; Maliszewska-Kordybach et al., 2003). Estima-se que mais de 90% da carga total de HAP reside nos solos superficiais, onde a maioria destes compostos pode acumular (Wild e Jones, 1995).

A degradação microbiana de HAP tem recebido uma atenção especial como uma possível estratégia para a biorremediação de HAP's em solos contaminados (Johnsen et al. 2005). Grandes quantidades de compostos orgânicos e inorgânicos são liberadas para o meio ambiente a cada ano como resultado de atividades humanas (Viñas et al. 2005).

Uma estratégia para descontaminação dos HAP's do ambiente é através da biorremediação, que é a utilização do processo ou atividade biológica para transformar os contaminantes em substâncias inertes (Holliger et al., 1997; Bouchez et al., 2000; Samantha et al., 2002; Wu et al, 2005).

O alto custo para promover a remoção de HAP's do ambiente induziu ao grande interesse para a busca de microrganismos com potencial os processos de biorremediação e detoxificação de locais poluídos (Sutherland, 1992; Boonchan et al., 2000; WU et al., 2005; Leitão, 2009).

A biorremediação de sítios contaminados depende da imensa capacidade metabólica do mundo microbiano para a transformação de poluentes, essencialmente compostos inofensivos ou, pelo menos, menos perigosos (Hofrichter et al., 1995; El Fantroussi e Agathos 2005; Pazarlioglu, Telefoncu, 2005, Tao et al, 2009).

O fungo *C. elegans* metaboliza HAP's e por isso é importante para processos de biorremediação (Boonchan et al. 1998; Banfourth e Singleton, 2005; Gentili et al., 2006). *C. elegans* metaboliza inicialmente HAP's em trans-hidrodióis, fenóis, quinonas e epóxidos de hidrodióis. *C. elegans* oxida fenantreno nas posições 1,2 e 3,4 para formar trans-dihidrodióis. *C. elegans* oxida fenantreno nas posições 9,10, que são principais locais para a oxidação de fenantreno (Cerniglia, 1979; Brodkorb, 1992; Barclay, 1995; Leitão, 2009). Esta

biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (Banforth e Singleton, 2005). Por outro lado, a degradação dos HAP's no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar eficientemente esses compostos, devido pela falta de nutrientes ou pela baixa disponibilidade dos HAP's aos microrganismos degradadores (Johnsen et al., 2005). Neste trabalho foi investigada a forma de *Cunninghamella elegans* em remover fenantreno nas concentrações 0,1 e 0,2 mM, utilizando um planejamento fatorial completo de 2<sup>2</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismo

*Cunninghamella elegans* (UCP 542) foi isolada do sedimento de mangue do Município de Rio Formoso, Pernambuco, Brasil, catalogada e depositada na Coleção do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB- Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP (Gomes et al., 2000). A coleção é registrada no World Federation Culture Collection-WFCC. A linhagem foi mantida em meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) a 5°C.

### Fenantreno

O hidrocarboneto aromático policíclico fenantreno foi obtido da Sigma. A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o fenantreno em acetona a uma concentração de 10mM, filtrada em membrana de Millipore e armazenada em frasco âmbar, a temperatura de 5°C.

### Produção de biomassa

Os esporângios de *C. elegans* cresceram durante sete dias a 28°C em placas de Petri contendo o meio Yeast Malt Agar (YMA). Utilizando-se uma cultura monospórica de *C. elegans* foi realizada a padronização de inóculo através de contagem de esporângios em hematocítmetro para uma concentração final de 10<sup>7</sup> esporângios/mL. Cerca de 30mL do

inóculo foi transferido para de Erlenmeyers de 1000mL de capacidade, contendo 600mL do meio de cultura descrito por Hesseltine e Anderson (1957), adicionado de concentrações de glicose e de fenantreno, segundo as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial. Em seguida, os frascos foram incubados a 28°C, por 96 horas, sob agitação orbital de 150 rpm. Ao final do crescimento a biomassa foi coletada por filtração em membrana de fibra sintética de silkscreen (0,8 µm), seguida de duas lavagens com água deionizada gelada e mantida a temperatura de 5°C.

### **Inativação da Biomassa**

Cerca de 5g de micélio fresco de *C. elegans* foram imersos em 20 mL de água deionizada e inativados em autoclave por 15 minutos, a temperatura de 121°C. O micélio inativado foi separado por filtração através de um filtro de nylon serigrafia (0,8 µm) ( Moraes Filho et al., 2009).

### **Cinética de remoção do fenantreno pela biomassa de *C. elegans***

A remoção do fenantreno foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo 100 mL do meio de cultura Hesseltine & Anderson (1957), modificado contendo 0,6% (Campos-Takaki et al., 1983) e 6% de glicose (Andrade et al., 2000) . O pH do meio foi ajustado para 5,3, antes da esterilização a 121°C. Em seguida, foram adicionados esterilmente 0,1 e 0,2 mM de fenantreno e adição de 5g de biomassa viva e inativada. Os experimentos foram incubados em agitador orbital (150 Hz a 28° C). Cinética de remoção do fenantreno foi realizada através da coleta de alíquotas de 2,00 mL a cada 24h até completar 96 h. Os experimentos foram preparados de acordo com o planejamento fatorial completo de 2<sup>2</sup>, contendo controles.

### **Determinação do teor de fenantreno**

O teor de fenantreno foi determinado por espectrofotometria, através de uma curva de calibração com uma solução de fenantreno de 1-10mM, no comprimento de onda de 250nm, segundo Veintemilia, 2006.

### **Planejamento Fatorial**

Realizou-se um planejamento fatorial  $2^2$  com 4 pontos centrais para analisar os efeitos principais do fenantreno e glicose, sobre a produção de quitina e quitosana por *C. elegans* (UCP 542). A Tabela 1 apresenta as variáveis e os níveis estudados no referido planejamento. O erro experimental estimado foi calculado por quatro repetições do ponto central. Os cálculos de todos os testes foram realizados com a ajuda do programa STATISTICA versão 6.0 da Statsoft Inc., USA.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Efeitos da concentração de glicose na remoção do fenantreno**

Estudos foram realizados com diferentes concentrações de glicose, como co-substrato na remoção de fenantreno por *Cunninghamella elegans* utilizando biomassa inativada e viva, como estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Conforme demonstrado na Tabela 2, a biomassa inativada na presença apenas de glicose nas concentrações 0,6 e 6,0%, como controles, não foram observadas qualquer reação. Contudo, a biomassa inativada de *C. elegans* na presença de uma baixa concentração de glicose (0,6%) incorporada ao meio demonstrou uma remoção de 90% de fenantreno a 0,2mM, com 96 horas de incubação. Os experimentos com glicose a 6,0% de glicose removeu 74%, e no ponto central foi capaz de remover apenas 53%, com a concentração de 3,3% de glicose. Contudo, em todos os experimentos foram observados uma remoção do fenantreno gradual no decorrer de 96 horas. Com a condição (2) o meio de Mucorales glicose (0,6%), adicionado de 0,2mM fenantreno observou-se uma grande estabilidade da biomassa inativada, com o aumento gradativo de remoção do HAP, até o final do tempo de incubação utilizado, nas condições estudadas do planejamento. No entanto, estudos prévios demonstraram que a concentração máxima de fenantreno (0,2mM), pode ter inibido totalmente a germinação de esporangiólos de *C. elegans* (Freitas Silva et al., 2009).

Na tabela 3, os resultados mostraram também que a biomassa viva foi capaz de remover fenantreno em alta percentagem em ambos os meios, contendo 0,6 e 6,0% de glicose, demonstrando maior eficiência na remoção de fenantreno, com a maior concentração de

glicose (85%). Como pode ser observado, cerca de 65 e 66%, respectivamente de remoção do fenantreno ocorreu com glicose 6,0 e 0,6%, nas primeiras 72 horas de incubação. O efeito de similaridade na biorremoção foi observado especialmente nas primeiras 24 horas, mudando ao final do período de incubação (96h). Igualmente, como com a biomassa inativada ocorreu uma biorremoção gradual do fenantreno, mesmo na condição do ponto central do planejamento (Tabelas 2 e 3). No entanto, as tendências de utilização de glicose como co-substrato em relação ao fenômeno de maior remoção do fenantreno pela biomassa inativada, provavelmente, ocorre um maior número de sítios, sendo um biossorbente com maior vantagem operacional e custo, por usar glicose a 0,6%. Neste sentido, a biomassa inativada de *C. elegans* demonstrou excelentes resultados como sorbente, utilizando glicose, na sua menor concentração, como co-substrato. Os dados obtidos com o alto desempenho da biomassa inativada de *C. elegans*, são considerados relevantes a estabilidade e habilidade de adsorção, sendo estas características confirmadas pela literatura, como importante nos processos de biorremediação de sítios contaminados por HAPs (Hwang e Cutright, 2003; Amezcua-Allieri et al., 2005; Gentili et al., 2006; Leitão, 2007; Leitão et al., 2009).

Outra vantagem do biossorbente de fungos é a facilidade de separação de biomassa por filtração devido à sua estrutura filamentosa. Deve ser considerando ainda, a comparação com leveduras, onde os fungos filamentosos são menos sensíveis às variações de nutrientes, aeração, pH, temperatura e têm um menor teor de ácidos nucléicos na biomassa. Além disso, resíduos hipersalinos são gerados em diversas atividades industriais, tais como fábricas de produtos químicos, petróleo e gás natural e as práticas de minimização de resíduos. Estes resíduos, vulgarmente designadas como águas de produção são constituídas por altas concentrações de sais, óleos, ácidos orgânicos, metais pesados e radionuclídeos (Woolard e Irvine, 1995; Leitão et al., 2007; Leitão, 2007; 2009).

Além disso, a capacidade de halotolerância é uma capacidade importante dos biossorbentes para corrigir os processos de poluição. Portanto, microrganismos halotolerantes apresentam propriedades fundamentais para o tratamento biológico, sem, no entanto, causar prejuízos para o ecossistema (Leitão, 2007; 2009; Leitão et al., 2007).

Neste caso, a biomassa de *C. elegans* pode ser considerada um biossorbente extremamente importante, tendo em vista seu comportamento halotolerante, tendo sido isolada de sedimentos de mangue do município de Rio Formoso, Pernambuco, Brasil (Gomes et al., 2000, Freitas da Silva et al., 2007).

### **Potencial biotecnológico da linhagem de *Cunninghamella elegans* na remoção do fenantreno**

A figura 1 A, B e C apresentam a cinética de remoção do fenantreno por *C. elegans*, associado a utilização de glicose como substrato. Como pode ser observada, a linhagem utilizada apresenta grande potencial como sorbente, tanto na concentração mais elevada de fenantreno (0,2mM), como no ponto central do planejamento (0,15mM). Contudo, nos experimentos realizados observa-se, em grande parte que o processo de biorremoção é realizado na presença de co-substrato, glicose. Os resultados obtidos sugerem que a linhagem de *C. elegans* apresenta potencial de aplicação na remoção de fenantreno e seus metabólitos, como de outros compostos aromáticos presentes no ambiente.

Microorganismos têm se mostrado eficazes para o tratamento de águas residuais com a produção de lodo (Strandberg et al., 1981; Woolard e Irvine, 1995; Robles et al., 2000; Say et al., 2004; Pazarlioglu, Telefoncu, 2005; Wu et al, 2005;). Outros estudos foram dirigidos para o processo de imobilização do microrganismo, considerando ser esta uma forma com bom potencial de aplicação no tratamento de efluentes industriais que contém fenantreno e ou outros compostos aromáticos (Field et al, 1992; Hurst et al, 1996; Samanta et al., 2002).

A literatura se refere ao uso de sorbentes de baixo custo, como a palha de arroz, considerando a sua capacidade de remover poluentes da áreas poluídas por derramamentos de petróleo (Sun et al., 2002), corantes (Gong et al., 2008) e íons de metais pesados (Say et al, 2003; Mendil et al, 2008; Rocha et al., 2009). Neste sentido, estudos foram desenvolvidos com a linhagem GY2B, incorporado um biossurfactente à palha de arroz. Os resultados obtidos demonstraram maior eficiência na remoção de fenantreno do que a

linhagem livre. Desta forma é sugerido que a palha de arroz apresentou uma ação de co-sustrato, tendo em vista o aumento da absorção de fenantreno, melhorando também a eficiência de degradação.

### **Efeitos das interações entre glicose e biomassa de *Cunninghamella elegans* no fenômeno de remoção do fenantreno**

As figuras 2-A e B apresentam os efeitos das interações entre glicose e fenantreno nas diferentes concentrações, tendo como variável resposta a porcentagem de remoção do fenantreno. Os resultados obtidos indicam que entre todas as interações a condição da biomassa inativada associada à concentração de 0,6% de glicose foi a mais eficiente. Contudo, os efeitos observados com a biomassa do fungo viva demonstraram que ocorre interação similar entre 0,6 e 6% de glicose. É provável que neste efeito as duas concentrações de glicose no nível maior e menor, não estejam adequadas à concentração da biomassa, demonstrando um efeito não claramente definido.

### **CONCLUSÕES**

Incorporação de glicose à biomassa de *C. elegans* no processo de remoção de fenantreno investigada mostraram que a linhagem promoveu elevados percentuais de remoção do HAP. A maior eficiência foi com a menor concentração de glicose. A cinética de biorremoção mostrou-se linear em todos os experimentos, contudo, com o ponto central do planejamento utilizado ocorreu um efeito negativo, com baixos níveis de remoção. A linhagem de *C. elegans* UCP (542) apresenta um bom potencial para aplicação em processos de remoção de fenantreno, e provavelmente, para outros compostos aromáticos

### **Referências Bibliográficas**

Amezcuá-Allieri, M.A.; Lead, J.R.; Rodríguez-Vázquez, R. Changes of chromium behavior in soil during phenanthrene removal by *Penicillium frequentans*. *J. BioMetals* 18: 23-29, 2005.

Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W., CAMPOS-TAKAKI, G.M. A factorial designs analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microbiol.* v.46, n.11, p.1042–1045. 2000.

Bamforth, S.; Singleton, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 80, n.7, 723-736, 2005.

Barclay, C.D., Farquhar, G.F., Legge, R.L., 1995. Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 42, 958–963, 1995.

Boonchan, S.; Britz, M. L.; Stanley, G. A. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol Bioeng.* v.59, p.482–494. 1998.

Boonchan, S.; Britz, M.L.; Stanley, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 66, 1007-1019, 2000.

Bouchez, T., D. Patureau, P. Dabert, S. Juretschko, J. Dore, P. Delegenes, R. Moletta, and Wagner, M. Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* v. 2, 179–190, 2000.

Brodkorb, T.S., Legge, R.L., Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58 (9), 3117–3121, 1992..

Campos-Takaki, G. M. ; Dietrich, S. M. ; Gordon W. Beakes . Electron microscopic X-ray microprobe and cytochemical study of isolated cell walls of Mucoralean fungi. *Mycol. Research.*, Inglaterra, v. 80, p. 536-541, 1983.

Cerniglia, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* v.3, p.351-368. 1992.

Cerniglia, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, 5-6, 324–333, 1997.

Cerniglia, C. E.; Gibson, D. T. Oxidation of benzo[a]pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *J Biol Chem.* v. 254, 12174–12180. 1979.

Cerniglia, C.E.; Sutherland, J.B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic fungi. In *Fungi in Bioremediation*; Gadd, G.M. Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2001; pp. 136-187.

Cerniglia, E.C., C. Van Baalen, & T.D. Gibson. 1980) Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp.strain JCM. J. Gen. Microbiol. v. 116: 485-494

De'zie'l E, Paquette G, Villemur R, Lepine F, Bisailon J. Biosurfactant production by soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbon. Appl. Environ. Microbiol. v. 62:1908–1912, 1996.

El Fantroussi, S., Agathos, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol*, v. 8:268–275, 2005.

Field, J.A.; de Jong, E.; Cost, G.F.; Bont, J.A.M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 58, 2219-2226, 1992.

Freitas Silva, M. C. ; Barros Neto, B. ; Stamford, T. C. M. ; Takaki, G. M. C. Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. *Asian Chitin J.*, v. 3, 15-22, 2007.

Freitas Silva, M. C. ; Moraes Filho, M. A. de ; Jara, A. M.A.T. ; Silva, A.C. ; Stamford, T.L.M. ; Campos-Takaki, G. M. . Effect of phenanthrene on the germination, radial growth and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* Lendner. A.Mendez-Vilas (Editor) - 06002 Badajoz, Spain. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Toh Tuck Link, Singapore 59622: World Scientific Publishing Company PTE LTD, 2009, v. 01, p. 219-222.

Gentili, A.R.; Cubitto, M.A.; Ferrero, M.; Rodriguez, M.S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbondegrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int. Biodeter. Biodegr.* v. 57, 222-228, 2006.

Gomes, P.F., Nascimento, A.E., Okada, K., Messias, A.S., Sharia, A.E.N., Campos-Takaki, G.M. (2000), Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. *International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challengens and propects*. p82

Gong, R.M.; Jin, Y.B.; Sun, J.; Zhong, K.D. Preparation and utilization of rice straw bearing carboxyl groups for removal of basic dyes from aqueous solution. *Dyes Pigments* v. 76, 519-524, 2008.

Hesseltine, C.W., Anderson, R.F. (1957), Microbiological production of carotenoids. *Mycologia*, v. 49, 449-452

Hofrichter, M.; Bublitz, F.; Fritsche, W. Cometabolic degradation of o-cresol and 2,6-dimethylphenol by *Penicillium frequentans*. *J. Basic Microb.* v. 35, 303-313, 1995.

HOLLIGER, C. et al. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 20, 4, 517-523, 1997.

Hurst, J.C.; Sims, R.; Sims, J.; Sorensen, D.; McLean, J.; Huling, S. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation as a function of oxygen concentration in contaminated soil. *J. Hazard Mater.* v. 51, 193-208, 1996.

Hwang S. ; Cutright T. J. Hwang S. Statistical implications of pyrene and phenanthrene sorptive phenomena: Effects of sorbent and solute properties, v. 44, 2, 152-159, 2003.

Johnsen, A.R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollution*, v.133, .1, p.71-84, 2005.

Johnson, D.L. et al. Soil microbial response during the phytoremediation of PAH contaminated soil. *Soil, Biol. Biochem.* v.37, 12, 2334-2336, 2005.

Leitão, A.L. Biodegradation of phenol and resorcinol by a halotolerant *Penicillium*. In *Environmental Biodegradation Research*; Wang, B.Y. Ed.; Nova Science Publishers, Inc: New York, USA, 2007 ; pp. 273-287.

Leitão, A.L. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. *Int J Environ Res Public Health.* v. 6(4): 1393–1417, 2009.

Leitão, A.L.; Duarte, M.P.; Oliveira, J.S. Degradation of phenol by a halotolerant strain *Penicillium chrysogenum*. *Int. Biodeter. Biodeg.* v. 59, 220-225, 2007.

Maliszewska-Kordybach, B.; Smreczak, B. Habitual function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ. Int.* v. 28:719–728, 2003.

Mendil, D.; Tuzen, M.; Soylak, M. A biosorption system for metal ions on *Penicillium italicum*- loaded on Sepabeads SP 70 prior to flame atomic absorption spectrometric determinations. *J. Hazard. Mater.* v. 152, 1171-1178, 2008.

Moraes Filho, M.A. ; Freitas Silva, M. C. ; Stamford, T. M. ; Okada, K. ; Campos-Takaki, G. M. Biotechnological potential of *Phanerochaete chrysosporium* UCP( # and *Cunninghamella elegans* UCP596 in the copper and zinc removal. In: A.Mendez-Vilas (Editor) - 06002 Badajoz, SPAIN. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Toh Tuck Link, Singapore 59622: World Scientific Publishing Company PTE LTD, 2009, v. 01, p. 180-183.

Pazarlioglu, N.K.; Telefoncu, A. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process Biochem.* v.40, 1807-1814, 2005.

Robles, A.; Lucas, R.; de Cienfuegos, G.A.; Galvez, A. Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Biores. Tecnhol.*, v. 74, 217-221, 2000.

Rocha, C.G.; Zaia, D.A.M.; Alfaya, R.V.D.; Alfaya, A.A.D. Use of rice straw as biosorbent for removal of Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Hg(II) ions in industrial effluents. *J. Hazard. Mater.* v.166, 383-388, 2009.

Sakai, M.; Daisuke, Y.; Mizusaki, S. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Salmonella typhimurium* TA97. *Mutat. Res.* 86, 61-67, 1985.

Samanta, S.K.; Singh, O.V.; Jain, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* v. 20, 243-248, 2002.

Say, R.; Yilmaz, N.; Denizli, A. Removal of chromium(VI) ions from synthetic solutions by the fungus *Penicillium purpurogenum*. *Eng. Life Sci.* v. 4, 276-280, 2004.

Say, R.; Yilmaz, N.; Denizli, A. Removal of heavy metal ions using the fungus *Penicillium canescens*. *Adsorpt. Sci. Technol.* v. 21, 643-650, 2003.

Strandberg, G.W.; Shumate, S.E.; Parrot, J.R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 41, 237-245, 1981.

Sun, X.F.; Sun, R.C.; Sun, J.X. Acetylation of rice straw with or without catalysts and its characterization as a natural sorbent in oil spill cleanup. *J. Agric. Food Chem.* v. 50, 6428-6433, 2002.

Sutherland, J.B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind. Microbiol.*, v. 9, 53-62, 1992.

Tao, Xue-Qin; Lu, Gui-Ning, Liu, Jie-Ping, Li, T; Yang, Li-Ni. Rapid Degradation of Phenanthrene by Using *Sphingomonas* sp. GY2B Immobilized in Calcium Alginate Gel Beads. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 6, 2470-2480, 2009.

Veintemilia, C.A.C. Impactos do fenantreno sobre tabaqui *Colossoma macroporum* Cuvier, 1818: CL<sub>50</sub>, crescimento e hematologia. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais INPA/UFAM, 2006, 49p.

Viñas, M.; Sabate, J.; Espuny, M.J.; Solanas, A.M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 71:7008–7018, 2005

Wild, S.R.; Jones, K.C. (1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* v. 88:91–108

Woolard, C.R.; Irvine, R.L. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res.* v. 29, 1159-1168, 1995.

Wu, Z.; Wang, Y.; Xing, Z. Study on degrading phenol by immobilized *Ralstonia metallidurans* CH34. *Microbiology* v. 32, 31-36, 2005.

**Tabela 1:** Matriz do planejamento fatorial que estuda a influência de 2 fatores na remoção de fenantreno por *Cunninghamella elegans*. As condições 5 a 8 referem-se ao ponto central, que equivale às médias dos dois níveis extremos.

Condições	Níveis	
	Glicose (%)	Fenantreno (mM)
(1) Meio de Mucorales glicose (0,6%)	-1	-1
(2) Meio de Mucorales glicose (0,6%) + 0,2mM F	+1	-1
(3) Meio de Mucorales glicose (6,0%)	-1	+1
(4) Meio de Mucorales glicose (6,0%) + 0,2mM F	+1	+1
(5) Meio de Mucorales glicose (3,3%) + 0,1mM F	0	0
(6) Meio de Mucorales glicose (3,3%) + 0,1mM F	0	0
(7) Meio de Mucorales glicose (3,3%) + 0,1mM F	0	0
(8) Meio de Mucorales glicose (3,3%) + 0,1mM F	0	0

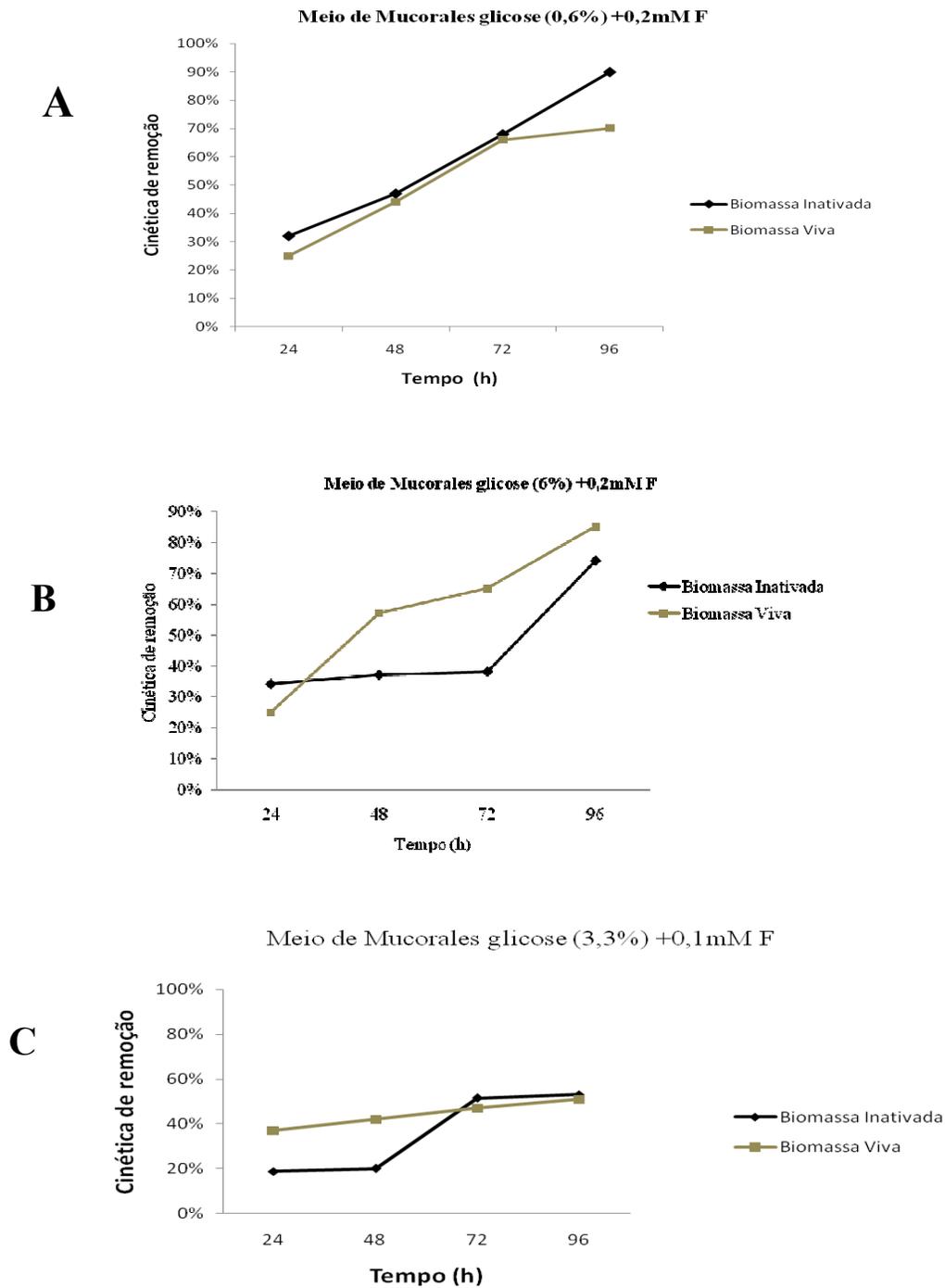
Concentração de glicose: 0,6% nível (-1); 3,3% nível (0); 6,0% nível (+1); Concentração de Fenantreno: 0 nível (-1); 0,15 Mm nível (0); 0,2Mm nível (+1); Repetições.

**Tabela 2:** Porcentagem de remoção do fenantreno pela biomassa inativada de *Cunninghamella elegans*, de acordo com as condições do planejamento fatorial.

Ensaio	Biomassa inativada (5g/100mL) x Remoção de Fenantreno (%)			
	24	48	72	96
(1) Meio de Mucorales glicose (0,6%)	0%	0%	0%	0%
(2) Meio de Mucorales glicose (0,6%) +0,2mM F	32,0%	47,0%	68,0%	90,0%
(3) Meio de Mucorales glicose (6,0%)	0%	0%	0%	0%
(4) Meio de Mucorales glicose (6,0%) +0,2mM F	37,0%	38,0%	34,0%	74,0%
(5,6,7)Meio de Mucorales glicose (3,3%) +0,15mM F	18,8%	20,0%	51,5%	53,0%

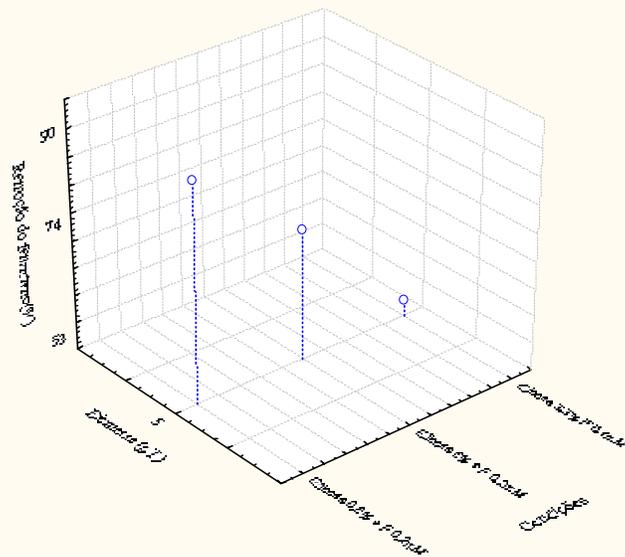
**Tabela 3:** Porcentagem de remoção do fenantreno pela biomassa viva de *Cunninghamella elegans*, de acordo com as condições do planejamento fatorial.

Ensaio	Biomassa viva (5g/100mL) x Remoção de Fenantreno (%)			
	24	48	72	96
(1)Meio de Mucorales glicose (0,6%)	0%	0%	0%	0%
(2)Meio de Mucorales glicose (0,6%) +0,2mM F	25%	44%	66%	70%
(3)Meio de Mucorales glicose (6,0%)	0%	0%	0%	0%
(4)Meio de Mucorales glicose (6,0%) +0,2mM F	25%	57%	65%	85%
(5,6,7)Meio de Mucorales glicose (3,3%) +0,15mM F	37%	42%	47%	51%

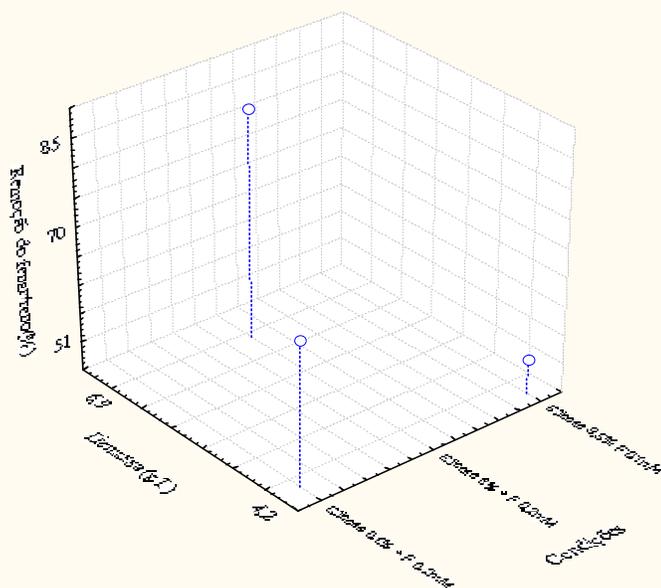


**Figura 1.** Cinética de remoção do fenantreno (0,2mM e 0,1mM) pela biomassa de *Cunninghamella elegans*, tendo como substrato glicose 0,6, 6,0 e 3,3%.

A



B



**Figura 2.** Interações entre as variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo de  $2^2$  para expressar a remoção de fenantreno utilizando biomassas inativada (A) e viva (B) de *Cunninghamella elegans*, na remoção de fenantreno (%) tendo glicose 0,6 e 6%, como co-susstrato.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos com *Cunninghamella elegans* (UCP 542) sob efeito do fenantreno conclui-se:

### Primeiro Artigo

- Os esporângios de *C. elegans* germinam utilizando fenantreno na menor concentração, como única fonte de carbono;
- *C. elegans* na presença tanto de NaCl, como em associação com fenantreno de acordo com o planejamento fatorial, observa-se crescimento tardio;
- O fenantreno, na maior concentração testada, inibe totalmente o crescimento de *C. elegans*;
- O fenantreno causa alterações morfológicas nos esporângios, apresentando diferenças associadas ao padrão de desenvolvimento dos esporângios, além de, eletrondensidade e entumescimento aumentados;
- As condições de crescimento de *C. elegans* tanto na presença de fenantreno na maior concentração, como associado a cloreto de sódio, observa-se maior toxicidade para *Artemia salina*;
- Na presença da menor concentração de fenantreno ocorre apenas metade da toxicidade para o microcrustáceo;
- No entanto, a associação de fenantreno com sal promove ausência de toxicidade para o microcrustáceo, confirmando o favorecimento da condição de halofilia de *C. elegans*.

## Segundo Artigo

- O NaCl (4,0%) associado ao fenantreno e às fontes de carbono glicose e sacarose influenciam diretamente a produção de quitina e quitosana;
- A sacarose é a fonte de carbono que menos influencia no aumento da produção da quitina e quitosana;
- O NaCl associado ao fenantreno são os constituintes que mais influenciam no aumento da produção da quitosana;
- Os resultados obtidos permitem indicar que o estresse do composto tóxico, fenantreno, associado às fontes de carbono D-glicose e sacarose, são condições importantes para a produção dos biopolímeros quitina e quitosana.

## Terceiro Artigo

- O crescimento de *C. elegans* é parcialmente inibido pela presença do fenantreno;
- A glicose apresenta um efeito positivo no crescimento de *C. elegans*;
- O fenantreno associado a baixa concentração de glicose influencia positivamente o crescimento do fungo demonstrado pelo Diagrama de Pareto;
- O fenantreno associado à baixa concentração de glicose é a condição mais favorável nos processos fisiológicos de *C. elegans*;
- A produção de quitosana apresenta um efeito negativo, contudo é influenciada fortemente pela associação glicose na menor concentração e fenantreno;
- A interação glicose na menor concentração e fenantreno apresenta efeito positivo na produção de quitina por *C. elegans*;
- As porcentagens de quitina e quitosana são influenciadas pela glicose na menor concentração e fenantreno;

- O fenantreno associado a glicose nas concentrações utilizadas não promove alteração nas microfibrilas de quitina;
- Quitosana demonstra ser eficiente no processo de adsorção do fenantreno na associação glicose e fenantreno;
- Os dados obtidos confirmam a eficiência da linhagem de *Cunninghamella elegans*;

## Quarto Artigo

- *C. elegans* apresenta a capacidade de remover fenantreno tanto com a biomassa viva como inativada;
- A biomassa inativada apresenta um alto índice de remoção de fenantreno;
- A biomassa inativada obtida de *C.elegans* crescida na glicose na menor concentração influencia a remoção de fenantreno, funcionando como co-substrato;
- Observa-se uma maior disponibilidade de interação da biomassa inativada na remoção do fenantreno;
- A cinética de remoção de fenantreno utilizando biomassa viva ou morta apresenta uma porcentagem crescente adsorção, em especial com a biomassa inativada;
- A biomassa obtida no ponto central do planejamento apresenta efeitos de remoção do fenantreno similares ao final do experimento;
- Em ambas as situações com biomassa viva e morta é observado o grande potencial biotecnológico da linhagem de *C. elegans*, indicando a sua utilização em ambientes contaminados com o HAP.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland publishers 1294.

Alexopoulos, C. J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology* New York. John Wiley and Sons.

Allen C. C. R., Boyd D. R., Larkin M. J., Reid K. A., Sharma N. D., Wilson K. 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. *Appl Environ Microbiol*. 63: 151–155.

Allen-King, R. M., Grathwohl, P., Ball, W. P. 2002. New modeling paradigms for the sorption of hydrophobic organic chemicals to heterogeneous carbonaceous matter in soils, sediments, and rocks. *Adv. Water Resour* 25(8-12): 985-1016.

Ames, B. N., Lee, F. D., Durston, W. E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 782-786.

Amorim, R.V.S., Ledingham, W.M., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. 2005. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(1): 19-23.

Andrade, V.S., Neto, B.B., Souza, W., Campos-Takaki, G.M. 2000. A factorial designs analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microbiol* 46(11): 1042–1045.

Ang, L.E., Zhao H., Obbard J.P. 2005. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme Microbiol. Technol.* 37: 487-496.

Atlas, R. M. 1995. Bioremediation: research expands range of organisms used to clean up pollution. *Chemical & Engineering News* 3: 1-32.

Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology* 45(1): 180-209.

Atlas, R. M., Bartha, R. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology* 12(1): 287-338.

Baijal, U., Mehrotra, B. S. 1980. The genus *Cunninghamella* – reassessment. *Sydowia* 33: 1-13.

Baker, K. H., Herson, D. S. 1994. Bioremediation. *McGraw-Hill Inc.*

Banjoo, D.R., Nelson. P.K. 2005. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *J Chromatogr.* 1066: 9-18.

Barra, R., Popp, P., Quiroz, R., Bauer, C., Cid, H., Tumpling, W.V. 2005. Persistent toxic substances in soils and waters along an altitudinal gradient in the Laja river basin, central southern Chile. *Chemosphere* 58: 905-915.

Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 98-108.

Benguella, B.; Benaissa, H. 2002. Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies. *Water Res.* 36: 2463–74.

Besombes, J. L., Maître, A., Patissier, O., Marchand, N., Chevron, N., Stoklov, M., Masclet, P. 2001. Particulate PAHs Observed in the Surrounding of a Municipal Incinerator. *Atmospheric Environment.* 35: 6093-6104.

Blanc, P., Connan, J. 1994. Preservation, degradation and destruction of trapped oil. Magoon, L.B. & Dow, W.G. (eds.), *The petroleum system from source to trap*: AAPG Memoir 60, 237-247.

Bodzek D., Janoszka B., Dobosz C., Warzecha L., Bodzek M. 1997. Determination of polycyclic aromatic compounds and heavy metals in sludges from biological sewage treatment plants. *J.Chromatogr.* 774: 177-192.

Bogan, B. W., Lamar, R. T. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 6 (2): 1597–1603.

Bonnet, J.L., Guiraud, P., Dusser, M., Kadri, M., Laffosse, J., Steiman, R., Bohatier, J. 2005. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 60(1): 87-100.

Boonchan, S., Britz, M. L., Stanley, G. A. 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol Bioeng.* 59: 482–494.

Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol.* 66 (3): 1007-19.

Bouchez, M. 1996. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 45(4): 447-574.

Bracker, C. E. 1967. Ultrastructure of fungi. *A. Rev. Phytopath.* 5: 343-374.

Bragg, J. R., Prince, R., Harner, E. J., Atlas, R. M. 1993. Bioremediation effectiveness following the Exxon Valdez spill. *Proceeding of the Oil Spill Conferenc.*, 1(1): 435-447.

Brassell, S. C. 1992. Biomarkers in sediments, sedimentary rocks and petroleum: biological origins, geological fate and applications. *In: Drapp, R. (ed.) Geochemical of Organic Rocks SEPM Short Course 27: 29-72.*

Brown, T. L., Lemay, H. E., Burten, B. E. 2005. Chemistry – The Central Science 9: 919-921.

Campos-Takaki, G. M. The fungal versatility on the co-polymers chitin and chitosan production. Dutta, P.K. 2005. Chitin and Chitosan Opportunities & Challenges (Ed.). SSM International Publication. Contai, Índia. 59-94.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. 1996. The Fungi. *Academic Press.* Tokyo.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3: 351-368.

Cerniglia, C. E., Gibson, D. T. 1979. Oxidation of benzo[*a*]pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *J Biol Chem*. 254: 12174–12180.

Cerqueira, V. S., Costa, J. A. V. 2009. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. *Química Nova* 32(2): 394-400.

Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. *Editora da Unicamp*. ed.6, p.279. 1995.

Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 595-603.

Connell, D.W. 1987. Ecotoxicology – A framework for investigations of hazardous chemicals in the environment, *Ambio* 16: 47–50.

Cookson, T. 1995. Bioremediation Engineering: Design and Application. *McGraw-Hill Inc*, 525p.

Cornelissen, G., Gustafsson, O., Bucheli, T. D., Jonker, M. T. O., Koelmans, A. A., Van Noort, P. C. M. 2005. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation and biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 39 (18): 6881-6895.

Crawford, R. L., Crawford, D. L. 1996. Bioremediation: principles and applications. *Biotechnology Research Series* 1: 1-12.

Czymbek, K. J., Bourett, T. M., Howrad, R. J., 1995. Immunolocalization of tubulin and actin in thick-sectioned fungal hyphae after freeze-substitution fixation and methacrylate de-embedment. *Journal of Microscopy* 181: 153-161.

David, R., Singleton, S. N., Powell, R. S., Avram, B. G. L. M., Aitken, M. D. 2005. Stable-Isotope Probing of Bacteria Capable of Degrading Salicylate, Naphthalene, or Phenanthrene in a Bioreactor Treating Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3): 1202–1209.

Del 'Arco, J. P. 1999. Degradação de Hidrocarbonetos por Bactérias e Fungos em Sedimento Arenoso. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, Rio de Janeiro, 169p.

Domsch, K. H., Gams, W., Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. *Academic Press*.

Dos Santos, J. E., Soares, J. P., Dockal, E. R. F., Campana, S. P., Cavalheiro, E. T.G. 2003. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímero: Ciência e Tecnologia*. 13 (4): 242-249.

Eisenreich, W., Bachera, A., Arigoni, D., Rohdich, F. 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway, *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 1401–1426.

Fairbrother, A., Lewis, M. A., Menzer, R. E. 2001. Methods in Environmental Toxicology. *Principles and Methods of Toxicology*. 4: 1759-1801.

Faiz, A., Weaver, C.S., Walsh, M.P. 1996. Air pollution from motor vehicles: standards and technologies for controlling emissions. *The World Bank*. Washington.

FEAM, 2004, Poluição Veicular. (Disponível em: [www.feam.gov.br](http://www.feam.gov.br))

Figueiredo, L. H. M. 1999. Investigação das Contribuições Orgânicas Antropogênicas e Naturais em Sedimentos Costeiros Utilizando-se Hidrocarbonetos Marcadores. *Tese de Doutorado*, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC, 170p.

Finlayson-Pitts, B. J., Pitts Jr.J.N. 1997. Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Particles. *Science*. 276: 1045-51.

Floodgate, G. D. 1984. The fate of petroleum in marine environments. *Petroleum Microbiology* 1(1): 35-60.

Franco, L. O., Stamford, T. C. M., Stamford, N. P., Campos-Takaki, G. M. 2005. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica* 4(14): 40-44.

Freitas Silva, M. C. , Barros Neto, B., Stamford, T. C. M., Takaki, G. M. C. 2007. Effect of environmental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. *Asian Chitin Journal* 3: 15-22.

Furnas, M. J. 1992. The behavior of nutrients in tropical aquatic ecosystems. *Pollution in Tropical Aquatic Systems* 1(1): 30-65.

Gamo, M., Oka, T., Nakanishi, J. 2003. Ranking the risk of 12 major environmental pollutants that occur in Japan. *Chemos.* 53: 277-284.

Gesamp. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. 1993. *Report of Joint Group of Experts on Scientific Aspects of marine Pollution.*

Giacomazzi, S. Cochet, N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere.* 56: 1021-1032.

Gill, H., Kole, P.L., Wiley, J.C., Li, K.M., Higginbotham, S., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L. 1994. Synthesis and tumor-initiating activity in mouse skin of dibenz(a,l)pyrene *syn*- and *anti*-fjord-region diol epoxides. *Carcinogenesis* 15: 2455-2460.

Gogou, A., Bouloubassi, I., Stephanou, E. G. 2000. Marine Organic Geochemistry of the Eastern Mediterranean: Aliphatic and Polyaromatic Hydrocarbons in Cretan Sea Surficial Sediments. *Marine Chemistry* 68: 265-282.

Griffin, D. H., Fungal Physiology. John Wiley & Sons Incorporation, Publishers. 1994

Grisolia, C.K.; Cordeiro, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*. v. 23 n.1, p. 235-239. 2000.

Grove, S. N., Bracker, C. E., Morre, D. J. 1970. An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Am. J. Bot.* 57: 245-266.

Guerin, W.F., Jones, G.E. 1988. Mineralization of fenantreno by a *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ Microbiol.* 54(4): 937–944.

Guha, S. 1999. Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, fenantreno and pyrene mixtures. *Biotechnology and Bioengineering* 65(5): 491-499.

Heath, I. B. 1990. The roles of actin in tip growth of fungi. *International Reviews of Cytology* 123: 95-127.

Heipieper, H.J., Bont, J.A.M.D. 1994. Adaption of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4440–4444.

Heipieper, H.J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H., De Bont, J. A. M. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechno* 12: 409–415.

Heitkamp M.A., Cerniglia C.E. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl Environ Microbiol* 54(6): 1612–1614.

Hoff, R. Z. 1993. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin* 26(9): 476-481.

Holliger, C., Gaspard, S., Glod, S. 1997. Contaminated environments in subsurface and biodegradation: organic contaminants”, *FEEMS Microbiology Reviews*. 20: 517-523.

International Programme On Chemical Safety (IPCS), Environmental Criteria 202. 1998. Selected Non-heterocyclic PAHs, *World Health Organization*, Geneva.

Johns, R.B. 1986. Biological markers in the sedimentary record. *Methods in Geochemistry and Geophysics, Elsevier Publishers B. 2*: 43-99.

Juhasz, A.L. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology* 30(5): 396-401.

Jung, H., Sohn, K., Neppolian, B., Choi, H. 2008. Effect of soil organic matter (SOM) and soil texture on the fatality of indigenous microorganisms in integrated ozonation and biodegradation. *Journal of Hazardous Materials* 150 (3): 809-817.

King, R., Long, B., Gilbert, M., Sheldon, J. K. 1997. *Practical Environmental Bioremediation - The Field Guide* Lewis Publishers Press.

Klomparens, K.L. 1990. Development and application of ultrastructural research in mycology. *Mycopathologia* 109: 139-148.

Kullman, S.W., Matsumura, F. 1997. Identification of a novel cytochrome P-450 gene from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ Microbiol.* 63: 2741–2746.

Landrum, P.F., Dupuis, W.S., Kukkonen, J. 1994. Toxicokinetics and toxicity of sediment associated pyrene and phenanthrene in *Diporeia spp.*: Examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazards. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1769-1780.

Langwaldt, J.H., Puhakka, J.A., 2000, On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review, *Environmental Pollution*, v. 107, pp. 187- 197. 2000.

Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., Springael, D. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1944–1955.

Lindstrom, J. E., Prince, R. C., Clark, R. C., Grossman, J. C., Yeager, T. R., Braddock, J. F., Brown, E. J. 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1): 2514-2522.

Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. 2003. Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 363-372.

Love, N.G., Grady, C. 1995. Impact of Growth in Benzoate and m-Toluate Liquid Media on Culturability of *Pseudomonas putida* on Benzoate and m-Toluate Plates. *Appl Environ Microbiol.* 61(8): 3142–3144.

Magnelli, P. E., Cipollo, J. F., Robbins, P. W. 2005. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Analytical Biochemistry* 336(2): 202-212.

Mahony, T. O., Guibal, E., Tobin, J. M. 2002. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 456-463.

Meire, R. O., Azeredo, A., Torres, J. P. M. 2007. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras.* 11(2): 188-201.

Merlin, F. X., Lee, K., Swannel, R., Outdot, J., Basseres, A., Relly, T., Chauery, C., Dalmazzone, C., Sveum, P. 1994. Protocol for experimental assessment of bioremediation

agents on a petroleum polluted shoreline. *Proceeding of the 17th Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar 1*: 465- 478.

Michizoe, J., Icinose, H., Kamiya, N., Maruyama, T., Goto, M. 2005. Biodegradation of phenolic environmental pollutants by a surfactant-laccase complex in organic media. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(6): 642-647.

Mims, C. W., Rodriguez-Lothar, C., Richardson. E. A. 2001. Ultrastructure of the host-parasite interaction in leaves of *Duchesnea indica* infected by the rust fungus *Frommeëla mexicana* var. *indicae* as revealed by high pressure freezing. *Canadian Journal of Botany* 79(1): 49–57.

Mims, C.W., Richardson, E.A. 2005. Ultrastructure of urediniospore development in *Coleosporium ipomoeae* as revealed by high-pressure freezing followed by freeze substitution. *International Journal of Plant Sciences* 166: 219-225.

Mitra, A.P., Morawska, L., Sharma, C., Zhang, J. 2002. Chapter two: methodologies for characterization of combustion sources and for quantification of their emissions. *Chemosphere* 49: 903-922.

Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamentals of the Fungi*. 4th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Morgan, P., Watkinson, R. J. 1994. Biodegradation of Components of Petroleum. *In*: Ratledge, C. (ed.) *Biochemistry of Microbial Degradation*. 1: 1-27.

Mumtaz, M.M., George, J.D., Gold, K.W., Cibulas, W., DeRosa, C.T. 1996. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service* 12(6): 742-971.

Murugan, R., Ramakrishna, S. 2004. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nanohydroxyapatite. *Biomaterials* 25(17): 3829- 835.

Nascimento, A.E., Shari'a, A.E.N., Lima, M.A.B., Campos-Takaki, G.M., 2000. A cytochemical study of acid carbohydrates on the surface of *Candida lipolytica* grown in tween 80-containing medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 30-36.

Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Rodrigues, E. G., Travassos, L. R. 2005. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes and Infection* 7(4): 789– 798.

Noll, I.B., Toledo, M.C.F. 1997. Benzo(a) pireno em carnes defumadas pelos processos caseiro e industrial. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 10: 19-23.

Okoro, C.C., Amund, O.O. 2002. Biodegradation of hydrocarbons in untreated produce water using pure and mixed microbial cultures. *J. Sci. Tech. and Environ.* 2(2): 14-23.

Oldfield, C., Wood, N. T., Gilbert, S. C., Murray, F. D., Faure F R. 1998. Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus* and related taxa. *Antonie Leeuwenhoek* 74: 119–132.

Ovrebo, S., Haugen, A., Phillips, D.H., Hewer, A. 1992. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells from coke oven workers: correlation with job categories. *Cancer Res. Mar.* 15(52):1510–1514.

Paje, M. L., Marks, P., Couperwhite, I.. 1998. Degradation of benzene by a *Rhodococcus* sp. using immobilized cell systems. *World J Microbiol Biotechnol.* 14: 675–680.

Passos, C. T., Burkert, J. F. M., Kalil, S. J., Burkert, C. A. V. 2009. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. 32(4): 950-954.

Pérez, P., Ribas, J. C. 2004. Cell wall analysis. *Methods*, Amsterdam. 33(3): 245-251.

Peters, K. E., Moldowan, J. M. 1993. *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossil in Petroleum and Ancient Sediments*. Prentice Hall, New Jersey.

Phillips, T. M. 2000. Monitoring biodegradation of creosote in soils using radiolabels, toxicity tests and chemical analysis. *Environmental Toxicology* 15(2): 99-106.

Pino, V., Ayala, J.H., Afonso, A.M., González, V. 2000. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by High Performance Liquid Chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. *Journal of Chromatography A*. 869: 515-522.

Pott, P. 1775. Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kind of ruptures and the mortification of the toes and feet. *Hawes, Clark e Collins*.

International Programme on Chemical Safety (IPCS), Environmental Criteria 202. Selected Non-heterocyclic PAHs. *World Health Organization* .1998.

Rytkonen, J., Itavaara, M., Paulsen, J. E. 1997. The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. *Proceedings of the 7th International Offshore and Polar Engineering Conference* 2(1): 25-30.

Sabate, J., Vinas, M., Solanas, A. M. 2006. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere* 63(10): 1648-1659.

Sasek, V., Cajthaml, T., Bhatt, M. 2003. Use of fungal technology in soil remediation: A Case Study. *Water, Air and Soil Pollution* 3: 5-14.

Scherrer, P., Mille, G. 1989. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. *Marine Pollution Bulletin* 20(9): 430-432.

Scott, P.M. 1991. Methods of Analysis for Mycotoxins – an Overview. Analysis of Oilseeds, Fats and Fatty Foods. *Elsevier Applied Science* 4: 141 – 184.

Shari'a, A.E.N., Nascimento, A.E., Campos-Takaki, G.M. 1999. Actin cytoskeleton structure and its localization in *Gongronella butleri*, *Mucor javanicus* and *Absidia cylindrospora* (Mucorales – Zygomycetes). *Boletín Micológico* 14: 1-7.

Shields, M.S., Reagin, M.J., Gerger, R.R., Campbell, R., Somerville, C. 1995. A new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Appl Environ Microbiol.* 61(4): 1352–1356.

Shigemasa, Y., Minami, S. 1996. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 17: 413-420.

Shipton, W. A., Lunn, J. A. 1980. Sporangiole morphology and species separation in *Cunninghamella*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74(3): 483-491.

Song, Y. F., Jing, X., Fleisemann, S., Wilke, B. M. 2002. Comparative Study of Extraction Methods for the Determination of PAHs from Contaminated Soils and Sediments. *Chemosphere* 48: 993-1001.

Sood N., Lal B. 2009. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions. *Journal of Environmental Management* 90: 1728–1736.

Speight, J. G. 1991. The Chemistry and Technology of Petroleum. 2° ed. *New York, Marcel Dekker*.

Srinivasan, S., Vargas, M. M., Roberson, R. W., 1996. Functional, organizational, and biochemical analysis of actin in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Mycologia* 88: 57-70.

Stamford, T. C. M., Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Neto, B. B., Campos-Takaki, G. M. 2007. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using *Yam bean* medium. *Electron. J. Biotechnol* 10(1): 61-68.

Stokes, J. D., Wilkinson, A., Reid, B. J., Jones, K. C., Semple, K. T. 2005. Prediction of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in contaminated soils using an aqueous hydroxypropyl-beta-cyclodextrin extraction technique. *Environ. Toxicol. Chem* 24(6): 1325-1330.

Sutherland, J.B., Fu, P.P., Yang, S.K., Von Tungeln, L.S.; Casillas, R.P.; Cerniglia, C.E. 1993. Enantiomeric composition of the *trans*-dihydrodiols produced from phenanthrene by fungi. *Appl Environ Microbiol* 59: 2145–2149.

Synowiecki, J., Al-Khatteb, N. Ali, A. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(2): 145-171.

Tavares, A.P.M., Coelho, M.A.Z., Coutinho, J.A.P., Xavier, A.M.R.B. 2005. Laccase improvement in submerged cultivation, induced production and kinetic modelling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80(6): 669-676.

Tharanathan, R. N., Kittur, F. S. 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(1): 61-87.

Tissot, B. P., Welte, D. H. 1984. Petroleum formation and occurrence. 2. ed. *Rev. e aum. Berlin: Springer- Verlag*.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. 2000. Microbiologia. 6. ed. *Porto Alegre: Artmed*,

Uruahy, A. F. P. 1998. Biodegradação de Resíduos Oleosos Proveniente de Refinaria de Petróleo. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 344p.

Valentín L., Lu-Chau T.A., López C., Feijoo G., Moreira M.T., Lema J.M. 2006. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Process Biochemistry* 42(4): 641-648.

Van Wetter, M. A., Wösten, H. A. B., Sietsma, J. H., Wessels, J. G. H. 2000. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology* 31: 99-104.

Venosa, A. D., Haines, J. R., Nisamenepong, W., Govind, R., Pradhan, S., Sidique, B. 1991. Screening of commercial inoculate for efficacy in stimulating oil biodegradation in closed laboratory system. *Journal Haz. Materials* 28(1): 131-144.

Walker, G., Weatherley, L. R. 2000. Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye. *Environmental Pollution* 108: 219-223.

Walter, M., Boyd-Wilson, K. B., Boul, L, Ford, C., McFadden, D., Chong, B., Pinfeld, J. 2005. Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 51-57.

Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T. 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 58: 202-209.

Woo, S. H. 2001. Evaluation of the interaction between biodegradation and sorption of fenantreno in soil-slurry systems. *Biotechnology and Bioengineering* 73(1): 12-24.

Wu, J.; Xiao, Y.; Yu, H. 2005. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology* 96(12): 1357-1363.

Yong-Hak, K. 2005. Effects of pH on the degradation of fenantreno and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67(2): 275-285.

Yusof, N. L. B. M., Wee, A., Lim, L. Y. Khor, E. 2003. The flexible chitin films as potential wound-dressing materials: Wound model studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 66A(2): 224-232.

Zhang, C. 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 600-618.

Zhang, H.B., Luo, Y.M., Wong, M.H., Zhao, Q.G., Zhang, G.L. 2005. Distributions and concentrations of PAHs in Hong Kong soils. *Environmental Pollution* 141(1): 107-114.

**METABOLISMO DO FENANTRENO POR CUNNINGHAMELLA ELEGANS UCP 542  
ASSOCIADO AOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ULTRAESTRUTURAIS, NA  
PRODUÇÃO DE QUITINA E DE QUITOSANA**

**MARTA CRISTINA DE FREITAS DA SILVA**

*Data da Defesa: 06/11/2009*

**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki- Orientadora  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP



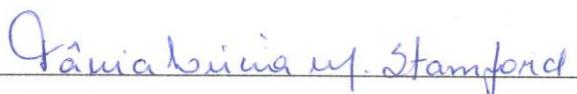
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida Resende-Stoianoff  
Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Kaoru Okada  
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia de Figueiredo Porto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Tânia Lúcia Montenegro Stamford  
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

**Silva, Marta Cristina de Freitas da**

**Metabolismo do fenantreno por *Cunninghamella elegans* UCP 542 associado aos aspectos morfológicos, ultraestruturais e na produção de quitina e quitosana/ Marta Cristina de Freitas da Silva. – Recife: O Autor, 2010.**

**124 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Galba Maria de Campos-Takaki.**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Microbiologia aplicada, 2010.**

**Inclui bibliografia.**

**1. *Cunninghamella elegans* 2. Fenantreno 3. Quitina 4. Quitosana I. Título.**

**579.53 CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2010-108**