



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**Renata Gonçalves dos Santos Inácio**

**Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do  
petróleo) no Crescimento e na Morfologia de  
*Rhizopus arrhizus* UCP 402**

**Recife  
2009**

**Renata Gonçalves dos Santos Inácio**

**Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo) no Crescimento e na Morfologia de *Rhizopus arrhizus* UCP 402**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

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

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kaoru Okada

**Recife**

**2009**

I35e

Inácio, Renata Gonçalves dos Santos

Efeito do dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo) no crescimento e na morfologia de rhizopus arrhizus UCP 402 / Renata Gonçalves dos Santos Inácio ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Kaoru Okada, 2009.  
48, [34] f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Rhizopus arrhizus. 2. Dibenzotiofeno. 3. Quitosana.  
4. Quitina. I. Título.

CDU 576.8

**EFEITO DO DIBENZOTIOFENO DBT (DERIVADO DO PETRÓLEO)  
NO CRESCIMENTO E NA MORFOLOGIA DE *Rhizopus arrhizus* UCP**

**402**

**Renata Gonçalves dos Santos Inácio**

Examinadores:

---

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

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliane Cardoso de Vasconcelos  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

---

Prof. Dr. Ricardo Kenji Shiosaki  
Faculdade de Integração do Sertão - FIS

Defendida em \_\_\_\_\_

Coordenador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Galba Maria de Campos Takaki

*A Deus,  
pois ele sempre me apóia e acredita  
no meu potencial, fazendo com que eu lute  
para que meus sonhos se tornem realidade.  
Por isso todas as minhas conquistas eu dedico a Deus!*

## **Dedico**

*Aos meus pais, Raimundo Inácio neto e Vera Lúcia Inácio,  
que são os responsáveis por tudo o que sou.*

*Ao meu tio, André Freire Furtado, por ser meu guia, meu mestre  
e meu ídolo nessa escolha pelos caminhos da vida,  
e por ter se dedicado com tanto amor e compreensão  
na minha orientação que ultrapassa o profissional.*

*Ao meu esposo, Leonardo José Vidal A. de Carvalho,  
que é a melhor pessoa que podia conhecer na vida  
e que tanto me apóia nas minhas decisões, sempre presente.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus onipotente, onipresente e infinito em sua sabedoria por haver permitido a concretização desse ideal;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki, uma pessoa maravilhosa que dispensa apresentações, tão grande seu sucesso no campo profissional, pela dedicação e competência na orientação desse trabalho;

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kaoru Okada, minha co-orientadora, por todas as sugestões e contribuições para o trabalho;

A Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S. J., pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-NPCIAMB;

Aos amigos e colegas do NPCIAMB pelo apoio no desenvolvimento do projeto;

Às amigas Marta Cristina Freitas da Silva do Doutorado CCB-UFPE, Geisane Priscila Messias do PIBIC-CNPq-UNICAP e Fabíola Carolina Gomes de Almeida do Mestrado MDPa-UNICAP, pelo companheirismo, competência, colaboração e amizade, presentes em todos os momentos;

Aos técnicos Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana e André Felipe e a secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais-NPCIAMB, Sônia Maria de Souza, pela presteza dos seus serviços;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS   | i    |
| LISTA DE TABELAS   | iv   |
| LISTA DE SÍMBOLOS  | v    |
| LISTA DE ABREVIATURAS  | vi   |
| RESUMO   | vii  |
| ABSTRACT   | viii |
| CAPÍTULO 1   | 07   |
| 1.1 Introdução   | 08   |
| 1.2 Objetivos  | 11   |
| 1.3 Revisão da Literatura  | 12   |
| 1.4 Referências Bibliográficas   | 36   |
| CAPÍTULO 2   | 49   |
| Efeitos Fisiológicos e Morfológicos mediados pelo Dibenzotiofeno em<br><i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 402  | 50   |
| Resumo   | 51   |
| Introdução   | 52   |
| Material e Métodos   | 54   |
| Resultados e Discussão   | 55   |
| Conclusões   | 68   |
| Referências Bibliográficas   | 69   |
| CAPÍTULO 3   | 71   |
| Produção de Quitina e Quitosana por <i>Rhizopus arrhizus</i> mediados pela ação<br>do Dibenzotiofeno-DBT | 72   |
| Resumo   | 73   |
| Introdução   | 74   |
| Material e Métodos   | 76   |
| Resultados e Discussão   | 77   |
| Conclusões   | 79   |
| Referências Bibliográficas   | 80   |

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Evolução da especificação do teor de enxofre na gasolina do ano 2000 para 2010 (CERUTTI, 2007).   | 13 |
| Figura 2  | Limites de enxofre para a gasolina comercializada no Brasil (CERUTTI, 2007).  | 14 |
| Figura 3  | Estrutura química do dibenzotiofeno.  | 18 |
| Figura 4  | Vias degradativas do dibenzotiofeno. A – Via de Kodama; o átomo de enxofre não é removido, havendo ruptura de ligações C-C. B – Via de Van Afferden; o enxofre é removido na forma de ião sulfito ocorrendo ruptura da estrutura carbonada. | 22 |
| Figura 5  | Via “4S”; o enxofre é removido na forma de sulfito, permanecendo intacta a estrutura carbonada.   | 24 |
| Figura 6  | Classificação dos processos de dessulfurização baseada na transformação dos compostos orgânicos de enxofre. Babich e Moulijn (2003).  | 26 |
| Figura 7  | Tecnologias de dessulfurização classificadas pela natureza do processo chave para remover enxofre. Babich e Moulijn (2003).   | 27 |
| Figura 8  | Arranjo molecular das cadeias de quitina nas formas $\alpha$ , $\beta$ e $\lambda$ (ANTONINO, 2007)   | 32 |
| Figura 9  | Mecanismos de produção de quitina e quitosana e principais enzimas envolvidas (SILVA, 2007).  | 33 |
| Figura 10 | Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (Dallan, 2005).  | 33 |

### Capítulo 2

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Perfil de crescimento e pH de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 0,5mM de DBT sem glicose (A). | 56 |
| Figura 2 | Perfil de crescimento e pH de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 0,5mM de DBT com glicose (B). | 57 |
| Figura 3 | Perfil de crescimento e pH de <i>Rhizopus arrhizus</i> em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 1,0mM de DBT sem glicose (A). | 58 |

- Figura 4 Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 1,0mM de DBT sem glicose (A). 59
- Figura 5 Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 2,0mM de DBT sem glicose (A). 60
- Figura 6 Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 2,0mM DBT de DBT com glicose (B). 61
- Figura 7 Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido com glicose e sem DBT – Controle (A). 62
- Figura 8 Microscopia ótica de *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio de cultura Sabouraud líquido: Controle (A e A1) [www.telmeds.org](http://www.telmeds.org) e [www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org), respectivamente; 0,5 mM de DBT (B e B1), 1 mM de DBT (C, C1 e C2) e 2 mM de DBT (D e D1); incubados à 28°C, no período de 96hs: hifa (  ), modificações nas hifas (  ) aumento de 400X. 63
- Figura 9 Microscopia ótica de *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio de cultura Sabouraud líquido: 0,5 mM de DBT + Glicose (A, A1 e A2); 1 mM de DBT + Glicose (B, B1, C e C1) e 2 mM de DBT + Glicose (D, D1 e D2) incubados à 28°C, no período de 96hs: modificações nas hifas (  ) aumento de 400X. 64
- Figura 10 Microscopia ótica de *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio de cultura Sabouraud líquido: 0,5 mM de DBT (A, A1 e A2); 1 mM de DBT (B e B1) e 2 mM de DBT (C) incubados à 28°C, no período de 48hs: modificações nas hifas (  ) aumento de 400X. 65
- Figura 11 Teste de toxicidade com sementes de Repolho das 4 estações utilizando meio de cultura Sabouraud líquido: sementes em água destilada, meio Sabouraud puro + glicose, Sabouraud Puro sem glicose e Controle negativo (DBT + dimetilformamida) (A, A1, A2 e A3); meio Sabouraud + glicose com 0,5 mM de DBT, meio Sabouraud + glicose com 1 mM de DBT e meio Sabouraud + glicose com 2 mM de DBT (B, B1 e B2) e meio Sabouraud sem glicose com 0,5 mM DBT, meio Sabouraud sem glicose com 1 mM de DBT e meio Sabouraud sem glicose com 2 mM de DBT (C, C1 e C2) incubados à 28°C, no período de 96hs. 66
- Figura 12 Gráficos mostrando a porcentagem de sementes germinadas, a Média de Crescimento e o Índice de Germinação de sementes “Repolho das 4 estações” em teste de toxicidade. 67

### Capítulo 3

Figura 1 Porcentagem de quitina e quitosana produzida por *Rhizopus arrhizus* e Controle, mediados por tratamentos com dibenzotiofeno-DBT, com e sem suplemento de glicose.

78

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Estrutura molecular de alguns compostos orgânicos de enxofre. (CERUTTI, 2007). | 16 |
| Tabela 2 | Principais aplicações da quitina e da quitosana.                               | 35 |

### Capítulo 3

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Biomassa (g/L), Consumo de glicose (g/L), pH, Quitosana (g/L), Quitina (g/L), Controle e tratados com concentrações de dibenzotiofeno (DBT) na presença e ausência de D-glicose, durante 96h de cultivo de <i>Rhizopus arrhizus</i> . | 78 |
|----------|---|----|

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                              |   |
|------------------------------|---|
| $\mu \text{ máx. } ^{(h-1)}$ | Velocidade específica máxima de crescimento de microrganismo. |
| $Y_{x/s}$                    | Rendimento de biomassa pelo substrato consumido.              |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |                             |
|------------------|-----------------------------|
| DBT              | Dibenzotiofeno              |
| H <sub>2</sub> S | Hidróxido de enxofre        |
| SVE              | Extração de Vapores do Solo |
| pH               | Potencial hidrogênico       |

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do dibenzotiofeno – DBT (derivado do petróleo) no crescimento e na morfologia de *Rhizopus arrhizus* UCP 402. Com o aumento da utilização de combustíveis fósseis por vários países industrializados, um sério problema ambiental se agrava devido à qualidade das reservas do petróleo, tendo em vista a quantidade de enxofre, e conseqüentemente, maior toxicidade para o meio ambiente. Por sua vez, o dibenzotiofeno (DBT) é um composto organossulfurado heterocíclico presente no óleo diesel, sendo considerado um combustível que causa grandes problemas ambientais. A utilização do DBT por *R. arrhizus* UCP 402 foi avaliada a partir de diferentes concentrações desse composto, observando-se os efeitos na cinética de crescimento e morfologia do fungo, na produção de quitina e quitosana, como também na formação de metabólitos tóxicos. Os resultados obtidos indicam que *R. arrhizus* apresenta habilidade para crescer nas diferentes concentrações do composto, porém apenas, em co-metabolismo, isto é, na presença de glicose. Observou-se uma variação no teor de proteínas totais, em quitina e quitina pela ação do DBT. A microscopia ótica evidenciou variações na morfologia de *R. arrhizus*, causando também alterações no padrão de ramificação das hifas. Os produtos do metabolismo do DBT indicam que ocorreu degradação do composto por *R. arrhizus*, cujos metabólitos apresentaram uma acentuada inibição da germinação de Repolho das 4 estações (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Os estudos realizados demonstram um grande potencial biotecnológico de *R. arrhizus* no processo de degradação de DBT, podendo ser empregado no futuro em processos de biorremediação.

**Palavras-Chave:** 1. *Rhizopus arrhizus*; 2. Dibenzotiofeno; 3. Crescimento; 4. Quitina; 5. Quitosana.

## ABSTRACT

The present work had as objective investigate the effect of dibenzotiofene - DBT (derived from oil) in the growth and morphology of *Rhizopus arrhizus* UCP 402. Had the increase of the use of the fossil fuels used for some industrialized countries, a serious environment problem aggravates due to quality of the reserves of the oil, in view of the amount of sulphur, and consequently, greater toxicity for the environment. In turn, the dibenzothiofene (DBT) is a composition heterocyclic organossulfurated in the oil diesel, being considered a great fuel that cause ambient problems. The use of the DBT for *R. arrhizus* UCP 402 was evaluated from different concentrations of this composition, having observed itself the effect in kinetic of growth and the morphology, in the production of quitina and quitosana, as well as in the formation of toxic methabolits. The gotten results had indicated that *R. arrhizus* presents ability to grow in the different concentrations of the composition, however only, in co-metabolism, that is, in the glucose presence. A variation in the total protein text, quitina and quitosana for the action of the DBT was observed. The óptic microscopy evidenced variations in the morphology of *R. arrhizus*, also causing alterations in the ramification of hifas on standard. The products of the metabolism of the DBT had indicated that degradation of the composition for *R. arrhizus* occurred, whose methabolits had presented one accented inhibition of the germination of Cabbage of the 4 stations (*oleracea Brassica to var. capitata*). The carried through studies had demonstrated a great biotechnological potential of *R. arrhizus* in the process of degradation of DBT, being able to be used in the future in biorremediation processes.

**Keywords:** 1. *Rhizopus arrhizus*; 2. Dibenzotiofene; 3. Growth; 4. Chitin; 5. Chitosan.

Inácio, R.G.S. Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo).....

# **CAPÍTULO 1**

## 1.1 Introdução

Atualmente, as refinarias apresentam a necessidade de mudança a respeito das especificações e da qualidade do produto, utilizando as tecnologias existentes e desenvolvendo continuamente tecnologias avançadas (BABICH e MOULIJN, 2003). A nova legislação mundial requerer reduções significativas no teor de enxofre de combustíveis de transporte. Por exemplo, no Brasil, a especificação atual para a gasolina é de 1000 ppm de enxofre (Portaria ANP 309, 2001) e há indicativos de que será reduzida para 50 ppm, em 2009.

O dióxido de enxofre, resultante da reação do enxofre com o oxigênio durante a queima de combustíveis, é um dos principais poluentes do ar. Quando combinado com a umidade da atmosfera, causa as chuvas ácidas. Portanto, o controle da poluição do ar, em termos de dessulfurização, e o estudo para o desenvolvimento de tecnologias eficazes de controle destas emissões de gases têm um papel importante (KOPAC, 1999).

Além de problemas ambientais, a presença de compostos de enxofre nas frações de petróleo é altamente indesejável por contribuir para a corrosão do equipamento da refinaria (DENOME et al, 1993). Estes compostos são também responsáveis por reduzir o desempenho dos motores usando tais combustíveis. Além disso, quando presente em concentrações superiores a 100 ppm, o SO<sub>2</sub> é nocivo ao homem, provocando irritações nas mucosas (SCHMIDT et al, 1973).

Considerando o aumento na utilização dos combustíveis fósseis pelos países industrializados, o que constitui um sério problema ambiental e que se agrava devido à qualidade das reservas do petróleo serem todas ricas neste elemento, estudos estão sendo realizados no intuito de reduzir a quantidade de enxofre desses combustíveis e conseqüentemente no ambiente (KONISHI et al, 1997). O dibenzotiofeno (DBT) é um composto organosulfurado heterocíclico, presente no óleo diesel, e o processo de dessulfurização deste composto, é considerado como reação modelo para os tratamentos dos combustíveis fósseis (LEE et al, 1995; GROSSMAN et al, 1999).

A hidrodessulfurização é o método convencional através do qual os compostos de enxofre são reduzidos. Porém, nesses processos são requeridas condições severas tais como temperaturas de 300 a 430° C e altas pressões que podem chegar a 2x10<sup>7</sup> Pa, obtendo-se uma perda razoável da octanagem. Além disso, há um consumo alto de hidrogênio e são usados catalisadores caros de cobalto e molibdênio (SALEM, 1994).

O novo desafio é usar o processo de biodessulfurização para remover seletivamente estes compostos de enxofre dos combustíveis líquidos, pois os microrganismos podem

realizar seus trabalhos em diferentes temperaturas e pressões atmosféricas com custo mais baixo.

Estudos de biodessulfurização vêm sendo desenvolvidos, desde os anos 50, na busca de microrganismos capazes de utilizar o enxofre presente nos combustíveis; entre estes microrganismos encontram-se *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Arthrobacter*, que agem através de uma via degradativa específica, onde ocorre a separação do átomo de enxofre do composto de uma forma que não gera outro composto recalcitrante, e também sem alterar o combustível quanto a seu valor carburante. As formas como os microrganismos utilizam o composto DBT ainda não está estabelecida, sabendo-se que a clivagem das ligações dos compostos pode ser realizada por enzimas, como as monooxigenases (ALVES et al, 1999). Alguns gêneros bacterianos são capazes de transformar o dibenzotiofeno, pelo crescimento em sua presença, através da utilização como fonte de energia e enxofre. Processos biológicos de oxidação e redução de compostos sulfurados na biosfera estão intrinsecamente ligados aos processos de mineralização e imobilização nos ciclos biogeoquímicos.

Além das bactérias, um grande número de microrganismos remove o enxofre do DBT através da via degradativa específica do hidrogênio, que envolve clivagem das ligações carbono-carbono resultando numa redução do valor carburante. Portanto, essa condição de transformação do DBT, explica a importância do emprego de microrganismos termofílicos (KONISHI et al, 1997; LEE et al, 1995; CASTRO et al, 2000; FURUYA et al, 2003).

Dentre os fungos, os Zygomycetes, devido a sua participação nos processos de biodeterioração, biodegradação; bem como seu papel na indústria (produção de enzimas, ácidos graxos, antibióticos, conservantes e ácidos lácticos), apresentam grande importância econômica (DUBE, 1978; TOMBS e BLAKE, 1982; ENDO et al, 1985; CARLILE e WATKINSON, 1996; HERRERA e ULLOA, 1998; ALEXOPOULOS, 1996; VOLESKY e HOLAN, 1995; KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995; BAIK et al, 2002; MAHONY et al, 2002).

Na maioria dos trabalhos publicados sobre biodessulfurização, o dibenzotiofeno (DBT) e outros compostos análogos com substituintes alquila são utilizados quer como fonte de carbono e energia principal ou secundária (co-substrato), por serem considerados representativos dos compostos organosulfurados recalcitrantes presentes nos combustíveis fósseis (MONTICELLO, 1985). O DBT é, no entanto, geralmente designado como composto modelo. No entanto há que salientar a existência de numerosos estudos efetuados com outros compostos orgânicos contendo enxofre (KAYSER et al,1993; EATON e NITTERAUER, 1994; KROPP et al,1994; CONSTANTINI et al, 1996), misturas de DBT com alcanos (OHSHIRO et al,1995; SETTI et al,1993) e até mesmo com amostras de carvão (DAHLBERG et al, 1993) ou petróleo (VAN AFFERDEN et al,1993).

A literatura revela um crescente aumento dos estudos com espécies do gênero *Cunninghamella* devido sua habilidade de metabolizar compostos xenobióticos através da excreção de hidrolases. Dessa forma, esses organismos são estudados em função de sua potencialidade nos processos de biodegradação e biotransformação (BAIJAL e MEHROTRA, 1980; REDDY et al, 1991; FOSTER et al, 1991; POTHULURI et al, 1992; CERVANTES et al, 1994; SCHWARTZ et al, 1996; ZHANG et al, 1996a e 1996b; POTHULURI et al, 1998a e 1998b; AMBRÓSIO e CAMPOS –TAKAKI, 2004).

O sucesso neste desenvolvimento conduziria a um avanço no refino de petróleo. Entretanto, o sucesso depende do desenvolvimento de um microrganismo com uma capacidade altamente seletiva de enxofre, porque os atualmente disponíveis, não são satisfatórios para esta aplicação.

Neste trabalho, a remoção de compostos de enxofre é investigada usando o processo de adaptação e avaliação da cinética de crescimento, com objetivo de esclarecer o processo de degradação de compostos contendo enxofre, derivados do diesel como o dibenzotiofeno por *Rhizopus arrhizus*.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do dibenzotiofeno – DBT (derivado do petróleo) no crescimento e na morfologia de *Rhizopus arrhizus* UCP 402 e na produção de quitina e quitosana.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a cinética de crescimento de *R. arrhizus* UCP 402 nos meios de cultivo contendo diferentes concentrações de DBT;
- Estudar as características morfológicas de *R. arrhizus* UCP 402 mediadas pelo tratamento com DBT;
- Avaliar a influência da fonte de carbono associada ao processo de degradação/remoção do DBT por *R. arrhizus* UCP 402;
- Realizar a cinética de degradação/remoção do DBT por *R. arrhizus* UCP 402;
- Avaliar a produção de biomassa por *R. arrhizus* UCP 402 e relacionar com a produção de quitina e de quitosana, mediadas pela ação do DBT;
- Avaliar o consumo dos substratos com a velocidade de produção de quitina e quitosana;
- Utilizar um acompanhamento estatístico para obtenção dos dados com a degradação/remoção do DBT.

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 A Problemática

A poluição ambiental é caracterizada pela presença de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos em quantidade superior a capacidade que o meio ambiente possui de absorvê-los num curto tempo. As diferentes formas de poluição afetam a composição e o equilíbrio da atmosfera, das águas, do solo e do subsolo, interferem na cadeia alimentar, alteram os mecanismos naturais de proteção do planeta, prejudicam as espécies animais e vegetais existentes e podem ameaçar sua reprodução.

O homem tem transformado profundamente a natureza, destruindo espécies animais e vegetais, cortando montanhas, desviando cursos de rios, drenando pântanos e amontoando toneladas de detritos no ar, na água e no solo. A saúde e o bem-estar do homem estão diretamente relacionados com a qualidade do meio ambiente, isto é, com suas condições físicas, químicas e biológicas.

A poluição atmosférica caracteriza-se basicamente pela presença de gases tóxicos e partículas sólidas no ar e suas principais causas são a emissão de resíduos por certos tipos de indústrias (siderúrgicas, petroquímicas, etc.), a queima de carvão e derivados de petróleo em usinas, automóveis e sistemas de aquecimento doméstico. O ar poluído penetra nos pulmões, ocasionando o surgimento de várias doenças, em especial no aparelho respiratório, como bronquite crônica, asma e câncer pulmonar.

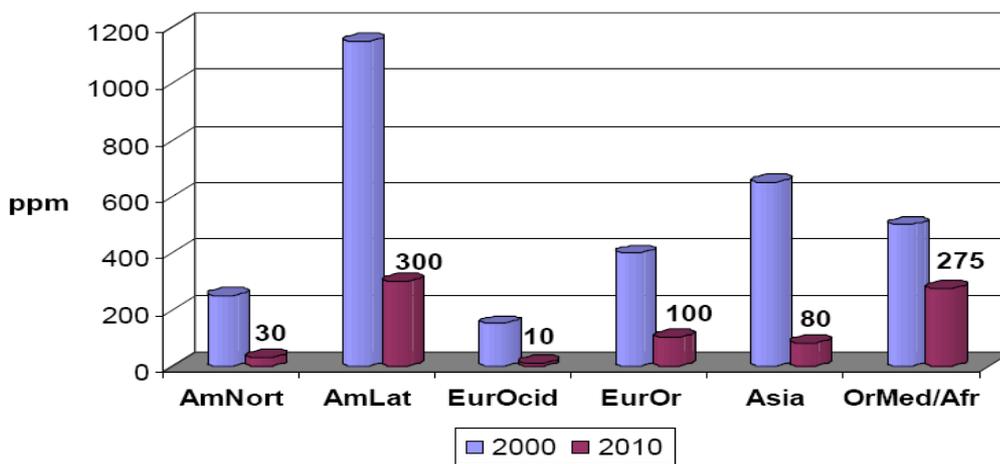
A proteção da atmosfera é uma questão ambiental que dominará as políticas comunitárias nos próximos anos e as emissões de gases provocadas pelo setor dos transportes têm particular importância devido sua rápida taxa de crescimento. Nas grandes cidades, por exemplo, cerca de 40% da poluição do ar resultam da queima de gasolina e óleo diesel pelos veículos automotores, responsáveis pela emissão de monóxido e dióxido de carbono (COx), óxidos de nitrogênio (NOx), dióxido de enxofre (SO<sup>2</sup>), derivados de hidrocarbonetos (HC) e chumbo. Crescente atenção mundial está sendo direcionada ao processamento químico dos combustíveis. Este aumento de interesse está relacionado a eficiência térmica e aos aspectos ambientais que incluem os poluentes e emissões de gás de efeito estufa.

O teor de enxofre nos combustíveis é uma preocupação ambiental porque o enxofre é convertido a SOx durante a combustão, que contribui não somente para a chuva ácida, mas também envenena o conversor catalítico no tratamento da emissão de exaustão. O teor de enxofre é expresso geralmente como porcentagem em massa (% m/m) ou partes por milhão em massa (ppm m/m) de enxofre total no combustível, quando existem muitos compostos diferentes contendo enxofre nos combustíveis derivados do petróleo.

Muitas mudanças vêm acontecendo nos países a respeito dos regulamentos de enxofre dos combustíveis de transporte. Segundo Song e Ma (2003), o teor de enxofre máximo no combustível diesel de rodovia nos Estados Unidos foi reduzido através de regulamentos, de aproximadamente 2000 – 5000 ppm na década de 80 e para 500 ppm a partir do dia 01 de outubro de 1993. Na Europa Ocidental, o valor limite Máximo de enxofre aplicável a todos os combustíveis líquidos, incluindo o óleo diesel, variou de 3000 ppm em 1989 a 2000 ppm a partir de 01 de outubro de 1994, e mais adiante se reduziu a 500 ppm em 01 de outubro 1996. O teor de enxofre do diesel no Japão foi reduzido através de regulamento de 4000 a 2000 ppm em 1993, e mais adiante para 500 ppm em 1997.

Em janeiro de 2001, os Estados Unidos através da Agencia de Proteção Ambiental (EPA) anunciou novas regras que exigem uma redução de 97% no teor de enxofre do combustível diesel de estrada, ou seja, 15 ppm, a partir de junho de 2006. Pelo mesmo regulamento, o teor Máximo de enxofre na gasolina e de 30 ppm, em media, a partir de 01 de janeiro de 2006 (SONG e MA, 2003). Na Figura 1 pode se observar a evolução das especificações do teor de enxofre na gasolina do ano 2000 e a prevista para o ano 2010 na America do Norte, America Latina, Europa Ocidental, Europa Oriental, Ásia, Oriente Médio e África

Em função da constatação da grave poluição ambiental nos grandes centros urbanos no inicio da década de oitenta, o Brasil implementou uma política nacional para controle dos poluentes atmosféricos originados da queima de combustível em veículos automotores.

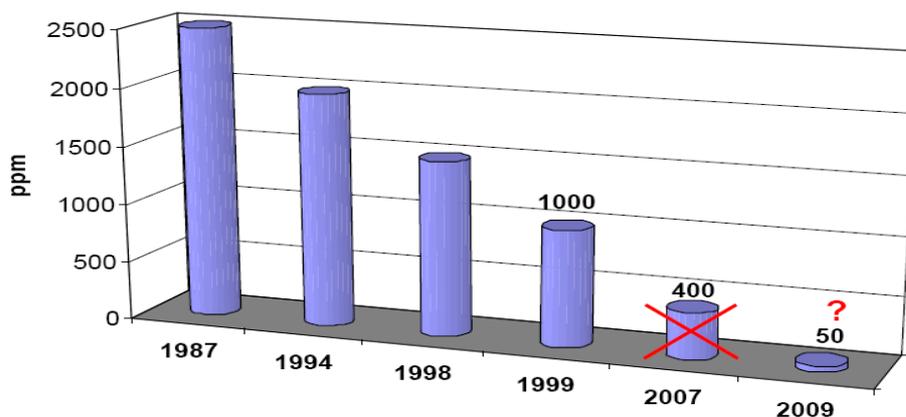


**Figura 1.** Evolução da especificação do teor de enxofre na gasolina do ano 2000 para 2010 (CERUTTI, 2007).

Com o objetivo de viabilizar um programa nacional, técnica e economicamente viável, foi instituído o Programa de Controle da Poluição por Veículos Automotores – PROCONVE com origem na Resolução CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente no. 18/1986. Este programa veio ao encontro da preocupação mundial para o desenvolvimento

sustentável, justificando as legislações de emissões mais restritivas, no que diz respeito a poluição gerada por veículos e objetivando a melhoria tecnológica dos mesmos e dos combustíveis. O PROCONVE tem por objetivo reduzir os níveis de emissões dos poluentes em veículos automotores, além de promover a evolução tecnológica da indústria automotiva. A partir da Resolução do CONAMA no. 18/1986 foram publicadas outras Resoluções complementares dentre as quais as Resoluções no. 08/93 e 315/02, que definiram novos critérios e metas de redução de poluentes atmosféricos por veículos automotores.

A Agência Nacional do Petróleo, Gas Natural e B combustíveis – ANP, considerando os futuros limites de emissões veiculares estipulados pela Resolução CONAMA no. 315/2002 e as disposições previstas no PROCONVE, através de consultas públicas, vêm negociando com as partes envolvidas as futuras especificações dos combustíveis automotivos. A especificação atual para a gasolina é de 1000 ppm de enxofre (Portaria ANP 309, 2001) e as próximas especificações foram propostas para serem cumpridas em duas fases: a primeira de 400 ppm na gasolina comum em 2007 e a segunda, de 50 ppm para 2009 (Figura 2). A primeira fase não entrou em vigor em 2007, pois novas tecnologias ainda estão sendo desenvolvidas e as gasolinas atualmente comercializadas já atendem a especificação proposta de 400 ppm e a segunda de 50 ppm encontra-se ainda em fase de discussão. Com relação ao diesel, a Resolução ANP no. 15, de 17-7-2006 estabeleceu a nova especificação de enxofre para a comercialização do óleo diesel metropolitano e óleo diesel interior de 500 e 2000 ppm, respectivamente, revogando a Portaria ANP no. 310/2001 que estabelecia um limite Máximo de 2000 ppm e 3500 ppm, respectivamente. Há indicativos de especificações ainda mais rigorosas para o diesel de 50 ppm a partir de 2009 e 10 ppm para 2013 (IV Conferência Internacional de Emissões Veiculares da AFEEVAS, junho de 2005).



**Figura 2.** Limites de enxofre para a gasolina comercializada no Brasil. (CERUTTI, 2007).

O problema da remoção de enxofre vem se tornando mais sério devido não somente ao limite das especificações cada vez mais baixo de teor de enxofre nos produtos

combustíveis, como também pelos teores cada vez mais elevados de enxofre no petróleo cru no mundo. O resultado do refino, que por sua vez define o nível de dessulfurização atingido, depende da qualidade do petróleo processado. O Brasil, sob o controle da Petrobras, dispõe de vários tipos de petróleos para processamento, utilizando na maioria das vezes misturas de petróleos com, por exemplo, qualidades aproximadas que vão de 500 ppm de enxofre no tipo Urucu (45,6° API), brasileiro, a 28000 ppm de enxofre no tipo Bachaquero (11,5° API), importado da Venezuela. De maneira geral, o petróleo brasileiro e do tipo pesado, com algumas exceções tais como duas descobertas feitas em 2003, sendo uma no Espírito Santo (40o API e 900 ppm de enxofre) e outra em Sergipe (42o API e 800 ppm de enxofre). Como mais representativos da qualidade nacional citam-se o petróleo Marlim com 19° API e 7000 ppm de enxofre e o petróleo Cabiúnas, com 25° API e 5000 ppm de enxofre, ambos da Bacia de Campos.

Este trabalho tem por enfoque principal investigar o efeito do dibenzotiofeno – DBT (derivado do petróleo) no crescimento e na morfologia de *Rhizopus arrhizus* UCP 402, a fim de gerar novas alternativas de biodessulfurização para atingir as próximas especificações referentes ao teor de enxofre da gasolina automotiva.

### 1.3.2 Compostos orgânicos de enxofre

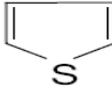
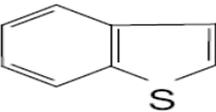
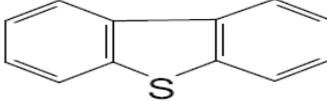
Os compostos orgânicos de enxofre estão geralmente presentes em quase todas as frações de destilação do óleo cru. As frações de ponto de ebulição mais elevado contêm relativamente mais enxofre e estes compostos são de massa molar mais elevada.

De acordo com Song e Ma (2003), existem três tipos principais de combustíveis de transporte: a gasolina, o óleo diesel e o querosene de aviação, que tem diferentes composições e propriedades. Os tipos comuns de compostos de enxofre nos combustíveis líquidos estão listados a seguir:

- a. Gama da Gasolina: nafta, nafta de craqueamento catalítico (FCC), produtos alquilados, reformados e isomerizados,
  - mercaptanas; sulfetos e dissulfetos;
  - tiofeno e seus derivados alquilados;
  - benzotiofeno.
- b. Gama do querosene de aviação: nafta pesada, destilados médios,
  - benzotiofeno e seus derivados alquilados.
- c. Gama do Diesel: destilados médios, óleo leve de reciclo (LCO),
  - benzotiofenos alquilados;
  - dibenzotiofeno e seus derivados alquilados.

Na Tabela (1), são apresentadas as estruturas moleculares de alguns dos compostos orgânicos de enxofre de interesse, que são mercaptanas, sulfetos, dissulfetos, tiofeno (T), benzotiofeno (BT), e dibenzotiofeno (DBT). Naturalmente, para a ultra dessulfurização das correntes na refinaria, os compostos de enxofre orgânicos polinucleados são também de interesse.

**Tabela 1.** Estrutura molecular de alguns compostos orgânicos de enxofre. (CERUTTI, 2007).

| Compostos orgânicos de enxofre       |  |
|--------------------------------------|--|
| ▪ Mercaptanas<br>$R - S - H$         | ▪ Tiofeno<br>          |
| ▪ Sulfetos<br>$R^1 - S - R^2$        | ▪ Benzotiofeno<br>    |
| ▪ Dissulfetos<br>$R^1 - S - S - R^2$ | ▪ Dibenzotiofeno<br> |

### 1.3.3 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ocorrem em uma série de produtos ambientais como fuligem, carvão, piche, fumaça de cigarro, petróleo, e óleo para corte. São frequentemente encontrados como produtos da combustão incompleta. A produção comercial de PAHs não é uma fonte significativa desses compostos no meio ambiente. No entanto, alguns dos PAHs - acenafteno, acenaftileno, e antraceno - são produzidos comercialmente (ATSDR, 1997).

Não há uso conhecido para o acenaftileno, benz[a]antraceno, benzo[a]fluoranteno, benzo[e]pireno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, ou pireno exceto como compostos de pesquisa.

O antraceno é usado como intermediário na produção de pigmentos, na fabricação de fibras sintéticas, e como diluente para preservante de madeira. Também é usado em cortinas de fumaça, como cristais de monitoramento de radiação, e em pesquisa de

semicondutores orgânicos. O antraceno é usado para sintetizar o agente quimioterapêutico, Amsacrina. O acenaftaleno é usado como pigmento intermediário na fabricação de produtos farmacêuticos e de plásticos, e como inseticida e fungicida. O fluoreno é usado como intermediário químico em muitos processos químicos, na formação de polirradicais para resinas, e na fabricação de pigmentos. O fenantreno é usado na fabricação de tintas e explosivos e em pesquisas na área biológica. O fluoranteno é usado como material de revestimento para proteger o interior do aço, e em tubulações maleáveis de ferro para água potável e reservatórios (ATSDR, 1997).

Os principais produtos fabricados a partir do naftaleno são repelentes de traças, na forma de bolinhas de naftalina ou cristais, e sachês perfumados para sanitários. Também é usado na fabricação de tinturas, resinas, agentes de curtição de couro, e do inseticida carbaril (ATSDR, 1997). Os derivados alquil mais simples do naftaleno, 1-metilnaftaleno e 2-metilnaftaleno são usados para a fabricação de outros compostos, como pigmentos, resinas, e a vitamina K para o 2-metilnaftaleno. Junto com o naftaleno, estes PAHs estão presentes na fumaça do cigarro, na fumaça de madeira, no piche, e no asfalto, e em alguns locais que contêm resíduos perigosos (ATSDR, 1997).

Os PAHs causam danos à saúde humana. Indivíduos expostos a misturas de PAHs e outros compostos através da respiração e do contato na pele, durante longos períodos de tempo, podem desenvolver câncer (ATSDR, 1997). Muitos dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos carcinogênicos são derivados de um esqueleto de benz[a]antraceno angular. O antraceno, em si, não é carcinogênico, mas o benz[a]antraceno aparenta ter carcinogenicidade, ainda que baixa. A adição de outro anel de benzeno em determinadas posições resulta em agentes com forte carcinogenicidade, como o dibenz[a,h]antraceno ou o benzo[a]pireno. Além disso, a substituição de grupos do metil em carbonos específicos do anel também aumenta a carcinogenicidade. Portanto, o 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) é um dos carcinógenos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos sintéticos mais poderosos conhecidos (WILLIAMS, 1986). Estudos em animais de laboratório demonstraram a capacidade do benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, e indeno[1,2,3-c,d]pireno induzir tumores de pele (isto é, são carcinógenos completos) após exposição dérmica intermediária. O antraceno, fluoranteno, fluoreno, fenantreno e pireno não agem como carcinógenos completos (ATSDR, 1997).

A exposição pré- e pós-natal a PAHs poderia produzir efeitos adversos na reprodução e no desenvolvimento em fetos humanos. A maioria dos PAHs e seus metabólitos atravessam a placenta devido à sua solubilidade em lipídeos (ATSDR, 1997).

A exposição a uma grande quantidade de naftaleno pode danificar ou destruir algumas células vermelhas do sangue humano. Pessoas, especialmente crianças, desenvolveram

esse problema após ingerir bolinhas de naftalina ou sachês perfumados contendo naftaleno. Anemia também ocorreu em crianças usando fraldas armazenadas com bolinhas de naftalina. (ATSDR, 1997).

#### 1.3.4 O Dibenzotiofeno (DBT)

O dibenzotiofeno (DBT) é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA's) contendo enxofre em substituição de um átomo de carbono na estrutura principal da molécula, como se pode observar na Figura 3. Os HPA's sulfurados (HPAS's) são formados no curso de algumas reações geológicas, incluindo fossilização de plantas ou da atividade antropogênica em relação às indústrias de petróleo, produção de gás, preservação de madeira, fumaça de cigarro, exaustão de automóveis entre outros (CARLSSON e ÖSTMAN, 1997; TRINDADE, 2005). Por suas características químicas (polaridade e basicidade) é considerada substância indesejável no nível de refino do petróleo e é definido como potencial poluente ambiental, por ter mostrado atividade carcinogênica e mutagênica nos seres vivos (ALVES e MESQUITA, 1999; PEREIRA et al, 2000).



**Figura 3.** Estrutura química do dibenzotiofeno.

As substâncias contendo enxofre representam uma fração importante dos combustíveis fósseis, sendo o dibenzotiofeno e seus derivados os maiores representantes (CARDOSO, 2004; PEREIRA et al, 2000). Estas estão amplamente distribuídas no petróleo e em rochas-mãe e são importantes marcadores de maturidade (CHAKHMAKHCHEV e SUZUKI, 1995).

A presença de nitrogênio e de enxofre no petróleo e em seus derivados combustíveis é indesejável pela liberação dos respectivos óxidos durante sua combustão ( $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_2$ ). Estes óxidos são considerados principais poluentes atmosféricos, estritamente regulamentados por serem responsáveis pelas chuvas ácidas e efeito estufa. Atualmente, uma das estratégias para diminuir os níveis de emissão de  $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_2$  consiste na remoção do nitrogênio e enxofre do carvão, petróleo e derivados antes da sua combustão. Processos biológicos têm sido aplicados com sucesso na remoção do nitrogênio, mas no caso do enxofre, a remoção tem sido muito mais complicada, devido a sua difícil biodegradabilidade

em meios anaeróbicos, pelo que, geralmente os hidrocarbonetos contendo enxofre são denominados de recalitrantes (CLEGG et al, 1998; LEITE et al, 2005). Técnicas de dessulfurização deste enxofre ligado covalentemente estão sendo aplicadas em escala piloto, onde o dibenzotiofeno (DBT) é a substância-modelo utilizada para avaliar a eficiência desses processos (DORBON et al, 1984).

Adicionalmente, a presença de substâncias nitrogenadas e sulfuradas na gasolina e no óleo diesel leva a corrosão de partes do motor, promove a formação de gomas, afeta a estabilidade da coloração e do odor destes produtos (CARDOSO, 2004). Os derivados de enxofre são também responsáveis pela queda da octanagem da gasolina.

O conhecimento dos tipos e níveis de concentração das substâncias nitrogenadas e sulfuradas nos produtos derivados do petróleo se faz claramente necessário do ponto de vista econômico e ambiental dado à necessidade de aperfeiçoar os métodos para sua remoção e de classificação de matérias primas e derivados em função da quantidade e tipos de componentes menores e traço (VO-DINH et al, 1998). A combustão incompleta de material de origem orgânico natural ou por atividades humanas fazem que estes poluentes estejam amplamente presentes nos compartimentos ambientais (água, ar, solo, sedimento e biota) pelo que sua detecção pode indicar o tipo e o grau de impacto ambiental (TRINDADE, 2005).

O monitoramento ambiental pode ser feito no meio ambiente (meio receptor) ou no agente poluidor (no caso, petróleo e seus derivados). O monitoramento ambiental permite verificar as alterações no meio ambiente, quantificar as mudanças ocorridas e identificar os agentes impactantes. No caso do agente poluidor, devem estar estabelecidos os padrões de referência (ou de aceitabilidade) por meio das regulamentações oficiais ou dos padrões definidos pelas licenças ambientais (TRINDADE, 2005). Isso exige técnicas e estratégias analíticas adequadas para a aplicação em cada tipo de amostra e para as substâncias-problema em questão.

A identificação e quantificação dos HPA's e seus semelhantes sulfurados e nitrogenados é rotineiramente realizada por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-visível, fluorimétrica ou amperométrica ou ainda por cromatografia gasosa e cromatografia a gás (GC) acoplada espectrometria de massas (GC MS) (BISHOP, 1997). Cardoso (2004) fez a determinação direta de HPAS's em petróleo e derivados na fração aromática após o *clean-up* utilizando os sistemas de GC com detecção fotométrica de emissão em chama e GC-MS. Dorbon et al (1984) estudaram do ponto de vista geoquímico a distribuição de derivados do carbazol em amostras de petróleo, as quais foram caracterizadas por GC com detecção fotométrica de emissão em chama e detector seletivo de nitrogênio-fósforo, após serem realizadas sucessivas etapas de extração. Carlsson et al

(1997) desenvolveram um método para caracterização e classificação de acridinas e carbazóis usando HPLC para o isolamento, GC-MS para identificação e GC com detecção seletiva de nitrogênio-fósforo para quantificação dessas espécies.

Devido os baixos níveis de concentração destas substâncias no meio ambiente, muita dessas técnicas analíticas nomeadas acima para a determinação de HPA's incluem necessárias etapas de pré-concentração. A complexidade e o custo da instrumentação e do material usado no seu consumo rotineiro de operação justificam a busca de metodologias analíticas alternativas para a determinação dos mesmos.

A fosforimetria na temperatura ambiente tem sido utilizada no desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação direta de alguns HPA's minimizando o uso de etapas prévias de separação do analito da matriz. Isto se baseia na seletividade na indução de fosforescência desses HPA's usando condições experimentais cuidadosamente otimizadas no sentido do aumento da seletividade da emissão luminescente. No entanto, a aplicação das técnicas fosforimétricas em química analítica estava principalmente orientada para o uso de substratos rígidos, que facilitam a observação da fosforescência.

A maioria dos trabalhos com as técnicas fosforimétricas para HPA's reportada até 1994 foram todos desenvolvidos a 77 K, em substratos sólidos (papel de filtro, sílica gel, alumina, asbestos, e fibra de vidro) ou em meio organizado por micelas de detergente (SEGURA-CARRETERO et al, 1997; HURTUBISE, 1981). Mesmo assim, são poucas as referências que indicam estudos voltados para o carbazol (CBZ) e para o DBT.

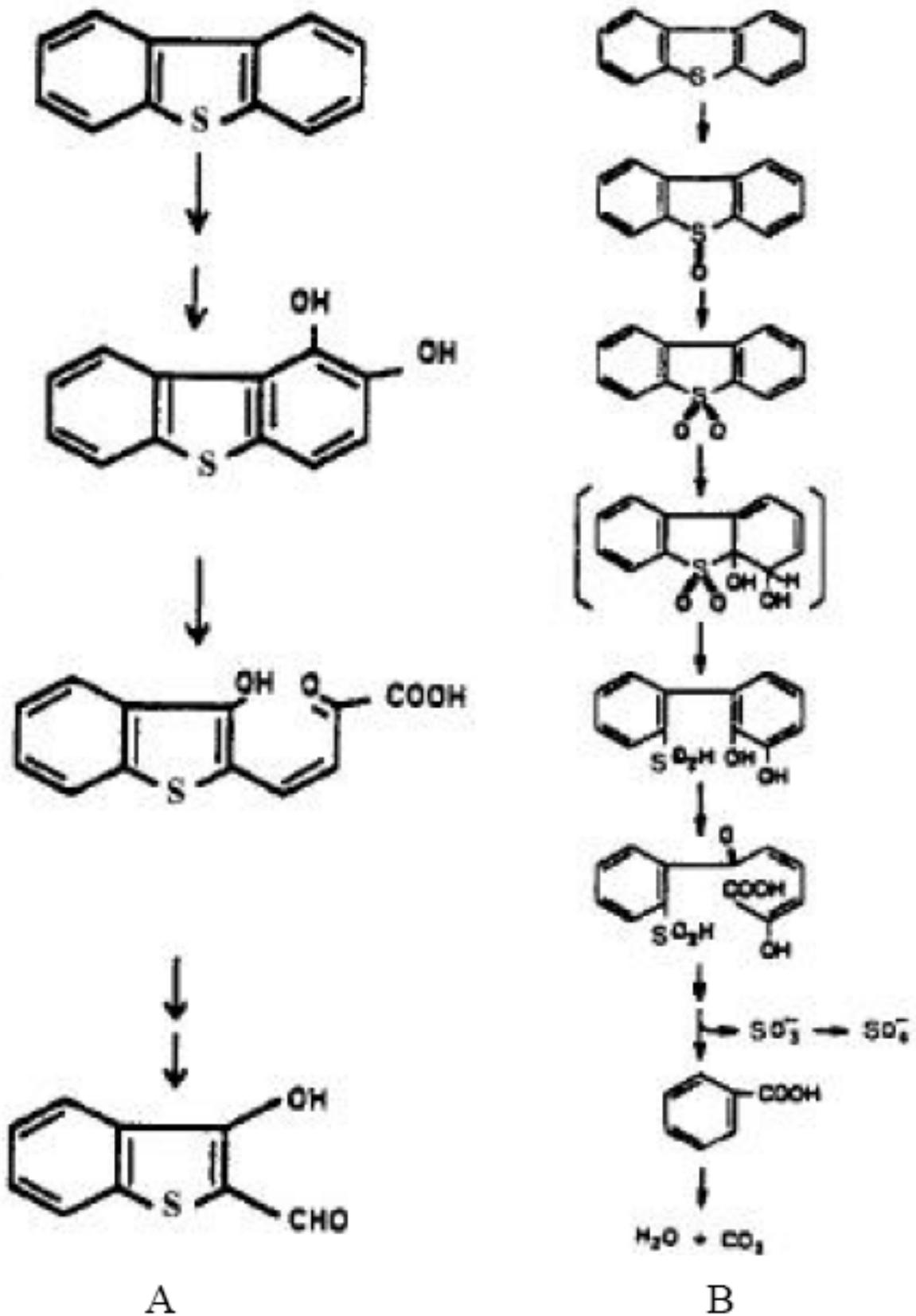
Skrliec et al (1981) reportaram o primeiro estudo de FTA do carbazol e seus derivados em meio micelar. Eles acharam que o fator mais importante na indução da FTA, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), foi à solubilidade relativa das distintas espécies, aparentemente influenciada pela polaridade do substituinte, e a eficiência da micela de promover o acoplamento spin-orbital entre o átomo pesado e o carbazol. Femia e colaboradores (1984) caracterizaram onze HPA's, entre eles o DBT, a partir de padrões sintéticos usando FTA de varredura sincronizada induzida por micelas de SDS e mostraram a possibilidade de usar esta técnica na identificação de uma substância específica em amostras com multicomponentes.

Mallik et al (1985) estudaram o efeito do átomo pesado na emissão fosforescente do CBZ em n-hexano e metilcicloexano na presença dos ácidos cloroacético e bromoacético a 300 K e a 77 K. Boutilier e Winefordner (1979) caracterizaram o CBZ e outras dez moléculas orgânicas fosforimetricamente, na temperatura do nitrogênio líquido, usando pela primeira vez, como fonte de excitação, o laser pulsado de N<sub>2</sub> obtendo resultados satisfatórios. Scypinski e colaboradores (1984) avaliaram a seletividade da técnica FTA induzida por ciclodextrinas a partir da determinação de fluoreno na presença de várias substâncias aromáticas, entre elas CBZ e DBT.

O'Reilly e Winefordner (1980) usaram o CBZ como modelo na avaliação da influência de partículas de magnetita incorporadas em vesículas de dihexadecilfosfato (DHP) sobre as propriedades luminescentes de diferentes moléculas. O estudo foi feito na presença e ausência de magnetita e nestas condições encontraram menores limites de detecção e melhor precisão nos casos onde a magnetita estava ausente. Segura-Carretero et al (2000) demonstraram a aplicabilidade, em química analítica, da técnica FTA induzida por átomo pesado em meio aquoso para diferentes HPA's, entre eles o CBZ.

### **1.3.5 Vias Metabólicas Degradativas do DBT**

Em 1973 Kodama e seus colaboradores, estudando duas espécies de *Pseudomonas* spp. constataram que o DBT era parcialmente degradado através de sucessivas oxidações por um mecanismo semelhante ao da degradação do naftaleno (DENOME et al, 1993) (Fig. 4-A). A dihidroxilação de um dos anéis aromáticos do DBT conduz à destruição desse anel, obtendo-se como produto final o 3- hidroxil-2-formil-benzotiofeno no qual persiste o núcleo tiofênico. Esta é a via utilizada pela maioria das bactérias estudadas que atacam o DBT (KILBANE e JACKOWSKY, 1992). Na via de Kodama, o ataque ao anel benzênico ocorre nas posições 2 e 3 do DBT (GALLAGHER et al, 1993). Como geralmente os compostos análogos ao DBT presentes nos combustíveis fósseis, têm substituintes alquila ou arila nessas posições, esses compostos não poderão ser degradados por esta via. Por outro lado, o produto final da degradação parcial do DBT ainda contém o átomo de enxofre, apresentando níveis de toxicidade biológica semelhantes ao substrato inicial (GALLAGHER et al, 1993).

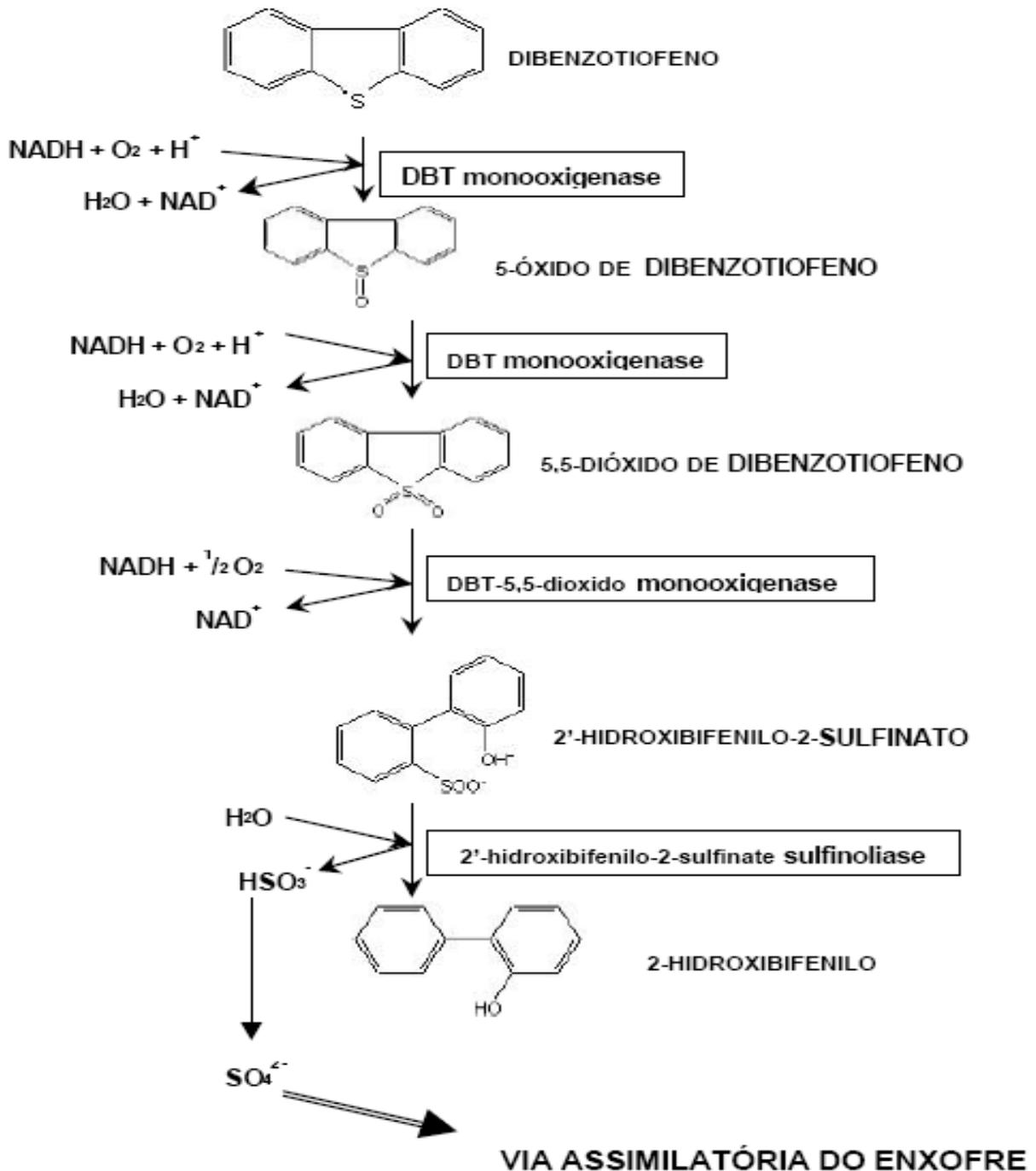


**Figura 4.** Vias degradativas do dibenzotiofeno. A – Via de Kodama; o átomo de enxofre não é removido, havendo ruptura de ligações C-C. B – Via de Van Afferden; o enxofre é removido na forma de íon sulfito ocorrendo ruptura da estrutura carbonada.

Em 1990 Van Afferden propõe uma via metabólica diferente em *Brevibacterium* sp., na qual o DBT é convertido, em quantidades estequiométricas, a benzoato e sulfito que por sua vez é oxidado a sulfato, por oxidação abiótica (Fig. 4-B) (VAN AFFERDEN et al, 1990).

O benzoato é, por sua vez, totalmente mineralizado a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Deste modo, o DBT é usado como nutriente pela bactéria no papel duplo de fonte de carbono e enxofre. Esta via de degradação do DBT não tem grande interesse em termos de processos de biodessulfurização de combustíveis fósseis, já que a mineralização completa da estrutura carbonada implicará necessariamente uma diminuição na energia química potencial dos combustíveis. Porém, as bactérias utilizadoras desta via metabólica são potencialmente úteis na formulação de inóculos microbianos mistos para processos de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos contendo enxofre libertados no ambiente.

Uma terceira via metabólica descrita é a via sulfóxido-sulfonasulfonato-sulfato, normalmente denominada "4S". Trata-se de uma via específica para a remoção do átomo de enxofre presente no DBT em que o grupo tiofênico sofre um ataque oxidativo progressivo. Atualmente sabe-se, a partir de estudos em *Rhodococcus* sp. IGTS8, que esta via envolve um sistema multienzimático com três atividades diferentes (Figura 5) (GRAY et al, 1996). A primeira enzima é uma monoxigenase do DBT, que oxida o DBT a 5,5'-dióxido de DBT em dois passos; a segunda enzima é igualmente uma monoxigenase que converte o 5,5'-dióxido de DBT a 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato e finalmente uma liase que catalisa a quebra da ligação C-S transformando o 2'-hidroxibifenilo-2-sulfinato em dois produtos finais, 2-hidroxibifenilo (HBP) e sulfato.



**Figura 5.** Via “4S”; o enxofre é removido na forma de sulfito, permanecendo intacta a estrutura carbonada.

As duas primeiras enzimas da via requerem oxigênio molecular, NADH e FMN como cofatores. Uma terceira enzima foi recentemente descrita em *Rhodococcus* sp., uma redutase de FMN endógena responsável pelo fornecimento da flavina reduzida às monooxigenases (GRAY et al, 1996). Este novo sistema multienzimático pressupõe a existência de monooxigenases que utilizem flavina livre como substrato e a conseqüente existência de um complexo enzimático entre as oxigenases e a redutase de flavina. Os

microrganismos que utilizam esta via para metabolizar o DBT conseguem assim que o átomo potencialmente tóxico seja retirado do composto tiofênico, sob a forma de um composto tratável (sulfato) apenas com uma ligeira perda do seu valor energético (WANG e KRAWIEC, 1994). Deste modo, as estirpes utilizadoras da via “4S” poderão constituir uma “ferramenta” biológica fundamental no tratamento em larga escala dos combustíveis fósseis, caso se consigam obter biocatalisadores de elevada estabilidade em ambiente industrial (WANG e KRAWIEC, 1994).

### **1.3.6 Classificação das Tecnologias de Dessulfurização**

Não existe uma convenção universal para classificar os processos de dessulfurização. Segundo Babich e Moulijn (2003) os processos podem ser classificados pelo destino dos compostos orgânicos de enxofre durante a dessulfurização (1), pela função do hidrogênio (2), ou pela natureza do processo usado (químico e/ou físico) (3).

Baseados no método em que os compostos orgânicos de enxofre são transformados (1), os processos podem ser divididos em três grupos dependendo se os compostos de enxofre são decompostos, separados da corrente da refinaria sem decomposição, ou separados e decompostos (Figura 6). Quando os compostos orgânicos de enxofre são decompostos, os produtos de enxofre sólidos ou gasosos são formados e parte do hidrocarboneto é recuperada e permanece nas correntes da refinaria. A hidrodessulfurização (HDS) convencional é o exemplo mais típico deste tipo de processo.

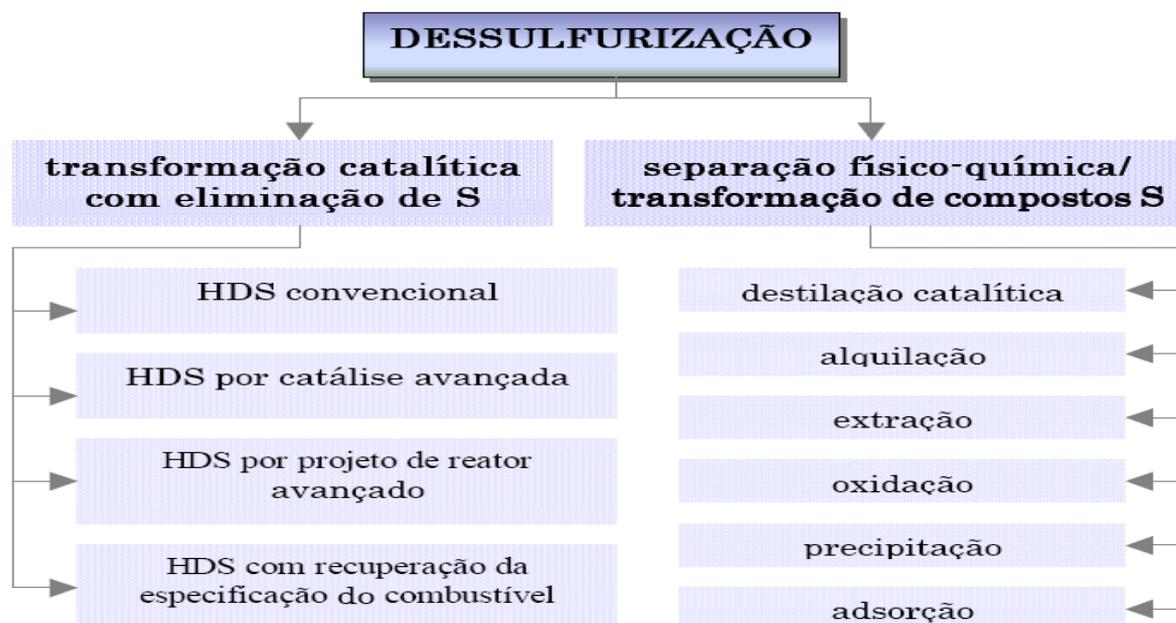
Em outros processos, os compostos orgânicos de enxofre são simplesmente separados das correntes da refinaria. Alguns processos deste tipo transformam primeiramente os compostos orgânicos de enxofre em outros compostos que são mais fáceis de separar das correntes da refinaria. Quando as correntes são dessulfurizadas por separação, algum produto desejado pode ser perdido e a eliminação das moléculas orgânicas de enxofre retidas é ainda um problema. No terceiro tipo de processo, os compostos orgânicos de enxofre são separados das correntes e decompostos simultaneamente em uma única unidade do reator ou em uma série de equipamentos de reação e separação. Estes processos combinados, que fornecem a base para muitas tecnologias atualmente, possuem grande aplicação industrial, que podem produzir combustíveis com teores ultra-baixos de enxofre. A dessulfurização por destilação catalítica é um exemplo deste tipo de processo.



**Figura 6.** Classificação dos processos de dessulfurização baseada na transformação dos compostos orgânicos de enxofre. Babich e Moulijn (2003).

Os processos de dessulfurização podem também ser classificados em dois grupos, baseados em HDS e baseados em não-HDS, dependendo da função do hidrogênio na remoção do enxofre (2). Nos processos baseados em HDS, o hidrogênio é usado para decompor os compostos orgânicos de enxofre e eliminar o enxofre das correntes da refinaria enquanto que os processos baseados em não-HDS não requerem hidrogênio. Os processos baseados em HDS são o HDS convencional e o HDS avançado, e os processos baseados em não-HDS são o deslocamento do ponto de ebulição por alquilação, a dessulfurização via extração, a dessulfurização por precipitação, a dessulfurização por oxidação seletiva e a dessulfurização por adsorção em sólidos adsorventes.

Finalmente, os processos de dessulfurização podem ser classificados baseados na natureza do processo físico-químico chave usado para a remoção do enxofre (3) (Figura 7). As tecnologias mais desenvolvidas e comercializadas são aquelas que convertem cataliticamente compostos orgânicos de enxofre com eliminação de enxofre. Tais tecnologias catalíticas de conversão incluem o hidrotreatamento convencional, o hidrotreatamento com catalisadores avançados e/ou projeto do reator, e uma combinação do hidrotreatamento com alguns processos químicos adicionais para manter as especificações do combustível. A característica principal das tecnologias da direita na Figura 7 é a aplicação de processos físico-químicos diferentes da natureza do HDS catalítico para separar e/ou transformar compostos orgânicos de enxofre das correntes da refinaria. Tais tecnologias incluem como um passo chave a destilação, alquilação, oxidação, extração, adsorção ou uma combinação destes processos (BABICH e MOULIJN, 2003).



**Figura 7.** Tecnologias de dessulfurização classificadas pela natureza do processo chave para remover enxofre. Babich e Moulijn (2003).

### 1.3.7 Biodessulfurização: bactérias que removem o enxofre dos combustíveis fósseis

Os estudos de biodessulfurização tiveram início nas décadas de 50 e 60, no entanto sem resultados significativos. Só na última década é que esta área sofreu desenvolvimentos significativos. Foram selecionadas bactérias com a capacidade de utilizar o enxofre presente em hidrocarbonetos poliaromáticos pertencentes a diferentes gêneros. *Brevibacterium* sp. (VAN AFFERDEN et al, 1990), *Corynebacterium* sp. (OMORI et al, 1992), *Rhodococcus* sp. (IZUMI et al, 1994), *Sulfolobus* sp. (KARGI, 1987), *Pseudomonas* sp. (DE FATIMA et al, 1996), *Agrobacterium* sp. (CONSTANTI, 1994), *Arthrobacter* sp. (LEE et al, 1995), *Acinetobacter* sp. (MALIK, 1978), *Rhizobium* sp. (MALIK, 1978), *Desulfovibrio* sp. (KIM et al, 1990), *Gordona* sp. (RHEE et al, 1998), *Beijerinckia* sp. (LABORDE e GIBSON, 1977), *Xanthomonas* sp. (CONSTANTI, 1994) e *Bacillus* sp. (ALVES et al, em preparação).

Na maioria dos trabalhos publicados sobre biodessulfurização, o dibenzotiofeno (DBT) e outros compostos análogos com substituintes alquila são utilizados quer como fonte de carbono e energia principal ou secundária (co-substrato), por serem considerados representativos dos composto organosulfurados recalcitrantes presentes nos combustíveis fósseis (MONTICELLO, 1985). O DBT é, no entanto, geralmente designado como composto modelo. No entanto há que salientar a existência de numerosos estudos efetuados com outros compostos orgânicos contendo enxofre (KAYSER et al, 1993; EATON e NITTERAUER, 1994; KROPP et al, 1994; CONSTANTI et al, 1996), misturas de DBT com

alcanos (OHSHIRO et al, 1995; SETTI et al, 1993) e até mesmo com amostras de carvão (DAHLBERG et al, 1993) ou petróleo (VAN AFFERDEN et al, 1993).

O petróleo e o carvão são substratos complexos e o fato de um microrganismo ser capaz de metabolizar o DBT em condições laboratoriais não implica necessariamente que consiga remover o enxofre orgânico presente nesses combustíveis fósseis. Há que ter em conta, por um lado, o problema da acessibilidade dos microrganismos aos compostos que contêm enxofre, e por outro, mesmo que essa acessibilidade exista, à existência de impedimentos estéricos associados à estrutura desses mesmos compostos, que dificultam a atuação dos sistemas enzimáticos microbianos. Alternativamente ao uso de células intactas, a utilização de enzimas livres ou imobilizadas tem sido objeto de patentes para aplicação em processos de biodessulfurização (KILBANE et al, 1994, KERN et al, 1989).

### **1.3.8 Fungos**

Os fungos são microrganismos unicelulares ou multicelulares formados por células eucarióticas. A parede celular é rica em quitina, galactose e manana, podendo também apresentar celulose ( $\beta$ -1,4-glucana), caso dos Oomycota. De modo geral, os fungos são microrganismos aeróbios, entretanto alguns estão envolvidos diretamente nos processos fermentativos. As formas unicelulares podem formar estruturas alongadas, em condições especiais, denominadas de pseudo-hifas. As formas filamentosas, consideradas as mais numerosas, apresentam-se como células tubulares, denominadas de hifas, sendo o conjunto de hifas denominado de micélio. O micélio geralmente é bem desenvolvido, cenocítico, com septos ocorrendo de modo esparso, principalmente com o envelhecimento da colônia (TRUFEM, 2000). As hifas podem ser contínuas, simples ou ramificadas, sendo também não septadas (cenocíticas), ou septadas (apocíticas) (BARTINICK-GARCIA, 1994; NASCIMENTO, 2006).

Atualmente, foram descritas aproximadamente 70,000 espécies de fungos; porém, algumas estimativas sugerem que existam 1.5 milhões de espécies. As mais recentes classificações taxonômicas dos fungos verdadeiros incluem os Filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota e fungos mitospóricos (HAWKSWORTH et al., 1995). A moderna classificação taxonômica para fungos tem como base a introdução de técnicas envolvendo a biologia molecular, tais como a análise de proteínas, carboidratos, sonda de DNA, caracterização molecular e análises genômicas. Muitas modificações têm sido introduzidas no sistema de identificação dos fungos, causando conflitos entre os micólogos e os fitopatologistas, uma vez que trabalham com diferentes especificidades (NASCIMENTO, 2006).

### 1.3.9 Zygomycetes

Os Zygomycetes constituem grupo de fungos sapróbios por excelência em matéria orgânica em decomposição, bem como fezes de herbívoros, sendo conhecidas espécies coprófilas obrigatórias e facultativas. Alguns poucos gêneros são reconhecidos como apresentando espécies parasitas de plantas superiores, outros atacam grãos, legumes e frutos estocados. Há casos relatados de micoses profundas (sistema nervoso central, pulmões, globo ocular) em pessoas imunodeprimidas por tratamentos quimioterápicos ou em portadores do vírus HIV. Há ainda um grupo micorrízico, representados pela Ordem Glomales, simbiotróficos obrigatórios e mutualistas com plantas que os hospedam (ALEXOPOULOS et al. 1996; TRUFEM, 2000).

Os Zygomycetes estão representados por seis ordens, Mucorales, Glomales, Entomophthorales, Kickxellales, Endogonales e Dimargaritales, das quais as duas primeiras são mais conhecidas, quer em função do número de representantes, em função do nicho ecológico ocupado ou das técnicas de isolamento desenvolvidas para seu estudo. A Ordem Mucorales abriga indivíduos geralmente sapróbios ou parasitos fracos, e a ordem Glomales caracteriza-se pelos representantes obrigatoriamente simbiotróficos mutualistas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Mucorales é a ordem com maior número de representantes (299 espécies), (HAWKSWORTH et al., 1995), sendo também conhecidos como fungos do açúcar, uma vez que sua capacidade de degradação limita-se às moléculas de estrutura mais simples, como glicose e sacarose. Assim, seus representantes são os primeiros fungos a colonizar um substrato, crescendo rápida e exuberantemente, com micélio denso e conspícuo, chegando a atingir 2-3 cm de altura. Consumidos os açúcares primários, cedem lugar na sucessão aos fungos com bagagem enzimática mais complexa, não sem antes deixar sobre o substrato e adjacências seus milhões e bilhões de esporos (HESSELTINE e ELLIS, 1973). A Ordem Mucorales abriga 13 famílias: Chaetocladiaceae (dois gêneros, sete espécies), Choanephoraceae (três gêneros, cinco espécies), Cunninghamellaceae (um gênero, Cunninghamella, sete espécies), Gilbertellaceae (um gênero monoespecífico), Mortierellaceae (sete gêneros, cento e seis espécies, sendo que o gênero Mortierella abriga cerca de noventa espécies), Mucoraceae (vinte gêneros, cento e vinte e duas espécies, sendo os principais gêneros Absidia, Circinella, Mucor, Rhizopus, Zygorhynchus), Mycothyphaceae (dois gêneros, seis espécies), Phycomycetaceae (um gênero, Phycomyces, com três espécies), Pilobolaceae (três gêneros, treze espécies, sendo Pilobolus o mais conhecido), Radiomycetaceae (dois gêneros, quatro espécies), Sakseneaceae (um gênero monoespecífico), Syncephalastraceae (um gênero, Syncephalastrum, com duas espécies) e Thamniaceae (doze gêneros, vinte e duas

espécies, sendo mais conhecidos os gêneros *Thamnidium* e *Thamnostylum*), (HAWKSWORTH et al., 1995).

### **1.3.10 *Rhizopus arrhizus***

*Rhizopus* são fungos filamentosos, cosmopolitas, sendo encontrados no solo ou decompondo frutas, legumes, fezes de animais e alimentos. Algumas espécies deste gênero são contaminantes comuns, também são ocasionais causadores de sérias, e frequentemente fatais, infecções em humanos. Algumas espécies são consideradas fitopatogênicas (TRUFEM, 2000).

No gênero *Rhizopus* são descritas várias espécies, sendo as mais comuns *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus azygosporus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae* e *Rhizopus stolonifer*. Algumas características morfológicas, como o comprimento dos rizóides e esporangioforos, o diâmetro dos esporângios, a forma da columela, o tamanho, a forma e a textura dos esporangiosporos auxiliam na diferenciação das espécies do gênero. A temperatura de crescimento é variável entre as espécies (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A morfologia do gênero *Rhizopus* é realizada em relação ao crescimento rápido (quatro dias), a textura da colônia, a coloração inicialmente branca, passando para cinza com a idade, hifas não septadas (cenocíticas) e estruturas de reprodução, como esporângio, esporangiosporos e os esporos (NASCIMENTO, 2006).

### **1.3.11 Aplicações biotecnológicas do *Rhizopus arrhizus***

Estudos realizados por Pochanavanich e Suntornsuk (2002), descrevem a significativa produção de quitosana por *R. arrhizus* evidenciando o potencial biotecnológico desse fungo, na produção desse biopolímero, ao comparar com os resultados obtidos por fungos das espécies *Aspergillus niger*, *Zygosacharomyces rouxii* e *Candida albicans*.

*Rhizopus arrhizus* é um importante microrganismo que ao metabolizar carboidrato, produz ácido láctico. Vários subprodutos tais como ácido málico, ácido fumárico, ácido fórmico, ácido propiônico e etanol, podem ser produzidos simultaneamente dentro da fermentação láctica. (SKORY et al., 1998; ZHANG et al., 2006). Entre estes subprodutos, o ácido fumárico e o etanol são os dois principais (LONGACRE et al., 1997; JIN et al., 2003). Estes subprodutos podem afetar, significativamente, o rendimento do ácido láctico. Como o carbono e os demais nutrientes podem competir durante o metabolismo do microrganismo para a síntese desses compostos, a presença dos subprodutos pode afetar a qualidade do ácido láctico produzido (ZHANG et al., 2006). Estudos realizados por Magnuson e Lasure (2004) sugerem que a redução na produção dos subprodutos que interferem na qualidade

do ácido láctico é um passo importante no processo de fermentação láctica promovida por este microrganismo, evitando, dessa maneira, os custos elevados nos processos de separação e purificação do ácido produzido.

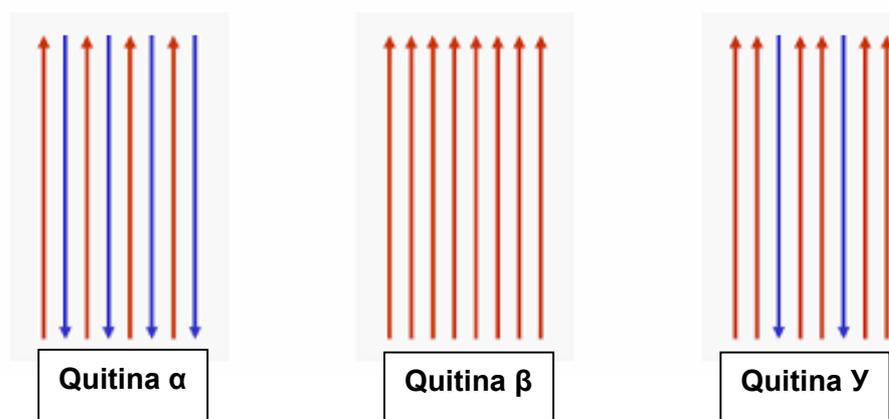
Outra aplicação biotecnológica dos fungos ocorre nos processos de biorremediação, onde estes microrganismos são bastante utilizados na biorremoval de metais pesados, tanto na forma ativa, como na forma inativa (TZESOS e VOLESKY, 1982). Cervantes et al., (2001), analisando a interação do Cromo com microrganismos e plantas, afirmam que os fungos, especialmente o *R. arrhizus*, apresentam considerável compatibilidade com este metal, revelando potencial biosortivo. Rosche et al. (2001), testando o potencial de bioconversão do benzaldeído em fenilacetilcarbinol, substância precursora de efedrina e pseudo-efedrina, relatam significativos resultados de crescimento micelial e de conversão da substância estudada por *R. arrhizus*. A aplicação de técnicas biotecnológicas tem sido utilizada como um meio de biodegradação de resíduos orgânicos no meio ambiente. Estas técnicas, inovadoras, contribuem como uma alternativa para solução de tratamento de rejeitos sólidos produzidos pela ação do homem na natureza. Zhang et al. (2006), avaliando a importância da fonte de nitrogênio em diferentes meios de cultivo, para a produção de biomassa e eficiência na produção de ácido láctico, afirma que o *R. arrhizus* apresenta condições satisfatórias na bioconversão de resíduos sólidos utilizados no experimento

### **1.3.12 Quitina e Quitosana: considerações gerais**

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É sintetizado, principalmente, por fungos, nematódeos e artrópodes. Alguns pesquisadores consideram a quitina como um derivado da celulose porque ambas partem de uma estrutura molecular semelhante (MERZENDORFER, 2005). A celulose diferencia-se da quitina por apresentar um radical que contém uma hidroxila no carbono da posição dois da cadeia monomérica, enquanto que na quitina, neste carbono, ocorre a presença do radical acetamida. A quitina e a celulose possuem funções semelhantes. Os dois polímeros servem, principalmente, como componentes estruturais do arcabouço celular. A quitina está presente na parede celular dos fungos (SYNOWIECKY e AL-KHATEEB, 1997) e nas células do exoesqueleto dos artrópodes, conferindo assim o caráter de rigidez a estas estruturas. A celulose desempenha papel semelhante nas células dos vegetais (LEHNINGER et al., 1995; ALEXOPOULOS et al., 1996; DALLAN, 2005).

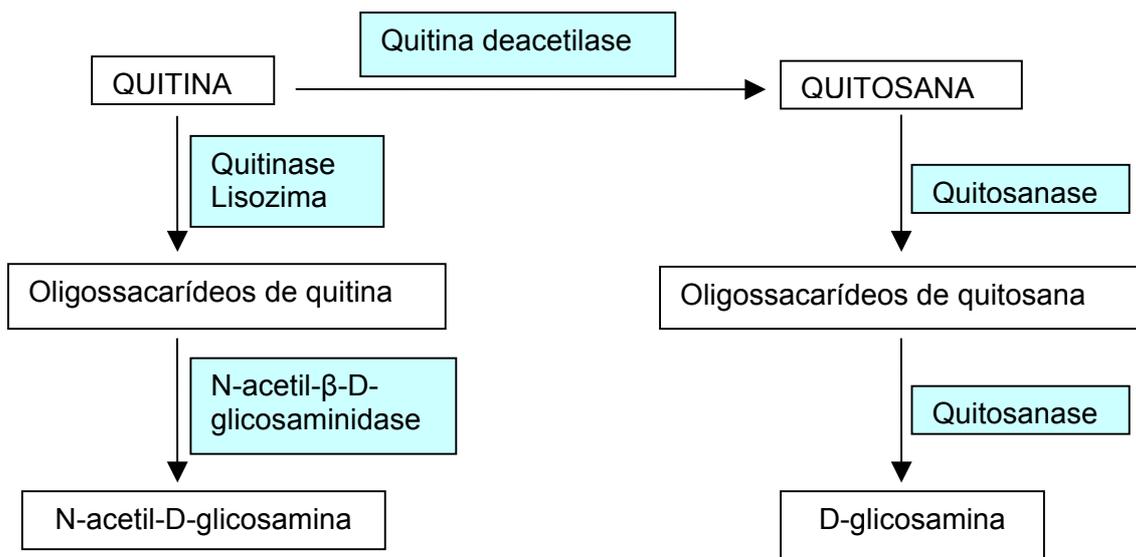
A quitina é um polímero linear composto por (poli-(1-4)-2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-Glucana) (SANO et al., 1991; SHEPHERD et al., 1997), que, de forma espontânea, se une em microfibrilas de diâmetros e comprimento variados após a síntese do polímero, sendo transportadas para o espaço extra celular. As microfibrilas são unidas por pontes de

hidrogênio entre os grupos amino e carbonila da cadeia carbônica. (RUDALL e KENCHINGTON, 1973; KRAMER e KOGA, 1986; IMAI et al., 2003). São três as variantes morfológicas da quitina e diferem entre si, principalmente, pelo grau de hidratação, pelo tamanho das unidades e do número de cadeias por célula. Na primeira forma, todas as cadeias exibem uma orientação antiparalela; na segunda forma, as cadeias obedecem a um paralelismo; na terceira forma, as cadeias se dispõem em duplas paralelas, alternadas por uma antiparalela. O arranjo antiparalelo das cadeias permite o empacotamento mais compacto das microfibrilas que corresponde a dez ou mais polímeros estabilizados por um alto número de ligações de pontes de hidrogênio (IMAI et al., 2003). A conformação estrutural da quitina é representada pelas formas alfa, beta e gama (ANTONINO, 2007) (Figura 8).



**Figura 8.** Arranjo molecular das cadeias de quitina nas formas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$   
(ANTONINO, 2007)

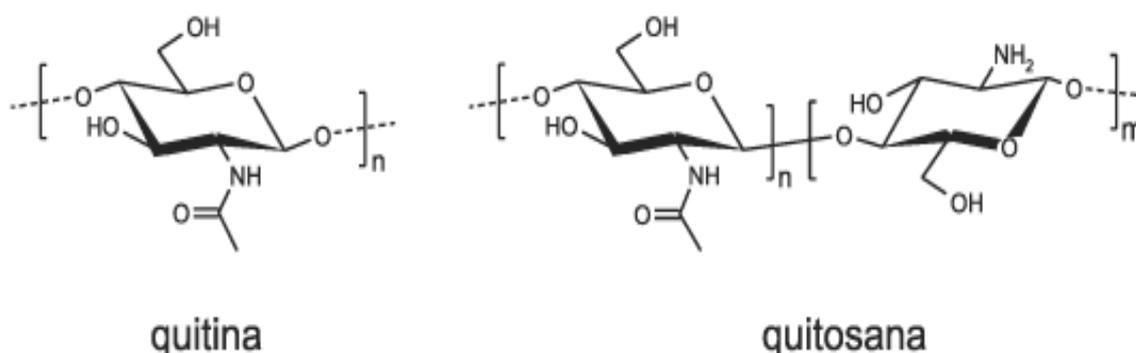
A quitina e a quitosana, derivadas através do mecanismo de desacetilação, apresentam propriedades que as tornam úteis para uma variedade de aplicações (Figura 10). A fonte comercial de quitina tem sido a carapaça de moluscos, de camarão, do “krill” antártico, de caranguejos e lagostas, contudo, o isolamento industrial deste polímero é limitado pelos problemas sazonais, e pela poluição ambiental causada pelo descarte de grandes quantidades de resíduos provenientes do processamento industrial. Além disso, outro fator limitante trata-se dos custos elevados da produção, correspondendo 10 gramas de quitosana à faixa de mercado aproximado de sete dólares e cinquenta centavos (US\$ 7,50) (CRAVEIRO et al., 1999; FRANCO et al., 2004).



**Figura 9.** Mecanismos de produção de quitina e quitosana e principais enzimas envolvidas (SILVA, 2007).

Além das fontes de obtenção da quitina citadas anteriormente, outras fontes naturais são utilizadas para produção desse polissacarídeo, tais como algas verdes, algas marrons, fungos, leveduras, escorpiões, aranhas, formigas, besouros, anelídeos e celenterados (DALLAN, 2005). A Quitina apresenta grande variedade de usos, principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos. Entretanto, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana (Figura 11), que vem sendo utilizada em diferentes setores da produção tecnológica (SINGLA e CHAWLA, 2001).

A quitosana é um polissacarídeo natural composto por unidades de beta (1-4)-D-glicosamina, originada da desacetilação da quitina (SINGLA & CHAWLA, 2001; DEE et al, 2001). É solúvel em meio ácido (pH <5,5) devido à presença de grupos amino, livres ao longo da cadeia do polímero. A presença destes grupos amino permite a síntese de diferentes derivados da quitosana (KHAN et al., 2002; FRANCO et al., 2004).



**Figura 10.** Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (Dallan, 2005).

A quitosana não pode ser considerada uma molécula uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 50% podem ser considerados como quitosana (CRAVEIRO et al., 1999).

A produção industrial da quitosana se faz por meio de reações de desacetilação, utilizando substâncias ácidas como reagentes. Entretanto, nos últimos anos, outras formas de desacetilação têm sido utilizadas, principalmente a desacetilação microbiológica através da enzima quitina deacetilase, proporcionando excelentes rendimentos de quitosana (FELSE e PANDA, 1999; DALLAN, 2005).

A quitosana é uma fibra natural solúvel em meio ácido, cuja característica permite que este polímero possa ser utilizado na indústria alimentícia, uma vez que as enzimas envolvidas nos processos de hidrólise deste polissacarídeo (lisozima, quitina deacetilase, quitinase e quitosanase), estão presentes nos organismos animais e vegetais (YAMAGUCHI et al., 1981; MELLO et al., 2006). Este polímero é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução for inferior a seis (MELLO et al., 2006).

#### **1.3.13 Aplicações da quitina e da quitosana**

As aplicações e a produção industrial da quitosana foram iniciadas a partir de 1970. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37% ao ano entre 1978 e 1983 (CRAVEIRO et al., 1999), onde pesquisas atuais apontam para uma grande variedade de aplicações da quitina e da quitosana devido à sua versatilidade (CAMPOS-TAKAKI, 2005; DALLAN, 2005) (Tabela 2). Assim, ela é utilizada na purificação da água, em processamento de alimentos, e na adsorção de íons metálicos. Atualmente, a quitosana tem sido aplicada em produtos de alto valor agregado, como cosméticos, na liberação de fármacos, estabilizantes, aditivos alimentares, membranas, produtos farmacêuticos, fotográficos, nas indústrias têxteis e de papel. Pesquisas descrevem sua aplicação na forma de géis, flocos e na imobilização celular em meios de cultura (DALLAN, 2005).

**Tabela 2.** Principais aplicações da quitina e da quitosana

| MEIO AMBIENTE                                | INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA            | INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS        | INDÚSTRIA MÉDICO/FARMACÊUTICA   |
|--|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Purificação de águas residuais de indústrias | Suplementos nutricionais         | Aditivo de cosméticos e xampus | Carreador de medicamentos       |
| Absorvente na remoção de metais pesados      | Conservantes                     | Cremes dentais                 | Imobilização de enzimas         |
| Remoção de pesticidas                        | Emulsificantes                   | Gel                            | Lentes de contato               |
| Remoção de corantes                          | Estabilizantes                   | Emolientes                     | Bandagens                       |
| Remoção de fenóis                            | Proteção bactericida de sementes |                                | Prótese óssea                   |
| Remoção de radioisótopos                     | Filmes para embalagens de frutas |                                | Vacinas                         |
| Remoção de policarbonatos                    |                                  |                                | Redução de colesterol           |
| Recuperação de íons metálicos                | Clarificante de bebidas          |                                | Regeneração da pele             |
| Recuperação de resíduos sólidos              |                                  |                                | Controle da pressão arterial    |
| Meio de troca iônica                         |                                  |                                | Redução do nível de ácido úrico |
| Imobilização de microrganismos               |                                  |                                |                                 |

**Fonte:** Silva (2007).

As propriedades biológicas da quitosana são explicadas pela presença de grupos amínicos livres ao longo de sua cadeia polimérica, que condicionam a protonação em suas unidades desacetiladas, proporcionando inúmeros e variáveis meios de aplicação em experimentos biotecnológicos. Além de que, os meios de produção destes co-polímeros são decorrentes de fontes naturais, principalmente de exoesqueletos de crustáceos e parede celular de fungos, e demais fontes citadas nesta revisão (MUZZARELLI, 1977; MUZZARELLI, 1997; ZIMUCH e MERZENDORFER, 2002; FRANCO et al., 2004; DALLAN, 2005; NASCIMENTO, 2006; COSTA SILVA et al., 2006; MELLO et al., 2006).

Considerando o grande potencial biotecnológico dos co-polímeros quitina e quitosana, e tendo em perspectiva diferentes aplicações no campo das pesquisas, as previsões futuras do uso destes biopolímeros expõem uma variedade, não mensurável, de aplicações destes polímeros no meio ambiente, na farmacologia, na indústria de alimentos, e na indústria química.

## 1.4 Referências Bibliográficas

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR, 1997. Toxicological Profiles. **U.S. Public Health Service** (CD-ROM).

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO – ANP. **Portaria ANP nº 309/2001**, de 27 de dezembro de 2001, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 de dezembro de 2001; Agência Nacional do Petróleo.

\_\_\_\_\_ **Portaria ANP nº 310/2001**, de 27 de dezembro de 2001, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 de dezembro de 2001; Agência Nacional do Petróleo.

\_\_\_\_\_ **Resolução nº 15, de 17-7-2006** - Estabelece as especificações de óleo diesel e mistura óleo diesel/biodiesel – B2. DOU 19 de julho de 2006.

ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons publishers.

ALVES, L.; RODRIGUES, C.; MESQUITA, E.; AMARAL-COLLAÇO, M.T.; GIRÍO, F.M. Desulfurization of dibenzothiophene by *Bacillus* sp. 1B (artigo em preparação).

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GIRÍO, F.M. 1999. Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis. **Biologia de Biotecnologia**, v.62, p.3-7.

AMBRÓSIO, S.T.; CAMPOS TAKAKI, G.M. 2004. Decolorização of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* (UCP-542) under co-metabolic conditions. **Bioresource Technology**, 91, pp. 69 – 75.

ANTONINO, N.A.; Souza, A.G.; Santos, J.E. 2007. Otimização do processo de obtenção de quitina e Quitosana de exoesqueletos de camarões Oriundos da indústria pesqueira paraibana. **Dissertação** - Universidade Federal da Paraíba. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Química (Química Inorgânica). 88p.

ASSOCIAÇÃO DOS FABRICANTES DE EQUIPAMENTOS PARA CONTROLE DE EMISSÕES VEICULARES DA AMÉRICA DO SUL - AFEEVAS. 2005. **Apresentação no Seminário de inspeção e manutenção veicular – FEEMA**, Rio de Janeiro.

Inácio, R.G.S. Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo)...

BABICH, I.V.; MOULIJN, J.A. 2003. Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review. **Fuel**, 82; 607 – 631.

BAIJAL, U.; MEHROTRA, B. S. 1980. The genus *Cunninghamella* - a reassessment. **Sydowia**, 33, pp.1-13.

BAIK, W.Y; BAE, J.H; CHO, K.M; HARTMEIER, W. 2002. **Bioresource Technology**, 81, pp.167-170.

BARTINICKI-GARCIA, S. 1994. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**. v. 22. p. 6-15.

BISHOP, M. 1997. Environmental Analytical Methods for organics and metals, New England Testing Laboratory, relatório.

BOUTILIER, G.; WINEFORDNER, J. 1979. *Analyst*, 51, p 1384-1390.

CAMPOS-TAKAKI, G.M. 2005. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P. K. **Chitin and chitosan opportunities & challenges**. India.

CARDOSO, C.E. 2004. Utilização de técnicas analíticas luminescentes para quantificar e identificar compostos de N e S em petróleos e derivados, Exame de Qualificação, PUC – Rio.

CARLILE, M.J; WATKINSON, S.C. 1996. Tokyo, Academic press. **The Fungi**.

CARLSSON, H., ÖSTMAN, C. 1997. Clean-up and analysis of carbazole and acridine type polycyclic aromatic nitrogen heterocyclics in complex sample matrices, **Journal of Chromatography**. A, 790, p 73-82.

CASTRO, H.F.; WILLIAMS, N.H.; OGRAM, A. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.31, p.1-9.

CERUTTI, M.L.M.N.; SOUZA, S.M.A.G.U.; SOUZA, A.A.U.; PINTO, R.R.C. 2007. Dessulfurização da Gasolina por Adsorção em Zeólitas “y” Trocadas com Cobre. **Tese** - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação Doutorado em Engenharia Química.184p.

CERVANTES E GUTIERREZ-CORANA. 1994. Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **Microbiol. Rev** **14**, pp.121-138.

CERVANTES, C.; CAMPOS-GARCÍA J.; DEVARS S.; GUTIÉRREZ-CORONA F.; LOZATAVERA H.; TORRES-GUZMÁN J.C.; MORENO-SÁNCHEZ R. 2001. Interactions of Chromium with microorganisms and plants. **Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas**. Universidad Michoacana. México.

CHAKHMAKHCHEV, A.; SUZUKI, N. 1995. Aromatic sulfur compounds as maturity indicators for petroleum from the Buzuluk depression, Russia, **Organic Geochemistry**, **23**, p 617-625.

CLEGG, H.; HORSFIELD, B.; WILKES, H.; DAMSTÉ, J.S.; KOOPMANS, M. 1998. Effect of artificial maturation on carbazole distributions, as revealed by the hydrous pyrolysis of an organic-sulphur-rich source rock (Ghareb Formation, Jordan), **Organic Geochemistry**, **29**, p 1953-1960.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução 18/1986** – Dispõe sobre a Instituição do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores. DOU 17 de junho de 1986.

\_\_\_\_\_ **Resolução 08/1993** – Complementa a Resolução 18/1986 do CONAMA. DOU 31 de dezembro de 1993.

\_\_\_\_\_ **Resolução 315/2002** – Dispõe sobre as novas etapas para o Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores. DOU 20 de novembro de 2002.

CONSTANTI, M.; GIRALT, J.; BORDONS, A. 1994. Desulfurization of dibenzothiophene by bacteria. **World J. Microbiol. Biotechnol.** **10**: 510-516.

CONSTANTI, M.; GIRALT, J.; BORDONS, A. 1996. Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other sulfur compounds by *Agrobacterium* MC501 and a mixed culture. **Enzyme Microb. Technol.** **19**: 214-219.

COSTA SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. 2006. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**. São Paulo. v. 29, n. 4. p. 776-785.

Inácio, R.G.S. Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo)...

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C.; QUEIROZ, D.C. 1999. Quitosana: a fibra do futuro. **PADETEC**. v. 1. p. 124.

DAHLBERG, M.; ROHRER, R.L.; FAUTH, D.J.; SPRECHER, R.; OLSON, G.J. 1993. Biodesulfurization of Dibenzothiophene sulfone by *Arthrobacter* sp. and studies with oxidized. Illinois No.6 coal. **Fuel**. 72:1645-1649.

DALLAN, P.R.M. 2005. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. 180 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP. São Paulo.

DEE, J.D.; RHODE, O.; WACHTER, R. 2001. Chitosan multi functional marine polymer. **Cosmetics and Toilets**. v. 116, n. 2. p. 39-42.

DE FATIMA; W.M.J.; SETTI, L.; LANZARINI, G.; PIFFERI, G. 1996. Dibenzothiophene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. In poorly degradable organic solvents. **Process Biochem**. 31: 711-717.

DENOME, S.A.; OLSON, E.S.; YOUNG, K.D. 1993. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. **Appl. Environ. Microbiol**. 59: 2837-2843.

DORBON, M.; SCHMITTER, J. M.; GARRIGUES, P.; IGNATIADIS, I.; EWALD, M.; ARPINO, P.; GUIOCHON, G. 1984. Distribution of carbazole derivatives in petroleum, **Organic Geochemistry**, 7, p 111-120.

DUBE, H.C. 1978. A Textbook of Fungi, Bacteria and Viruses. **Vikas Publishing House Put Ltd.**, pp. 239.

EATON, R.W.; NITTERAUER, J.D. 1994. Biotransformation of benzothiophene by isopropylbenzene degrading bacteria. **J. Bacteriol**. 176: 3992-4002.

ENDO, A.; TAKESHIMA, H.; KUWABARA, K. 1985. Acetil CoA Carboxylase Inhibitors From the Fungus *Gongronella butleri*. **The Journal of Antibiotics**, XXXVIII, pp. 599-604.

FEMIA R.; CLINE LOVE, J. 1984. Micelle-stabilized room-temperature phosphorescence with synchronous scanning, **Analytica Chemistry**, 56, p 327-33.

FOSTER, B.C.; LISTER, D.L.; ZAMECNIK, J.; COUTTS, R.T. 1991. The biotransformation of tranylcypromine by **Cunninghamella equinulata**. **Canadian Journal of Microbiology**, 37, pp.791-795.

FRANCO, L.O.; MAIA, R.C.C.; PORTO, A.L.F.; MESSIAS, A.S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOSTAKAKI, G.M. 2004. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. v. 35, n. 3.

FRANCO, L.O.; MAIA, R.C.C.; PORTO, A.L.F.; MESSIAS, A.S.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOSTAKAKI, G.M. 2004. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35. n. 4. p. 243-247.

FURUYA, T.; ISHII, Y.; NODA, K.; KINO, K.; KIRIMURA, K. 2003. Thermophilic biodesulfurization of hydrodesulfurized light gas oils by *Mycobacterium phlei* WU-F1. **FEMS Microbiology Letters**, v.221, p.137-142.

GALLANGHER, J.R.; OLSON, E.S.; STANLEY, D.C. 1993. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. **FEMS Microbiol. Lett.** 107: 31- 36.

GRAY, K.A.; POGREBINSKY, O; MRACHKO, G.T.; SQUIRES, C.H. 1996. Biochemical characterization of the biodesulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 - potencial role in fossil fuel desulfurization (conference abstract). **Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.**, 212 Meet., Pt.1, p. BIOL 054.

GROSSMAN, M.J.; LEE, M.K.; PRINCE, R.C.; GARRETT, K.K.; GEORGE, G.N.; PICKERING, I.J. 1999. Microbial desulfurization of a crude oil middle-distillate fraction: analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, n.01, p.181-188.

HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N. 1995. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8<sup>a</sup> ed. Wallingford. United Kingdom: CAB International. 616 p.

HERRERA, T.; ULLOA, M. 1998. **El Reino de los Hongos (micología básica y Aplicada)**. 2ª ed.

HESELTIME, C.W.; ELLIS, J.J. 1973. **The Fungi: an advanced treatises**. In: AINSWORTH, SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S. (Eds.). New York: Academic Press. v. 4B. p. 187-217.

HURTUBISE, R. 1981. Room-temperature and fluorescence of nitrogen heterocyclics adsorbed on silica gel chromatoplates, **Talanta**, 28, p 145- 148.

IMAI, T.; WATANABE, T.; YUI, T.; SUGIYAMA, J. 2003. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. **Journal of Biochemistry**. v. 374. p. 755-760.

IZUMI, Y.; OHSHIRO, T.; OGINO, H.; HINE, Y.; SHIMAO, M. 1994. Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 223-226.

JIN, B.; HUANG, L.P.; LANT, P. 2003. *Rhizopus arrhizus*: a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L (+) - lactic acid. **Biotechnology Letters**. v. 25. p. 1983-1987.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. 1995. Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresource Technol., Inglaterra**, 53, pp. 195-206.

KARGI, F. 1987. Biological oxidation of thionthrene, thioxanthene and dibenzothiophene by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. **Biotechnol. Lett.** 9:478-482.

KAYSER, K.J.; BIELAGA-JONES, B.A.; JACKOWSKY, K; ODUSAN, O.; KILBANE, J.J. 1993. Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochromus* IGTS8. **J. Gen. Microbiol.** 139: 3123-3129.

KERN, E.E.; MENGER, W.M.; ODELSON, D.A.; SINSKEY, A.S.; WISE, D.L; TRANTOLO, D.J. 1989. Enzymatic coal desulfurization. US Patent nº 5094668.

KHAN, T.A.; PEHN, K.K.; CHING, H.S. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Science**. v. 5, n. 3. p. 205-212.

KILBANE, J. J.; JACKOWSKY, K. 1992. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. **Biotechnol. Bioeng.** 40:1107-1114.

KILBANE, J.J.; WOODSTOCK, I.L; 1994. Enzyme from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 53968, *Bacillus sphaericus* ATCC 53969 or a mutant thereof for cleavage of organic C-S bonds. US Patent nº5516677.

KIM, H.Y.; KIM, T.S.; KIM, B.H. 1990. Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* Mb. **Biotechnol. Lett.** 12: 757-760.

KODAMA, K.; UMEHARA, K.; SHIMIZU, K.; NAKATANI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. 1973. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 45 – 50.

KONISHI, J.; ISHII, Y.; ONAKA, T.; OKUMURA, K.; SUZUKI, M. 1997. Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3164-3169.

KOPAÇ, T. 1999. Non-isobaric adsorption analysis of SO<sub>2</sub> on molecular sieve 13X and activated carbon by dynamic technique. **Chem. Eng. And Proc.**, 38(1), 45-53.

KRAMER, K.J.; KOGA, D. 1986. Insect Chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochemistry**. v. 16. p. 851-877.

KROPP, K.G.; GONÇALVES, J.A.; ANDERSSON, J.T.; FEDORAK, P.M. 1994. Microbial mediated formation of benzonaphthothiophenes from benzo[b]thiophenes. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 3624-3631.

LABORDE, A.L.; GIBSON, D.T. 1977. Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 34: 783-790.

LEE, M.K.; SENIUS, J.V.; GROSSMAN, M.J. 1995. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 4362-4366.

Inácio, R.G.S. Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo)...

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. 1995. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sanvier. P. 229-233.

LEITE, A.; MOITINHO, T.; BONIFÁCIO, O. 2005. Cloning and expression of metacleaveage enzyme (CarB) of carbazole degradation pathway from *Pseudomonas stutzeri*, **Brazilian Archives of biology and technology**, 48, p 127-134.

LONGACRE, A.; REIMERS, J.M.; GANNON, J.E.; WRIGHT, B.E. 1997. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields. **Fungal Genetic Biology**. v. 21. p. 30-39.

MAGNUSON, J.K.; LASURE, L.L. 2004. Organic acid production by filamentous fungi. In: **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine**. TKACZ, J.S.; LANGE, L. (Eds.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. P. 207-340.

MAHONY, T.O'; GUIBAL, E; TOBIN, J.M. 2002. Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Enzyme and Microbial Tecnology**, **31**, pp.456-463.

MALIK, K.A. 1978. Microbial removal of organic sulfur from crude oil and the environment: some new perspectives. **Process Biochem**. 13: 10-12.

MALLIK, G.K.; PAL, T.K.; LAHA, S.; GANGULY, T.; BANERJEE, S.B. 1985. External heavy atom effect on the emission of carbazole, **Journal of Luminescence**, 33, p 377-390.

MELLO, K.G.P.C.; BERNUSSO, L.C.; PITOMBO, R.N.M.; POLAKIEWICZ, B. 2006. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 4 p. 665-668.

MERZENDORFER, H. 2005. Insect chitin synthases: a review. **Comparative Physiology**. v. 176. p. 1-15.

MONTICELLO, D.J.; FINNERTY, W.R. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. **Ann. Ver. Microbiol**. 39: 371-389.

MUZZARELLI, R.A.A. 1977. **Chitin** 1<sup>st</sup> ed. London: Pergamon press. 309p.

NASCIMENTO, J.S. 2006. **Noções básicas sobre fungos**. 1ª ed. Instituto de Biologia. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas. Brasil. 210 p.

OHSHIRO, T.; HIRATA, T.; IZUMI, Y. 1995. Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44: 249-252.

OMORI, T.; MONNA, L.; SAIKI, Y.; KODAMA, T. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 911-915.

O'REILLY, T.; WINEFORDNER, J. 1980. **Anal. Chem.**, 44, p 948-952.

PEREIRA, A.; MOREIRA, J.; DIAS, A.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.; OLIVEIRA, A; BAREK, J. 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): Uma revisão metodológica, **Química Nova**, 23, p 765-773.

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, n. 3 p. 17-21.

POTHULURI, J.V.; FREEMAN, J. P.; EVANS, F.E.; CERNIGLIA, C.E. 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, 58, pp. 3654-3659.

POTHULURI, J.V.; DOERGE, D.R.; CHURCHWELL, M.I.; FU, P.P.; CERNIGLIA, C.E. 1998a. Fungal metabolism of nitrofluoranthenes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 53, pp. 153-174.

POTHULURI, J.V.; SUTHERLAND, J.B.; FREEMAN, J.P.; CERNIGLIA, C.E. 1998b. Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. **Applied Environmental Microbiology**, 64, pp. 3106-3109.

REDDY, C.S.; ACOSTA, D.; DAVIS, P.J. 1991. Microbial models of mammalian metabolism: biotransformations of phenacetin and its O-alkyl homologues with *Cunninghamella* species. **Xenobiotica**, 20, pp. 1281-1297.

RHEE, S.; CHANG, J.H.; CHANG, Y.K.; CHANG, H.N. 1998. Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordona* strain, CYKS1. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:2327-2331.

ROSCHE, B.; SANDFORD, V.; BREUER, M.; ROGERS, P. 2001. Biotransformation of Benzaldehyde into (R) - phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 57. p. 309-315.

RUDALL, K.M.; KENCHINGTON, W. 1973. The chitin system. **Biological Review**. v. 48. p. 597-636.

SALEM, A.B.S.H. 1994. Naphta Desulfurization by Adsoption **Ind. Eng. Chem. Res.** 33, p. 336-340.

SANO, H.; MATSUKUBO, T.; SHIBASAKI, K.; TAKAESU, Y. 1991. Inhibition of oral *Streptococci* to saliva treated hidroxyapatite by chitin derivatives. **Bull Tokyo Den. Coll.** v. 32, n. 1. p. 9-17. Feb.

SCHMIDT, M.; SIEBERT, W.; BAGNALL, K.W. 1973. "The chemistry of sulphur, selenium, tellurium and polonium" Pergamon Texts in Inorganic Chemistry, vol.15, **Pergamon Press**, Oxford.

SCHWARTZ, H.; LIEBIG WEBER, A; HOCHSTATTER, H.; BOTTCHEER, H. 1996. Microbial oxidation of ebastine. **Applied Environmental Microbiology**, 44, pp. 731-735.

SCYPINSKI, S.; CLINE LOVE, L. 1984. Room-temperature phosphorescence of polynuclear aromatic hydrocarbons in cyclodextrins, **An. Chem**, 56, p 322- 327.

SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. 1997. Simultaneous microemulsion room temperature phosphorimetric determination of five polycyclic aromatic hydrocarbons by variable-angle synchronous scanning, **Anal. Chim. Acta**, 353, p 337-344.

SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; CAÑABATE-DÍAZ, B.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. 2000. Heavy-atom induced roomtemperature phosphorescence: a straightforward methodology for determination of organic compounds in solution, **Anal. Chim. Acta**, 417, p 19-30.

SETTI, L.; ROSSI, M.; LANZARINI, G.; PIFFERI, P.G. 1993. Barrier and carrier effects of n-dodecane on the anaerobic degradation of benzothiophene by *Desulfovibrio desulfuricans*. **Biotech. Lett.** 15: 527-530.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. 1997. Chitosan functional properties. **Glycoconjugatives Journal**. v. 14, n. 4. p. 535-542. jun.

SILVA, A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; BERNARDINO JR, F.M. 2007. Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para mucorales. **Dissertação** – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. 93p.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M. 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects. An update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 53. p. 1047-1067.

SKORY, C.D.; FRER, S. N.; BOTHAST, R.J. 1998. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**. v. 20. p. 191-194.

SKRILLEC, M.; CLINE LOVE, J. 1981. Micelle-Stabilized room-temperature phosphorescence characteristics of carbazole and related derivatives, *J. Phys.Chem.*, 85, p 2047-2050.

SMIRNOV, M.; FROLOV, B. 1998. A complete analysis of a crude oil C2-carbazole fraction by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, **Organic Geochemistry**, 29, p 1091- 1099.

SONG, C.; MA, X. 2003. New design approaches to ultra-clean diesel fuels by deep desulfurization and deep dearomatization. **Appl. Catal. B: Environ.** 41; 207 – 238.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.Q. 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**. v. 64, n. 4. p. 605-610.

TOMBS, M.P.; BLAKE, G.G. 1982. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 700, pp. 81-89.

TRINDADE, C. 2005. Avaliação do tempo de residência de derrames de óleo no mar, através do monitoramento de parâmetros geoquímicos – testes laboratoriais.

Inácio, R.G.S. Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo)...

TRUFEM, S.F.B. 2000. **Diversidade no reino fungi: Zygomycota**. São Paulo: Universidade de São Paulo. USP. Instituto de Botânica. Brasil.

VAN AFFERDEN, M.; SCHACHT, S.; KLEIN, J.; TRÜPER, H.G. 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp.DO. **Arch. Microbiol.** 153:324-328.

VAN AFFERDEN, M.; TAPPE, D.; BEYER, M.; TRÜPER, H.G.; KLEIN, J. 1993. Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds. **Fuel.** 72: 1635-1643.

VO-DINH, T.; FETZER, J.; CAMPIGLIA, A. 1998. Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment, **Talanta**, 47, p 943-969.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals. **Biotechnol. Prog. Washington**, 11, pp. 235-250.

YAMAGUCHI, R.; ARAI, Y.; ITOH, T. 1981. Preparation of partially N-succinilated gels. **Carbohydrates Research**. v. 88, p. 172-175.

WANG, P.; KRAWIEC, S. 1994. Desulfurization of dibenzothiophene to 2- hidroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains. **Arch. Microbiol.** 161: 266-271.

WILLIAMS G.M.; WEISBURGER J.H. 1986. Chemical carcinogens. In Toxicology: the basic science of poisons.

ZHANG, Z.Y.; JIN, E.J.; KELLY, M. 2006. Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 2, n. 4. p. 263-267.

ZHANG, D.; HANSEN, E.B. JR.; DECK, J.; HEINZE, T.M.; SUTHERLAND, J.B.; CERNIGLIA, C.E. 1996a. Fungal biotransformation of the antihistamine azatadine by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, 62, pp. 3477-3479.

ZHANG, D.; FREEMAN, J.P.; SUTHERLAND, J.B.; WALKER, A.E.; YANG, Y.; CERNIGLIA, C.E. 1996b. Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. **Applied Environmental Microbiology**, 62, pp. 798-803.

Inácio, R.G.S. Efeito do Dibenzotiofeno - DBT (derivado do petróleo)...

ZIMOCH, L.; MERZENDORFER, H. 2002. Immunolocalization of chitin synthase in tobacco hornworm. **Cell Tissue Research**. v. 308. p. 287-297.

## **CAPÍTULO 2**

### **Primeiro Artigo**

**Alterações morfológicas mediadas pelo tratamento com  
Dibenzotiofeno em *Rhizopus arrhizus* UCP 402**

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico:  
**World Journal of Microbiology and Biotechnology**

# Alterações morfológicas mediadas pelo tratamento com Dibenzotiofeno em *Rhizopus arrhizus* UCP 402

Inácio, R.G.S.<sup>1,2</sup>, Okada, K.<sup>2,3</sup>, Campos-Takaki, G.M.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil

<sup>3</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, <sup>4</sup>Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, PE – Brasil, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE, Brasil E-mail: takaki@unicap.br

## Resumo

Estudos foram realizados com os aspectos morfológicos de *Rhizopus arrhizus* UCP-402, mediados por diferentes concentrações do dibenzotiofeno, utilizando o meio de cultivo Sabouraud com e sem dextrose. Os resultados obtidos indicaram que *R. arrhizus* cresce na presença de dibenzotiofeno apresentando maior crescimento em relação ao controle. Este maior crescimento é explicado pelo rápido consumo da fonte de carbono, em 24 horas de cultivo, sugerindo também o uso do DBT. O pH foi semelhante para o controle e tratado com DBT, na presença de glicose. No entanto, com a retirada de glicose e na presença de DBT ocorreu um significativo aumento do pH. Variação no perfil de proteínas totais foi detectada. O dibenzotiofeno induziu variações na morfologia de *R. arrhizus* UCP-402, analisadas por microscopia ótica. Além disso, o DBT em todas as concentrações utilizadas induziu alterações no padrão de ramificação das hifas, como: bifurcações bilaterais ou unilaterais; aumento na quantidade de ramificações; surgimento de protuberância na base da ramificação primária; e hifas mais delgadas. O dibenzotiofeno induziu também ao surgimento por toda hifa, variações associadas à textura, aumento de ramificações e presença de clamidósporos em *R. arrhizus* UCP-402, observados por microscopia ótica.

Autor para correspondência: G.M. Campos-Takaki, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42-Boa Vista, 50.050-590 Recife, Pernambuco, Brasil

## INTRODUÇÃO

A poluição provocada pela indústria petroquímica, não pode ser medida em termos de níveis quantitativos de contaminantes específicos, mas por métodos genéricos de caracterização. A alta proporção de carbono e hidrogênio, existente no petróleo, mostra que os hidrocarbonetos são seus principais constituintes podendo chegar a mais de 90% de sua composição. Os hidrocarbonetos presentes no petróleo são de três classes diferentes - parafínicos, naftênicos e aromáticos. Os outros elementos presentes aparecem sob a forma de compostos orgânicos, os quais em alguns casos formam complexos organometálicos. Metais também podem ocorrer como sais de ácidos orgânicos. O enxofre ainda pode estar presente na forma inorgânica, H<sub>2</sub>S e enxofre elementar em alguns casos. Dentre os produtos derivados, encontra-se o óleo diesel, que é um combustível de composição complexa constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (OLIVEIRA, 2001).

Processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de compostos xenobióticos derivados do petróleo. Processos como extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, bioventilação, extração com solventes, incineração, torres de aeração, adsorção em carvão ativado, biorreatores, biorremediação no local, entre outros, tem sido usados para remover contaminantes orgânicos de águas subterrâneas e sistemas de solo subsuperficial (WEBER & CORSEUIL, 1994; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Muitos estudos têm demonstrado a existência de uma grande diversidade de microrganismos biodegradadores presentes em amostras de solo, sedimento, água doce ou ambiente marinho. Os microrganismos capazes de degradar um composto recalcitrante específico são encontrados com maior frequência nos locais contaminados previamente com o poluente (WALKER et al, 1976; CERNIGLIA et al, 1980; LEAHY & COLWELL, 1990; MORGAN & WATKINSON, 1994).

Como existem restrições à introdução de microrganismos no ambiente, é necessário estabelecer o potencial de biorremediação inerente às espécies autóctones de um determinado local. Por isso, faz-se necessário estudar os processos de biodegradação ou biotransformação de compostos xenobióticos e a biodiversidade das comunidades microbianas responsáveis por estes processos no meio ambiente ao qual já estão adaptadas (MADSEN, 1991; PRITCHARD et al, 1996; MAC CORMACK & FRAILE, 1997).

Os efeitos do DBT no crescimento de microrganismos determinados pela produção de biomassa, consumo de glucose, pH e proteínas totais, mostraram um crescimento logarítmico da cultura controle durante experimentos realizados com *C. elegans*, com uma

produção de biomassa de 750mg/L. Culturas tratadas com 0.5mM, 1.0mM e 2.0mM de DBT, tiveram rendimentos na produção de biomassa equivalentes a um aumento de 33.8%, 24.0% e 19.4%, respectivamente, relativos à cultura controle. Os valores de pH obtidos revelaram um comportamento do teste padrão similar para todos os tratamentos. O índice de proteínas cresceu nas primeiras 72 horas. Após esse período houve um decréscimo no índice de proteínas totais para todos os tratamentos (NASCIMENTO et al, 2007).

A biorremediação surgiu como uma tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. O benefício máximo desse processo é a mineralização, obtendo como produto final CO<sub>2</sub> e água pela via aeróbica, assim como a formação de biomassa (da CUNHA, 1996).

Desde meados dos anos 90, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas seriamente como uma maneira eficaz e de baixo custo para a remediação de solos contaminados por petróleo e de outros compostos orgânicos; causando, ainda, menores distúrbios na superfície a ser tratada (GRUIZ & KRISTON, 1996; IZUMI et al, 1994).

Desta forma, os fungos consideram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade. Com base na informação de que os fungos podem ser utilizados para degradar hidrocarbonetos e sequestrar metais pesados, realizam-se cada vez mais estudos que visam o desenvolvimento de tecnologias que utilizam esses organismos para descontaminação de áreas afetadas por óleo diesel (da CUNHA, 1996).

Entre os compostos organosulfurados presentes nos combustíveis fósseis, o dibenzotiofeno (DBT) e seus derivados são considerados como representativos. A remoção seletiva de compostos orgânicos com enxofre dessas amostras é desejável sob o ponto de vista prático, considerando que significativas quantidades de compostos contendo enxofre estão presentes nos combustíveis fósseis, e sua combustão conduz a liberação de óxidos sulfurados que contribuem para a chuva ácida e a poluição do ar. Contudo, compostos tiofênicos, como o DBT, são refratários a dessulfurização química, sendo, portanto um composto modelo para a biodessulfurização (LI et al., 2003; ABBAD-ANDALOUSSI et al., 2003).

A identificação das variáveis associadas ao metabolismo de *R. arrhizus* frente à presença de agentes recalcitrantes, especificamente o dibenzotiofeno, composto organo sulfurado encontrado em óleo diesel, representa mais um passo para a otimização de processos de biorremediação, que culminam com o desenvolvimento de tecnologias alternativas para a minimização e/ou remoção completa dos aspectos poluidores dos derivados de petróleo.

## Material e Métodos

**Microrganismo:** foi utilizado o microrganismo *Rhizopus arrhizus* UCP 402, isolado de uma área contaminada por resíduos de petróleo no Porto do Recife – PE, cedida pelo Banco de Culturas do Núcleo em Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, mantida em tubos de Sabouraud ágar a 4°C.

**Caracterização das linhagens:** *R. arrhizus* UCP 402 foi caracterizado através de métodos morfo-fisiológicos frente DBT (ALVES *et al.*, 1999).

**Meio de cultura e condições de cultivo:** o microrganismo foi cultivado em frascos de Erlenmeyers de 250 ml de capacidade contendo 50 ml de Sabouraud líquido com e sem glicose. Ao meio de cultivo foram adicionados 0,5mM, 1 mM e 2 mM de DBT dissolvido em dimetilformamida, mantidos sob agitação em “shaker” orbital (150 rpm) à temperatura de 28 °C, por um período de 96 horas. Os ensaios foram feitos em duplicatas. Foi medida a turbidez em espectrofotômetro a 660nm. Inóculo de  $10^7$  células/mL, com densidade óptica (D.O<sub>660</sub>) de 0.8, overnight e determinadas as viabilidades. Após tempo de cultivo as amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 15 min a 10°C, para separação das células do líquido metabólico. A biomassa foi liofilizada para determinação de peso seco e do líquido metabólico foram determinadas as proteínas totais, consumo de glicose, a cinética de degradação do DBTe teste de toxicidade.

**Proteínas totais:** a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método espectrofotométrico do Biureto (LABTEST<sup>®</sup> Diagnostic - Brasil), utilizando como padrão albumina de soro bovino, lida a espectrofotômetro Genesys no comprimento 660nm.

**Consumo de glicose:** o consumo de glicose foi determinado no líquido metabólico livre de células pelo método colorimétrico (LABTEST<sup>®</sup> Diagnostic - Brasil) a 505 nm.

**pH:** o pH foi medido em pHmetro Orion, modelo 310, a cada 24 horas até 96 horas de fermentação.

**Teste de toxicidade com sementes:** foram feitos testes de toxicidade com sementes de “Repolho das 4 estações” (*Brassica oleracea* var. *capitata*) previamente lavadas e esterilizadas, utilizando o controle com água destilada, controle negativo (DBT + dimetilformamida) e o líquido metabólico das amostras. Nestes ensaios foram observados a quantidade de sementes germinadas e o comprimento da raiz, e então calculado o índice de germinação (%) e o crescimento médio da raiz (%), segundo TIQUIA *et al.* (1996).

## Resultados e Discussão

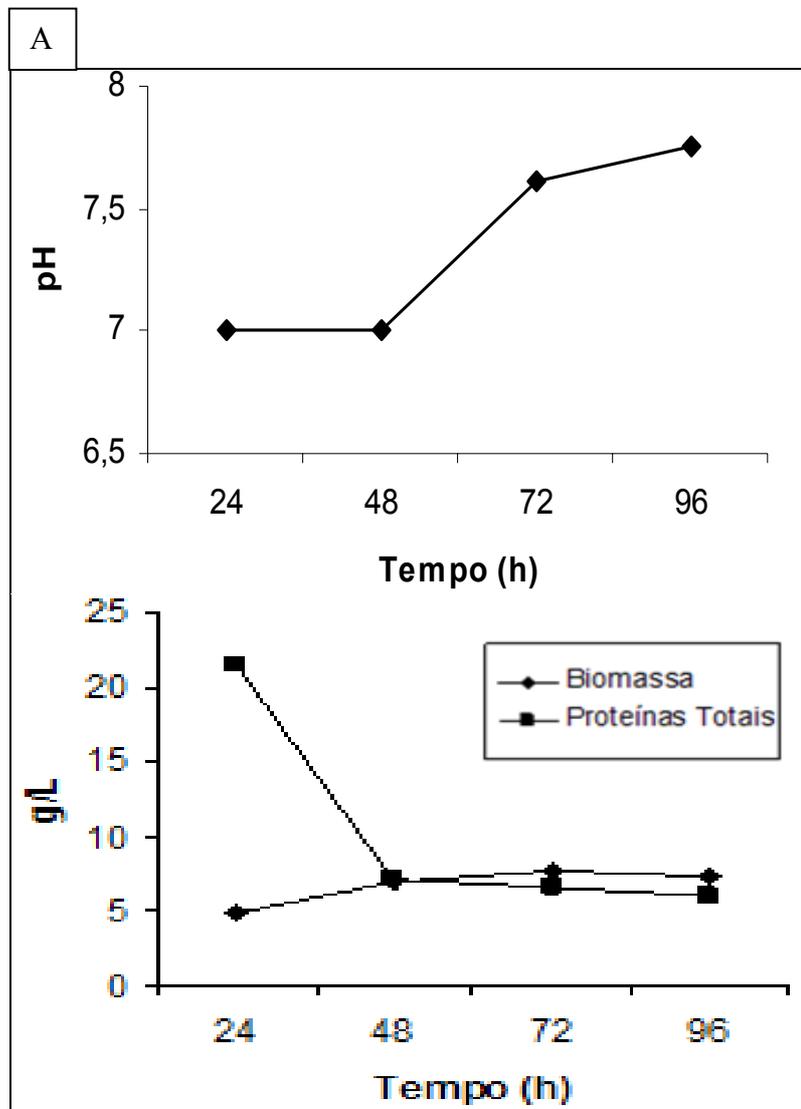
O crescimento, a produção de biomassa, o pH e consumo de glicose de *R. arrhizus* no meio Sabouraud Líquido com as diferentes concentrações de DBT, com e sem glicose, estão apresentados nas Figuras 1 a 6, demonstrando a ocorrência de uma fase exponencial, que se inicia com 24 horas e atinge o máximo de produção de biomassa com até 48 horas de cultivo, exceto para o controle (Figura 7), onde esse máximo ocorre com 96 horas de cultivo. Ao mesmo tempo, ocorre cerca de 30% do consumo de glicose nas primeiras 48 horas de cultivo, com pH variável entre geralmente 4,01 e 7,0 para meios contendo glicose e sem glicose, respectivamente.

Para Stamford et al.<sup>24</sup>, ocorre uma produção superior de biomassa por *C. elegans* (10,9 g/L), quando o fungo foi crescido no meio de cultivo para Mucorales<sup>22</sup>. Estudos recentes demonstraram que *C. elegans*, apresenta uma produção de biomassa correspondente a 5,1g/L<sup>5</sup>, sob condições de estresse salino e diferentes concentrações de D-glicose, sendo esses resultados superiores aos obtidos neste trabalho.

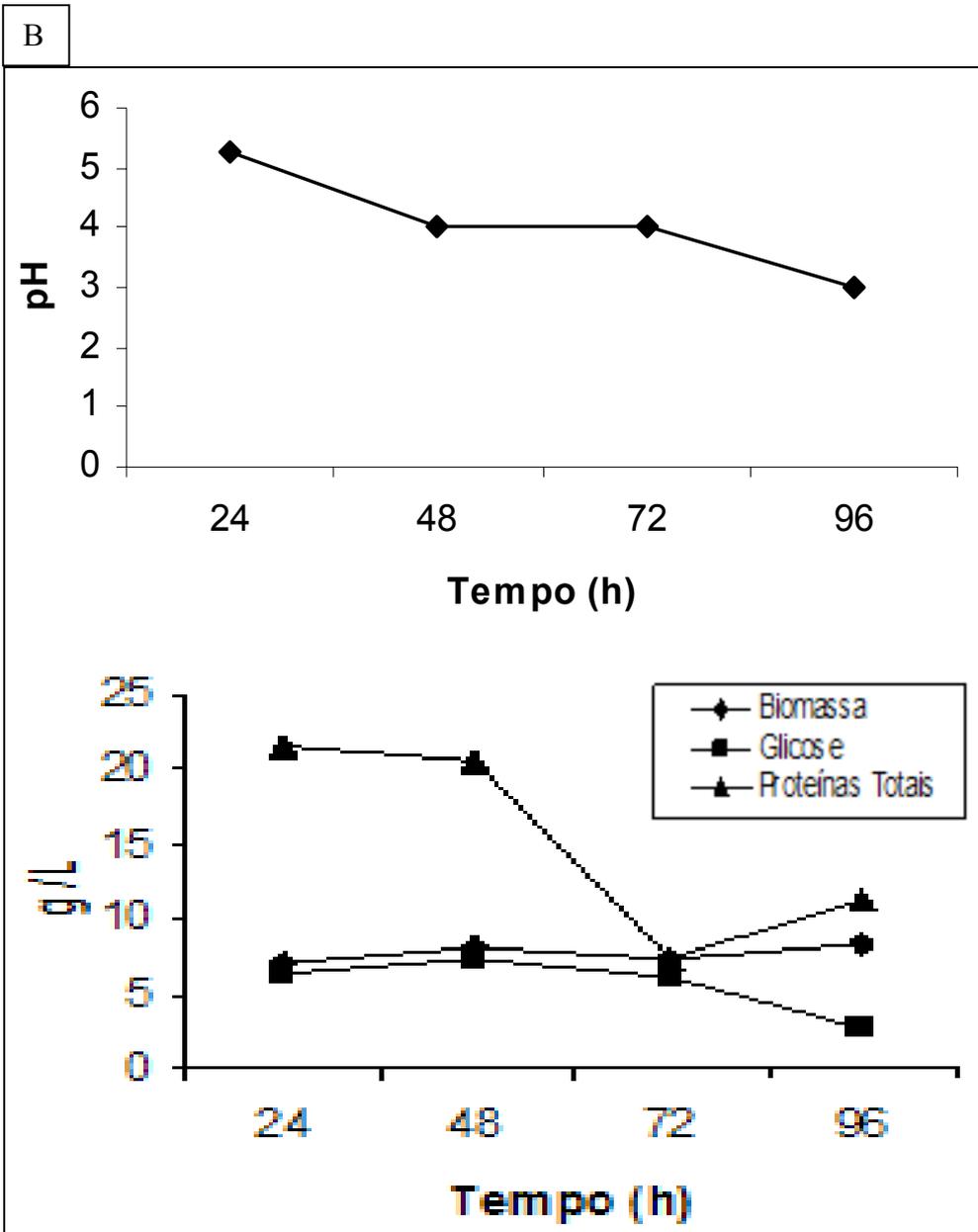
Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados para avaliar o nível de toxicidade nas diferentes concentrações de DBT (0,5 mM, 1 mM e 2 mM) e quais eram os seus efeitos na microbiota.

A análise dos resultados dos ensaios de fitotoxicidade (Figura 12) sugere que na primeira concentração ocorre uma adaptação de *R. arrhizus* ao meio adverso. Com o aumento da concentração de DBT de 0,5 mM para 1 mM o índice de germinação também apresentou aumento, indicando uma possível degradação do material tóxico pelo fungo. As análises também mostram que o índice de germinação é sempre maior que o desenvolvimento da raiz das sementes. Este resultado era esperado, já que a germinação é um processo físico, dependendo apenas de um ambiente aquoso. A presença de água ativa os processos enzimáticos pertinentes à germinação, e substâncias tóxicas existentes no meio serão absorvidas inicialmente, pois dentro das sementes ocorrem quantidades apreciáveis de nutrientes para a sua germinação sem, contudo, absorver os componentes do meio que a circunda. Uma vez que haja água, o processo ocorre automaticamente. Já o desenvolvimento da raiz está intimamente associado aos constituintes presentes no meio. Se houver cargas tóxicas em quantidades que afetem o desenvolvimento da planta, esta não ocorrerá satisfatoriamente.

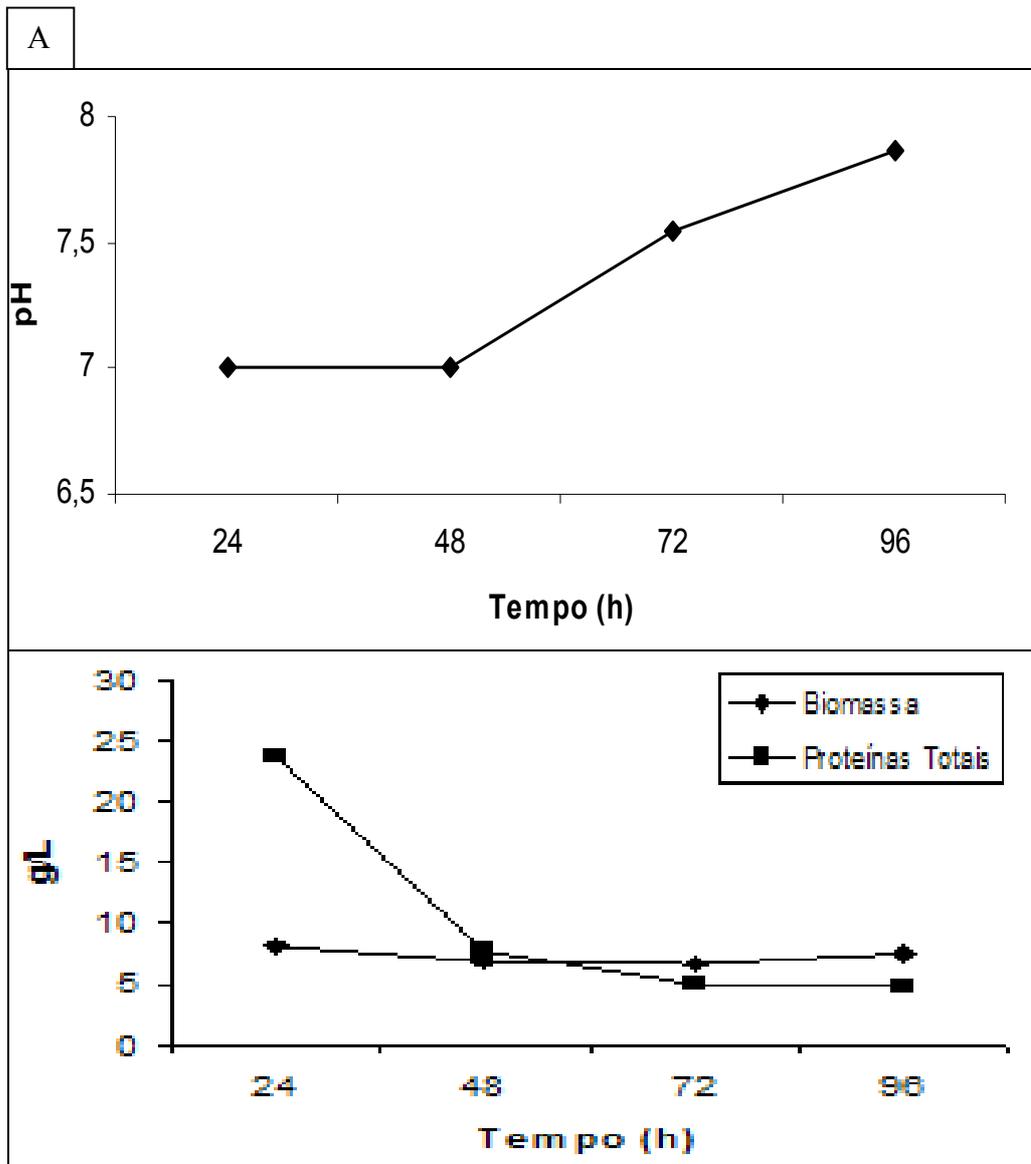
Segundo WANG & KETURI (1990) a germinação de plantas e o comprimento da raiz tem sido um teste bastante usado por ser uma técnica simples, rápida, segura e reproduzível, para avaliar os danos causados pelas combinações tóxicas presentes em vários compostos.



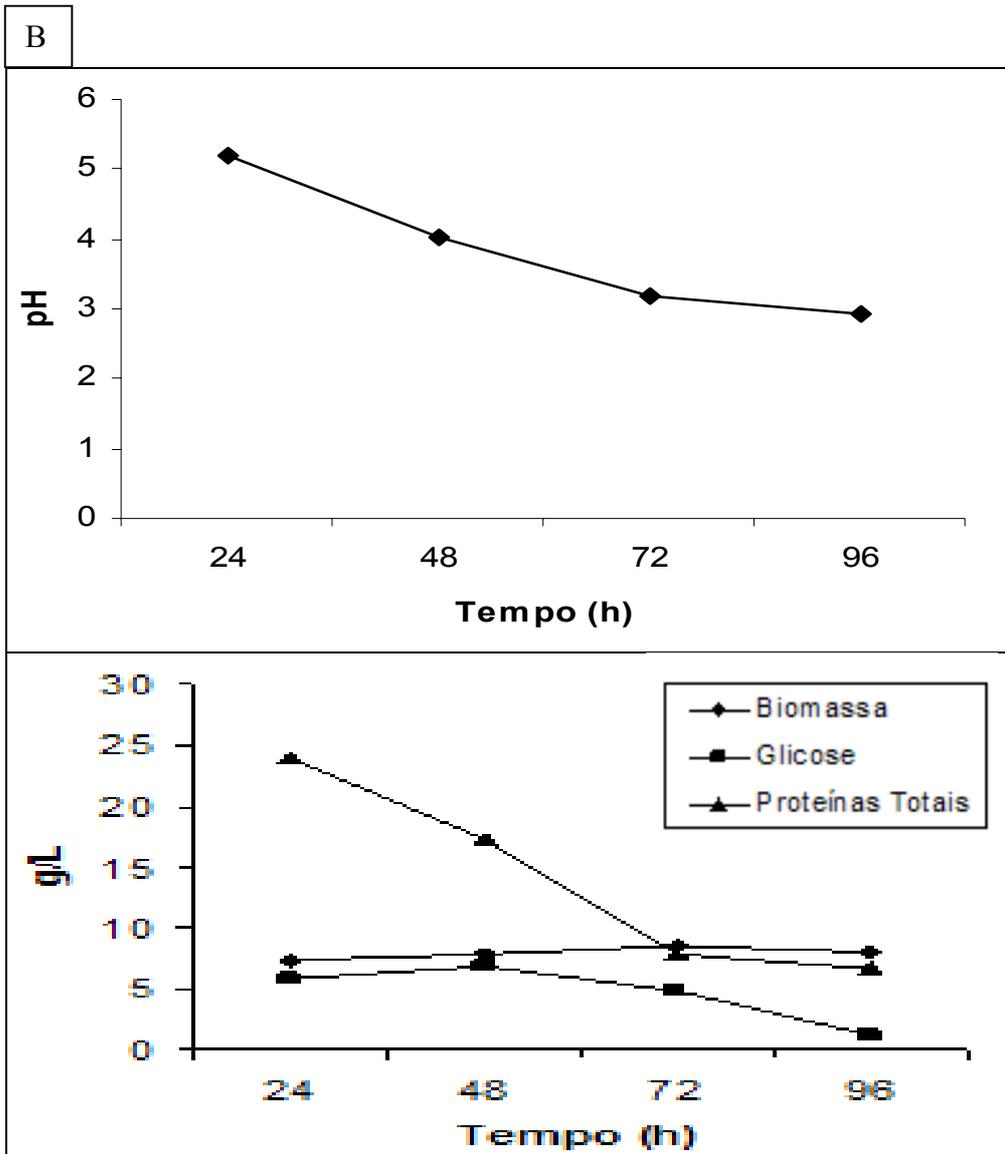
**Figura 1.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 0,5mM de DBT sem glicose (A).



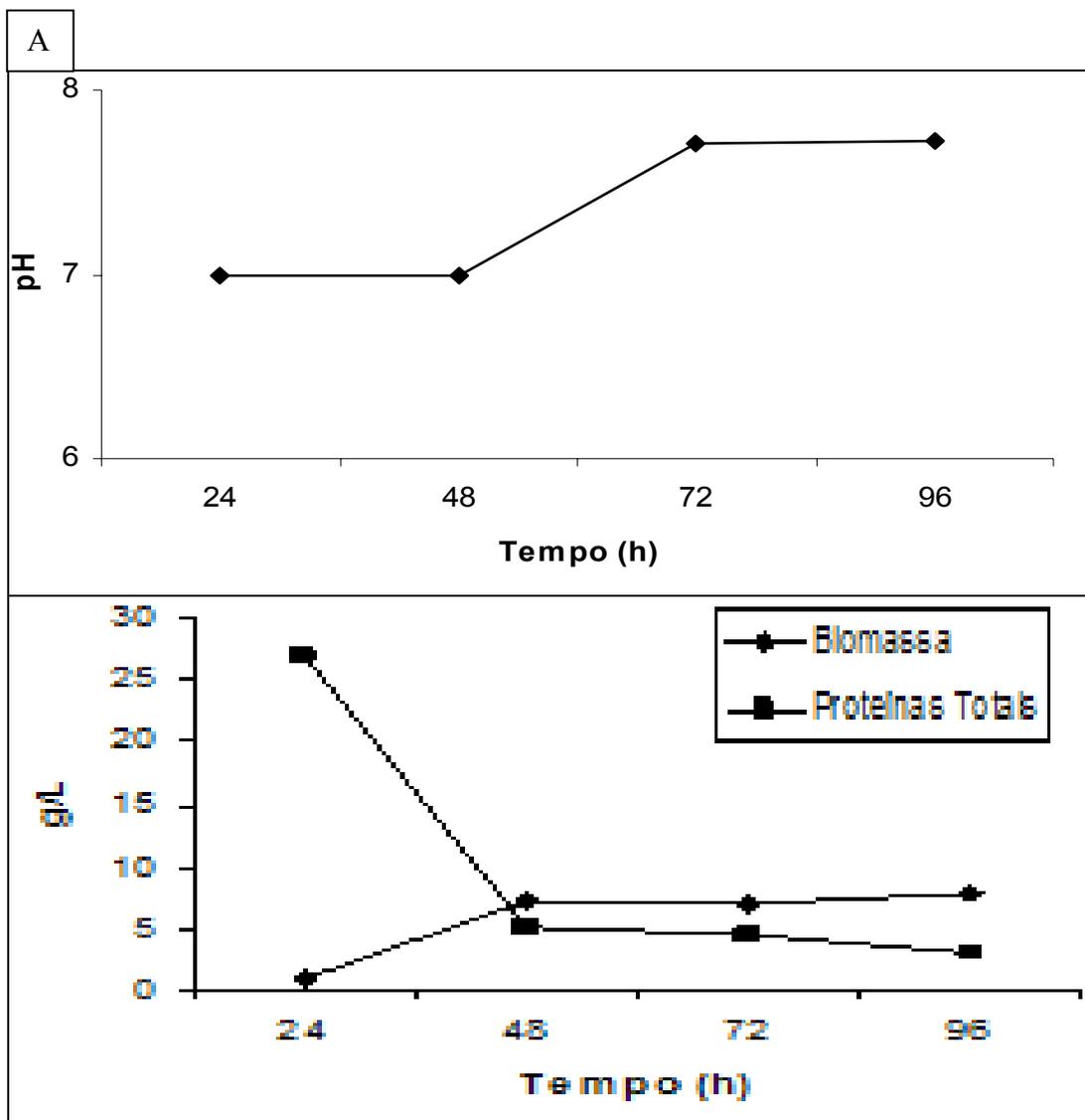
**Figura 2.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 0,5mM de DBT com glicose (B).



**Figura 3.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 1,0mM de DBT sem glicose (A).

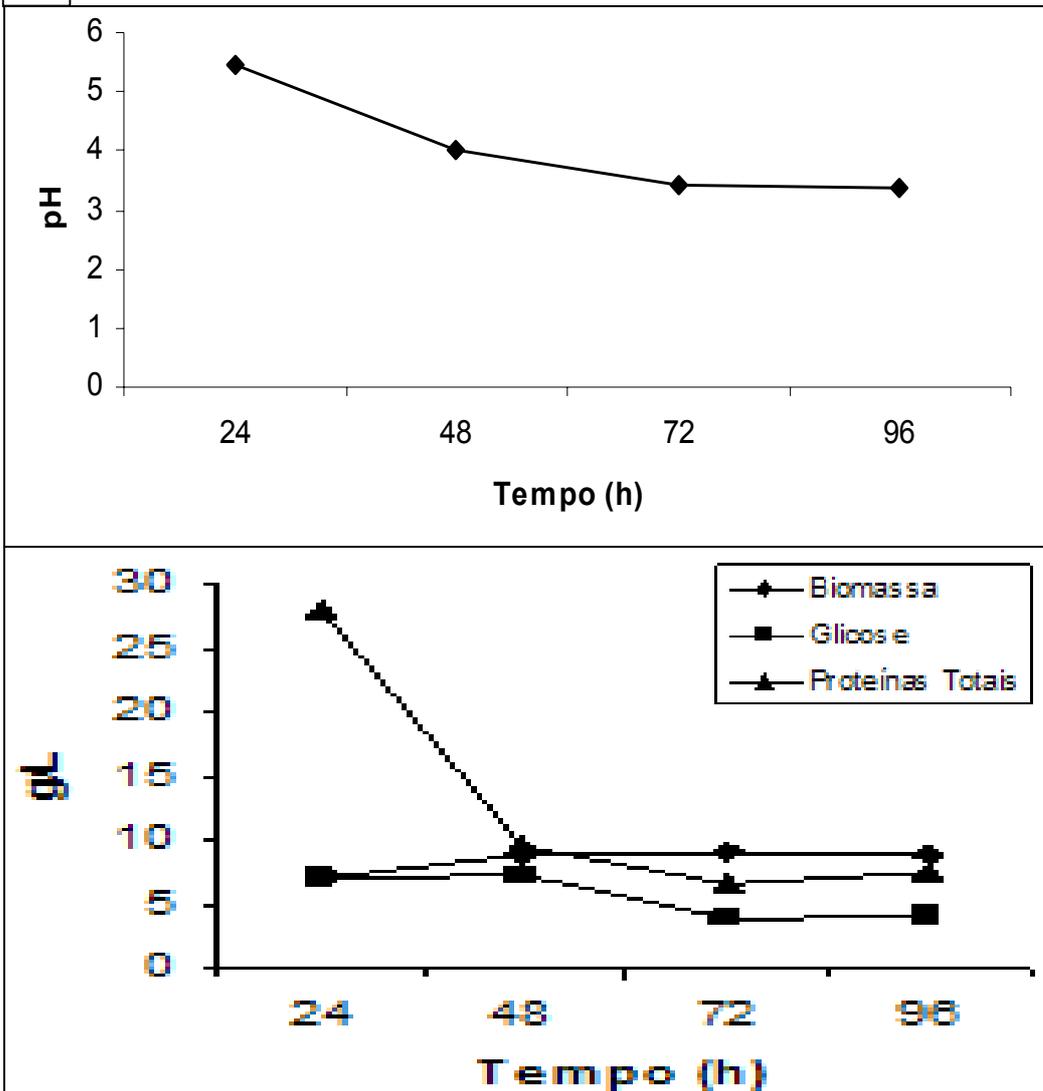


**Figura 4.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud líquido contendo 1,0mM de DBT com glicose (B).

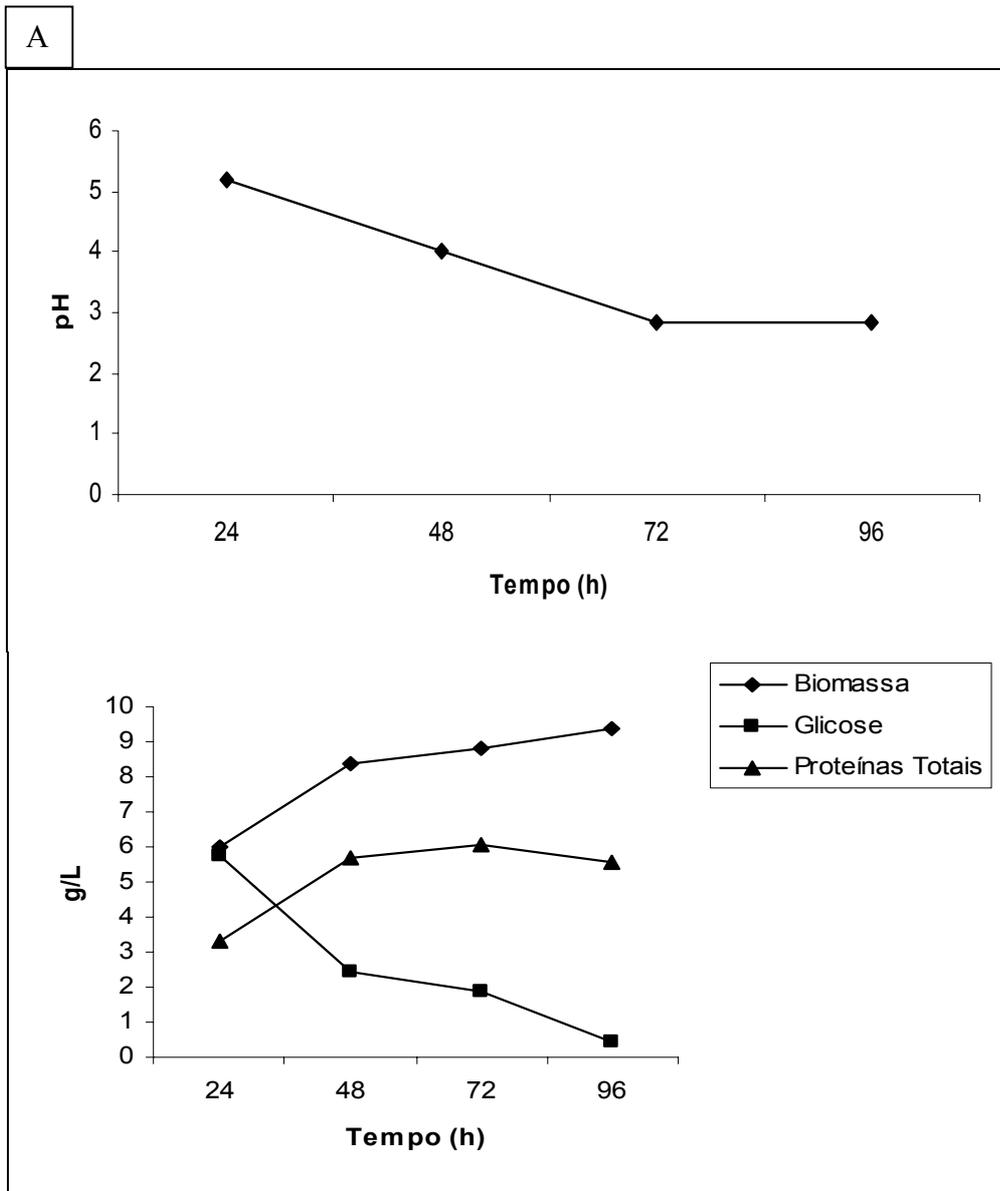


**Figura 5.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud Líquido contendo 2,0mM de DBT sem glicose (A).

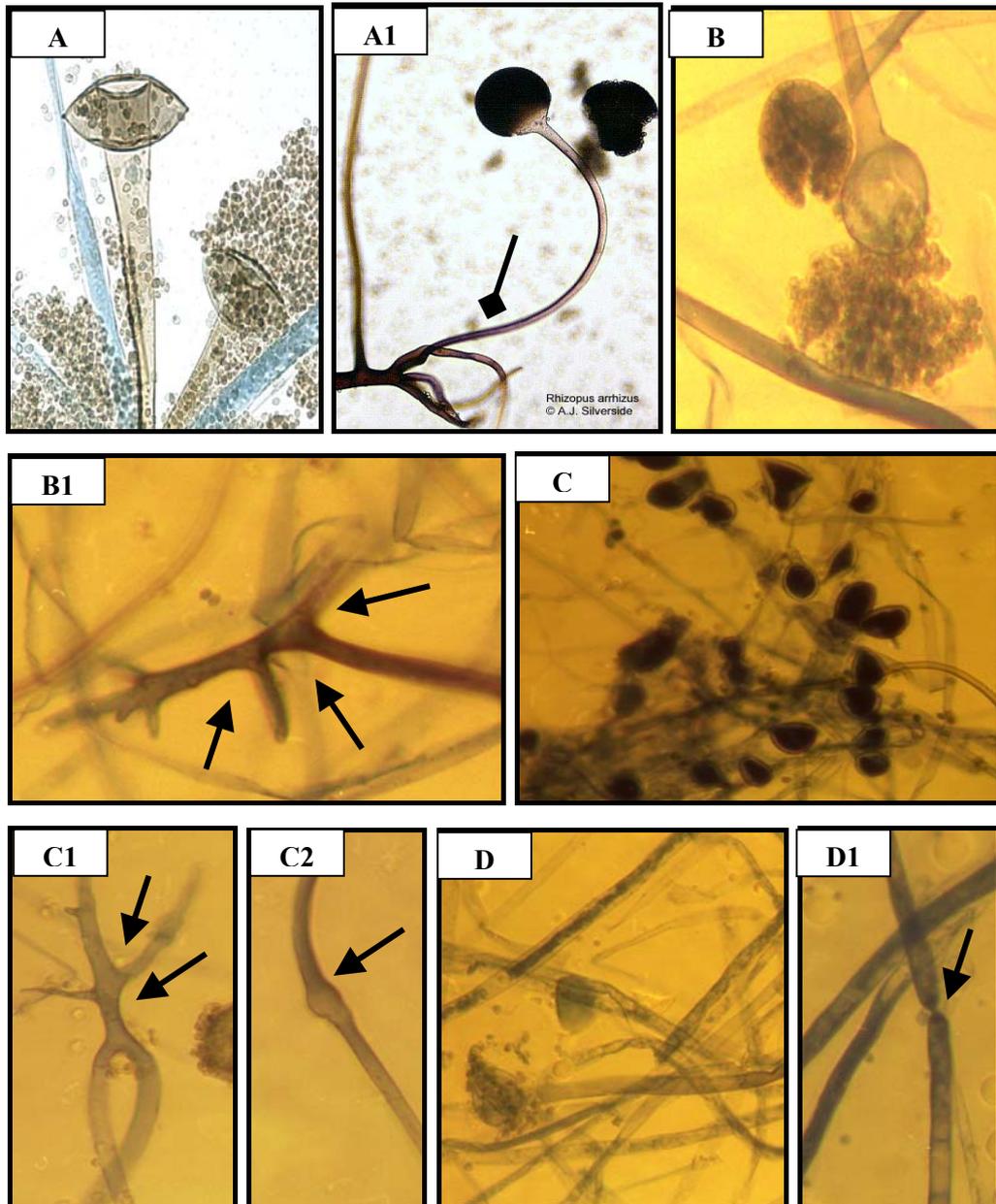
B



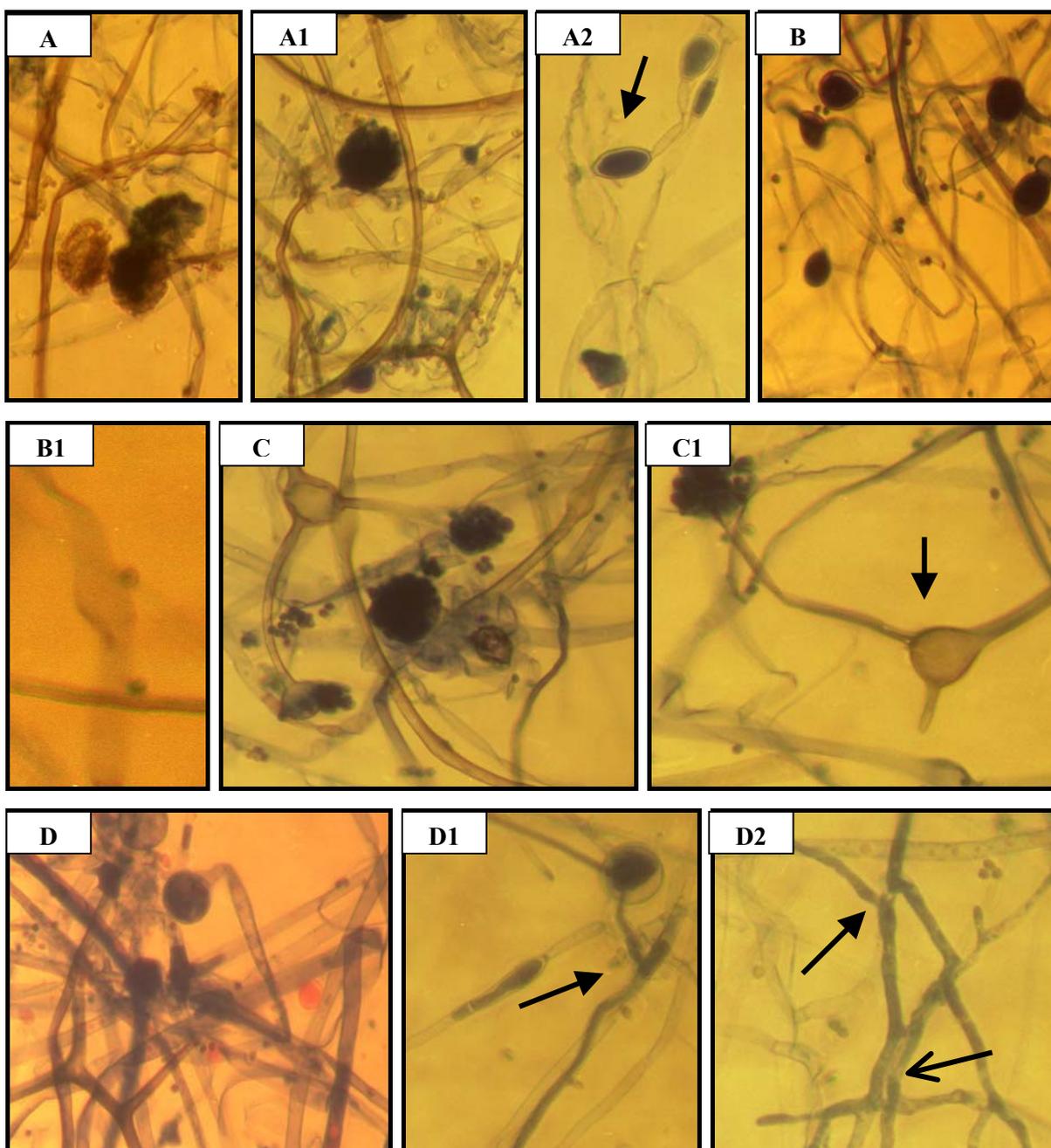
**Figura 6.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud Líquido contendo 2,0mM DBT de DBT com glicose (B).



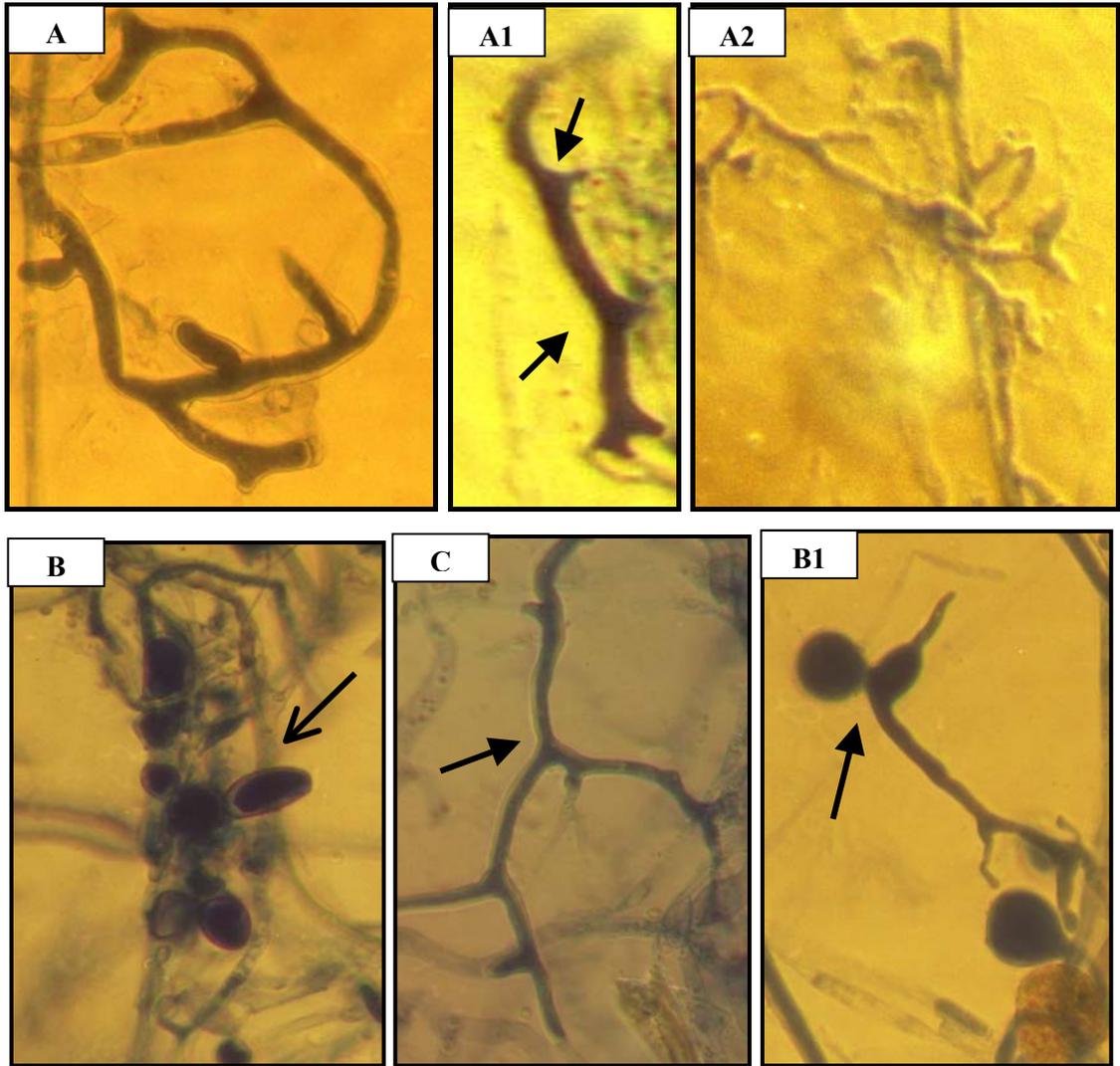
**Figura 7.** Perfil de crescimento e pH de *Rhizopus arrhizus* em meio de cultivo Sabouraud Líquido com glicose e sem DBT – Controle (A).



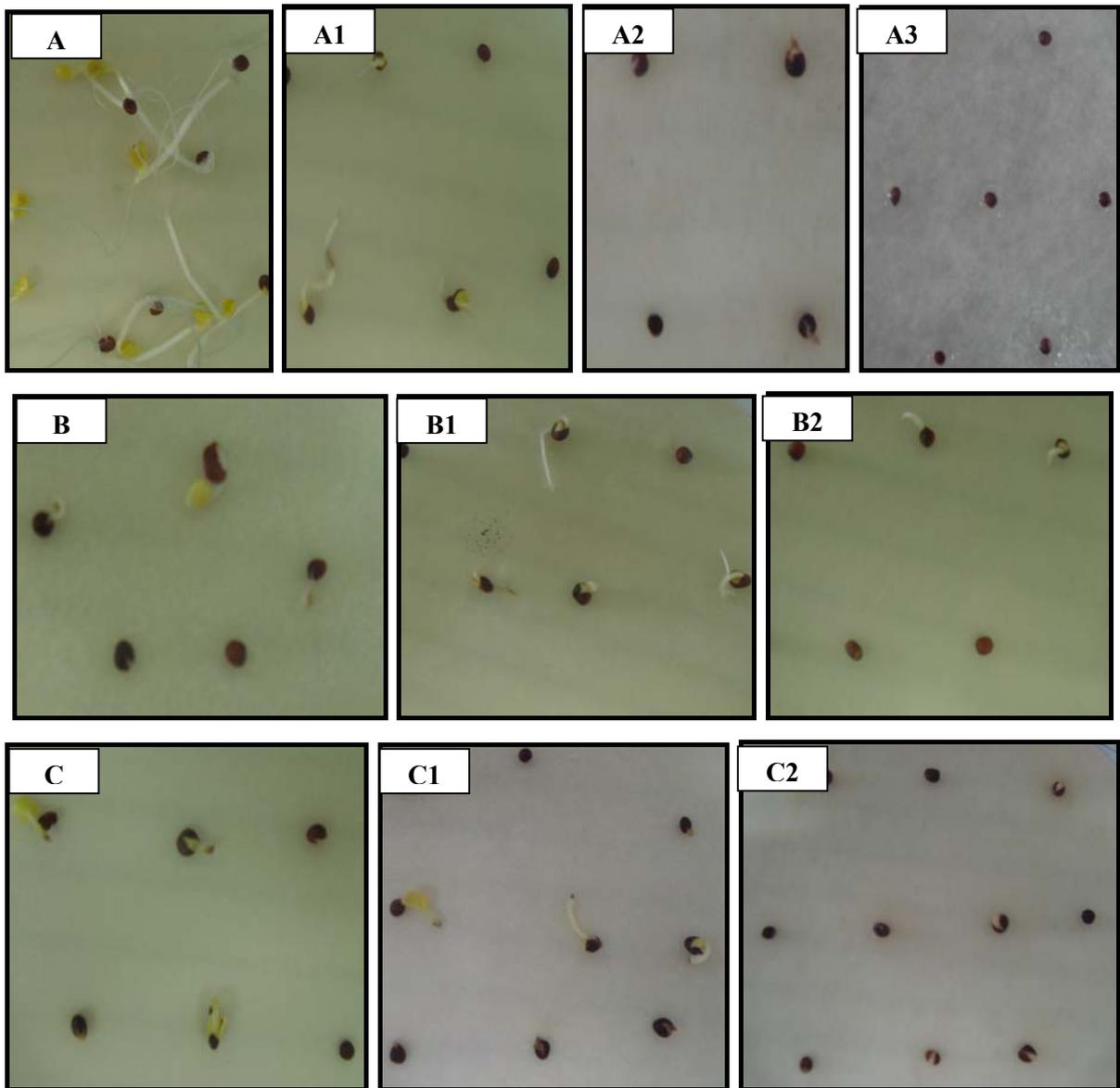
**Figura 8.** Microscopia ótica de *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio de cultura Sabouraud Líquido: Controle (A e A1) [www.telmeds.org](http://www.telmeds.org) e [www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org), respectivamente; 0,5 mM de DBT (B e B1), 1 mM de DBT (C, C1 e C2) e 2 mM de DBT (D e D1); incubados à 28°C, no período de 96hs: hifa (◆), modificações nas hifas (→) aumento de 400X.



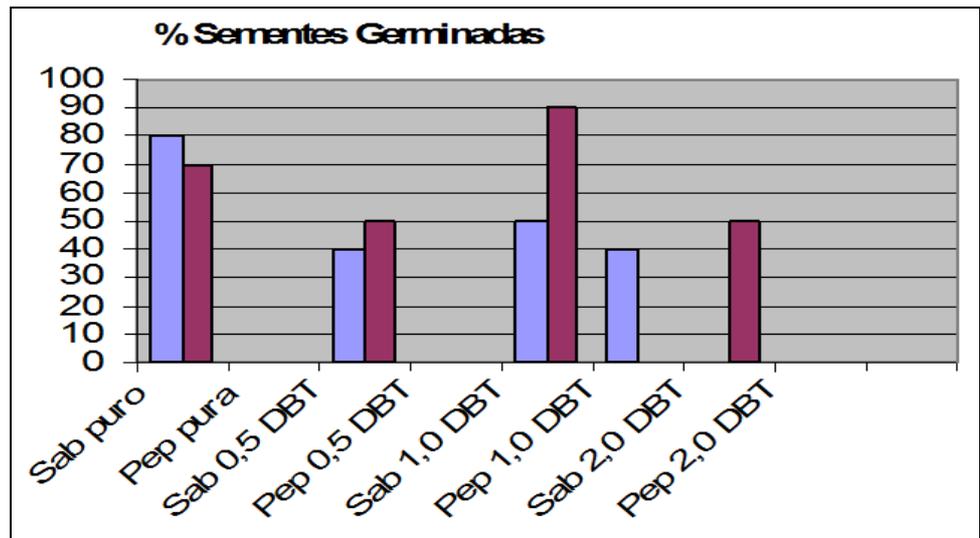
**Figura 9.** Microscopia ótica de *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio de cultura Sabouraud líquido: 0,5 mM de DBT + Glicose (A, A1 e A2); 1 mM de DBT + Glicose (B, B1, C e C1) e 2 mM de DBT + Glicose (D, D1 e D2) incubados à 28°C, no período de 96hs: modificações nas hifas (➔) aumento de 400X.



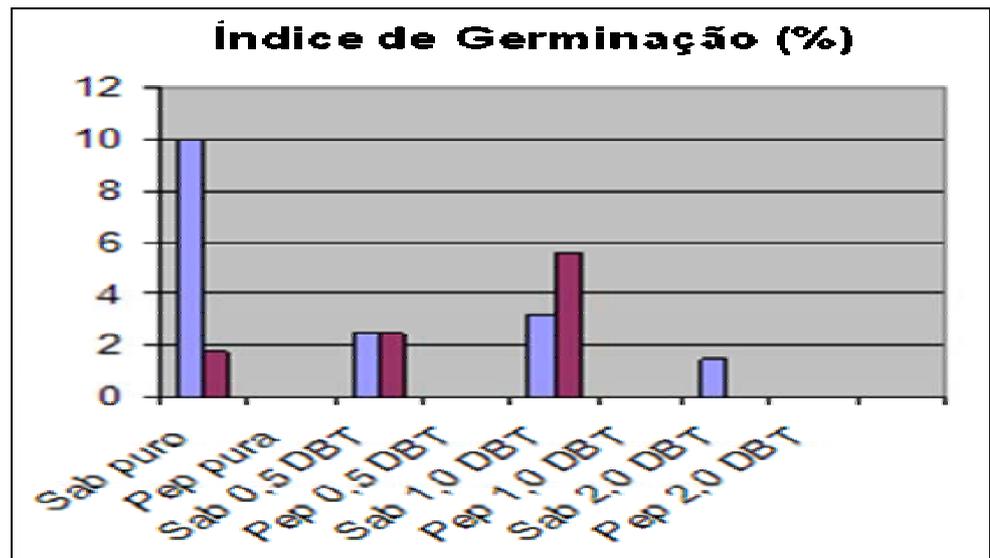
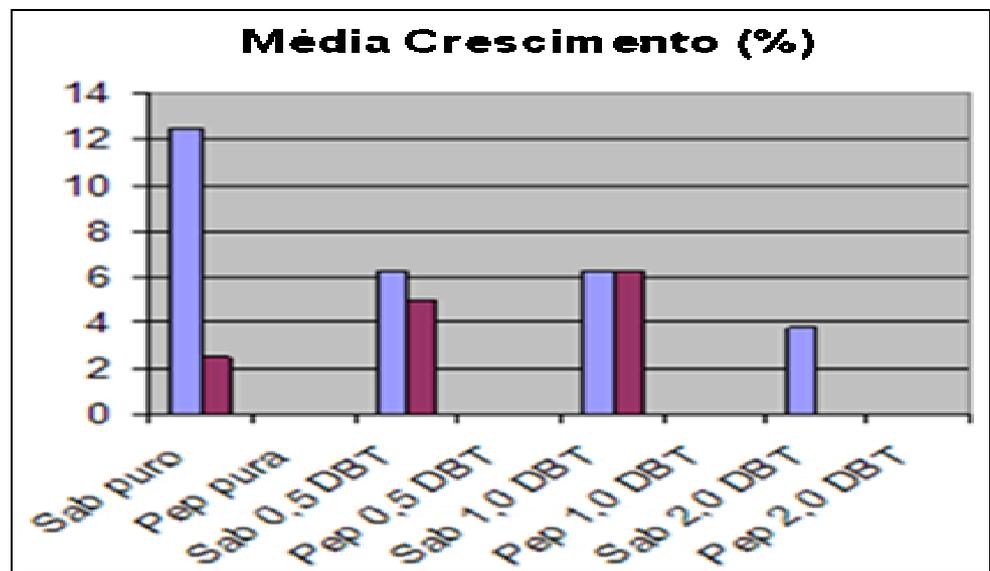
**Figura 10.** Microscopia ótica de *Rhizopus arrhizus* cultivado em meio de cultura Sabouraud líquido: 0,5 mM de DBT (A, A1 e A2); 1 mM de DBT (B e B1) e 2 mM de DBT (C) incubados à 28°C, no período de 48hs: modificações nas hifas ( ➔ ) aumento de 400X.



**Figura 11.** Teste de toxicidade com sementes de Repolho das 4 estações utilizando meio de cultura Sabouraud líquido: sementes em água destilada, meio Sabouraud puro + glicose, Sabouraud Puro sem glicose e Controle negativo (DBT + dimetilformamida) (A, A1, A2 e A3); meio Sabouraud + glicose com 0,5 mM de DBT, meio Sabouraud + glicose com 1 mM de DBT e meio Sabouraud + glicose com 2 mM de DBT (B, B1 e B2) e meio Sabouraud sem glicose com 0,5 mM DBT, meio Sabouraud sem glicose com 1 mM de DBT e meio Sabouraud sem glicose com 2 mM de DBT (C, C1 e C2) incubados à 28°C, no período de 96hs.



■ Sabouraud com glicose  
■ Sabouraud sem glicose



**Figura 12.** Gráficos mostrando a porcentagem de sementes germinadas, a Média de Crescimento e o Índice de Germinação de sementes “Repolho das 4 estações” em teste de toxicidade.

## Conclusões

A biomassa em até 96 horas apresentou seu ponto máximo da exponencial de crescimento e conseqüentemente maior consumo de glicose e menor pH, para o controle. Sugerindo a utilização da fonte de carbono e formação de ácido pirúvico, tendo em vista a redução do pH de 5,18 para 2,83.

Em relação a biomassa, houve uma discreta inibição da produção frente as diferentes concentrações de DBT (0,5 mM, 1 mM e 2 mM). Na presença de glicose os valores ficaram mais próximos ao controle, sugerindo a utilização do DBT como segunda fonte de carbono.

Os dados (glicose + DBT) são comprovados pelo consumo durante o crescimento e, conseqüentemente, alteração do pH para uma faixa ácida, de 5 para 2,94.

O aumento das proteínas nas primeiras 24 horas sugere que ocorre a produção de enzimas que catalizam o metabolismo do DBT por *Rhizopus*.

## Referências Bibliográficas

ABBAD-ANDALOUSSI, S.; WARZYWODA, M.; MONOT, F. 2003. Microbial Desulfurization of Diesel Oils by Selected Bacterial Strains – **Oil & Gas Science and Technology** – Ver. IFP. Vol. 58, nº4, pp. 505 –513.

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GÍRIO, F.M. 1999. Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis. **Biologia de Biotecnologia**, v.62, p.3-7.

CERNIGLIA, C.E.; GIBSON, D.T.; van BAALEN, C. 1980. Oxidation of naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae., **J. Gen. Microbiol.**, 116: 495-500.

CORSEUIL, H.X., ALVAREZ, P.J.J. 1996. Natural Bioremediation Perspective for BTEX-Contaminated Groundwater in Brazil. **Rev. Microbiol.** S. Paulo v.27, n.1, p. 43-50.

DA CUNHA, C. D. 1996. “Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo”. **Tese M. Sc.**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97p.

GRUIZ, K.; KRINSTON, E. 1996. In situ bioremediation of hydrocarbons in soil. **Journal of soil Contamination**, v.4, n.5, p. digital.

IZUMI, Y.; OGINO, T. O.; HINE, Y.; SHIMAO, M. 1994. Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 223-226, vol 60, nº 1.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiol. Reviews**, 54 (3): 305-315.

LI, L. F.; XU P.; MA, C. Q.; LUO, L. L.; WANG, X. S. 2003. Deep Desulfurization of Hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. – **FEMS Microbiology Letters** 223, pp. 301 – 307.

MAC CORMACK, W.P.; FRAILE, E.R 1997. Characterization of a Hydrocarbon Degrading Psychrotrophic Antarctic Bacterium. **Antarctic Science**, 9 (2): 150-155.

MADSEN, E.L. 1991. Determining *In Situ* Biodegradation. Facts and Challenges. **Environ. Sci. Technol.**, 25 (10): 1663-1673.

MORGAN, P.; WATKINSON, R.J. 1994. Biodegradation of Components of Petroleum. In: RATLEDGE, C. (Ed.). **Biochemistry of Microbial Degradation**. Kluwer Academic Publishers, London, UK. 590p.

NASCIMENTO, A.E.; SOUZA, P.M.; LIMA, M.A.B.; MARINHO, P.H.; MOURA, G.F.; TAKAKI, G.M.C. 2007. Effect of Dibenzothiofene: Growth, Morphology and Ultraestructura of *Cunninghamella elegans* UCP 596 - In: II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Biomicroworld2007), sevilha.

OLIVEIRA, F. J. S. 2001. "Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru". **Tese M. Sc.**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 110 p.

PRITCHARD, P.H.; MUELLER, J.G.; LANTZ, S.E.; SANTAVY, D.L. 1996. The Potencial Importance of Biodiversity in Environmental Biotechnology Applications: Bioremediation of PAH-contaminated Soils and Sediments.

TIQUIA S.M.; TAM N.F.Y.; HODGKISS I.J. 1996. Effects of Composting on Phytotoxicity of Spent Pig-Manure Sawdust Litter. *Environmental Pollution*. Vol. 93. pp. 249-256. **Elsevier Science Ltd**. Great Britain,

WALKER, J.D.; COLWELL, R.R.; PETRAKIS, L. 1976. Biodegradation of Petroleum by Chesapeake Bay Sediment Bacteria. **Can. J. Microbiol.**, 22: 423-428.

WANG, W.& KETURI, P.H. 1990. Comparative Seed Germination Tests Using Ten Plant Species for Toxicity Assessment of a Metal Engraving Effluent Sample. *Wat. Air Soil Pollut.* pp 52, 369 – 376.

WEBER W.J. JR.; CORSEUIL H.X. 1994. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. **Wat. Res.**; 28: p.1407-1414.

## **CAPÍTULO 3**

### **Segundo Artigo**

**Avaliação da Produção de Quitina e Quitosana por  
*Rhizopus arrhizus* mediados por Dibenzotiofeno-DBT**

Trabalho a ser submetido para publicação no periódico:

**Asian Chitin Journal**

# **Avaliação da Produção de Quitina e Quitosana por *Rhizopus arrhizus* mediados por Dibenzotiofeno-DBT**

RENATA G.S. INÁCIO<sup>1,3</sup>; MARTA C. FEITAS DA SILVA<sup>2,3</sup>; KAORU OKADA<sup>3,4</sup>;  
GALBA M. CAMPOS-TAKAKI<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE – Brasil

<sup>2</sup>Curso de Doutorado em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, <sup>3</sup>Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, <sup>3</sup>Centro de Ciências e Tecnologia – Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, Recife, PE – Brasil, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE, Brasil E-mail: takaki@unicap.br

Foram realizados estudos avaliando a ação do dibenzotiofeno na produção dos biopolímeros, quitina e quitosana, por *Rhizopus arrhizus* UCP 402, na presença e ausência de D-glicose. A produção dos co-polímeros foi acompanhada por um crescimento de 96 horas, avaliando a produção de biomassa, consumo de glicose e determinação de pH. A quitina e quitosana obtida foi investigada ao final de 96 horas de crescimento tratada com DBT. Os biopolímeros foram obtidos por desproteinização e tratamentos ácidos. Os resultados obtidos mostraram elevada quantidade de quitina, mediado por diferentes concentrações de DBT (0.5, 1, 2mM), na presença e ausência de D-glicose. Os estudos sugerem co-metabolismo por meio da adição de glicose e DBT. A produção de quitina por *R. arrhizus* aumentou provavelmente devido à repressão da quitina desacetilase mediada pela ação do DBT.

**Palavras-chave:** 1. *Rhizopus arrhizus*; 2. Dibenzotiofeno; 3. Quitina; 4. Quitosana.

## Introdução

A quitina é o polissacarídeo considerado mais abundante e largamente distribuído na natureza, depois da celulose, sendo um elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos<sup>1,2,3</sup>. É um polímero natural, insolúvel em água, linear, que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica -  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina<sup>4,5</sup>.

A quitosana, considerada como quitina desacetilada, pela perda do radical N-acetil, sofre várias etapas de desacetilação, gerando assim diversos derivados da quitosana<sup>6,7,8</sup>. Neste sentido, observa-se que a molécula de quitosana (poli- $\beta$ -(1-4)-D-glucosamina) apresenta um grupo amino e um radical hidroxila, os quais podem ser facilmente modificados quimicamente, desta forma permitindo novas propriedades e aumentando assim, as possibilidades de aplicação da quitosana<sup>9, 10, 11, 12, 6,13</sup>.

Em função dos amplos campos de aplicações, os polissacarídeos quitina e quitosana têm sido extensivamente estudados na atualidade, sendo a fonte tradicional para obtenção de quitina os exoesqueletos de crustáceos. Contudo, existem várias limitações em relação à utilização destes animais, tais como: a adaptação ao clima, os locais de confinamento e o processamento em larga escala associados à conversão química da quitina em quitosana, que induzem à limitação e inviabilidade do processo de obtenção desses polissacarídeos<sup>14,15,4</sup>.

Em recentes estudos, demonstram que várias espécies de fungos têm sido identificadas como fontes alternativas na produção de quitina e quitosana<sup>16,17,18</sup>. Assim, o uso da biomassa de fungos para obtenção de quitina e quitosana vem demonstrado grandes vantagens, como: extração simultânea dos biopolímeros, independência de fatores sazonais, produção em larga escala, processo simples e econômico resultando na diminuição do tempo e dos custos requeridos para extração, além da ausência de contaminação por proteínas. Outro aspecto importante a considerar, tem sido a presença de proteínas que induzem às reações alérgicas em indivíduos com predisposição alérgica a crustáceos<sup>4,19</sup>.

A quitina e a quitosana apresentam um grande valor econômico devido às versáteis propriedades e aplicações, destacando-se a área médica<sup>5,8,20</sup>, farmacêuticas<sup>21</sup>, biocompatibilidade, bioação, permeabilidade seletiva, ação de polieletrólitos, propriedades de troca iônica, antitumoral e atividade antimicrobiana<sup>5,20</sup>, na área ambiental destacam-se os fenômenos de biodegradação, biossorção, adsorção e controle ambiental<sup>4,17</sup>.

Pesquisas atuais apontam para uma grande variedade de aplicações da quitosana devido à grande versatilidade<sup>8</sup>, podendo ser utilizada na purificação da água, em processamento de alimentos e na adsorção de íons metálicos. Considerando o alto valor

agregado da quitosana na indústria, ressalta-se o emprego, como cosméticos, na liberação de fármacos, estabilizantes, aditivos alimentares, membranas, produtos farmacêuticos, fotográficos, nas indústrias têxtil e de papel, na fabricação de vidros e plásticos, na remoção de pesticidas, fenóis, policarbonatos, radioisótopos, na recuperação de resíduos sólidos, como antifúngico e antibacteriano, na cobertura de frutas e de sementes, na clarificação de sucos, como antioxidante, emulsificante, em ração animal, na deacidificação de sucos e bebidas, aplicados na forma de géis, no tratamento de cabelos, como emoliente, na proteção das unhas, na forma de flocos, e na imobilização celular em meios de cultura<sup>4,5,7,8,20,21,28,29</sup>.

Os polímeros quitina e quitosana são aplicados na recuperação biotecnológica dos recursos naturais renováveis. Neste sentido, a biossorção de íons metálicos torna-se uma alternativa para o tratamento de efluentes industriais<sup>4,23</sup>.

A biorremoção de óleos, metais pesados e de substâncias radioativas nos efluentes, vem sendo realizada por meio da quitina ou da quitosana, devido à formação do complexo quitina-íons ou quitosana-íons durante o processo de remoção. Esta interação possibilita a remoção de percentuais significativos de elementos poluidores ambientais, resultantes da ação antrópica<sup>30</sup>. Por outro lado, compostos organosulfurados, tais como dibenzotiofeno (DBT) e benzotiofeno (BT), em combustíveis fósseis são liberados como enxofre oxidação por combustão causando problemas ambientais como a chuva ácida.

Além disso, essa contaminação de petróleo pode ter impacto sobre os organismos que vivem em ecossistemas contaminados porque alguns destes compostos são relatados como tendo mutagenicidade e carcinogenicidade<sup>35,36</sup>. O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos de ação do dibenzotiofeno sobre a produção de quitina e quitosana por *R. arrhizus*, na presença e ausência de D-glicose.

## Material e Métodos

**Microrganismo:** Neste trabalho foi utilizada a linhagem *Rhizopus arrhizus* UCP 402, depositada no banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, sendo mantida no meio Sabouraud líquido, 4°C.

**Condições de cultivo e produção de biomassa:** *R. arrhizus* foi crescido em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo meio Sabouraud ágar, incubado a temperatura de 28°C, por cinco dias até esporulação. Os esporos foram coletados, transferidos para frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 120 mL de solução salina tamponada a 0,9% (fosfato de sódio monobásico 0,45g, fosfato de sódio dibásico 5,8125g, cloreto de sódio 2,25g, água destilada 250 mL). Os esporos contados em hematócrito para uma concentração de  $10^7$ /mL células/mL. Em seguida, 5 mL da suspensão de esporos foi transferida para frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL do meio Sabouraud líquido com e sem glicose nas diferentes concentrações de DBT (0,5 mM, 1 mM e 2 mM). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm à temperatura de 28°C, por um período de 96 horas. Após esse período a biomassa foi obtida por filtração e do líquido metabólico foram determinados o pH e consumo de glicose. Os ensaios foram realizados em triplicata.

**Determinação da biomassa:** A massa micelial foi removida por filtração a vácuo, lavada com água destilada gelada e liofilizada e, em seguida, mantida em dessecador até peso constante.

**Determinação do pH:** A determinação do pH, no líquido metabólico livre de células, foi determinada por potenciometria.

**Determinação da glicose:** O consumo de glicose foi realizado a partir do líquido metabólico livre de células pelo método enzimático colorimétrico (LabTest), utilizando D - glicose como padrão e absorvância a 500 nm<sup>19</sup> .

**Extração de Quitina e Quitosana:** As extrações de quitina e quitosana foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Stamford et al (2006)<sup>23</sup>, baseado na desproteinização da biomassa por uma solução de hidróxido de sódio a 2% (30:1 v/v, 90°C, 2 h.), centrifugado a 4000g, durante 15 minutos. O resíduo obtido foi submetido ao tratamento com ácido acético a 10%, (40:1 v/v, 60°C, 6 h). O pH foi ajustado a 9 e a

quitosana obtida por precipitação *overnight* a 5°C. A fração de quitina foi lavada com água destilada, etanol e acetona. Quitosana e quitina foram mantidas em dessecador até peso constante.

## **Resultados e Discussão**

### **Efeito do Dibenzotiofeno (DBT) na produção de biomassa**

A produção de biomassa, consumo de glicose e pH é representada na Tabela 1, após 96 horas de cultivo. Os resultados obtidos mostraram uma discreta inibição no crescimento de *R. arrhizus* quando tratado com DBT sem glicose e sua maior inibição foi de 21.28% quando tratado com 0.5mM de DBT. Neste caso *R. arrhizus* UCP 402 tem capacidade para degradar os compostos organosulfurados de dibenzotiofeno. No entanto, a suplementação com glicose durante o tratamento com diferentes concentrações de DBT aumentou a quantidade de biomassa e a maior inibição foi 19.14%, quando tratados com 1mM de DBT.

A relação com consumo de glicose e ao tratamento com 1mM de DBT utilizando D-glicose, bem como a concentração final inferior (1.17 g/L), e pH 2.94 (Tabela 1). Os resultados indicaram pH inferior quando suplementado com D-glicose durante o tratamento com DBT. Por outro lado, houve aumento do pH até valores alcalinos, quando tratado apenas com concentrações de DBT (Tabela 1).

É provável que o metabolismo enzimático de *R. arrhizus* fosse ainda capaz de atuar sobre produtos químicos sintéticos (DBT) utilizando como fonte de carbono. A resposta do metabolismo da *R. arrhizus* para DBT, sem suplementação de glicose dá algumas vantagens adicionais, como processos de dessulfurização, como descrito<sup>35,36</sup>. Neste caso, é possível uma grande exploração de novas fontes de energia utilizadas por *R. arrhizus*. Estes resultados são apoiados pela resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, dá algumas vantagens adicionais, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes de energia<sup>37,38</sup>.

### **Produção de Quitina e Quitosana mediadas pelo efeito do dibenzotiofeno (DBT)**

Os resultados obtidos indicam maior produção de quitina e de quitosana no experimento tratado com DBT, exceto o tratamento com 2mM suplementado com glicose (Tabela 1, Figura 1). No entanto, o conteúdo de quitina aumentou na presença de glicose,

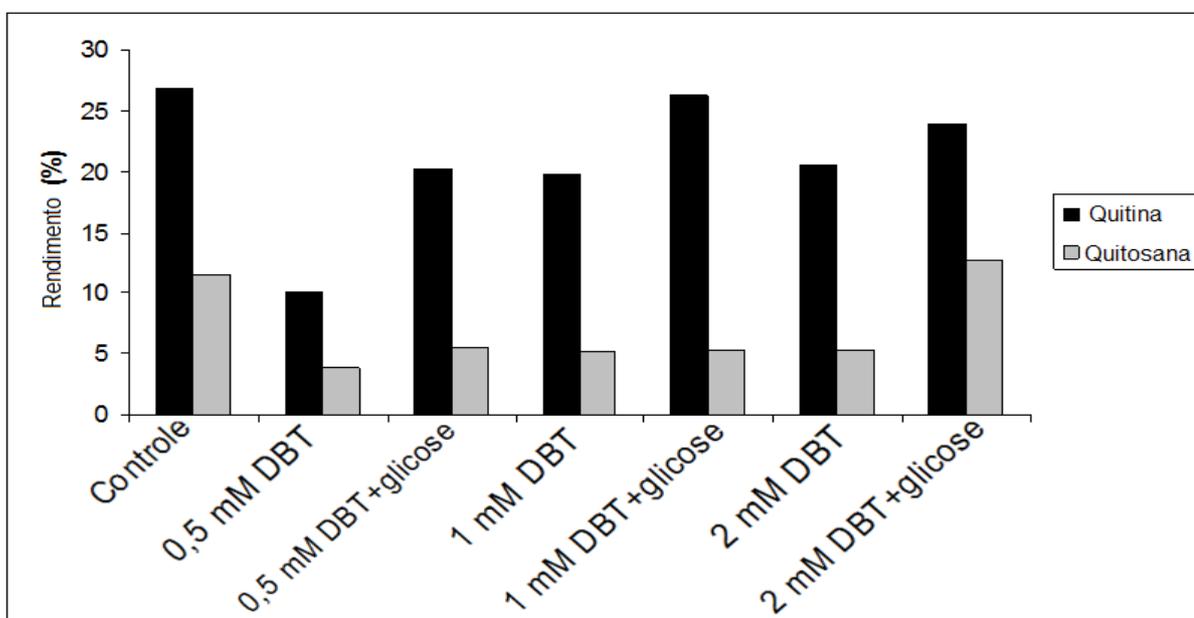
sugerindo uma adaptação fisiológica de *R. arrhizus* com a presença de DBT, de acordo com a literatura<sup>4,24,25,26</sup>.

**Tabela 1.** Biomassa (g/L), Consumo de glicose (g/L), pH, Quitosana (g/L), Quitina (g/L), Controle e tratados com concentrações de dibenzotiofeno (DBT) na presença e ausência de D-glicose, durante 96h de cultivo de *Rhizopus arrhizus*.

| Condições           | Biomassa g/L | Glicose g/L | pH   | Quitina g/L | Quitosana g/L |
|---------------------|--------------|-------------|------|-------------|---------------|
| Controle            | 9.40         | 0.43        | 2.83 | 2.45        | 1.08          |
| DBT (0.5mM)         | 7.40         | -           | 7.76 | 0.75        | 0.28          |
| DBT (0.5mM)+glicose | 8.40         | 2.64        | 3.00 | 1.70        | 0.46          |
| DBT (1mM)           | 7.60         | -           | 7.87 | 1.50        | 0.39          |
| DBT (1mM)+glicose   | 8.00         | 1.17        | 2.94 | 2.10        | 0.57          |
| DBT (2mM)           | 7.80         | -           | 7.73 | 1.60        | 0.42          |
| DBT (2mM)+glicose   | 8.80         | 4.03        | 3.35 | 2.10        | 1.08          |

Inicial = 20.00g/L de glicose

- = Não determinado



**Figura 1.** Porcentagem de quitina e quitosana produzida por *Rhizopus arrhizus* e Controle, mediados por tratamentos com dibenzotiofeno-DBT, com e sem suplemento de glicose.

Esses resultados são corroborados pelas informações de Pochavanavanich e Suntorasuk<sup>31</sup> que obtiveram 0,9 g/L e 138 mg/g de biomassa de quitina e de quitosana, respectivamente, extraídas do micélio de *R. oryzae*. Para outros Mucorales foram observados um máximo de produção de biomassa com 96 horas de crescimento, contudo, demonstraram rendimentos superiores (11,6 g/L e 11,0 g/L), respectivamente, *Cunninghamella elegans* e *C. bertholletiae*<sup>18,27,32</sup>.

O decréscimo na extração de quitina e quitosana verificados no início do experimento, fase de maior equilíbrio na formação de constituintes celulares, principalmente, os polissacarídeos estruturais quitina e quitosana, indicaram modificações fisiológicas na estrutura da parede celular do fungo. Essas informações são apoiadas pela literatura, sugerindo conexão direta da síntese de quitina e a ação da quitina deacetilase pela formação de quitosana na parede celular no ciclo dos Mucorales<sup>26, 33,34,35</sup>.

## **Conclusões**

Estes estudos com os mecanismos do dibenzotiofeno-DBT indicaram algumas alterações no conteúdo de quitosana sugerindo uma repressão da enzima quitina deacetilase, conseqüentemente, com aumento no nível de quitina. A suplementação com glicose fornece uma fonte ideal para o aumento do co-metabolismo para a produção quitina. Estes estudos contribuíram para conhecer o possível mecanismo de DBT sobre a produção de quitina e quitosana em fungos Mucorales.

## Referências Bibliográficas

1. Lehninger, A.L. *Biochemistry*. 2002. 2<sup>a</sup> ed. Ney Work: W.H. Freeman.
2. Kent, P.W. 1964. Chitin and mucosubstances. Em *Comparative Biochemistry*. Florkin, M & Mason, H.S., eds.; Academic Press Inc.: New York, p. 93-136.
3. Kaftzopoulos D. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Process National Academ. Sci.*90:2564-2568
4. Franco L.O.; Maia R.C.C.; Porto A.L.F.; Messias A.S.; Fukushima K.; Campos-Takaki G.M. 2004. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Braz. J. Microbiol.* 35:3-9
5. Freitas Silva, M.C.; Stamford, T.C.M.; Neto, B.B.; Campos-Takaki, G.M. 2006. Influência da salinidade e de fontes de carbono na produção de quitina e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP 542. *Asian Chitin Journal.* 1: 4-9
6. Singla, A.K.; Chawla, M. 2001. *Journal of Pharm. Pharmacology.* 53, 1047.
7. Dee, J.D.; Rhode, O.; Wachter, R. 2001. *Cosmetics and Toilets.* 116, 39.
8. Campos-Takaki, G.M. 2005. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta, PK (ed) *Chitin and chitosan opportunities & challenges*. India, SSM: International Publication, pp. 69-94
9. Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. 1989. *Biomaterials.* 10, 574.
10. Sano H.; Matsukubo T.; Shibasaki K.; Takaesu Y. 1991. Inhibition of oral *Streptococci* to saliva treated hidroxyapatite by chitin derivatives. *Bull Tokyo Den. Coll.* 32:9-17
11. Shepherd R.; Reader S.; Falshaw A. 1997. Chitosan functional properties. *Glycoconj. Journal.*14:535-542
12. Khan, T.A.; Pehn K.K.; Ching H.S. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *J. Pharm. Sci.* 5:205-212
13. Mello, K.G.P.C.; Bernusso, L.C.; Pitombo, R.N.M.; Polakiewicz, B. 2006. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49,665. Mello K.G.P.C; Bernusso L.C.; Pitombo R.N.M.; Polakiewicz B. 2006. Synthesis and physicochemical characterization of chemically modified chitosan by succinic anhydride. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49:665-668
14. White, S.A.; Farina, P.R.; Fulton, I. 1979. *Carbohydrate Research.* 38, 323.
15. Mathur, N.K.; Narang, C.K. 1990. *Journal of Chemistry Education.* 14, 938.
16. Muzzarelli, R.A.A. 1977. *Chitin.* 1<sup>st</sup> ed., Pergamon press: London.
17. Knorr, D. 1991. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol.* 45: 114-122
18. Costa Silva, H.S.R.; Santos, K.S.C.R.; Ferreira, E.I. 2006. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova.* 29:776-785

19. Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J.W. 1974. *Clinical chemistry, principles and technics*. 2<sup>nd</sup> ed., Harper & Row: New York.
20. Yadav, A.V.; Bhise, S.B. 2004. *Current Science*. 87, 1176.
21. Kato, Y.; Onishi, H.; Machida, Y. 2003. *Current Pharm. Biotechnol.* 4, 303.
22. Synowiecky, J; Al-Khateb, N.A.A.Q. 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry* 64:605-610.
23. Stamford, T.C.M.; Stamford, T.L.; 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. *Electronic J. Biotechnol.* 10: 10-18
24. Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki, G. M. 2000. *Ver. Canadian J. Microbiol.* 46, 1042.
25. Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. 2003. *Rev. Iber. Micologia.* 20, 149.
26. Amorim, R.V.S.; Souza, W.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G.M. 2001. *Braz. J. Microbiol.* 32, 19.
27. Amorim R.V.; 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. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32:19-23
28. Dallan, P.R.M. 2005. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP, Brasil.
29. Costa Silva, H.S.R.; Santos, K.S.C.R.; Ferreira, E.I. 2006. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova.* 29:776-785
30. Roux Van Der Merwe, M.P.; Badenhorst, J.; Britz, T.J. 2004. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 15, 312.
31. Pochanavanich, P.; Suntornsuk, W. 2002. *Letters Applied Microbiol.* 35, 17.
32. Schoroeder, H.W. 1996. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology*, 14:381-385.
33. Sun, C; Kong, Q; Xu, W. 2002. Efficient transformation of *Penicillium chrysosporium* mediated by *agrobacterium tumefaciens* LBA4404 for cloning of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Eletronic Journal Biotechnology* 5:21-28.
34. Souza-Ticlo, D; Verma, A.K.; Mathew, M.; Raghukumar, C. 2006. Effect of nitrogen on laccase production, its isozyme pattern and effluent decolorization by fungus NIOCC #2<sup>a</sup>. Isolated from mangrove. *Indian Journal Marine Sciences*, 35:364-372
35. Bezalel L., Hadar Y., Fu P.P., Freeman J.P., Cerniglia C.E. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, .uorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2554–2559.
36. Mohebalı G., Ball A.S., Rasekh B., Kaytash A. 2007. Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *E. Microbial Technol.* 40: 578-584.

37. Liu S., Suflita J.M. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in biotechnol.* 11(8):344-52.
38. Guarro J., Gene J., and Stchigel A.M. 1999. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 454-500.