



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**MAIRLA SANTOS COLINS**

**POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS NO ESTADO DO MARANHÃO NA  
BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO**

São Luís  
2018

**MAIRLA SANTOS COLINS**

**POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS NO ESTADO DO MARANHÃO NA  
BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO**

Monografia apresentada ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Maranhão  
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Juliano dos Santos

São Luís – MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Santos Colins, Mairla.

Potencial de fungos isolados no estado do Maranhão na biodegradação de derivados do petróleo / Mairla Santos Colins. - 2018.

56 p.

Orientador(a): Juliano dos Santos.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, 2018.

1. Biorremediação. 2. Diesel. 3. Gasolina. 4. Microrganismos. 5. Querosene. I. dos Santos, Juliano. II. Título.

**MAIRLA SANTOS COLINS**

**POTENCIAL DE FUNGOS ISOLADOS NO ESTADO DO MARANHÃO NA  
BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO**

Aprovada em            /            /

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup> Dr. Juliano dos Santos  
Orientador

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mayara Ingrid Sousa Lima

---

Prof. Dr<sup>ª</sup> Geusa Felipa de Barros Bezerra

A Deus e às mulheres da minha vida: mãe e irmã,  
por terem sido as razões das minhas lutas  
e o motivo de todo sucesso até aqui conquistado.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria, por terem ouvido minhas orações, acalentado meu coração em todos os momentos que precisei, principalmente quando minha fé se abalou. Obrigada por cuidarem de mim, até mesmo quando eu não merecia. Costumo dizer que Deus nos deu o livre-arbítrio, e com ele o direito de escolher, até mesmo o errado. Mas como bom Pai, mesmo nos punindo, Ele nos recompensa colocando pessoas em nossa vida que nos ajudam a dividir os fardos pesados das escolhas erradas e compartilhar as alegrias das escolhas certas, e é dessas pessoas que aqui venho falar.

Então por que não começar por aquela que me deu o que mais ninguém podia? DNA mitocondrial. Brincadeiras à parte, minha mãe não só deu base para todo o meu maquinário molecular e metabólico, mas me fez ser tudo que eu sou. Desde criança eu escuto “Você é igual à sua mãe!”, mas hoje eu posso afirmar que nem me esforçando até as minhas últimas forças eu chegarei à metade do que a Dona Maria José é e sempre foi para aqueles que a rodeiam. Uma mulher de coração gigante, simples, humilde e, sobretudo, forte, que não mede esforços para cuidar de mim, seja me buscando muito tarde e me deixando muito cedo na parada de ônibus, ou de tudo que abriu mão pra cuidar de nós.

Menina do interior, quebradeira de coco, empregada doméstica, dona de casa e super-heroína. Antes mesmo de entrar na biologia eu já conhecia o significado de resiliência, porque essa foi a maior lição que ela poderia me dar, mesmo sem saber. Ser resiliente é recuperar a homeostase à frente das adversidades. Sempre brinco dizendo que minha mãe não é uma “mãe de novela”. As “mães de novela” quando olham seus filhos cabisbaixos sempre os deixam chorar, sofrer e viver seu luto pessoal por dias a fio. Já a minha mãe não, em todas as situações em que eu me sentia fraca, e por vezes queria também chorar por dias a fio, ela me dava seu colo, porém, pra me reestabelecer. Engolia seu choro e me fazia enxergar o que nem eu mais enxergava: que eu era capaz e me fazia voltar. E enfrentar. E lutar. Com ela aprendi que é na fraqueza que nos fazemos forte, aprendi a ser resiliente, e jamais terei palavras suficientes para agradecer-lá por isso.

Através dela tive dois presentes maravilhosos. O primeiro é a minha vó, a Vovó Zeca, que deixou saudades enormes e lembranças maravilhosas de todos os anos que a puder ter comigo (principalmente aquela em que estou penteando seu cabelo no quintal

no fim da tarde). O segundo foi uma irmã. Dona de uma personalidade incrível, mas um tanto quanto difícil. Ser a irmã mais nova de alguém que sempre foi uma boa filha, com comportamento excelente e um boletim invejável foi difícil, confesso. Mas nada que não seja recompensado por nossa longa jornada de risos, filmes e lanches. Obrigada Marília, por todo o companheirismo, as brigas, conversas, por ter sido e ser responsável por mim, pelo cuidado e principalmente por nossos momentos de bagunça enquanto jantamos no teu quarto ou brincamos com os três bens mais preciosos da nossa casa: Scooby, Fred e Kiara.

Obrigada também ao meu pai, por todo apoio e suporte me dado, e também pela família que me deu. Aos meus tios Alexandrina e Zequinha, e aos primos Anderson e Jota, por terem sido sempre presentes e por fornecerem um apoio fundamental à minha família. Aos demais familiares que fizeram dos meus domingos momentos mais leves, risonhos e fraternos, em especial, à minha prima Karlliane, que não deixa ninguém ficar sério diante de tanta loucura e brincadeira. E falar de família, me lembra de outra mulher importante na minha caminhada. Alguém que é minha prima, madrinha, comadre, amiga, e com certeza, uma mãe pra mim. Obrigada Andréa por tudo que me ensinou e apoiou. Quem convive conosco sabe o quanto temos em comum nas nossas personalidades, o jeito de falar (muuuuuuito), de se impor, a teimosia, a vaidade, a segurança, a autoconfiança, e todas as outras coisas que aprendi em nossa vivência, da parceria nos momentos ruins aos nossos shows maravilhosos. Mas de tudo que você poderia me dar, você me deu alguém que ganha com uma única palavra: Dinda. Maria Cecília, mais conhecida como meu coração que pula fora do peito. Ter me feito madrinha da sua filha só nos uniu ainda mais, e eu espero ser para ela ao menos metade do que você é pra mim.

Como quase tudo na vida, o caminhar da minha pesquisa foi cheio de obstáculos. As burocracias, a falta de fomento, os imprevistos, os protocolos que não padronizaram, os prazos apertados, e todas as outras coisas que só um pesquisador entenderia. E felizmente eu tive um pesquisador único na orientação deste trabalho, seja na bancada, nas planilhas, ou nas conversas. Obrigada meu orientador e amigo, prof. Juliano dos Santos, por toda confiança e apoio. Obrigada por ter acreditado no meu potencial até mesmo quando eu não acreditei, e principalmente, todas as vezes que tivemos obstáculos e você pacientemente me fazia direcionar meus esforços para solução, e não para o problema. Sem dúvidas, uma lição que vou levar pra sempre. Se eu pudesse fazer algo para todos os pesquisadores do mundo, eu faria com que eles

tivessem orientadores parecidos com você. Mas já que não posso, me esforço para que um dia eu possa ser semelhante, na pesquisa e na vida.

Agradeço também ao meu grupo de pesquisa, GPDEM, onde me encontrei cientista e finalmente senti estar no meu lugar, feliz e madura com as minhas escolhas. Obrigada Leandro, por todo suporte, conversas e ensinamentos. Agradeço também a Italo, meu amigo e parceiro de laboratório/da vida, por ter sido paciente, prestativo, cuidadoso, e viver intensamente cada momento comigo, seja na escolha da *playlist* do trabalho, nos conselhos ou no desespero. Há uma música que eu gosto bastante, chamada Girassol – Cidade Negra, que sempre me lembro de você ao escutar um de seus versos, que diz: “*Já que pra ser homem tem que ter a grandeza de um menino*”, e não há definição melhor pra você, obrigada por tudo.

A todos do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal, por toda amizade cultivada durante esse tempo, pelos risos e momentos de descontração, que fizeram os momentos mais leves. Agradeço também à Renata, pela ajuda, conversas e pelo café maravilhoso. Em especial, agradeço à prof.<sup>a</sup>. Ilisandra, por toda confiança e por todo suporte fornecido. Pelo aprendizado, conselhos, carinho e por ter me feito gostar de botânica com aulas maravilhosas de fisiologia vegetal. Aproveito o espaço pra dizer que Gabriel é uma criança de sorte por ter pais maravilhosos, pessoalmente e profissionalmente falando.

Agradeço também todos do NIBA, em especial à prof.<sup>a</sup>. Geusa, por toda ajuda prestada, que foi crucial para o desenvolvimento deste trabalho. Também ao meu amigo Igor, por todo auxílio no laboratório e fora dele, e principalmente por tornar as conversas mais leves e engraçadas com o seu jeito.

Ao PET Biologia por todos esses anos de experiência. Levo uma bagagem muito grande da minha participação nesse programa, que sempre olharei com carinho e saudades. Aqui incluo a tutora egressa, Gisele, por todo cuidado e amor dedicado ao programa. Agradeço também à minha tutora e amiga, prof.<sup>a</sup>. Mayara, por todos os momentos vividos, pelas conversas, conselhos, discussões, almoços, pizzas, chopps e caronas, que se repitam mesmo com a minha saída do programa. Agradeço a todos que fizeram parte e companhia nessa minha estadia, lembrando sempre que “Uma vez petiano, sempre petiano”. Em especial, a petiana mais meiga da existência do programa, que era também uma tutora pra todo mundo, o *biscuit* do PET, Mariana. Obrigada Mari por todos os conselhos, pela amizade, por todas saídas e bagunças na tua casa, pelos *reggaetons* e por me receber tão bem sempre com esse sorriso maravilhoso (volta



logo!). Obrigada também aos veteranos parceiros de time, Leonardo e Clarisse, que se tornaram mais que colegas de curso e ótimos companheiros de reviver.

Agradeço também à minha veterana favorita, Liana, que sempre foi um doce comigo, cuidadosa, risonha, e se tornou uma amiga preciosa. Obrigada por todas as conversas intermináveis de madrugada, orientações, conselhos, desabafos e sorrisos. Obrigada também a Marco Antônio, que com certeza vai reclamar por Liana ter sido a favorita. Brincadeiras à parte, obrigada por ser um amigo presente mesmo tão longe, por ser meus ouvidos e cérebro quando preciso, por ter me ajudado passar por cima de momentos ruins e comemorar os momentos bons. A saudade é enorme, mesmo com os áudios de 40 minutos, volta logo.

Aos meus ex-colegas de laboratório e amigos incríveis do LESPP. À prof.<sup>a</sup> Gisele, pela oportunidade de trabalhar em um local maravilhoso, cercada de pessoas únicas. Não era o que eu queria como profissional, mas sempre irei admirar a entomologia como uma fã. Ali ganhei amigos que levarei uma coisa de cada um para vida inteira. Foram vários momentos cercados de risadas, nas coletas com muita chuva, carro atolado, perdidos nas trilhas, medo de onça, de cobra, ou até mesmo imitando seu Tinoco... foram momentos especiais pela presença de cada um.

Agradeço ao Lucas por todo aprendizado, principalmente por me ensinar que as broncas servem pra gente crescer, mudar e persistir, e que críticas construtivas ajudam no amadurecimento profissional. À Ananda, que de longe é uma das pessoas mais humildes que já conheci, por ser exemplo de uma profissional maravilhosa, com leveza e modéstia que só ela tem. A David, por transformar nossas tardes de trabalho mais leves, com brincadeiras e arrumações que só David poderia inventar (arrumar potes pela cor, nunca mais). A Diego, por sempre ser prestativo, atencioso, e patrocinar um mocotó só pra reunir os amigos. A Elias, pela parceria, sinceridade, e por ser um amigo que, mesmo que fique um tempo afastado, sempre é o mesmo Elias em sua essência. À Gabriela, por ser a mãezona do grupo, exemplo de força, garra, responsabilidade, e por ter sempre as tiradas mais certeiras. À Thayrine, que é um presente de Deus na minha vida, irmã de alma, gosto, humor e de confusão. Companheira de ônibus, sorvetes, souzas, lálíos, chopps e da vida inteira. Obrigada por ser sempre presente na minha vida, mesmo morando tão longe, não há um dia que eu me sinta distante de ti.

Aos meus amigos da 2013.1, que estiveram comigo nessa jornada árdua e impetuosa. Nada até aqui foi fácil, mas se chegamos até aqui, já somos vitoriosos. Quero agradecer em especial a Jesiel, por ser um amigo e tanto, sempre presente e

perseverante. À Thalita, por todo companheirismo, ajuda, suporte, sorrisos e carinho. Obrigada por compartilhar vários momentos de desespero e felicidade na nossa caminhada.

A Augusto, por ocupar a vaga de abusivo e de amigo mais estiloso que tenho na minha vida. Obrigada por ser esse amigo especial, pelo carinho e apoio em diversos momentos, por ser exemplo de força, coragem e vontade. É um privilégio ter tua amizade por anos e espero seguir tua amiga a vida inteira. À Emilly, *my person*, por ser uma amiga maravilhosa, presente e dedicada. Obrigada por ser meu braço direito, e às vezes minhas pernas também, pois todas as vezes que quase caí você foi meu suporte, e quando me levantei, você também estava lá pra festejar comigo. Vocês possuem um lugar cativo na minha vida.

Aos meus demais amigos de curso que me ajudaram em toda a trajetória. A Meydson, por me ensinar principalmente que todos nós temos limites, e que não conseguir abraçar o mundo com as pernas é uma coisa que independe da nossa capacidade, obrigada amigo! A Gustavo, por ser meu companheiro de estresse e Masterchef, pela doçura e por me mostrar que quando se ama o que faz, dá sim pra ler trilhões de artigos. À Natália, pelo passeios, conversas, desesperos e por toda a acidez em seus comentários, que nos faz rir mesmo sem querer. Os almoços e caronas pra casa com vocês ficam muito mais divertidos. À Daniela, por ser a nerd mais engraçada da biologia, por me acompanhar em todas as disciplinas fazendo piada de tudo, tirando sorrisos largos em meio a tensão, mas sempre com responsabilidade e determinação.

Aos meus amigos da escola, Bianca, Nicolle e Renan, que por mais que o tempo passe, sempre estão presentes. Por vezes fui uma amiga ausente, justificando com toda a correria, e vocês foram compreensíveis. Podemos passar anos sem nos ver e a amizade continua a mesma. Obrigada, amigos!

A todos da coordenação e departamento do curso de Biologia. A todos os professores, em especial ao Prof. Eduardo, por toda sua alegria, cuidado, ponches e por ter me apelidado com meu sobrenome, depois disso nunca mais fui a mesma. Agradeço também aos melhores zeladores que poderíamos ter, Seu Magno, Dona Ana e Dona Cecília, pelas conversas, cafés e por ser um enorme suporte para todos. Ao Seu Ivaldo, por ser uma companhia maravilhosa, me abrigar na lanchonete sempre que eu ficava sem chave e por seus mistos acompanhados de papos excelentes. À Dona Linair, que é um dos bens mais preciosos do curso, sempre cordial e tranquila cuidando de tudo com

empenho na coordenação. Vocês são incríveis e partes importantíssimas para a rotina das pessoas que vivem na Biologia.

Gostaria de pedir perdão se deixei alguém fora dessas linhas, mas cada um que fez parte disso tem lugar na gratidão imensa que sinto, mesmo que não tenha esboçado no texto.

Pra finalizar, gostaria de reforçar que, quem me ajudou, me ajudou a realizar um sonho. E me faz lembrar Ernst Mayr, que em seu livro “Isto é biologia: a ciência do mundo vivo”, disse que “ser biólogo não é um trabalho, é um modo de vida”. É nunca perder a empolgação pelas descobertas, por novas ideias, novos vislumbres, novas teorias... É sempre querer saber mais! Decidir qual profissão eu deveria seguir foi um trabalho e tanto. Nada me agradava, eu sempre queria mais, queria poder fazer a diferença de alguma forma, tinha curiosidade em tudo... e por isso toda minha vida fui chamada de curiosa, até encontrar algo que usaria tudo isso a meu favor. Decidir qual profissão eu deveria seguir foi difícil, mas hoje vejo que nunca foi tão fácil sentir orgulho do que me tornei.

Antes, eu era chamada de curiosa, agora serei chamada de cientista e nada me deixaria mais feliz que viver em função desse sonho que se realizou. Obrigada!

*“I’m a good man in a storm”.*  
(Arizona Robbins – *Grey’s anatomy*)

“Nem sempre se pode ter fé,  
quando o chão desaparece  
embaixo dos seus pés.  
Mas, nem sempre  
a fraqueza que se sente  
quer dizer que a gente não é forte”.  
(Palavras Repetidas – Gabriel O Pensador).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
2.1.Petróleo.....	03
2.1.1 Derivados do petróleo.....	04
2.2 Biorremediação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados.....	06
2.3 Os fungos e seu potencial biotecnológico.....	08
3. OBJETIVOS	
3.1 Geral.....	11
3.2 Específicos.....	11
REFERÊNCIAS.....	<u>12</u>
Artigo: Potencial de fungos isolados no estado do Maranhão na biodegradação de derivados de petróleo.....	20

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação do meio ambiente por petróleo e seus derivados tem se tornado cada vez mais uma das principais causas de poluição ambiental. Atualmente o setor petrolífero lidera o *ranking* das fontes energéticas mais utilizadas, sendo responsável por 40% da produção da energia mundial (AZEVEDO, 2010). A grande quantidade de petróleo presente no meio ambiente, assim como sua circulação no mesmo, se deve ao fato da rápida aceitação desse composto como fonte de energia a diversas invenções, desde o início da exploração petrolífera em meados do século XIX (PALA et al. 2006).

A produção anual do petróleo atinge até três bilhões de toneladas por ano, sendo que aproximadamente a metade é transportada por transportes marítimos (MONTAGNOLLI, 2011). Contudo, com o aumento da sua exploração e comercialização, bem como seus derivados, houve um acréscimo no número de vazamentos acidentais e rejeite indevido, tendo como consequência danos graves ao meio ambiente, pois o contato com o mesmo pode provocar malefícios para os organismos aquáticos, terrestres e conseqüentemente para toda a cadeia alimentar (SOUZA FILHO, 2006; PIRÔLLO, 2006). Estima-se que aproximadamente dois milhões de toneladas são perdidas em acidentes na manipulação de petróleo anualmente (READMAN et al. 1992).

Apesar de estar atrelado ao desenvolvimento e ao progresso, o petróleo e seus derivados são extremamente nocivos ao meio ambiente devido sua toxicidade elevada por conta da alta taxa de compostos químicos tóxicos (FRANCO et al., 2004). Os derivados desse óleo estão disseminados por todo o mundo, e seu uso intenso está intimamente relacionado ao descarte de hidrocarbonetos no ambiente (LOPES, 2014).

Os hidrocarbonetos de origem petrogênica estão entre os poluentes mais persistentes no ambiente, e além de tóxicos ao meio ambiente, nos seres humanos e animais aquáticos também apresentam propriedades mutagênicas e carcinogênicas. Entretanto, a maior parte dos hidrocarbonetos derivados do petróleo é passível de biodegradação, porém, o processo de descontaminação ambiental pode ser lento e gradual (TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010).

A remoção desse composto e dos seus derivados do ambiente geralmente é feita mecanicamente por metodologias caras e complexas, que agem de forma lenta e gradual, comumente ineficazes (ULRICI, 2010). Por isso, a contaminação ambiental por esse óleo e seus derivados tem sido alvo de pesquisas científicas há aproximadamente 40 anos, pois a poluição pelo petróleo e seus procedentes é corriqueira e pode ocorrer

nas diferentes etapas de produção do mesmo, tais como a exploração, o refino, o transporte e o armazenamento (ATLAS, 1995).

São utilizadas diferentes metodologias na remediação de ambientes contaminados, e um dos métodos bastante utilizado é a adição de surfactantes químicos. Os surfactantes fazem parte de uma classe de compostos químicos que conseguem diminuir a tensão superficial da água e possuem alta capacidade emulsificante, utilizados largamente em variados setores industriais (NITSCKE; PASTORE, 2003). A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, o que traz à tona a preocupação ambiental aliada às legislações de controle do meio ambiente, pois muitos destes compostos apresentam alta toxicidade e baixa biodegradabilidade, necessitando de tratamento adicional após sua aplicação, o que induz a procura por surfactantes naturais como alternativa em relação aos produtos existentes (PACHECO, 2008; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

A tendência do uso de surfactantes naturais é levada pela necessidade de produtos mais amenos, pela substituição de compostos não biodegradáveis e pela especificidade que o produto natural pode oferecer. Vários desses compostos podem ser sintetizados por organismos vivos, como exemplo os microrganismos, sendo esse amplamente utilizado em biodegradação. Esses compostos surfactantes de origem microbiana são chamados de biosurfactantes e consistem em subprodutos metabólitos sintetizados por bactérias e fungos (LIMA, 2007; PEIXOTO, 2008).

O uso aplicado de processos biotecnológicos envolvendo microrganismos na remediação de ambientes contaminados é uma vertente crescente, tendo em vista o potencial que possui na solução de problemas ambientais causados por contaminantes. (AHAD et al. 2000). Apesar dos conceitos da técnica serem recentes ou incomuns, a aplicação das tecnologias de biorremediação foi introduzida em meados da década de 80, como um escape às alternativas convencionais, tais como escavação, bombeamento, e entre outras (APRIL; FOGHT; CURRAH, 2000).

Aliado a isto, podemos destacar que o estado do Maranhão, devido a variedade de biomas que compõem seu território, oferece uma riqueza e diversidade microbiana que certamente pode contribuir na prospecção de bactérias e fungos com potencial biodegradador de derivados de petróleo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de fungos isolados quanto à degradação de compostos derivados do petróleo, em áreas naturais e antropizadas de diferentes ecossistemas maranhenses.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Petróleo**

O petróleo é um óleo natural, constituído em sua maioria por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, incluindo alguns componentes organometálicos, principalmente, abrangendo vanádio e zinco (MONTAGNOLLI, 2011). Quando recolhido de áreas distintas, esse óleo difere bastante em sua composição e propriedades físico-químicas (ATLAS, 1995; CERNIGLIA, 1997).

Assim como suas substâncias associadas, o petróleo está presente no subsolo terrestre de diferentes formas, seja como sólidos, líquidos e/ou gases, que podem ser separados por cromatografia de absorção em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfalto (KARLSEN; LARTER; 1991).

Os hidrocarbonetos mais encontrados são os saturados, quais não apresentam duplas ligações e de acordo com suas categorias químicas são categorizados em alcanos (parafinas), com cadeias ramificadas ou não, e cicloalcanos (naftenos), que podem apresentar um ou mais anéis carbônico em sua fórmula. A maioria dos cicloalcanos presentes no petróleo possui um radical alquil, formado pela retirada de um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto saturado. Geralmente, existem mais hidrocarbonetos aromáticos com esse radical em petróleo cru do que aromáticos não alquilados (MATAR; HATCH, 1994).

Contudo, a maioria dos estudos acerca da composição do petróleo foi feita pelo uso de técnicas como a espectrometria de massa e cromatografia gasosa, pois as mesmas são capazes de detectar compostos de pesos moleculares muito altos (KILLOPS; AL-JUBOORI, 1990). Entretanto, propõe-se que tais técnicas sejam utilizadas mais direcionadas, em associação, a fim de uma melhor caracterização do petróleo, pois a composição do mesmo ainda não é absoluta e varia em cada local onde é encontrado (MONTAGNOLLI, 2011).

Para diferenciar o petróleo, a indústria petrolífera usa duas classificações: óleo convencional e óleo não convencional (TESTA, 2000). Os óleos convencionais podem ser mais explorados, refinados e produzidos de maneira mais simplificada de acordo com as técnicas de refino existentes, sem que sejam necessárias grandes adaptações. Em contrapartida, os óleos considerados não convencionais, como óleos muito pesados e



“*tar sands*” (combinação de argila, areia, água, betume e óleo) precisam de adaptações especiais para a exploração e serem utilizados como recursos naturais (TISSOT; WELTE, 1978). Porém, usualmente o petróleo é denominado de óleo cru, ao se referir a frações produzidas pelo refino, que basicamente consiste em uma destilação fracionada em que diferentes frações são retiradas ao decorrer de uma coluna (MONTAGNOLLI, 2011).

O petróleo e seus derivados são uma grande fonte energética, e conseqüentemente são utilizados potencialmente, mas durante a exploração, produção, refino, transporte e estoque dos produtos gerados há um número significativo de perdas e vazamentos acidentais (WARD et al. 2003). Estima-se que apenas a perda de óleo cru no meio ambiente seja de aproximadamente 200.000 toneladas por ano (KVENVOLDEN; COOPER, 2003).

Com a geração de poluentes pela indústria petrolífera, desde as etapas de exploração até a distribuição dos produtos comercializáveis, têm crescido os investimentos no que diz respeito à elaboração de processos preventivos aos lançamentos inadequados de material no meio, bem como projetos relacionados ao tratamento desses resíduos. Além de remediar os danos ambientais, tais iniciativas visam principalmente ampliar a margem de lucro, diminuindo os custos relacionados como pagamento de multas pela indústria e pela má fama deixada (OLIVEIRA; FRANÇA, 2014).

### **2.1.1 Derivados do petróleo**

Em sua forma natural o petróleo tem o uso limitado, entretanto, com o processamento do óleo cru através do refino é possível obter uma gama de produtos e derivados, com hidrocarbonetos de diferentes composições. No refino, o petróleo cru é convertido através de algumas etapas como a destilação, extração, catálise e purificação, onde os componentes químicos são distintos por suas diferentes propriedades físico-químicas, assim gerando produtos de composições diferentes (NRC, 1985).

Tais componentes são separados a partir do ponto de ebulição de cada um, através do processo de destilação fracionada. Após o fracionamento para a separação dos componentes do petróleo, algumas das principais frações obtidas, por ordem de mas leves a mais pesadas, são: fração gasosa, fração de gasolina e benzina, fração do querosene de aviação (QAV), fração do óleo diesel e óleos lubrificantes, e o resíduos. Ainda de acordo com NRC (1985), os derivados do petróleo não só apresentam

diferenças na composição como também podem causar efeitos ambientais distintos quando liberados na atmosfera, no solo ou em corpos d'água.

A gasolina é uma das frações mais leves do petróleo, tendo em sua composição hidrocarbonetos menos pesados e baixas concentrações de oxigenatos em comparação a outros combustíveis (FREUDENRICH, 2001). Composta por anéis aromáticos, alcenos e saturados, formando cadeias que variam de 4 a 12 carbonos, na gasolina também estão presentes baixas concentrações de compostos sulfurados, nitrogênio e metais, responsáveis pela sua instabilidade (STREVA; PASA; SODRÉ 2011). A presença de metais e altas quantidades de alcenos colaboram para processos oxidativos, acelerando-os e fazendo com que esse composto se torne mais denso (PEREIRA; PASA, 2005).

Quanto à composição do querosene, há uma mistura complexa de hidrocarbonetos com compostos que variam de 12 a 18 átomos de carbono e outros constituintes, como enxofre, nitrogênio e oxigênio (NEWELL; CONNOR, 1998). No Brasil há a produção de três tipos de QAV: QAV especial para a Marinha, QAV de uso geral (QAV-1) e BR Jet Plus, acrescido com anticongelante e antifúngicas (PETROBRAS, 2000).

Além de combustível, assim como a gasolina, o querosene pode ser utilizado de diferentes formas, mas ainda assim em determinados níveis pode ser tóxico, mutagênico e cancerígeno para os seres vivos em geral (PALMA – FLEMING et al. 2012). Contudo, em casos de contaminação, a gasolina por ser mais leve pode ser tratada por processos físico-químicos naturais de forma eficiente comparado ao querosene, que o processo de degradação pode levar meses, devido sua baixa volatilidade (GOMES et al. 2009).

Outro tipo de derivado do petróleo é o óleo diesel comercial, que também apresenta em sua composição uma mistura complexa de hidrocarbonetos, dependendo da origem do óleo cru usado no processo de destilação e das misturas anexadas à sua formulação final. A partir de técnicas de cromatografia, HPLC, foi determinada a abundância de componentes aromáticos e saturados, como cicloalcanos e cadeias ramificadas (PENET et al. 2004). Entretanto, a biodegradação desse composto é bastante debatida, pois em solo a degradação é incompleta e sua baixa biodegradabilidade é associada a limitações na transferência de hidrocarbonetos ou na pouca quantidade de oxigênio no meio (GALLEGO et al. 2001).

Outro tipo de derivado do petróleo são os óleos lubrificantes, capazes de tornar maior a duração e a autonomia dos motores através da lubrificação. Estes se diferem a

partir da origem ou do processo de produção, podendo ser minerais, sintéticos e semissintéticos. Os minerais são oriundos do refino, enquanto os sintéticos são produzidos a partir de reações químicas, enquanto os semissintéticos são fabricados a partir da mistura de dois ou mais tipos de óleos (MMA, 2006). Tais óleos são utilizados desde a lubrificação de rolamentos até maquinário industrial (AMUND, 1996).

Os óleos lubrificantes derivados do petróleo são constituídos de moléculas contendo 18 a 40 átomos de carbono em conformações básicas de hidrocarbonetos, além de átomos heterogêneos como enxofre, nitrogênio e oxigênio (MOURA et al. 2007). Cerca de 1% de todo petróleo consumido é usado na fabricação de lubrificantes e o comportamento ambiental desses óleos é a base para o desenvolvimento de novos fluidos, a fim de produzirem lubrificantes biodegradáveis com menor impacto ambiental e baixo custo (BARTS, 1998; GOYAN et al. 1998; EISENTRAEGER et al. 2002).

Após períodos prolongados, o uso do óleo lubrificante se torna inadequado, pois costumam ficar cheios de subprodutos resultantes de uma deterioração parcial, como compostos aromáticos polinucleares e oxigenados, resinas, aditivos, metais pesados e demais contaminantes (MOURA et al. 2007). Nesses casos, microrganismos como bactérias e fungos podem tornar o uso desses óleos inviável, pois esses organismos o utilizam como fonte de nutrientes a partir de substâncias orgânicas, através da biodegradação desses resíduos, ao metabolizar tais compostos (AHAD et al. 2000).

Embora alguns dos hidrocarbonetos do petróleo presentes nos ecossistemas se originem de fontes naturais, a maior parte da contaminação ambiental é decorrente de atividades antropogênicas, com alcance inestimável (MARGENSIN; SCHINNER, 1997). Assim, o tratamento de ambientes contaminados ainda é desafiante, pois os processos de descontaminação ainda são caros, demorados e nem sempre são totalmente eficazes (VASUDEVAN; RAJARAM, 2001).

## **2.2 Biorremediação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados**

A biorremediação é um método efetivo onde substâncias tóxicas e poluentes recalcitrantes são convertidos em produtos menos nocivos e ambientalmente benignos através da ação de microrganismos (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016). Uma das principais técnicas é a biodegradação, que consiste principalmente na transformação e degradação de substâncias poluentes do solo, da água ou de sedimentos através dos microrganismos (DEMNEROVA et al. 2005).

Apesar das técnicas de biodegradação empregarem processos químicos e físicos, os processos biológicos são mais destacados por conta do baixo custo e pela eficácia no processo de degradação de petróleo e outros contaminantes (FRANCO et al. 2004; AZEVEDO, 2010; LOPES, 2014). Além disso, a biorremediação é categorizada em *ex situ* e *in situ*. Os processos *ex situ* consistem em técnicas que envolvem a remoção física do material contaminado para que o mesmo possa ser tratado. Já as técnicas *in situ* o tratamento ocorre no próprio local contaminado (BOOPATHY, 2000).

A fim de aperfeiçoar o processo de biorremediação, algumas técnicas e estratégias foram desenvolvidas, entre as mais utilizadas estão a bioaugmentação e a bioestimulação (RAHMAN et al. 2003). Uma delas é a bioaugmentação, que consiste na adição de microrganismos autóctones ou alóctones competentes, com condições mínimas oferecidas, como nutrientes, temperatura adequada e pH ideal (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 1995). Já a bioestimulação é um processo onde ocorre a adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, visando estimular a atividade microbiana (JACQUES et al. 2006).

Para que tais técnicas sejam bem sucedidas é preciso que os microrganismos estejam em condições ambientais e fisiológicas favoráveis (ROSATO, 1997). Atualmente, conhece-se uma variedade de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos utilizando seu metabolismo. Contudo, quanto aos mecanismos de transformação desses substratos se faz necessária a presença de oxigênio para dar início ao ataque enzimático (ATLAS, 1995). Para isso, os microrganismos apresentam distintas formas de degradação aos substratos em questão, as bactérias utilizam como ponto de partida a oxidação, enquanto os fungos usam a hidroxilação para iniciar o processo de destoxificação (PEREIRA JR., 2009).

Desse modo, microrganismos como fungos filamentosos, leveduras, bactérias, cianobactérias, algas e protozoários são considerados bons agentes degradadores de diversas substâncias orgânicas presentes em efluentes e solos (URURAHY, 1998). Esses microrganismos vêm sendo apresentados como uma ótima alternativa aos métodos de tratamento convencionais, pois são excelentes assimiladores de substâncias como fonte de carbono, sendo assim, cada vez mais empregados em processos de remediação de áreas ambientais (ROSATO, 1997; DIAS, 2000).

As populações maiores e mais ativas desses microrganismos degradadores se encontram maiores e mais ativas nos locais contaminados. Amostras coletadas nestes locais permitem o isolamento de microrganismos em laboratório, que com as devidas

análises metodológicas comprovam a capacidade de degradação dos hidrocarbonetos contaminantes (JACQUES et al., 2007). Variadas vias metabólicas de degradação desses compostos já foram identificadas em microrganismos distintos, porém as mais estudadas são do metabolismo aeróbico realizado por bactérias, e em especial, os fungos (ARAÚJO, 2014).

### **2.3 Os fungos e seu potencial biotecnológico**

Os fungos se destacam por conta da morfologia robusta e sua diversa capacidade metabólica (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016). Além de serem decompositores e simbioses essenciais nos ecossistemas aquáticos ou solos, possuem um grande potencial na degradação de diversos poluentes. A partir de uma variedade de metabólitos extracelulares e sistemas enzimáticos intracelulares, como as peroxidases, as lacases e o citocromo P450, esses microrganismos conseguem remover ou diminuir a toxicidade em locais contaminados (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2004; SOTÃO; CAMPOS; COSTA, 2008).

A microrremediação é uma das vertentes da biorremediação, onde os fungos são utilizados na degradação de poluentes. Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias essenciais para seu desenvolvimento na natureza, onde geralmente se apresentam como moléculas insolúveis, as quais necessitam, primeiramente, serem degradadas em unidades mononuméricas solúveis antes de serem incorporadas (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Isso se justifica porque esses microrganismos absorvem os nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixo peso molecular dissolvidos em água, e a partir de exoenzimas que são secretadas, reduzem o tamanho dessas moléculas que atingem a solubilidade necessária (BAATH; SODESTROM, 1980). Essas ações enzimáticas são realizadas quando não há a presença de moléculas simples, onde o sistema regulador de incorporação de nutrientes é induzido à formação de enzimas para moléculas mais complexa (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Assim como as plantas em geral, os fungos possuem duas classes de nutrientes os macronutrientes e os micronutrientes. Entre os micronutrientes citados na literatura, está o ferro, o cobre, o manganês, o zinco e o molibdênio (PUTZKE; PUTZKE, 2002). A importância destes microelementos está ligada a produção de enzimas, ativadas pela presença mínima dos mesmos, ou por possuírem esses compostos em sua composição. Já os macronutrientes são: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio,

enxofre e magnésio, associados a processos bioquímicos importantes, no crescimento e no desenvolvimento desses microrganismos (GARRET; AMY, 1978).

De todos os macronutrientes citados, o carbono, além de ser o mais amplamente utilizado, é o mais exigido por ser um elemento estrutural associado ao oxigênio, hidrogênio e nitrogênio. Entre as fontes de carbono, a mais aproveitada é a glicose, sendo o carboidrato mais usado nos estudos com fungos. Contudo, vários gêneros fúngicos conseguem utilizar outros compostos como fonte energética, como é o caso do petróleo e seus derivados (HARTMAN; KEEN; LONG, 1972).

Dentro dos diversos tipos de substratos utilizados pelos fungos, Esses organismos possuem destaques na degradação de hidrocarbonetos do petróleo, como alcanos e outros aromáticos, a partir da sua atividade enzimática. (OLIVEIRA et al., 2008). Os hidrocarbonetos sofrem alterações em toda sua estruturação molecular pela biotransformação realizada a partir do metabolismo destes organismos (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011).

Isso se deve principalmente à natureza enzimática extracelular de alguns fungos, pois além da degradação dos substratos, essa atividade permite que esses microrganismos tolerem diferentes concentrações de substâncias químicas. Geralmente essas enzimas não apresentam natureza específica, permitindo que as mesmas possam agir numa gama diversa de compostos químicos (CERNIGLIA, 1997; BENNET; FAISON, 1997; AZEVEDO, 2010).

As enzimas são largamente conhecidas por catalizarem reações nos sistemas biológicos, atuando em substratos e condições específicas, como temperatura e pH. Diante disso, a utilização de enzimas produzidas por microrganismos é considerada uma opção vantajosa às técnicas de degradação, pois são apresentadas uma produção relativamente fácil, pois podem ser obtidas de origem natural a partir de uma variedade de microrganismos. Comumente se vê em dados da literatura a descrição que da produção de enzimas a partir de fungos, por vezes, considerada mais eficaz em relação aos outros microrganismos (SILVA; LOPES; SILVEIRA, 2009; OMURA, 1992; BRAVO et al. 2000; SOARES et al. 2000).

Dentre os processos de biodegradação de solos contaminados por hidrocarbonetos, os fungos filamentosos se mostram como uns dos principais biodegradadores por conta de alguns atributos, como seu crescimento micelial, que proporciona vantagem adaptativa em relação à colonização do substrato (VIEIRA, 2009). Assim como os fungos de solo, os fungos endofíticos também são destaque em estudos de remediação de ambientes

contaminados por derivados do petróleo. Os endofíticos são microrganismos que vivem uma parte ou todo seu ciclo de vida no interior de plantas, harmoniosamente, ao contrário dos fitopatógenos (AZEVEDO, 1999).

As propriedades desses fungos vêm tomando espaço na literatura, pois auxiliam na resistência dos vegetais em que hospedam a patógenos, ataques de herbívoros, através da produção de alcalóides, enzimas, antibióticos e outras substâncias que protegem e auxiliam a planta em condições de estresse. Como recompensa, esses microrganismos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira (AZEVEDO et al., 2000; OLIVEIRA, 2009).

Vários gêneros fúngicos vêm sendo descritos na literatura pela capacidade de degradar hidrocarbonetos. Alguns isolados de plantas e solos contaminados são corriqueiramente citados em estudos de despoluição ambiental em áreas contaminadas por hidrocarbonetos policíclicos e óleo diesel, como exemplo, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (BARBIERI, 1998; LIMA et al., 2006).

Por fim, a capacidade de degradação dos fungos não se limita a hidrocarbonetos. Eles também possuem a capacidade biodegradante em ambientes contaminados por outros compostos, como metais pesados, defensivos agrícolas, corantes e demais compostos nocivos, como os radioativos (AZEVEDO et al., 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a potencialidade de fungos isolados quanto à degradação de compostos derivados do petróleo, em áreas naturais e antropizadas de diferentes ecossistemas maranhenses.

#### **3.2 Específicos**

- Selecionar isolados fungicos representativos de diferentes áreas do estado do Maranhão nas coleções micológicas da UFMA;
- Realizar a identificação destes isolados através de caracteres morfológicos;
- Avaliar o potencial de degradação *in vitro* de derivados de petróleo pelos isolados selecionados;
- Comparar as frequências de isolados com potencial de biodegradação entre os diferentes locais de origem;
- Comparar o potencial de biodegradação de isolados originários de ambientes naturais com os de ambientes antropizados;
- Indicar isolados com potencial de biodegradação de petróleo para trabalhos futuros mais avançados de degradação do petróleo e seus derivados;



## REFERÊNCIAS

- AMUND, O. O. Utilization and degradation of an Ester-based synthetic lubricant by *Acinetobacter lwoffii*. **Biodegradation**, v. 7, p. 91-95, 1996.
- AHAD, J.M.E., LOLLAR, B.S., EDWARDS, E.A., SLATER, G.F., SLEEP, B. Carbon isotope fractionation during anaerobic degradation of toluene: implications for intrinsic bioremediation. **Environ Sci Technol.** 34: 892–896.2000.
- ARAÚJO, S. P. Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. **Tese de Doutorado** (Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
- AZEVEDO, L. M. Potencial de degradação de petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal impactado. **Dissertação** (mestrado). Universidade Federal do Pernambuco, Pernambuco. 2010.
- APRIL, T.M., FOGHT, J. M., CURRAH, R.S. Hydrocarbondegrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 46, no. 1, pp. 38–49, 2000.
- ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbons degradation-bioremediation of soils spills. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, 52, 149-156, 1995.
- AZEVEDO, L. M. Potencial de degradação de petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal impactado. **Dissertação** (mestrado). Universidade Federal do Pernambuco, Pernambuco. 2010
- BAATH, E; SODESTGROM, B. Degradation of macromolecules by microfungi isolated from different podzolic soil horizons. **Canadian Journal of Botany**, n. 58, p. 422-425, 1980.
- BARBIERI, S. M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds) **Microbiologia Ambiental**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 242 p. Jaguariúna, 1998.

BANAT, I.; M; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential comercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, 53, 495-508, 1995.

BARTZ, W. J. Lubricants and the environmental. **Tribology International**, v. 31, p. 35-47, 1998.

BENNETT, J.W.; FAISON, B.D. Use of fungi in Biodegradation. In: HURST, C. J.; PRESS, A.S.M. **Manual of Environmental Microbiology**. P. 758-765. Washington. EUA, 1997.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R.J.H.C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**. V. 24, n. 1, p. 137- 152, jan/fev. 2000.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.19, n. 5-6, p.324-333, 1997.

DEMNEROVA, K.; MACKOVA, M.; SPEVAKOVA, V.; BERANOVA, K.; KOCHANKOVA, L.; LOVECKA, P.; RYSLAVA, E.; MACEK, T. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics characterization of microbial populations. **International Microbiology**, v.8, n. 3, p.205–211, 2005.

DESHMUKH, Radhika; KHARDENAVIS, Anshuman A.; PUROHIT, Hemant J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016.

EISENTRAEGER, A.; SCHMIDT, M.; MURRENHOFF, H.; DOTT, W.; HAHN, S. Biodegradability testing of synthetic ester lubricants – effects of additives and usage. **Chemosphere**, v. 48, p. 89–96, 2002.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Educs**. Caxias do Sul, 2004.

FRANCO, I.; CONTIN, M.; BRAGATO, G.; DE NOBILI, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**. 121: 17-30. 2004.

FREUDENRICH, C. C. **How Oil Refining Works**. HowStuffWorks Inc, Atlanta, 2001. Disponível em <<http://www.howstuffworks.com/environmental/energy/oilrefining.htm>>

GALLEGO, J. L.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VAZQUEZ, F., SANCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v. 12, p. 325–335, 2001.

GARRET, R. H.; AMY, N. K. Nitrate assimilation in fungi. **Adv. Microb. Physiol.** N 18, p. 1-65, 1978.

GOMES, E.B., SORIANO, A.U., MIRANDA, R.C.M., SOUZA, M.F.V.Q. & PEREIRA JR., N. 2009. Biodegradation of stored Jet fuel by a *Nocardia* sp. Isolated from contaminated soil. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 52(5): 1279-1284.

GOYAN, R. L.; MELLEY, R. E.; WISSNER, P. A.; ONG, W. C. Biodegradable Lubricants. **Lubrication Engineering**, v. 54, p. 10-17, 1998.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D. WICK, L. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews, microbiology**, 9, 177-192, 2011.

HARTMAN, R.E.; KEEN, N.T.; LONG, M. Carbon dioxide oxidation by *Verticillium albo-atrum*. **Journal of General Microbiology**, n.73, p. 29-34, 1972.

JACQUES, R.S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**. 37 (4): 1192-1201. 2007.

KARLSEN, D. A.; LARTER, S. R. Analysis of petroleum fractions by TLC-FID: applications to petroleum reservoir description. **Organic Geochemistry**, v. 17, p. 603-617, 1991.

KVENVOLDEN, K. A.; COOPER, C. K. Natural seepage of crude oil into the marine environment. **Earth and Environ Sciences**, v. 23, p. 140-146, 2003.

KILLOPS, S. D.; AL-JUBOORI, M. A. H. A. Characterisation of the unresolved complex mixture (UCM) in the gas chromatograms of biodegraded petroleum. **Organic Geochemistry**, v. 15, p. 147-160, 1990.

LIMA, C. J. B. Bolner. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. **Tese (Doutorado)**. Apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química-Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Uberlândia, 2007.

LOPES, P. R. M. "Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI." (2014): 183-f.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation of diesel oil contaminated alpine soils at low temperatures. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 462-468, 1997.

MATAR, S.; HATCH, L. F. Chemicals based on propylene. **Chem. of Petrochemical Processes, Gulf Pub. Co., Houston**, p. 207-232, 1994.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Gestão de óleo lubrificante automotivo usado em oficinas automotivas**. Brasil, 2006.

MONTAGNOLLI, Renato Nallin. Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rios Claros. 2011.

MOURA, F. E.; PRASAD, S.; LEITE, V. D.; MORAIS, R. S.; BARROS, A. J. M, SOUZA, A. G. Thermogravimetric study of aerobic biodegradation of sanitary sewage

sludge and lubricating oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 679-683, 2007.

NEWELL, C.J.; CONNOR, J.A. Characteristics of Dissolved Petroleum Hydrocarbons Plumes: Results from four Studies. API Soil/Groundwater Technical Task Force. **American Petroleum Institute**, v 11. Washington D.C, 1998.

NITSCHKE, M.; PASTORE G. M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 63-67, 2003.

NRC - National Research Council. **Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects**. National Academy Press, Washington, 1985.

OLIVEIRA, F. J. S.; DE FRANÇA, F. P.; The use of biostimulation and intrinsic bioremediation for crude-oil contaminated sandy soil treatment, **Solos e Rochas - Revista Brasileira de Geotecnia**, v. 27, p. 287-292, 2004.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J.; BARROS, C.; LEITE, S. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: Estado da Arte. Série **Tecnologia Ambiental**, 45. CETEM/MCT. Rio de Janeiro, 67, 2008.

OMURA, S. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. **Journal of Industrial Microbiology**, Heidelberg, v.10, p. 135-156, 1992.

PACHECO, G. J. Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos. **Dissertação** (Mestrado em Química). Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.58, p.254-260, 2006.

PALMA-FLEMING, H., QUIROZ, R.E., CAMPILLAY, C., FIGUEROA, M., VARAS, A., VELÁSQUEZ, D. & PALMA-LARREA, B.J.X. Temporal and spatial trends of total aliphatic hydrocarbons of diesel range and trace elements in sediments and mussel

of the corral bay area, Valdivia, South Central Chile. **Journal of the Chilean Chemical Society**, 57(2): 1074-1082, 2012.

PEIXOTO, R. M. Bioprospeção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes. **Dissertação** (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2008.

PENET, S.; MARCHAL, R.; SGHIR, A.; MONOT, F. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p. 40–47, 2004.

PEREIRA-JR, N.; GOMES, E. B.; SORIANO, A. U. Biodegradação de hidrocarbonetos. **Rio de Janeiro: Escola de Química**, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

PINTO, M.; MARTINS, R.; COSTA, J. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes. **Química nova**, v.32, nº. 8, p. 2104-2108, 2009.

PEREIRA, R. C. C.; PASA, V. M. D. Effect of alcohol and copper content on the stability of automotive gasoline. **Energy Fuel**, v. 19 p. 426–432, 2005.

PETROBRAS. Querosene de Aviação QAV-1, Rio de Janeiro; Petrobras, 25 F, 2000.

PIRÔLLO, M. S. Estudo da produção de Biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. **Dissertação** (Mestrado em Biociências) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2006.

PUTZKE, Jair; PUTZKE, Maria Terezinha Lopes. **Os reinos dos fungos**. vol 2, 2002.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. **Journal of Basic Microbiology**, v. 4, p. 284-291, 2002.

READMAN, J. W.; FOWLER, S. W.; VILLENEUVE, J. P.; CATTINI, C.; OREGIONI, B.; MEE, L. D. Oil and combustion-product contamination of the Gulf marine environment following the war. **Nature**, v. 358, p. 662-665, 1992.

SILVA, L. D.; LOPES, F. C.; SILVEIRA, S. T.; BRANDELI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 152, n. 2, p 295 – 305. Clinton, 2009.

SOTÃO, H.M.P.; CAMPOS, E.L. de; COSTA, S. do P.S.E. Micologia diversidade dos fungos na Amazônia. **Série Cadernos de Alfabetização científica**, v.1, 2004. Disponível em: <[dcc.ifpa.edu.br/index.php?option=com\\_docman&tas=doc](http://dcc.ifpa.edu.br/index.php?option=com_docman&tas=doc)> Acesso em 24 de abril de 2018.

SOUZA FILHO, A. M. Planos Nacionais de Contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise de países representativos das Américas para implantação no caso do Brasil. **Dissertação** (Mestrado em Ciências), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

SOARES, I. A.; FLORES, A.C.; ZANETTIN, L.; PIN, H.K.; MENDONÇA, M.M., BARCELOS, R.P.; TREVISOL, L.R. CARVALHO, R.S.; SCHAUREN, D. ROCHA, C.L.M.S.C.; BARONI, S. Identification of the amylolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 30, n. 3, p. 700-705. Campinas, 2010.

STREVA, E. R.; PASA, V. M. D.; SODRÉ, J. R. Aging effects on gasoline–ethanol blend properties and composition. **Fuel**, v. 90, p. 215-219, 2011.

TESTA, S. M.; WINEGARDNER, D. L. Restoration of Contaminated Aquifer: Petroleum Hydrocarbons and Organic Compounds. **Lewis Publishers**, Chelsea, 2000.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H. **Petroleum formation and occurrence**. Springer-Verlag, Berlin, 1978.

TONINI, R.; REZENDE, C. E.; GRAVITOU, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, 14, 4, 1027-1035, 2010.

ULRICI, W. Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants. **Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology**, H. J. Rehm and G. Reed, Eds., vol. 11, pp. 5–42, 2000.

URURAHY, A.F.P.; PEREIRA Jr, N.; MARINS, M. D. M. Desempenho de um Biorreator do Tipo CSTR no Processo de Degradação de Borra Oleosa. **Boletim Técnico PETROBRÁS**, Rio de Janeiro, 41 (3/4): 125-132. 1998.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental International**, v. 26, p. 409–411, 2001.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 260–270, 2003.



1 **Potencial de fungos isolados no estado do Maranhão na biodegradação de**  
2 **derivados do petróleo.**

3 Mairla Santos COLINS<sup>1\*</sup> Juliano dos SANTOS<sup>2</sup>

4 <sup>1</sup>Departamento de Biologia - Universidade Federal do Maranhão, Avenida dos  
5 Portugueses, 1966, Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, Maranhão, Brasil.

6 <sup>2</sup>Centro de Ciências Humanas, Naturais, da Saúde e Tecnológicas, Universidade Federal  
7 do Maranhão, Campus Pinheiro, Pinheiro, Maranhão, Brasil.

8 \*Autor para correspondência: [mairlascollins@gmail.com](mailto:mairlascollins@gmail.com)

9

10 **Resumo:** O petróleo é uma das fontes energéticas mais utilizadas, responsável por 40%  
11 da produção da energia mundial, sendo também uma das principais causas de  
12 contaminação ambiental do solo e da água. Para a remediação dos ambientes  
13 contaminados faz-se o uso de várias técnicas, onde destaca-se a biorremediação. O  
14 objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de fungos isolados no estado do  
15 Maranhão na biodegradação de derivados do petróleo. Os fungos foram submetidos a  
16 testes de biodegradabilidade *in vitro* em tubos de ensaio contendo meio de cultura  
17 específico para o teste, o derivado petrogênico e o indicador de degradação, o redox 2,6-  
18 diclorofeno-indofenol. Com os resultados obtidos a partir dos dados colorimétricos,  
19 nossos dados sugerem que os fungos isolados no Maranhão apresentam potencial de  
20 biodegradação de derivados de petróleo. Contudo, se faz necessário estudos  
21 complementares que possam caracterizar e quantificar a biodegradação do petróleo por  
22 estes fungos em cada área.

23 **Palavras-chave:** microrganismos, biorremediação, gasolina, óleo diesel, querosene.

24

25 **Abstract:** Petroleum is one of the most widely used energy sources, responsible for  
26 40% of the world's energy production, and is also a major cause of environmental  
27 contamination by petroleum and its products. For the remediation of the contaminated  
28 environments is used several techniques, where the bioremediation is emphasized. The  
29 objective of the present study was to evaluate the potential of isolated fungi in the state  
30 of Maranhão in the biodegradation of petroleum products. The fungi were submitted to  
31 in vitro biodegradability tests in test tubes containing the specific medium for the  
32 analysis, the petrogenic derivative and the degradation indicator, the redox, 2,6-  
33 dichlorophen-indophenol. With the results obtained from the colorimetric data, our data  
34 suggest that many isolated fungi in Maranhão have potential for the biodegradation of  
35 petroleum derivatives. However, further studies are needed to better characterize fungal  
36 diversity in each area.

37

38 **Keywords:** microorganisms, bioremediation, gasoline, diesel, kerosene

39

40

## 41 **1. Introdução**

42 Os produtos à base de petróleo e seus derivados constituem a principal fonte  
43 energética para o ramo industrial e para vida diária, responsável por 40% da produção  
44 de energia mundial (Das & Chadran 2011). Contudo, com o desenvolvimento da cadeia  
45 de produção petrolífera, aumentaram os impactos ambientais. Muitas fontes de petróleo  
46 são necessárias para atender a demanda mundial, processos como o refino,  
47 armazenamento e transporte do óleo são constantemente necessários e corriqueiros  
48 (Kvenvolden & Cooper 2003). Com o aumento da sua exploração e comercialização,  
49 houve um aumento significativo do derramamento acidental e do rejeito indevido,

50 considerados uma das principais causas de poluição do solo e da água (Souza-Filho  
51 2006).

52 Além de ter uma mistura de hidrocarbonetos em sua composição, o petróleo  
53 também é composto de outros componentes orgânicos, como metais e demais químicos  
54 tóxicos, que são difíceis de degradar (Medina-Bellver *et al.* 2005). Os produtos de  
55 origem petrogênica estão entre os poluentes mais persistentes no meio ambiente, e além  
56 de tóxicos ao meio ambiente, podem apresentar propriedades mutagênicas e  
57 carcinogênicas (Ulrici 2010). A maior parte dos hidrocarbonetos derivados do petróleo é  
58 passível de degradação a partir de técnicas de remediação, porém, o processo de  
59 descontaminação pode ser lento, gradual, caro e ineficaz (Tonini *et al.* 2010).

60 Como alternativa, surge a biorremediação, definida como o uso de  
61 microrganismos no processo de desintoxicação e remoção de poluentes através das suas  
62 diversas capacidades metabólicas (Ahad *et al.* 2000). Além disso, a biorremediação  
63 representa um dos principais métodos efetivos na remoção de hidrocarbonetos poluentes  
64 de ambientes contaminados, tendo em vista que alguns microrganismos são capazes de  
65 o petróleo e seus derivados como fonte energética (April *et al.* 2000).

66 Entre os principais microrganismos utilizados em processos de degradação do  
67 óleo, estão os fungos, que se destacam por sua morfologia robusta e sua alta capacidade  
68 metabólica (Deshmukh *et al.* 2016; Marchand *et al.* 2017). Isolados fúngicos de plantas  
69 ou de solos contaminados são regularmente citados em pesquisas que visam à  
70 despoluição ambiental, por conta da sua capacidade de degradar hidrocarbonetos  
71 policíclicos e óleos, como os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*  
72 (Novotny *et al.* 2004; Marco-Urrea *et al.* 2015).

73           Desse modo, esse trabalho tem como objetivo avaliar a potencialidade de fungos  
74 isolados de diferentes ecossistemas maranhenses quanto à degradação de compostos  
75 derivados do petróleo, em áreas naturais e antropizadas.

## 76       **2. Material e Métodos**

### 77       **2.1 Local de estudo e material biológico**

78       O trabalho foi conduzido no Laboratório de Ecologia Vegetal do Departamento de  
79 Biologia e no Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada –  
80 NIBA, ambos localizados na Cidade Universitária Dom Delgado, Universidade Federal  
81 do Maranhão.

82       Os isolados fúngicos utilizados foram disponibilizados pela micoteca do NIBA e  
83 pela coleção de fungos do Grupo de Pesquisa em Diversidade e Ecologia Microbiana –  
84 GPDEM/UFMA, resultantes de pesquisas prévias. Os isolados foram selecionados de  
85 acordo com a sua origem (diferentes áreas do estado do Maranhão), de maneira que  
86 representassem ambientes distintos, variando de áreas muito ou pouco impactadas  
87 (tabela).

88       Desse modo, foram utilizados fungos provenientes do Cerrado maranhense,  
89 coletados no Parque Nacional da Chapada das Mesas e no Complexo Turístico da Pedra  
90 Caída, ambos localizados na região do município de Carolina. Além do Cerrado, regiões  
91 da Ilha de Upaon-Açu naturais ou fortemente impactadas pela ação antrópica também  
92 foram representadas, como a Laguna da Jansen e regiões adjacentes ao Aterro Sanitário  
93 da Ribeira.

### 94       **2.2 Seleção de isolados fúngicos**

95       Foram selecionados 30 isolados de fungos para serem submetidos a testes de  
96 biodegradabilidade *in vitro* em tubos de ensaio contendo o meio específico para o teste, o  
97 derivado petrogênico e o indicador de degradação.

## 98        **2.3 Derivados do petróleo**

99        Os derivados de petróleo utilizados nos ensaios de biodegradação foram: gasolina  
100 comum, óleo diesel B S10, óleo lubrificante automotivo sintético 5W-30 e querosene. A  
101 gasolina e o óleo diesel foram analisados, certificados e cedidos pelo Laboratório de  
102 Análise e Pesquisa em Química Analítica de Petróleo e Biocombustíveis, LAPQAP –  
103 UFMA. Já o óleo lubrificante automotivo e o querosene foram obtidos comercialmente.

104        Apesar de não ser um derivado do petróleo, o óleo lubrificante automotivo sintético  
105 foi incluído nos testes por sua maior vida útil, alta taxa de uso e, conseqüentemente,  
106 seus impactos causados ao meio ambiente.

## 107        **2.4 Avaliação do potencial de biodegradação por indicador redox DCPIP**

108        Para avaliar o potencial de degradação dos petroderivados foi utilizado a  
109 colorimetria aplicada a estudos de biodegradação a partir do indicador redox, 2,6-  
110 diclorofeno-indofenol, o DCPIP. Tal técnica se fundamenta na mudança de cor do  
111 indicador quando reduzido. Quando o indicador DCPIP está oxidado apresenta a  
112 coloração azul, e quando está reduzido é incolor. A alteração na coloração desse  
113 composto deve-se a uma mudança na ligação dupla entre nitrogênio e carbono para uma  
114 ligação simples, reduzindo o composto e modificando a coloração, de azul para incolor  
115 (Figura 1) (Bidoia *et al.* 2010).

116        Para este trabalho foi elaborada uma escala de intensidade azul proporcionado pelo  
117 indicador DCPIP em comparação com o tratamento controle (Figura 2), sendo possível  
118 diferenciar quatro níveis: nível 0 (sem degradação aparente, intensidade do corante igual  
119 ao controle), nível 1 (baixa degradação, intensidade do corante levemente alterada em  
120 relação ao controle), nível 2 (degradação intermediária, intensidade do corante bastante  
121 alterada em relação ao controle) e nível 3 (degradação elevada, corante totalmente  
122 oxidado, meio incolor).

## 123 **2.5 Ensaios de biodegradação**

### 124 **2.5.1 Meio de cultura**

125 O meio de cultura para os ensaios de biodegradação foi o meio mineral Ágar  
126 Bushnell-Haas adaptado, ou meio BH ( $\text{MgSO}_4$  0,2 g L<sup>-1</sup>,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g L<sup>-1</sup>,  
127  $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$  1,0 g L<sup>-1</sup>,  $\text{KNO}_3$  1,0 g L<sup>-1</sup>,  $\text{FeCl}_3$  0,05 g L<sup>-1</sup>,  $\text{CaCl}_2$  0,2 g L<sup>-1</sup>). Segundo  
128 Mariano (2006), tal meio é indicado em ensaios de biodegradação de hidrocarbonetos  
129 por microrganismos, onde o crescimento destes microrganismos evidencia a utilização  
130 destes compostos como única fonte de carbono.

### 131 **2.5.2 Composição dos tubos de ensaios**

132 Cada isolado foi submetido a cinco tratamentos, os quatro derivados de petróleo  
133 citados, além de um tratamento controle, onde no lugar do derivado de petróleo foi  
134 adicionada água destilada. Desse modo, os tubos eram compostos da seguinte forma:  
135 3,5 mL de Meio BH adaptado; 1,0 mL de DCPIP; 0,5 mL do derivado (gasolina/óleo  
136 automotivo/óleo diesel/querosene), salvo os controles negativos que ao invés do  
137 derivado possuíam 0,5mL de água destilada. A cada tubo foram adicionados dois discos  
138 de micélio de 5 mm de diâmetro de cada isolado de fungo testado.

## 139 **2.6 Delineamento experimental e análises de dados**

140 O experimento foi conduzido em esquema fatorial, utilizando 33 isolados fúngicos  
141 com cinco tratamentos, sendo quatro derivados de petróleo e um tratamento controle,  
142 em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os dados  
143 categóricos (degradação e não-degradação) foram comparados através de testes não  
144 paramétricos. Foi calculada ainda a frequência de isolados com potencial biodegradador  
145 para cada região.

## 146 **3. Resultados**

147 Os resultados demonstram que muitos fungos isolados no Maranhão apresentam  
148 potencial de biodegradação de derivados de petróleo. Dos 30 isolados testados, 25  
149 apresentaram resultados satisfatórios. A Figura 2 ilustra alguns resultados obtidos nos  
150 ensaios com o meio BH e o indicador DCPIP. Quando comparados ao tratamento  
151 controle do experimento, a maioria dos fungos apresentaram algum nível de degradação  
152 já nas primeiras 24h, pois aparentemente consomem o petróleo provocam a  
153 descoloração do meio devido a redução do indicador. Mais da metade dos fungos  
154 testados apresentação moderada ou elevada biodegradação de óleo de motor e gasolina  
155 (Figura 3). Este número diminuiu quando estes foram testados frente a óleo diesel e  
156 querosene, respectivamente.

157 Na Tabela 1, encontram-se os resultados individuais de cada isolado. Para a  
158 avaliação dos resultados, estes foram ainda separados por local de origem e pelo tipo de  
159 ambiente: natural, quando isolados de locais onde não há interferência acentuada do  
160 homem, e antropizado, quando há impacto ambiental direto ou indireto pela ação  
161 humana.

162 Dentre os fungos analisados, oito deles apresentaram destaque pelo elevado  
163 nível de degradação frente aos quatro derivados de petróleo (Tab 1). Destes oito, dois  
164 são isolados do Aterro Sanitário da Ribeira, dois do solo às margens da Lagoa da  
165 Jansen, ambientes fortemente impactados, e quatro isolados de plantas de cerrado do  
166 Parque Nacional da Chapada das Mesas.

167

#### 168 **4. Discussão**

169 Sendo os microrganismos, em especial os fungos, importantes agentes no  
170 processo de desintoxicação e remoção de poluentes através das suas diversas  
171 capacidades metabólicas, este trabalho teve o objetivo de avaliar e selecionar isolados

172 fúngicos de diferentes áreas e ambientes do estado do Maranhão com potencial de  
173 biodegradação de derivados de petróleo, através de ensaios in vitro utilizando indicador  
174 redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP).

175 O método do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) apresentou-se  
176 eficiente e em tempo menor foi capaz de selecionar microrganismos com habilidades  
177 para degradar os hidrocarbonetos de petróleo e derivados. Os hidrocarbonetos são  
178 substratos que requerem um aceptor de elétrons para a oxidação de um estágio inicial  
179 até sua forma reduzida. É essa reação redox que é indicada na mudança de coloração  
180 do indicador DCPIP, de azul (oxidado) a incolor (reduzido), o que pode acontecer entre  
181 24 e 48 horas (Marchand *et al.* 2017). Em comparação com os controles negativos de  
182 cada isolado fúngico, percebeu-se que a coloração dos tratamentos com derivados de  
183 petróleo era bem mais clara, indicando que em tais tratamentos houve atividade e  
184 crescimento microbiano, ou seja, infere-se que esses microrganismos utilizaram esses  
185 derivados como substrato.

186 No início do processo de biodegradação, os hidrocarbonetos são utilizados pelos  
187 microrganismos como fonte de energia (doadores de elétrons), enquanto os nutrientes  
188 (oxigênio molecular, nitratos, sulfatos ou íon férrico) são necessários como receptores  
189 de elétrons para a atividade microbiana. Ao final do processo os hidrocarbonetos são  
190 transformados em metabólitos, tais como ácidos orgânicos e/ou CO<sub>2</sub>,<sup>16</sup> levando a uma  
191 diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados (Cruz & Marsaioli, 2012).

192 Com os dados colorimétricos obtidos, é possível também inferir sobre a  
193 biodegradabilidade dos diferentes derivados, com base nas sua composição química. Em  
194 geral, nos ensaios que possuíam óleo lubrificante automotivo sintético, foi possível  
195 perceber que a descoloração aconteceu de forma rápida e efetiva. Isso pode ser  
196 explicado pelo fato de que tal óleo não é um derivado do petróleo, e sim resultado de



197 reações químicas e adição de aditivos, apesar de indiretamente possuir reagentes  
198 derivados do petróleo em sua fabricação (Poletto, 2010). Um exemplo disso é a  
199 presença de Polibutenos na composição desse tipo de óleo, que são produzidos a partir  
200 da polimerização do isobuteno. Esses compostos são bastante importantes para a  
201 melhora da viscosidade, porém, são menos resistentes à oxidação (Silva, 2011). Além  
202 disso, a composição desse tipo de óleo, obtida pela transformação de hidrocarbonetos de  
203 baixo peso molecular a partir de reações químicas de polimerização de insumos  
204 provenientes da indústria petroquímica, é considerada mais leve em comparação aos  
205 produtos de origem mineral, o que pode explicar a biodegradação obtida nos ensaios *in*  
206 *vitro*.

207         A gasolina foi o segundo composto que descoloriu mais rápido, o que pode ser  
208 explicado por suas concentrações baixas de oxigenatos e a presença de hidrocarbonetos  
209 de cadeia leve (Streva *et al.* 2011), facilitando a oxidação pelos fungos. Além disso, na  
210 sua composição estão presente uma grande quantidade de alcenos, e esses compostos  
211 são facilmente biodegradados, pois ativam enzimas, chamadas monooxigenases, que  
212 após serem carboxiladas, ativam o metabolismo dos microrganismos (Ensign 2001).

213         Já o óleo diesel é mais denso que a gasolina, com cadeias de hidrocarbonetos  
214 mais pesadas (Montagnolli 2011). O diesel, em relação à gasolina, apresenta moléculas  
215 com tamanhos maiores de cadeias, o que confere na maior massa específica (Mariano  
216 2006). Isso pode explicar a baixa taxa de degradação, pois os fungos têm preferência  
217 por moléculas simples e de baixo peso molecular. Moléculas com peso maiores  
218 requerem a atividade de enzimas, até que se atinja a solubilidade necessária para  
219 absorção, o que pode ser mais demorado (Putzke & Putzke 2002).

220         O querosene também é mais denso que a gasolina, apresentando em sua  
221 composição uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros constituintes, como

222 metais pesados e oxigenatos. Trabalhos como Montagnolli (2011) e Cruz (2012),  
223 afirmam que para melhores resultados na degradação desse composto é indicado o uso  
224 de biossurfactantes ou o uso de consórcios microbianos.

225 Com relação aos locais amostrados, percebe-se uma leve diferença na  
226 biodegradação dos derivados de petróleo entre os isolados fúngicos da Ilha de Upaon-  
227 Açú, São Luis, MA e os isolados de Carolina, MA. Estes últimos, de ambiente  
228 tipicamente de cerrado, apresentaram níveis de degradação mais homogêneos entre os  
229 quatro produtos testados, ou seja, degradação discretamente menor de óleo sintético e  
230 gasolina e maior de óleo diesel e querosene quando comparados aos demais locais (Fig.  
231 3). Estes dados sugerem que a diversidade fúngica dos dois ambientes pode influenciar  
232 e ser determinante na prospecção de microrganismos de interesse, já que a  
233 biodegradação total do petróleo tanto em laboratório quanto em ambientes naturais, não  
234 pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que os poluentes são  
235 constituídos por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum micro-organismo é capaz de  
236 degradar sozinho todos os componentes presentes no ambiente contaminado. (Pereira &  
237 Freitas, 2012).

238 Foi possível observar também que fungos isolados de áreas com intensa  
239 atividade humana, em geral, apresentaram níveis de biodegradação maior para óleo  
240 sintético e gasolina. Entretanto, alguns fungos do gênero *Aspergillus* oriundos dessas  
241 localidades demonstraram ter potencial para degradar todos os compostos utilizados.  
242 Soares *et al.* (2011) ressalta que fungos desse gênero são bons agentes biodegradadores  
243 frente a ambientes contaminados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs),  
244 compostos fenólicos, benzenos, e demais derivados do petróleo. Além disso,  
245 microrganismos presentes em ambientes impactados auxiliam na seleção das linhagens  
246 hábeis na degradação desses compostos (Morais 2005).

247           Microorganismos capazes de degradar hidrocarbonetos podem ser encontrados  
248 também em áreas menos impactadas, ou até mesmo em locais onde nunca houve contato  
249 com contaminantes (Morais 2005). Os fungos endofíticos isolados de áreas naturais,  
250 com menos efeito antrópico, foram mais eficientes para degradar querosene e óleo  
251 diesel. Contudo, quatro desses fungos apresentaram potencial biodegradador para todos  
252 os compostos testados. Os microrganismos endofíticos vivem dentro das plantas sem  
253 causar danos aparentes e auxiliam na sobrevivência do vegetal, fornecendo substâncias  
254 que a protegem em troca de nutrientes (Azevedo *et al.* 2000). Quando expostos a  
255 condições de estresse, esses vegetais estimulam tais microrganismos a defenderem de  
256 agentes tóxicos, como os hidrocarbonetos, utilizados como fonte de carbono por esses  
257 endófitos (Siciliano *et al.* 2001).

258           Além disso, a discrepância de degradação dos compostos por área pode ser  
259 explicada pelo fato de que, embora uma gama de contaminantes possa ser metabolizada  
260 pelos mesmos microrganismos, alguns são degradados mais facilmente que outros (Dua  
261 *et al.* 2002). A atividade metabólica na degradação pode variar entre os  
262 microrganismos e, em muitos casos, a degradação só é efetiva quando a estrutura  
263 molecular do composto permite a ação de enzimas hábeis, apresentando uma relação de  
264 especificidade. Este processo é mais provável quando a estrutura química do  
265 xenobiótico é semelhante à moléculas naturalmente incorporada por esses  
266 microrganismos (Gaylard *et al.* 2005).

267           No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, por apresentarem composições  
268 distintas, a maioria não é metabolizada da mesma forma. A velocidade da degradação  
269 pode estar ligada a vários fatores, como a concentração do contaminante e a eficácia da  
270 atividade metabólica dos microrganismos (Andrade *et al.*2010). Nesse contexto, a

271 junção de microrganismos habéis pode catalisar a degradação do contaminante,  
272 reforçando a importância do uso de consórcios microbianos (Araújo 2009).

273 Para Mariano *et al.* (2008), os consórcios microbianos são bastante indicados  
274 para estudos *in situ*, entretanto, para o uso desses consórcios se faz necessário o  
275 conhecimento da capacidade individual de biodegradação dos isolados a serem  
276 utilizados, a fim de que haja um sinergismo na degradação. Para isso, testes rápidos  
277 como o teste de colorimetria utilizando DCPIP são utilizados para a obtenção desses  
278 dados (Oliveira 2009). Sendo assim, a partir dos dados colorimétricos obtidos, foi  
279 possível inferir a capacidade individual de biodegradação de cada isolado fúngico  
280 utilizado, podendo assim, utilizá-los em consórcio em futuros ensaios de biodegradação.

281 Contudo, se faz necessário outros estudos que possam caracterizar melhor a  
282 diversidade de fungos em cada área. pois pouco se sabe sobre os microrganismos do  
283 estado do Maranhão e sua potencialidade de degradação. Sendo assim, destaca-se a  
284 importância de se conhecer melhor o potencial biotecnológico da biodiversidade  
285 do estado, a fim de se obter informações que consolidem estudos de degradação de  
286 derivados de petróleo.

## 287 **5. Conclusão**

288 A maioria dos fungos representa organismos robustos, que apresentam  
289 tolerância significativa à altas concentrações de poluentes, e por isso têm sido  
290 amplamente estudados desde meados dos anos 80, porém, ainda se sabe muito pouco  
291 sobre sua diversidade e fisiologia. A pesquisa e o uso de microrganismos isolados de  
292 diferentes localidades com graus diferentes de antropização é uma estratégia importante  
293 para seleção de agentes biodegradadores destas áreas. Os estudos em biorremediação  
294 visam uma série de benefícios para o meio ambiente, tendo em vista que há variados  
295 poluentes e que o uso dos microrganismos são mais eficazes, baratos e específicos.

296 Há uma grande diversidade de microrganismos a ser descoberta nos  
297 ecossistemas, e a busca por eles é imprescindível para novas perspectivas à frente de  
298 processos de recuperação ambiental. Porém, o empenho científico não solucionará  
299 sozinho todos os problemas ou reverterá todos os danos causados. É necessário que os  
300 conceitos da biorremediação seja trabalhado em âmbito social e cultural, a fim de  
301 sensibilizar a sociedade como um todo. A remediação de áreas contaminadas é essencial  
302 pois, além do efeito visual e protetor, em geral, é uma exigência legal e um  
303 compromisso social que precisam ser concretizados.

304

### 305 **Agradecimentos**

306 Os autores agradecem ao Grupo de Pesquisa em Ecologia e Diversidade  
307 Microbiana - GPDEM, ao Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal, e ao Núcleo  
308 de Pesquisa em Microbiologia Aplicada - NIBA, por todo suporte técnico e espaço  
309 cedido. Ao Laboratório de Análise e Pesquisa em Química Analítica de Petróleo e  
310 Biocombustíveis, LAPQAP – UFMA, pelas análises e certificações dos combustíveis  
311 concedidos. Ao Programa de Educação Tutorial, PET Biologia, pela concessão de bolsa  
312 durante o período de estudo.

313

314

315

316

317 **Bibliografia citada**

- 318 Ahad, J.M.E.; Lollar, B.S.; Edwards, E.A., *et al.* 2000. Carbon isotope fractionation  
319 during anaerobic degradation of toluene: implications for intrinsic bioremediation.  
320 *Environ Sci Technol.* v 34: p 892–896.
- 321 Andrade, J.A.; Augusto, F.; Jardim, I.C.S.F. 2010. Biorremediação de solos  
322 contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, São Paulo, v 35, p 17-  
323 43.
- 324 April, T.M.; Foght, J. M.; Currah, R.S. 2000. Hydrocarbondegrading filamentous fungi  
325 isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of*  
326 *Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 38–49.
- 327 Araújo, S.P. 2014. *Produção de inóculo microbiano, obtido de macrófitas aquáticas na*  
328 *amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo.* Tese de  
329 Doutorado (Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- 330 Azevedo, J.L.; Maccheroni, Jr. W.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. 2000. Endophytic  
331 microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.  
332 *Electronic Journal of Biotechnology* v3 p1.
- 333 Bidoia, E.D; Montagnolli, R.N.; Lopes, P.R.M. 2010. Microbial biodegradation  
334 potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *Current*  
335 *Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial*  
336 *Biotechnology.* p: 1277-1288.
- 337 Cruz, G.F.; Marsaioli, A.J.. Processos naturais de biodegradação do petróleo em  
338 reservatórios. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1628-1634, 2012 .
- 339 Das, N; Chadran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon  
340 contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011.

341 Dua, M.; Singh, A.; Sethunathan, N.; Johri, A.K. 2002. Biotechnology and  
342 bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology Biotechnology*, v 59, p  
343 143-152.

344 Deshmukh, R.; Khardenavis, A. A.; Purohit, H.J. 2016. Diverse metabolic capacities of  
345 fungi for bioremediation. *Indian journal of microbiology*, v. 56, n. 3, p. 247-264.

346 Gaylard, C.C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P. 2005. Aspectos biológicos e técnicas da  
347 biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v.  
348 8, n. 34.

349 Kvenvolden, K. A.; Cooper, C. K. 2003. Natural seepage of crude oil into the marine  
350 environment. *Geo-Marine Letters*, v. 23, p-140-146.

351 Marchand, C.; St-Arnaud, M.; Hogland, W., *et al.* 2017. Petroleum biodegradation  
352 capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International*  
353 *Biodeterioration & Biodegradation*, v 116, p 48-57.

354 Marco-Urrea, E., Garcia-Romera, I., Aranda, E., 2015. Potential of non-ligninolytic  
355 fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New*  
356 *Biotechnol.* v32, p 620-628.

357 Mariano, A.P.; Bonotto, D.M.; De Angelis, D.F.; Piróllo, M.P.S.; Contiero, J. 2008.  
358 Biodegradability of comercial and weathered Diesel Oil. *Brazilian Journal of*  
359 *Microbiology*, v 39, p 133-142.

360 Medina-Bellver, J. I.; Marín, P.; Delgado, A. *et al.* 2005. Evidence for *in situ* crude oil  
361 biodegradation after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 6,  
362 pp. 773–779.

363 Morais, E. *Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo*  
364 *através do sistema de biopilhas*. 2005. Dissertação. Instituto de Geociências e Ciências  
365 Exatas - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

366 Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., Sasek,  
367 V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and  
368 degradation rate. *Soil Biol. Biochem.* v 36, p 1545 - 1551.

369 Oliveira, N.C. 2009. *Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para*  
370 *a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou*  
371 *derivados*. Dissertação de Mestrado. Insituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.  
372 Universidade Federal de Goiás.

373 Sicilliano, S.D.; Fortin, N.; Mihoc, A.; Wisse, G.; Labelle, S.; Beaumier, D. et al. 2001.  
374 Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plantes in response to soil  
375 contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, v 67, p 2469-2475.

376 Soares, I.A.; Flores, A.C.; Mendonça, M.M.; Barcelos, R.P.; Baroni, S. 2011. Fungos  
377 na biorremediação de áreas degradadas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.78, n.2,  
378 p.341-350.

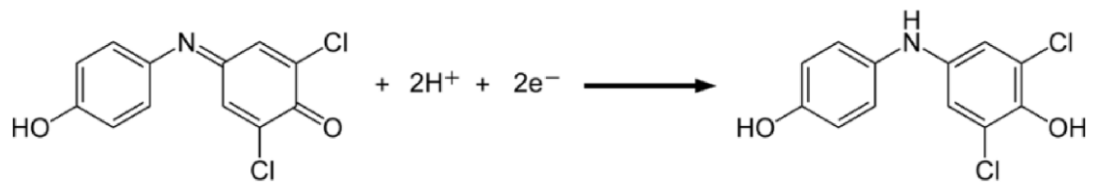
379 Souza Filho, A.M. 2006. *Planos Nacionais de Contingência para atendimento a*  
380 *derramamento de óleo: análise de países representativos das Américas para*  
381 *implantação no caso do Brasil*. Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro,  
382 Brasil.

383 Tonini, R.; Rezende, C. E.; Gravitou, A.D. 2010. Degradação e biorremediação de  
384 compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, vol 4, n.4, p 1027-  
385 1035.

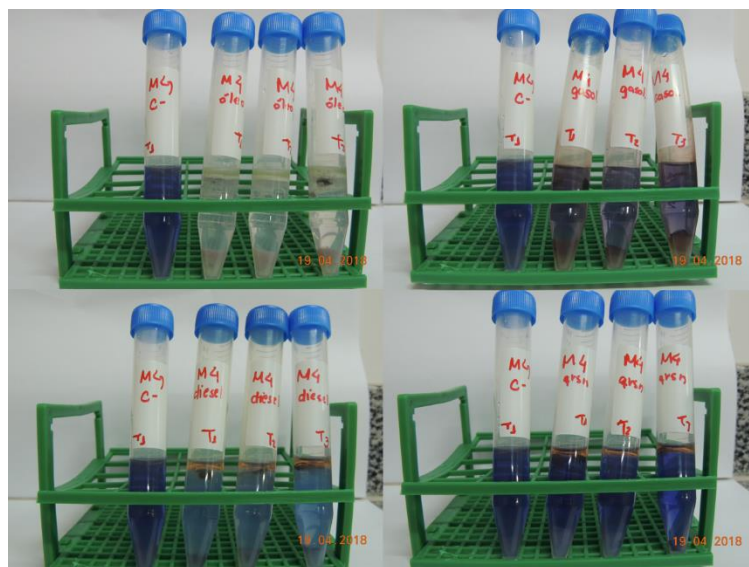
386 Ulrici, W. 2000. Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring  
387 of contaminants in *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology*, H.  
388 J. Rehm and G. Reed, Eds., vol. 11, pp. 5–42.







**Figura 1** Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol como aceptor de elétrons. Adaptado de BIDOIA et al. 2010.



**Figura 2** Reação do isolado M4 frente aos diferentes derivados de petróleo: (A) óleo sintético, (B) gasolina, (C) óleo diesel e (D) querosene

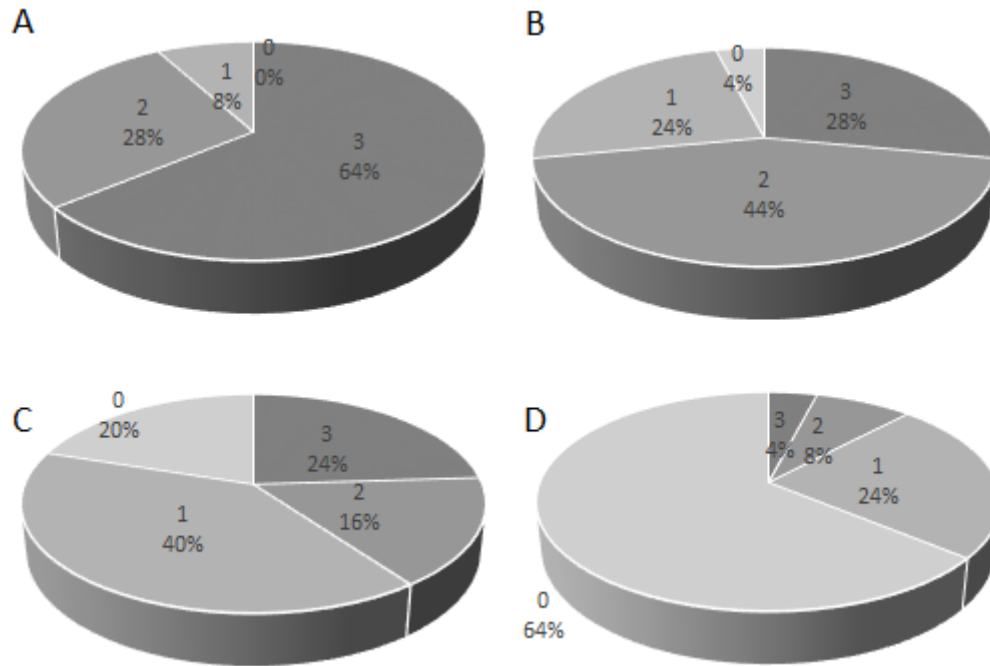


Figura 3: Percentual de fungos com diferentes níveis de biodegradação in vitro de derivados de petróleo, onde 0 = sem degradação aparente, intensidade do corante igual ao controle, 1 = baixa degradação, intensidade do corante levemente alterada em relação ao controle, 2 = degradação intermediária, intensidade do corante bastante alterada em relação ao controle) e 3 = degradação elevada, corante totalmente oxidado, meio incolor. (A) Óleo Sintético para Motor, (B) Gasolina (C) Óleo Diesel e (D) Querosene.

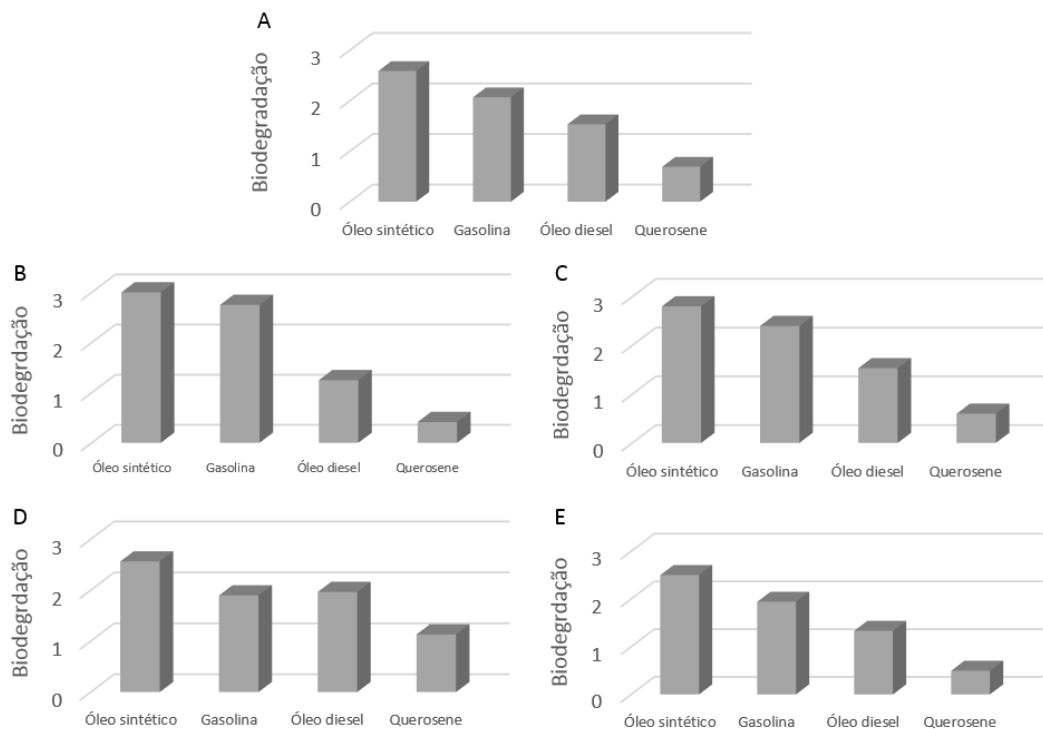


Figura 4: Níveis médios de biodegradação de derivados de petróleo onde 0 = sem degradação aparente, intensidade do corante igual ao controle, 1 = baixa degradação, intensidade do corante levemente alterada em relação ao controle, 2 = degradação intermediária, intensidade do corante bastante alterada em relação ao controle) e 3 = degradação elevada, corante totalmente oxidado, meio incolor. (A) geral, (B) Lagoa da Jansen, São Luis, MA (C) Aterro da Ribeira, São Luis, MA (D) Carolina, MA e (E) Igarapé do Sabino, São Luis, MA.

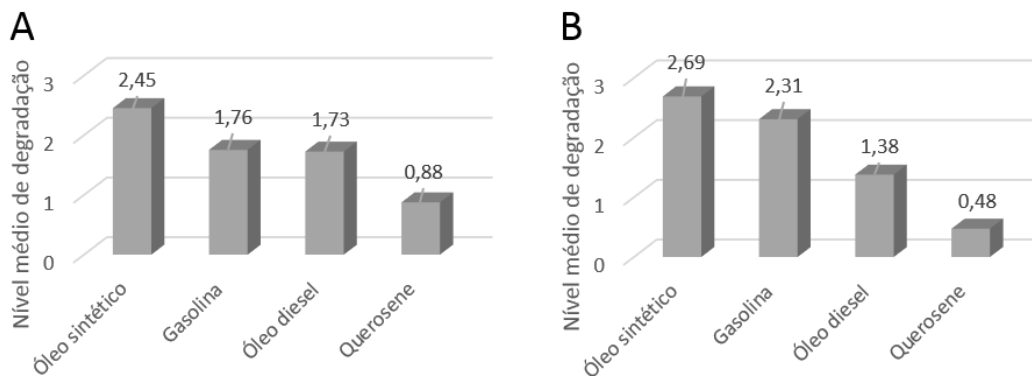


Figura 5: Níveis médios de biodegradação de derivados de petróleo onde 0 = sem degradação aparente, intensidade do corante igual ao controle, 1 = baixa degradação, intensidade do corante levemente alterada em relação ao controle, 2 = degradação intermediária, intensidade do corante bastante alterada em relação ao controle) e 3 = degradação elevada, corante totalmente oxidado, meio incolor. (A) Fungos isolados de ambientes naturais (B) Fungos isolados de ambientes impactados pela ação humana.

Tabela 1: Níveis de biodegradação de derivados de petróleo por fungos isolados no estado do Maranhão, onde 0 = sem degradação aparente, intensidade do corante igual ao controle, 1 = baixa degradação, intensidade do corante levemente alterada em relação ao controle, 2 = degradação intermediária, intensidade do corante bastante alterada em relação ao controle) e 3 = degradação elevada, corante totalmente oxidado, meio incolor. ID = identificação; ND = não determinado.

Isolado	Origem	Tipo de Ambiente	ID	Nível de biodegradação			
				Óleo sintético	Gasolina	Óleo diesel	Querosene
M01	Lagoa da Jansen / solo	Antropizado	<i>Trichoderma koningi</i>	3	3	2	1,66
M02	Lagoa da Jansen / solo	Antropizado	<i>Aspergillus tamaritii</i>	3	2	1	0
M04	Aterro da Ribeira /chorume	Antropizado	<i>A. fumigatus</i>	3	2	1	0
M05	Aterro da Ribeira /chorume	Antropizado	<i>A. terreus</i>	2	2	0	0
M06	Aterro da Ribeira /chorume	Antropizado	<i>A. niger</i>	3	2	1,66	1,33
M07	Aterro da Ribeira /chorume	Antropizado	<i>A. flavus</i>	3	3	3	1,66
M08	Lagoa da Jansen / solo	Antropizado	<i>A. fumigatus</i>	3	3	0	0
M09	Lagoa da Jansen / solo	Antropizado	<i>A. niger</i>	3	3	2	0
M10	Aterro da Ribeira /chorume	Antropizado	<i>A. niger</i>	3	3	2	0
M11	Pedra Caída / endófito	Antropizado	ND	3	2	1,33	1
M12	Pedra Caída / endófito	Antropizado	ND	2,66	2,33	1	0
M13	Pedra Caída / endófito	Antropizado	ND	3	2	1,33	0
M14	Igarapé do Sabino /	Natural	<i>Scytalidium lignicola</i>	1	0,33	0,33	0

	endófito						
M15	PNCM / endófito	Natural	ND	3	2	3	1,66
M16	PNCM / endófito	Natural	ND	3	3	3	3
M17	PNCM / endófito	Natural	ND	3	1	3	2
M18	Igarapé do Sabino / endófito	Natural	<i>A. japonicus</i>	2	1,66	0	0
M21	Pedra Caída / endófito	Antropizado	ND	2	2	2	0
M22	PNCM / endófito	Natural	ND	3	2,66	3	2,66
M23	Pedra Caída / endófito	Antropizado	ND	1	1	1	1
M24	PNCM / endófito	Natural	ND	2	1	1	0
M25	Igarapé do Sabino / endófito	Natural	<i>A. tamaritii</i>	3	1,66	3	0,66
M28	Igarapé do Sabino / endófito	Natural	<i>Chaetomium globosum</i>	3	3	0,66	0
M29	Igarapé do Sabino / endófito	Natural	<i>Trichoderma</i> sp.	2	1	1	0
M30	Igarapé do Sabino / endófito	Natural	<i>Aspergillus niger</i>	2	2	1	0,66
MÉDIA				2,58	2,06	1,53	0,69
VARIÂNCIA				0,3935	0,5782	1,0052	0,8409
DESVIO PADRÃO				0,6273	0,7604	1,0026	0,9170

