

KÊNIA CRISTINA NASSIF DE ARAÚJO

DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Belo Horizonte

2010

iii

KÊNIA CRISTINA NASSIF DE ARAÚJO

DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Monografia apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do Grau de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Vera Lúcia dos Santos

Co-orientadora: Dra. Andrea de Sousa Monteiro

Belo Horizonte

2010

iii

DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS

KÊNIA CRISTINA NASSIF DE ARAÚJO

Monografia aprovada em ___/___/___ para obtenção do Grau de Especialista em Microbiologia

Banca Examinadora

.....

.....

Dedicatória

“Deus, pois tornou possível a realização de mais um sonho.”

Com muito amor: Pai e Mãe

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força, orientação e sustento por ter colocado pessoas que me ajudaram a percorrer este difícil caminho.

A Dra. Vera Lucia dos Santos pelo exemplo de profissional, pela oportunidade, apoio e por ser uma pessoa maravilhosa, humana e dedicada em tudo o que faz.

A Dra. Adriana Andréa de Sousa Monteiro minha gratidão pela orientação, incentivo e disponibilidade no decorrer desta monografia.

Aos meus amigos que contribuíram de maneira significativa no decorrer deste das etapas transcorridas neste curso.

A minha família que com muito amor, me incentivou a continuar, lutando para alcançar mais uma vitória.

Em especial agradeço ao meu pai Abel, pela força, pelo apóio e esperança.

Sumário

1. Resumo	07
1.1. Abstrat	09
2. Introdução	10
3. Materiais e métodos	12
4. Revisão Bibliográfica	13
4.1. Petróleo	13
4.1.1. Origem e Histórico	13
4.1.2. Composição do petróleo	15
4.1.3. Hidrocarbonetos	16
4. 1.3.1. Toxicidade	19
4. 1.3.2. Contaminação	20
5. Microorganismos degradadores de hidrocarbonetos	23
5.1. Fungos degradadores de hidrocarbonetos	25
6. Vias metabólicas de microorganismos degradadores de Hidrocarbonetos	27
6.1 Vistas de degradação Aeróbica	29
6.1.2. Etapas de degradação aeróbia de compostos aromáticos	30
7. Biorremediação	35
7.1. Tipos de biorremediação	35
8. Conclusão	40
9. Referências Bibliográficas	41
10. Anexos	62
10.1. Figuras	62

1. Resumo

Os nossos antepassados conheceram o petróleo séculos antes de Cristo; ele e seus derivados eram utilizados como argamassa, betume (para calafetar madeira), produtos de iluminação e aquecimento, pavimentação de estradas, nas construções e, na área médica como unguento e lubrificantes. O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre. A partir do século XIX, os derivados do petróleo passaram a ser utilizados como combustíveis para veículos, componentes de explosivos (glicerina e tolueno), matéria sintética para roupas, solventes, medicamentos, entre outros. Com o uso crescente desses produtos, aumentaram também os riscos de contaminação ambiental por componentes ou derivados do petróleo, que são compostos, em sua maioria, tóxicos ao ser humano. A alta toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos está diretamente relacionada com a periculosidade desses compostos, pois são mutagênicos e cancerígenos causando assim problemas na saúde humana. Ao longo das últimas décadas, a quantidade de resíduos industriais contaminados por compostos recalcitrantes tem crescido, significativamente, por meio de práticas inadequadas de disposição de resíduos químicos e ocorrência de vazamentos durante o seu manuseio, transporte ou armazenamento. A grande quantidade de produtos químicos lançados no ambiente, associada a sua recalcitrância resultam em seu acúmulo no solo, na água, podendo ser absorvida por plantas e animais, interferindo na dinâmica dos ecossistemas. Diante desses fatos, surgiu à necessidade de investimentos na prevenção destas ocorrências e no desenvolvimento de tecnologias de remediação das áreas afetadas. A biorremediação consiste na utilização de agentes biológicos, dentre eles os microorganismos, para a remoção de compostos tóxicos ao ambiente, sejam via adsorção, inativação ou degradação, e é uma tecnologia inovadora para o tratamento dessas áreas. Esta revisão de literatura relata brevemente o potencial de aplicação de fungos na biorremediação. Estes microorganismos merecem destaque, considerando a grande diversidade e sua versatilidade em sobreviver em ambientes desfavoráveis por longos períodos e a capacidade de crescerem rapidamente quando o ambiente torna-se favorável. Também, a diversidade metabólica e a

inespecificidade e versatilidade de seus sistemas enzimáticos múltiplos que os torna degradadores de diferentes moléculas orgânicas, incluindo compostos xenobióticos de estruturas químicas relacionados, como os hidrocarbonetos do petróleo.

1.1 Abstract

Our ancestors knew oil centuries before Christ; the oil and its derivatives were used as mortar, putty (for caulk wood), lighting and heating products, paving of roads, in buildings and in the medical field as ointment and lubricants. Oil is a complex mixture of organic compounds, for the most part alkanes and aromatic hydrocarbons, with small quantities of compounds such as oxygen, nitrogen and sulfur. From the nineteenth century, the oil derivatives started being used as fuel for vehicles, components of explosives (glycerol and toluene), synthetic materials for clothing, medicines and solvents, among others. With the increasing use of these products, also increased the risk of environmental contamination by components or oil derivatives - mostly of them - toxic compounds to human beings. The high toxicity of aromatic hydrocarbons is directly related to the dangerousness of these compounds because they are mutagenic and carcinogenic causing problems for human health. Over the last decades, the amount of contaminated industrial wastes by recalcitrant compounds has grown significantly through improper practices of chemical wastes disposal and spills occurred during handling, transport or storage. The large amount of chemicals discarded in the environment, associated to its recalcitrance, results in their accumulation in soil, water, and it can be absorbed by plants and animals, interfering with the dynamics of ecosystems. Face of these events, it became necessary to invest in prevention and development of remediation technologies of affected areas. Bioremediation consists in utilization of biological agents, including microorganisms, to remove toxic compounds to the environment, whether by adsorption, inactivation or degradation, and it is an innovative technology for the treatment of these areas. This literature review briefly describes the potential application of fungi in bioremediation. These microorganisms are worth mentioning, considering the great diversity and their versatility to survive in harsh environments for long periods and also their ability to grow up quickly when the environment becomes favorable. Also, the metabolic diversity and the no specificity and versatility of their multiple enzymatic systems that make them degrading of different organic molecules, including xenobiotic compounds of related chemical structures, such as petroleum hydrocarbons.

2. Introdução

O petróleo e seus derivados vêm sendo utilizados pelo homem desde 5 mil anos a.C. A crescente demanda e oferta de novos produtos químicos pela sociedade industrializada do século XX acarretaram o incremento, no ambiente, de grandes quantidades de diversos compostos químicos provenientes das descargas industriais e de várias outras atividades antrópicas. Os compostos orgânicos liberados no ambiente compreendem espécies de uma ampla faixa de tamanhos de moléculas e de grupos funcionais (MELLO, 2007).

A composição do petróleo pode ser melhor definida pelo teor de hidrocarbonetos saturados, que compreende alcanos de cadeia normal e ramificada (parafínicos) e cicloalcanos (naftênicos); hidrocarbonetos aromáticos, que incluem moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (nafteno-aromáticos) e, usualmente, compostos cíclicos de enxofre; resinas e asfaltenos, que são componentes policíclicos, de alto peso molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Os asfaltenos são insolúveis em alcanos leves e, assim, precipitam com n-hexano (MELLO, 2007).

Os hidrocarbonetos contaminam o solo infiltrando rapidamente no subsolo e contaminando o lençol freático e conseqüentemente os rios. A ocorrência de contaminantes no solo, originados por diversas fontes, provocam inúmeras conseqüências negativas para os ecossistemas (cadeia alimentar) e recursos naturais (TIBURTIUS & ZAMORA, 2004). Os hidrocarbonetos aromáticos são introduzidos no ambiente em grandes quantidades devido às atividades relacionadas à extração, refino, transporte e utilização do petróleo e de seus derivados, tornando - os uma fonte de contaminação do solo e água, principalmente de fração solúvel em água (BARBOSA et al., 2009).

A alta toxicidade dos hidrocarbonetos derivados do petróleo tem o potencial de afetar os animais e também os seres humanos, pois possui um caráter mutagênico e cancerígeno (PEDROZA, 2009).

A contaminação por hidrocarbonetos tornou-se uma das grandes preocupações ambientais, uma vez que este tipo de substância interfere no ecossistema da área afetada, poluindo solo, ar, fauna, vegetação, águas superficiais e subterrâneas. Muitos dessas substâncias possuem um alto risco para a saúde

humana (ROMERO, 2009). Devido a esse fato, é necessária a remoção desses compostos do ambiente.

As técnicas convencionais de tratamento das áreas contaminadas têm um alto custo e diminui a eficiência da remoção do solo contaminado. A biorremediação natural mostra-se interessante devido principalmente ao baixo custo e por ser uma técnica com intervenção humana mínima (MARIANO, 2006). A biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processos biológicos, aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, ou ao tratamento de efluentes ou resíduos sólidos contaminados, que deveriam ser eliminados antes de sua descarga no ambiente. É crescente a aplicação de processos biotecnológicos envolvendo, microorganismos e /ou enzimas e surfactantes, com objetivo de mitigar problemas de poluição ambiental (RIZZO et al., 2006).

Os fungos são os principais decompositores da biosfera; degradam a matéria orgânica incorporada nos organismos, libera o dióxido de carbono na atmosfera e retorna, ao solo, os compostos nitrogenados e outras substâncias (OLIVEIRA, 2008). Algumas espécies de fungos têm grande importância econômica para o homem, são utilizados em vários ramos da economia: alimentício, na fabricação de medicamentos e atualmente na recuperação de área degradadas. A proposta deste trabalho foi fazer uma revisão do destino de hidrocarbonetos no ambiente e suas conseqüências, bem como das principais vias de degradação destes compostos principalmente por fungos algumas de suas aplicações biotecnológicas em processos de biorremediação e potenciais implicações ambientais.

3. Material e Métodos

A elaboração da monografia foi realizada uma pesquisa bibliográfica usando como fonte revistas de circulação mundial de alto fator de impacto. As revistas foram acessadas por meio do portal CAPES (www.capes.gov.br). Também foram consultados livros e outras publicações que tratam do tema em estudo.

A monografia contém as seguintes partes: resumo, introdução – justificativa, materiais e métodos, desenvolvimento, conclusões, referências bibliográficas e anexos.

4. Petróleo

4.1. Origem e Histórico

O petróleo e seus derivados vêm sendo utilizados pelo homem desde 5 mil anos a.C. (NEIVA, 1986). Heródoto, historiador grego do século V a.C., mencionou que ele era transportado pelos rios como um “precioso produto comercial”. No livro bíblico da Gênese, foi citado o uso de argamassa à base de petróleo no templo de Salomão e que a Arca de Noé deveria ser construída com madeira resinosa e depois calafetada com betume. Na China antiga (século II d. C.), há indícios de que havia poços de petróleo e gás natural (com até mil metros de profundidade), sendo os produtos utilizados na iluminação e aquecimento. Também há indícios do uso de bambus para canalização e transporte dos combustíveis, correspondendo a protótipos dos primeiros oleodutos. O primeiro registro oficial da abertura de um poço ocorreu na França no início do século XV, na cidade de Alsácia. E, na América Central, no século XVI, há referência de que os Astecas e Incas também usavam petróleo na pavimentação de estradas, nas suas construções, bem como na área médica, fazendo unguento à base de alcatrão. E os historiadores dizem que quando Pizarro chegou ao Peru, em 1527, lá encontrou uma pequena refinaria de petróleo rudimentar (POFFO, 2000).

Por volta de 1847, um comerciante de Pittsburgh, na Pensilvânia, EUA, começou a engarrafar e vender o petróleo resultante de vazamentos naturais para ser usado como lubrificante, a partir de então houve um aumento intenso em sua utilização. Após alguns anos, um químico canadense descobriu que ao aquecer e destilar o petróleo produzia querosene, esse era utilizado em lâmpadas. Mas somente em 1859, que o primeiro poço de petróleo foi perfurado em Titusville, Pensilvânia (EUA). Desde então, o petróleo passou a ser usado em grande escala, substituindo combustíveis utilizados na época. A invenção do motor de combustão interna e sua rápida adoção em todas as formas de transporte aumentaram o consumo dessa fonte natural, o que elevou sua demanda, produção, transporte e distribuição, assim com de seus subprodutos (CORRÊA, 2003).

A indústria petroquímica surgiu em 1930, possibilitando a utilização de derivados do petróleo como componentes de explosivos (glicerina e tolueno), matéria

sintética para roupas, solventes, medicamentos, entre outros. Estes derivados tiveram muita utilidade na Segunda Guerra Mundial (1939-1945) e são utilizados até hoje (CETESB, 2007). No Brasil, o petróleo começou a ser explorado efetivamente a partir do ano de 1939, em Lobato na Bahia. O seu uso trouxe um impulso extraordinário ao desenvolvimento econômico da humanidade, constituindo a mola propulsora da economia mundial fazendo com que a sua utilização seja imprescindível para a vida moderna.

Da década 1930 até os dias atuais, a indústria do petróleo vem crescendo progressivamente. Foram descobertos novos campos petrolíferos com o aperfeiçoamento das explorações submarinas; construídos petroleiros transoceânicos; inaugurados e ampliados terminais de carga e descarga de petróleo e derivados e refinarias; e construídos polidutos de dimensão interestadual e internacional. Em função da grande movimentação de petróleo por transporte marítimo, foi registrado, em 1967, o primeiro desastre ambiental devido ao encalhe do petroleiro *Torrey Canyon*, entre a zona costeira da Inglaterra e da França, liberando 123.000 toneladas de óleo, causando mortandade de aves e prejuízos à pesca e ao turismo. Desde então, outros casos ocorreram envolvendo navios, portos, terminais, oleodutos e refinarias, entre outras fontes, motivando a necessidade de investimentos na prevenção destas ocorrências e no desenvolvimento de tecnologias para a remediação das áreas afetadas (CETESB, 2007).

A indústria petroquímica está entre as principais responsáveis pela liberação de compostos orgânicos no ambiente, seja via efluente ou por meio de sedimentos. Entre estes compostos estão incluídos grupos que compõem a “*Priority List*” de substâncias perigosas da EPA: hidrocarbonetos poli-aromáticos (HPAs), ésteres fitálicos substituídos, dibenzofuranos, fenóis, PCBs e voláteis (estirenos), clorobenzenos e os BTEX - benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) (EPA, 2007).

O petróleo é o resultado da deposição de matéria orgânica oriunda de diversos organismos marinhos e terrestres, plâncton, vegetação típica de regiões alagadiças, formando bolsões entre rochas impermeáveis, transformado pela ação lenta e constante de microrganismos, de calor e pressão, levando assim milhões de anos para se forma. O petróleo é uma substância encontrada em terrenos conhecidos como bacias sedimentares formadas de camadas ou lençóis de areia, arenito ou calcário. Esse aloja - se entre os poros, formando uma jazida composta por gás

natural, petróleo e água (MELLO, 2007).

A posição geográfica, fontes de matéria-prima, evolução histórico - geológica e variáveis encontradas em uma mesma região são fundamentos para a determinação da qualidade do petróleo. Este é uma substância líquida de aspecto oleoso, inflamável, com cheiro característico e, geralmente, menos denso que a água e com variações de cor entre o negro e o castanho escuro (MELLO, 2007).

4.1.1. Composição

O petróleo bruto é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre (SOLOMONS, 2005). Existem mais de 600 compostos de hidrocarbonetos identificados no petróleo (FETTER, 1993). A menor molécula de hidrocarboneto encontrada no petróleo bruto é o metano (CH_4) e a maioria dos hidrocarbonetos é de baixo peso molecular (ROBBINS, et al., 1993).

A fonte primária de quase todos os derivados de petróleo é o óleo cru. Este consiste de uma mistura de hidrocarbonetos de peso molecular variável e, na média, contém aproximadamente 84,5% de carbono, 13% de hidrogênio, 1,5% de enxofre, 0,5% de nitrogênio e 0,5% de oxigênio (FETTER, 1993). A composição do petróleo pode ser melhor definida pelo teor de hidrocarbonetos saturados, que compreende alcanos de cadeia normal e ramificada (parafínicos) e cicloalcanos (naftênicos); hidrocarbonetos aromáticos, que incluem moléculas aromáticas puras, cicloalcanoaromáticos (nafteno-aromáticos) e, usualmente, compostos cíclicos de enxofre; resinas e asfaltenos, que são componentes policíclicos, de alto peso molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

Os hidrocarbonetos são substâncias compostas por carbono e hidrogênio, cujas quantidades variam pouco em termos relativos, produzindo pequenas diferenças. No entanto, as diferenças entre as propriedades físicas e químicas destes hidrocarbonetos são muito grandes, o que resulta em uma diversidade de características dos petróleos para uma faixa de variação de composição elementar do óleo bruto bem estreita. A infinita variedade de composições das misturas de hidrocarbonetos, aliada à variação de tipos de impurezas, faz com que praticamente todas as misturas tenham características diferentes. Cor, viscosidade, massa

específica, etc., podem diferir bastante de uma jazida para outra (WIDDEL & RABUS, 2001).

Os hidrocarbonetos de cadeia aberta ou cadeia linear incluem os alcanos que são hidrocarbonetos alifáticos saturados, ou seja, apresenta cadeia aberta com simples ligações e constituídos apenas por átomos de carbono e hidrogênio, desprovidos de insaturação, como exemplo o metano (CH_4) e pentano ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$). Os alcanos são divididos em n-alcanos, iso-alcanos e cicloalcanos (naftenos) (USBERCO & SALVADOR, 2002). Já os de cadeia fechada ou cíclicos incluem os cicloalcanos - hidrocarbonetos com cadeia cíclica saturada, de médio e a elevado peso molecular (C_{10} a C_{35}) apresentam um arranjo de 1 a 6 ciclos (PETERS e MOLDOWAN, 1993).

Os hidrocarbonetos aromáticos possuem cadeia fechada que apresenta na sua estrutura básica um anel com seis átomos de carbono (C_6H_6), com ligações duplas alternadas entre eles, esta unidade básica é chamada de benzeno. O benzeno (C_6H_6) apresenta sua estrutura molecular sob forma de um ciclo com ligações simples intercaladas por ligações duplas. No petróleo, são encontrados compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com números de anéis benzênicos condensados que variam de 2 a 4 (BENTO, 2005). Estes hidrocarbonetos são os compostos mais abundantes do petróleo, sendo encontrados na gasolina, no óleo diesel e entre outros derivados, esses compostos possuem na sua constituição ligações duplas e simples que se alternam em anéis com seis átomos de carbono (TIBURTUIS et. al., 2004). (Figura 2).

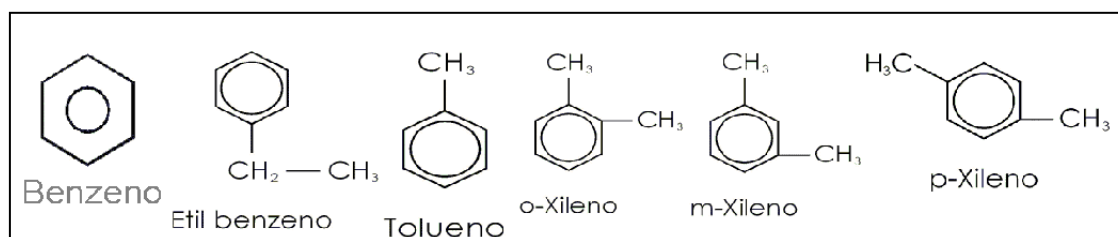


Figura 1 - Estrutura química de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEXS)

4.1.2. Hidrocarbonetos

O benzeno é um dos constituintes do petróleo presente em menor quantidade, é produzido industrialmente a partir da destilação do petróleo bruto, da destilação da

hulha e produção de coque e por síntese química a partir de hidrocarbonetos lineares. É um solvente volátil, estável, incolor de odor característico dos hidrocarbonetos aromáticos, inflamável, pouco solúvel em água, mas miscível na maioria dos solventes orgânicos. É utilizado como matéria prima na produção de materiais sintéticos como borrachas, plásticos, náilon, detergentes líquidos, inseticidas e tintas (SILVA & MAINIER, 2004).

O tolueno está presente no petróleo bruto e também em seus derivados, originado de frações do petróleo contendo metil-ciclo hexano, é um solvente orgânico volátil, utilizado na produção de tintas, resinas, produtos de limpeza e em acabamentos de couro e móveis (SILVA & MAINIER, 2004).

O Etilbenzeno também é um derivado do petróleo, subproduto do benzeno com o estireno. É um líquido incolor de odor aromático, empregado como solvente, na indústria do plástico e da borracha, sendo a principal matéria prima na produção do estireno (RIBEIRO, 2005).

O xileno ou dimetil-benzeno é um hidrocarboneto aromático de fórmula C_8H_{10} que possui três formas isoméricas: *orto*, *meta* e *para*. Está presente na gasolina, na borracha, nas indústrias de tintas e corantes, na produção de medicamentos, em plásticos e em alguns agrotóxicos (SILVA, 2008).

Como foi relatado, no petróleo são encontrados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com números de anéis benzênicos condensados que variam de 2 a 4. No entanto, devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, atualmente mais de 100 hidrocarbonetos aromáticos são reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (VERSCHUEREN, 2001). Dentre estes, somente 16 são considerados relevantes em função das informações químico-físicas, toxicológicas, industriais e ambientais existentes. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzoantraceno, benzopireno, benzofluoranteno, benzopireleno, criseno, dibenzoantraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indenopireno, naftaleno e pireno (POTIN et al., 2004). Por sua vez, os hidrocarbonetos ciclo-alcanoaromáticos (naftenoaromáticos) são constituídos por um ou mais anéis aromáticos fundidos com cicloalcanos, e ramificados por cadeias de radicais alquila. As estruturas de maior ocorrência variam de 2 a 5 anéis, incluindo a parte aromática e naftênica (TISSOT & WELT, 1984).

O processamento inicial de beneficiamento do óleo cru envolve sua separação por destilação em uma série de frações caracterizadas pelos intervalos de temperatura e pressão. A composição dos seus principais derivados dependerá do método de produção e dos processos de destilação, através do qual é obtido uma diversidade de produtos como: gás liquefeito de petróleo (GLP) ou gás de cozinha, gasolina, óleo diesel, gasóleos, querosenes de avião e de iluminação, óleo combustível, asfalto, lubrificantes, solventes, parafinas, coque de petróleo e resíduos. O objetivo é obter uma grande variedade de derivados com alto valor comercial e menor custo operacional possível (MELLO, 2007). Cerca de 20% do petróleo processado no Brasil é convertido em gasolina e 36% em óleo diesel (MME-DNC, 1995), que são os subprodutos do petróleo mais utilizados, atualmente, como combustíveis e lubrificantes. A composição química destes compostos é de grande importância para compreensão dos efeitos causados por eles (PEDROZO, 2002).

O processo de refino do petróleo envolve uma série de etapas físicas e químicas interligadas entre si, que promovem o aproveitamento energético dos produtos (MARINO, 2005). Este processo gera uma grande quantidade de compostos químicos que são lançados para o ambiente sob a forma de emissão atmosférica, efluentes líquidos ou resíduos sólidos.

A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos parafínicos, oleofínicos, naftênicos e aromáticos variando em sua composição de 6 a 12 átomos carbono em sua molécula (C_6 a C_{12}). Os compostos aromáticos constituem cerca de 10 a 59%, os hidrocarbonetos alifáticos correspondem 41 a 62%. Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam caráter de toxicidade maior que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e apresentam maior mobilidade em água (TIBURTIUS, et al., 2004).

O óleo diesel é constituído basicamente por hidrocarbonetos, que variam de 8 a 38 átomos de carbono em sua cadeia (C_8 a C_{38}) sendo que aproximadamente 40% são de n – alcanos; 39% de isoalcanos e cicloalcanos; 20% de hidrocarbonetos aromáticos, e o restante é formado por isoprenóides como enxofre, oxigênio e nitrogênio. O óleo diesel é um produto inflamável, tóxico, volátil, isento de material em suspensão e com odor forte e característico.

Os combustíveis derivados do petróleo podem conter vários aditivos em sua composição final, tais como; inibidores de corrosão, surfactantes e aditivos para

melhorar a estabilidade e a ignição. Entretanto a composição do óleo diesel está diretamente relacionada com a fonte de petróleo (PETROBRÁS, 2003).

4.1.3. Toxicidade

A toxicidade é habilidade de uma substância em causar dano a um sistema biológico; é a medida de quão venenoso ou perigoso uma substância pode ser para uma planta, animal, micro-organismo ou para o ser humano. A toxicologia é uma ciência que estuda os agentes químicos, físicos ou biológicos que produzem uma resposta no organismo quando interagem com o mesmo. A toxicidade pode ser classificada como aguda, quando o efeito adverso é decorrente da administração de uma ou mais doses de certa substância em um curto período de tempo, e o efeito é letal. E crônica quando os efeitos são observados depois de repetidas exposições ao composto por um longo período de tempo (NEPC, 1999).

Os BTEXS (-BENZENO, TOLUENO, ETILBENZENO, XILENO) são considerados perigosos e tóxicos, por causarem toxicidade crônica, por serem cancerígenos e teratogênicos (alterações sofridas no embrião ou feto). E, ainda, são considerados perigosos por serem potenciais causadores de depressão do sistema nervoso central e por causarem leucemia (EVANS et al., 1991; CORSEUL & ALVAREZ, 1996.). Estudos com animais e com o homem demonstraram a rápida absorção dos compostos BTEXs pela via pulmonar, com índices de retenção para o homem de 30 a 80% (PEDROZO et al., 2002).

Estudos têm mostrado que o benzeno é um composto carcinogênico tanto para humanos como para animais. O benzeno é tóxico quando introduzido no organismo por qualquer via, mas, a intoxicação comumente ocorre através da inalação dos vapores, seguida pelas vias: oral e dérmica. Muitas pesquisas laboratoriais com animais e estudos epidemiológicos em humanos revelam a relação causal entre a exposição ao benzeno e a ocorrência de doença como a leucemia linfóide, leucemia mielomonocítica, neoplasmas hematológicos, desordens sanguíneas, como a pré-leucemia e anemia apática. E experimentos com animais comprovaram o aumento do risco de tumores em múltiplas espécies, em múltiplos órgãos (fígado, estômago, pulmões, ovários, e glândulas mamárias), desordens mentais, psiconeuróticas e de personalidade (PEDROZO et al., 2002; MELLO, 2006).

O tolueno também é um depressor do sistema nervoso central e mesmo quando inalado ou ingerido em pequenas quantidades pode causar dores de cabeça, confusão mental, fraqueza, perda de memória afetando as funções dos rins e fígados. A ingestão pode causar irritação da boca e faringe, vômitos, dores abdominais e diarreia. Na inalação de seus vapores pode ocorrer: estado de euforia, instabilidade emocional, cefaléia, vertigens, náuseas, e vômitos. Portanto a exposição prolongada pode causar ressecamento e rachadura da pele, perda de apetite, náusea e danos aos rins e fígado, podendo causar danos ao cérebro (PREDROZO et al., 2002; TIBURTIUS et al., 2004).

O Etilbenzeno é um depressor do sistema nervoso central é absorvido pelas vias respiratórias e dérmicas. Os riscos à saúde, à exposição aguda são: tonteiras, delírios, dores de cabeça, vômitos, convulsões, coma e/ ou morte. Pode irritar os olhos, nariz e garganta. Os efeitos podem ocorrer após a exposição ao etilbenzeno e podem permanecer por meses ou anos (HENDERSON, 2005; PEDROZO et al., 2002; GRACIANI, 2009).

O xileno também é absorvido pela via respiratória, os sintomas causados pela sua exposição são: irritação da membrana das vias respiratórias, dos olhos, das mucosas, problemas estomacais, perda de apetite, fadiga, náuseas, vômitos, perda da memória, dores abdominais, dermatites falta de coordenação, distúrbio de humor e equilíbrio. Pode causar lesão cerebral e prejudicar o desenvolvimento de fetos, como também levar a morte por arritmia cardíaca ou por depressão do sistema nervoso central (RIBEIRO; 2005).

Os hidrocarbonetos mono-aromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno, e os três xilenos orto, meta e para (BTEX), são os contaminantes que primeiro poluem o nível freático. Entre os BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico, com padrão de potabilidade de 10 µg/L, podendo em exposições crônicas causar leucopenia, câncer, vertigens, tremores e afetar o sistema nervoso central (BRASIL, 2000).

4.1.3.1. Contaminação

Segundo Ferreira (2001), contaminação é o termo utilizado para indicar a presença de seres patogênicos que provocam doenças, ou substâncias em concentração nociva ao ser humano em um ambiente.

A crescente demanda e oferta de novos produtos químicos pela sociedade industrializada do século XX acarretou o incremento, no ambiente, de grandes quantidades de diversos compostos químicos provenientes das descargas industriais e de várias outras atividades antrópicas. Os compostos orgânicos liberados no meio ambiente compreendem espécies de uma ampla faixa de tamanhos de moléculas e de grupos funcionais (MELLO, 2007).

Os hidrocarbonetos aromáticos e os alifáticos são introduzidos no ambiente em grandes quantidades devido às atividades relacionadas à extração, refino, transporte e utilização do petróleo e de seus derivados, tornando-os uma fonte de contaminação do solo e água, devido a sua solubilidade em água (BARBOSA et al., 2009). O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são hidrocarbonetos aromáticos mais abundantes nas frações leves do petróleo, como a gasolina e o óleo diesel. Esses compostos podem ser transportados em locais distantes do ponto de origem. Além disso, devido ao seu pequeno tamanho molecular e baixo ponto de ebulição, esses compostos aromáticos podem ser volatilizados em temperatura ambiente constituindo uma fonte de contaminação do ar (BAKER, et al., 1995).

A manipulação indevida nos processos industriais causa a contaminação do solo e das águas subterrâneas. Os hidrocarbonetos contaminam o solo infiltrando rapidamente no subsolo e contaminando o lençol freático e, conseqüentemente, os rios. A ocorrência de contaminantes no solo, originados por diversas fontes, provocam inúmeras conseqüências negativas para os ecossistemas e recursos naturais (RODRIGUES & DUARTE, 2003).

A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos apresenta um caráter hidrofóbico, ou seja, pouca solubilidade em água. Em condições naturais sua solubilidade efetiva no ambiente depende da transferência facilitada por um composto mais solúvel, através de um processo denominado de “efeito de co-solvência”. Esse efeito permite que compostos com baixa solubilidade sejam lixiviados junto a um composto químico que age como solvente. Um exemplo clássico é a combinação de álcool com os compostos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEXs) presentes na gasolina que eleva o risco de contaminação por aumentar a solubilidade destes compostos na água (SPINELLI, 2007).

O escoamento dos hidrocarbonetos em meio saturado sempre é bifásico, por serem compostos orgânicos que apresentam baixa em água. A fase composta pelos

hidrocarbonetos é denominada de NAPL ou fase líquida não aquosa, que podem ser divididas em LNAPL (light non- aqueous phases ou fase líquida não aquosa leve) e DNAPL (dense non-aqueous phase liquid ou fase líquida não aquosa densa) de acordo com a densidade do hidrocarboneto (GUIIGUER, 2000).

Os LNAPLs possuem densidade menor que a água. Os hidrocarbonetos com essa característica estão associados com a produção, refino e distribuição de produtos do petróleo, como a gasolina, o óleo diesel e o querosene. Os DNAPLs apresentam densidade maior que a água; os hidrocarbonetos com esta característica estão relacionados com as atividades industriais, onde são utilizados hidrocarbonetos clorados, PCBs (bifenilas poli- cloradas), antraceno e pireno, 1,1,1-TCE e fenol, solventes e pesticidas (SHACKELFORFD , 1999).

A liberação dos hidrocarbonetos do petróleo para o meio sub-superficial ocorre a partir da migração do líquido através da zona não saturada do subsolo, em cujos poros se encontram a retenção do produto, formando uma fase denominada residual. Quando o contaminante alcança o lençol freático, por ser pouco solúvel, forma o NAPL. No caso de LNAPL com densidade menor que a da água, o líquido se deposita no topo do nível d'água, formando uma fase livre (GUSMÃO, 2002). Essa transferência dos contaminantes para o lençol freático se dá tanto a partir da fase livre como da fase residual, gerando uma pluma de contaminação. A duração da transferência depende da massa do NAPL e da sua taxa de dissolução na água subterrânea, que é afetada por diversos fatores, tais como volatilidade, solubilidade do contaminante, velocidade do fluxo do aquífero, arranjo e tamanho dos poros, composição da mistura de fluidos (BACKET & HUNTLEY, 2002). Os DNAPLs ultrapassam a superfície da zona saturada e atingem grandes profundidades, sendo de mais difícil remediação do que os LNAPLs. A remediação é dificultada, também, pela distribuição irregular destes compostos no subsolo, devido à heterogeneidade do solo (MARIZ, 2000).

A rota principal de transporte dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) é feita através da atmosfera. Os veículos motorizados também contribuem para o aumento da poluição atmosférica com HPAs por meio da exaustão de gases, partículas de pneu e óleo lubrificante (HOLLIGER, 1997). Os HPAs são caracterizados pela baixa solubilidade em água e alto coeficiente de partição octanol-água. Devido a essa hidrofobicidade natural, os HPAs se acumulam nas partículas

finas e na matéria orgânica do sedimento marinho, tornando-o assim, um reservatório de HPAs. Esse acúmulo nos sedimentos marinhos pode ser proveniente de várias fontes, incluindo deposição atmosférica, transporte de petróleo e lançamento de esgoto. A concentração de HPAs no sedimento marinho varia de algumas ng/Kg até g/Kg, dependendo da proximidade de áreas industriais, correntes marítimas e águas servidas. A concentração de HPAs em solos contaminados de áreas industriais varia em função da atividade industrial, do tipo de solo, constituintes do solo e grau de saturação do local. Além do ar, sedimento marinho e solo, os HPAs podem se acumular em organismos marinhos e em plantas, o que pode expor indiretamente o homem por meio da cadeia alimentar (CONNELL, 1988).

Há um acúmulo desses compostos orgânicos no solo, pois boa parte dos microrganismos existentes no solo não possui capacidade de degradá-los. Geralmente o solo é contaminado pelo benzeno, por este ser um dos mais solúveis dentre os BTEXs, pois é difundindo com mais facilidade (JAQUES et al., 2007).

Os hidrocarbonetos aromáticos são incorporados pela flora e fauna, sendo que a contaminação ocorre geralmente através da ingestão de plantas e animais contaminados. Os compostos aromáticos são acumulados nos animais, por se ligarem às moléculas protéicas e ao tecido gorduroso, sendo transferidos através da cadeia alimentar sem alterações de sua estrutura (TIBURTIUS & ZAMORA, 2004).

A contaminação por hidrocarbonetos tornou-se uma das grandes preocupações ambientais, uma vez que este tipo de substância interfere no ecossistema da área afetada, poluindo solo, ar, fauna, flora, águas superficiais e subterrâneas. Muitos dessas substâncias possuem um alto risco para a saúde humana (ROMERO, 2009). Devido a esse fato, é necessária a remoção desses compostos do ambiente. Uma estratégia promissora consiste no uso de técnicas de remediação utilizando micro-organismos para transformar hidrocarbonetos em intermediários comuns de suas vias metabólicas centrais, como a via glicolítica e o ciclo de Krebs. Com isso, estes compostos suportam o crescimento microbiano, por servirem como fonte de carbono e energia.

5. Microorganismos degradadores de hidrocarbonetos

Os microorganismos são agentes fundamentais responsáveis pela ciclagem do

carbono na natureza. A comunidade microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos primários e os secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários não utilizam o substrato principal, porém, os produtos liberados pelos micro-organismos primários (JAQUES et al., 2007).

A biodegradação de hidrocarbonetos depende principalmente do microorganismo utilizado e da sua capacidade de metabolizar os compostos presentes nos resíduos disponibilizados para o tratamento. As condições ambientais oferecidas para o desenvolvimento adequado do microorganismo, como aeração, temperatura, pH, umidade e a disponibilidade de nutrientes que permitem o bom desenvolvimento da população microbiana local, também devem ser considerados (THIELE & BRÜMER, 2002). Os nutrientes fundamentais para o crescimento microbiano incluem os macronutrientes, carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo, exigidos em concentrações na faixa de mg a g/L e micronutrientes, como ferro, cobalto, níquel, molibdênio, e selênio, que geralmente são metais com um importante papel na atividade de várias enzimas (MADIGAN & MARTINKO, 2006).

A estrutura dos compostos orgânicos tem uma estreita influência na habilidade dos microrganismos de metabolizarem estas moléculas, portanto alguns compostos são degradados e outros não, os quais podem persistir no ambiente (MELLO et al., 2006).

A biodegradação microbiana de hidrocarbonetos consiste em reações de oxidação – redução, em que os mesmos são oxidados na presença de receptores terminais de elétrons como o oxigênio, nitrato, ferro (III), sulfato e dióxido de carbono. As vias utilizadas na degradação são determinadas pelo modo de obtenção de energia dos microrganismos, podendo ser aeróbias e anaeróbias. O processo aeróbico utiliza o oxigênio como receptor final de elétrons e origina como produtos, dióxido de carbono, água e a biomassa celular. Na degradação anaeróbia, os receptores final de elétrons são outros elementos químicos como: o Nitrato, Manganês, íon de Ferro (III) e dióxido de Carbono (NUMES et al., 2007). Esse processo ocorre naturalmente na natureza, como em rios, lagos, pântanos, solos e no trato intestinal dos animais; sendo bastante utilizado em tratamentos de resíduos urbanos e indústrias.

A degradação aeróbica é um processo mais rápido e eficiente na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos. A complexidade dos processos metabólicos necessários para degradação leva à formação de consórcios, incluindo bactérias e fungos de diferentes gêneros e espécies, onde cada microorganismo é especializado em degradar uma ou várias substâncias contaminantes como, hidrocarbonetos aromáticos, alifáticos e policíclicos (MARGESIN & SCHINNER, 2001).

5.1. Fungos degradadores de Hidrocarbonetos

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, assim, eles são encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais. Constituem um conjunto de seres vivos que inclui, desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos. São formados por células eucariotas, com uma parede rígida, e se caracterizam por ser imóveis, apresentarem nutrição heterotrófica por absorção e reprodução assexuada e sexuada (OLIVEIRA, 2008). Os seus esporos e outras estruturas de resistência podem sobreviver sob condições ambientais adversas. (LEAHY e COLWELL, 1990).

O primeiro eucarioto descrito capaz de crescer utilizando o tolueno como única fonte de carbono e energia foi o fungo *Cladosporium sphaerospermum* (WEBER, 1995). Desde 1950, vêm sendo isolados vários fungos, degradadores de compostos derivados do petróleo, principalmente os pertencentes dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium* (JACQUES et al., 2005a).

Estudos vêm comprovando o grande potencial dos fungos em degradar diversas substâncias, alguns deles são decompositores da madeira podendo ser classificados em três grupos: fungos de decomposição branca (*white-rot fungi*), capazes de degradar os três componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina); fungos de decomposição parda (*Brown-rot fungi*), capazes de degradar principalmente as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) e fungos da decomposição mole (*Solf-rot fungi*), que podem degradar tanto os polissacarídeos quanto a lignina, mas em velocidades muito reduzidas (CULLEN et.

al., 1998; CARVALHO et al., 2009).

Diversos estudos relatam à aplicação de fungos basidiomicetos lignocelulolíticos no processo de biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes, baseados na capacidade desses organismos em degradar diversas moléculas de poluentes orgânicos e outras substâncias tóxicas persistentes, como: DDT, dioxinas (2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina), hidrocarbonetos aromáticos, além de bifenila policloradas, pentaclorofenol e hexaclorobenzeno, compostos aromáticos polinucleares de alto peso molecular como benzopireno, plásticos como polietileno e pesticidas (AUST, 1990; BAAR & AUST, 1994; DURÁN & ESPÓSITO, 1997; LEE et al. 1998; MACHADO et al., 2005; MATHEUS et al, 2000; REDDY & GOLD, 2000; SHIM & KAWAMOTO, 2002; TORTELLA et al., 2005).

Em estudos envolvendo utilização de leveduras, na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, relata que leveduras do gênero *Candida* demonstram preferência em degradar hidrocarbonetos de cadeias lineares, do que hidrocarbonetos aromáticos (SÁ, 2002). As leveduras *Yarrowia lipolytica* AF 335977, *Candida viswanathii* CVU 45752, *Pichia guilliermondii* AF 257270 e *Candida palmioleophila* CPU 45758 também são citadas por serem capazes de utilizar hidrocarbonetos de óleo cru. Essas linhagens apresentaram taxas de degradação superiores a 90% das frações de n-alcenos, pristano e fitano, presentes no óleo na concentração inicial de 1 g/L (CHAILLAN et al., 2004). Pan et.,al (2004) isolaram a levedura *Pichia anomala* 2.2540 de solo contaminado com óleo cru e relataram a capacidade da mesma de degradar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, naftaleno, dibenzotiofeno, fenantreno e criseno, puros ou combinados.

No trabalho de De Hoog et al. (2006) foi feita uma suposição que a presença de hidrocarbonetos aromáticos na amostra fosse favorável ao crescimento de espécies de leveduras negras. Os autores também observaram que cepas ambientais de *Exophiala xenobiotica* são frequentemente isoladas de habitats ricos em hidrocarbonetos monoaromáticos e alcanos.

Gallego et al. (2007) estudaram a biodegradação de hidrocarbonetos por um consórcio formado pelas bactérias *Nocardiodes simplex* B4, *Pseudomonas alcaligenes* B8 e *Acinetobacter calcoaceticus* B2 e pela levedura *Rhodotorula graminis* Y3. Os autores observaram 100% de degradação de alcanos lineares, 85% de cicloalcanos, 44% de alcanos ramificados e 31-55% de compostos aromáticos e

sulfúrico-aromáticos pelo consórcio.

Em um estudo realizado por Yadav e Reddy (1993) com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, conhecido como fungo da podridão da branca, observaram uma eficiente degradação de compostos BTEXs, puros ou misturados, sendo que benzeno e tolueno foram mineralizados a CO₂, e os compostos etilbenzeno e xileno foram apenas parcialmente degradados.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Gongronella*, isolados de ambientes contaminados ou não, são citados por serem capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo (saturados e aromáticos) em taxas de degradação variando de 5 a 49%. Dentre as espécies de fungos testadas, *Beauveria alba*, *Penicillium simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *P. fenophilium* e *Acremonium strictum* apresentaram as maiores taxas de degradação, cujos valores corresponderam a 49%, 45%, 40%, 33% e 33%, respectivamente (CHAÎNEAU et al, 1999).

Também, Araújo e Lemos (2002), selecionaram fungos com capacidade de degradar petróleo. Das oitenta linhagens obtidas, sessenta possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo e foram agrupadas em quatro gêneros, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*. Na pesquisa realizada Pena et al. (2008), utilizaram biofiltros, um sistema contendo micélio do fungo *Paecilomyces variotii* CBS115145, com o objetivo de comprovar a sua capacidade em metabolizar os compostos BTEX. Nos ensaios, o tolueno foi completamente degradado, seguido de etilbenzeno, e o benzeno foi parcialmente degradado, com taxa de degradação de 45%, à semelhança dos compostos m-xileno e p-xilenos para o-xileno, a taxa de degradação foi de apenas 30% na cultura líquida. Sendo, que a recuperações de carbono como CO₂ foram de 48, 40 e 53% para tolueno, benzeno e etilbenzeno, respectivamente.

Barbosa et al. (2009), utilizaram *Aspergillus niger* AN 400 em um reator operando em batelada, como o objetivo de tratar água contaminada por BTX. Os autores concluíram que a espécie que este microorganismo é capaz de remover benzeno e tolueno de água contaminada por hidrocarbonetos do petróleo.

6. Vias metabólicas de microorganismos degradadores de hidrocarbonetos

A utilização de hidrocarbonetos pelos microorganismos se inicia com a absorção do substrato pela célula. Devido à fraca solubilidade em água destes compostos, os microorganismos precisam ter adaptações específicas para facilitar a absorção de hidrocarbonetos. São três os caminhos para a entrada de hidrocarbonetos na célula: contato direto através da ligação da célula a grandes gotas de óleo; adsorção de gotas de óleo sub-microscópicas à superfície celular; ou pela absorção de hidrocarbonetos solubilizados na fase aquosa (MAUERSBERGER et al., 1996). Nos casos onde o hidrocarboneto está na forma de grande gota de óleo e as células se ligam a esta gota, a absorção toma lugar mediante a difusão a partir do ponto de contato (KIM et al., 2000).

A hidrofobicidade das células pode também ser considerada como um dos fatores controladores da absorção de hidrocarbonetos. Células crescidas em alcanos geralmente são mais hidrofóbicas quando comparadas a células crescidas em glicose. Isto possibilita a maior aderência às gotas de óleo (KIM et al., 2000). A estrutura da parede celular pode mudar e ocorre a formação de canais especiais que permitem a entrada de hidrocarbonetos. Isto também é acompanhado pela formação de vesículas de membranas (MAUERSBERGER et al., 1996).

O transporte através da parede celular é também facilitado pela excreção de biossurfactantes (MAUERSBERGER et al., 1996). Estes são capazes de emulsionar o substrato, aumentando a área interfacial entre o substrato e o microorganismo (KITAMOTO et al., 2002). A seguir, as gotas de hidrocarbonetos são encapsuladas nas micelas dos surfactantes, facilitando a assimilação pela célula (MAUERSBERGER et al., 1996; WATKINSON & MORGAN, 1990). Várias vias metabólicas de degradação dos hidrocarbonetos já foram identificadas em diferentes microorganismos, porém as mais estudadas são do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos (DÍAZ et al., 2001).

A degradação microbiana de hidrocarbonetos pode ocorrer tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. A incorporação do oxigênio é a reação enzimática chave na degradação aeróbica de poluentes e é catalisada por enzimas oxigenases e peroxidases. Após a oxigenação, os poluentes orgânicos são convertidos, por meio de vias de degradação periférica, em intermediários centrais do metabolismo, isto é, do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Os precursores metabólicos

centrais, acetil-CoA, succinato, piruvato, dentre outros, são requeridos para a biossíntese de massa celular. Os açúcares requeridos para biossíntese e crescimento podem ser sintetizados pela gliconeogênese (URURAHY, 1998).

6.1. Via de degradação aeróbia (alifáticos)

Os compostos alifáticos são conhecidos como alcanos, alcenos e alcinos em função das ligações entre os átomos de carbono presentes na molécula, sendo potencialmente contaminantes do solo e das águas subterrâneas (DURÁN & ESPOSITO, 1997). Os hidrocarbonetos alifáticos são potenciais substratos para a maioria dos microorganismos degradadores de petróleo (DEL'ARCO, 1999). Entretanto, nem todas as espécies podem crescer com apenas um tipo de composto, sendo necessária uma mistura de n-alcanos para promover o crescimento microbiano. Os n-alcanos com cadeias menores (C_6 e C_9) são facilmente usados como fonte de carbono e de energia pelos microorganismos em relação aqueles de maior cadeia (C_{10} - C_{14}) (BAPTISTA, 2003).

A degradação dos hidrocarbonetos alifáticos pode ocorrer quando o grupo metil terminal dos n-alcanos sofre uma degradação pela introdução de oxigênio molecular, pela ação da enzima monooxigenase, havendo a formação do álcool primário; esse por sua vez é oxidado a um aldeído que, posteriormente, é oxidado a ácido graxo. O ácido será degradado por meio de β -oxidação formando ácido acético e ácido graxo de menor peso molecular. O ácido acético é utilizado via o ciclo do ácido tricarboxílico e o ácido graxo é degradado formando ácidos graxos de menor peso molecular (LAPINSKAS, 1989). Na degradação envolvendo dioxigenases, os n-alcanos são transformados nos hidroperóxidos e subsequentemente reduzidos aos álcoois correspondentes (URURAHY, 1998).

Diversas classes de enzimas envolvidas na oxidação de alcanos têm sido caracterizadas: sistema citocromo P450 monooxigenase eucariótico (*CYP52*, classe II), presente em *Candida maltosa*, *C. tropicalis* e *Yarrowia lipolytica* (LIDA et al. 2000).

Enzimas citocromo P450s (*CYP*) catalisam a transformação de xenobióticos hidrofóbicos ou componentes endógenos a compostos mais hidrofílicos introduzindo um átomo de oxigênio derivado do oxigênio molecular (LIDA et al., 2000). A P450s em procariotos são proteínas solúveis em contraste às P450s eucarióticas, que se

encontram normalmente ligadas ao retículo endoplasmático (RE) ou à membrana interna da mitocôndria (WERCK-REICHHART & FEIEREISEN, 2000). A citocromo P450 monooxigenase é responsável pela hidroxilação destes compostos, resultando em derivados com menor potencial de oxidação e que apresentam estruturas mais suscetíveis à ação de oxidases. As P450 monooxigenases são necessárias para a assimilação de hidrocarbonetos por fungos, estando localizadas no RE, onde catalisam a primeira etapa enzimática na assimilação de alcanos, a hidroxilação (SAKAKI & INOUE, 2000). O fungo *Phanerochate chrysosporium* promove no composto tolueno reações de hidroxilação mediadas pela citocromo P450 monooxigase (TERAMOTO et al. 2004).

O início do metabolismo dos alcenos inclui o ataque de oxigenases ao grupo metila terminal, formando álcoois e ácidos insaturados correspondentes, ou a oxidação subterminal e oxidação da dupla ligação o respectivo diol (DEL' ARCO, 1999). As oxigenases em levedura *Candida lipolytica*, por exemplo, ataca a dupla ligação e convertem alceno em alceno-1-2-diol (RISE & ROBERTS, 1998).

Os cicloalcanos são mais resistentes ao ataque microbiano do que os alcanos lineares, devido a sua estrutura e ao seu estado físico. Os compostos mais complexos, tais como os hopanos, são os que mais persistem em um ambiente que sofreu derrame de petróleo (GRISHCHENKOV et al., 2000). Quando oxigenados a degradação prossegue ocorrendo a clivagem do anel. A degradação dos cicloalcanos substituídos ocorre mais rapidamente, sendo que, neste caso, o ataque inicial se dá na posição da substituição, gerando um intermediário aromático que posteriormente sofrerá uma clivagem (ATLAS, 1981).

As reações envolvidas na biodegradação dos compostos aromáticos pode ser oxidativas, realizadas em aerobiose, ou redutivas, realizadas em anaerobiose. As reações oxidativas dos compostos aromáticos pelos micro-organismos são baseadas principalmente nos processos de hidroxilação, seguidos pela clivagem dos anéis aromáticos e reações que envolvem a transferência de oxigênio (GOLOVLEVA et al., 1990).

6.1.2. Etapas de degradação Aeróbia dos compostos Aromáticos

A biodegradação destes compostos aromáticos envolve dois passos: ativação

e rompimento do anel (ATLAS, 1991). A ativação exige a ação de enzimas oxigenases, através da incorporação de oxigênio molecular ao anel. Monooxigenases são características de eucariotas como fungos filamentosos e leveduras. As monooxigenases catalisam a incorporação de um átomo de oxigênio na estrutura aromática, formando epóxido que, por hidratação, pode formar transdihidrodióis (SOARES, 2006).

A degradação aeróbia de compostos aromáticos ocorre inicialmente com o benzeno oxidado pela ação das enzimas oxigenases. O ataque da molécula pode ser catalisado pelas enzimas intracelulares monooxigenases que incorporam um átomo de oxigênio ao anel ou pelas dioxigenases, que tem a função de reconhecer o composto aromático e adicionar dois átomos de oxigênio, quebrando a estabilidade devido à ressonância do anel aromático. O produto dessa reação é um benzeno dihidrodiol (1,2-dihidroxíciclohexa-3,5-dieno), cuja isomeria espacial (cis ou trans) depende de qual enzima catalisará a reação (WRENN, 1995). O benzeno dihidrodiol, por sua vez, é convertido a catecol por uma desidrogenase.

Através da incorporação do oxigênio ao anel aromático é gerado um cis-dihidrodiol, que é o produto da dioxigenase e são rearranjados pela ação da enzima desidrogenase sendo transformado em um composto dihidroxilado. As oxidações permitem que ocorra a abertura de um anel aromático e a formação de ácido pirúvico, que será utilizado para a produção de carbono e energia pela célula. A molécula com o anel fechado será transformada em um dos intermediários centrais da via de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, que podem ser o catecol, o protocatecol ou gentisato, que participam do ciclo de Krebs (JAQUES et al., 2007).

A fissão do anel aromático se dá pela via de orto ou meta clivagem do catecol (HENDRICKX et al., 2006; TRIGUERIO, 2008). A via de orto clivagem do catecol envolve a quebra de ligação entre os átomos de carbono aos grupos hidroxila do catecol, pela ação da enzima catecol 1,2-dioxigenase, levando a formação de *cis*-muconato, e sucessivamente acetil-CoA e succinato (Figura 3). Já na via de meta clivagem, a fissão da molécula do catecol ocorre entre o átomo de carbono adjacente ao grupo hidroxila pela ação da enzima catecol 2,3-dioxigenase, formando semialdeído 2-hidroximucônico (2HMS) e, logo após, piruvato e acetaldeído (Figura 3) (HENDRICKX et al., 2006; TRIGUERIO, 2008). Os outros compostos como o tolueno, etilbenzeno e xileno, são degradados primeiramente pela oxidação do anel, ou a

oxidação dos grupos laterais pela ação de enzimas monoxigenases ou dioxigenases.

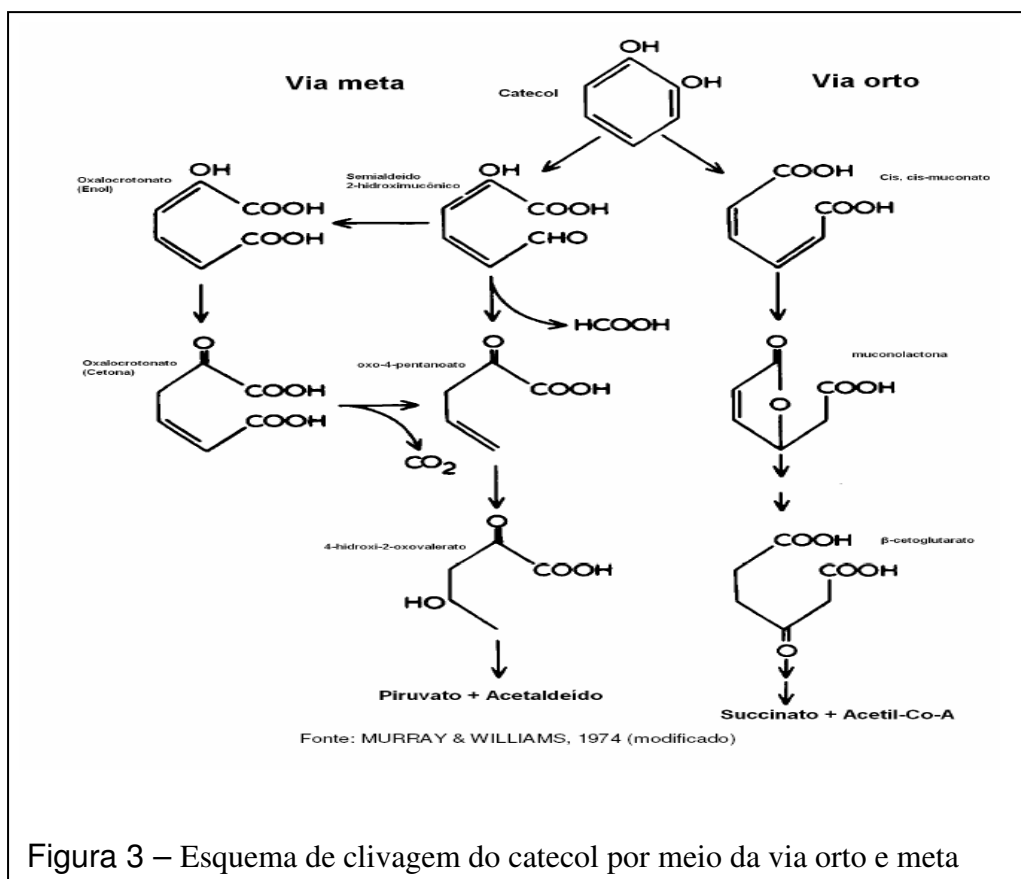


Figura 3 – Esquema de clivagem do catecol por meio da via orto e meta

Os fungos ligninolíticos possuem vias alternativas para a degradação de compostos aromáticos, ao contrário das bactérias eles produzem enzimas extracelulares. A produção dessas enzimas é fundamental para a aplicação destes fungos em processos de biorremediação e biodegradação desses compostos (TSAO et al., 1998). As principais enzimas extracelulares envolvidas nos processos de degradação da lignina e de compostos aromáticos de estruturas similares são a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP), lacase e a glucose-1-oxidase (LEONOWICZ et al., 1999).

A lignina, constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares, é um polímero amorfo complexo composto de unidades de fenil propano, uma variedade de compostos aromáticos, unidos através de diferentes tipos de ligações. Na madeira, a lignina pode ser encontrada nas paredes primárias e secundárias das células, e também nos espaços intercelulares, uma de suas funções é proteger a planta contra a degradação de suas paredes por microorganismos, função que se deve às suas características recalcitrantes, ou seja, de difícil biodegradação (SOUZA & ROSADO,

2009).

A Enzima Lignina Peroxidase pode ter sido formada durante a evolução dos fungos degradadores de lignina. Catalisa reações de desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos, conseqüentemente, o mecanismo extracelular, com a presença de LiPs, possibilitou a degradação da lignina. Lignina peroxidase tem a capacidade de degradar diversos compostos fenólicos e não fenólicos álcoois benzílicos e de metila, e provoca rearranjos intramoleculares (MOREIRA, 2006).

A enzima peroxidase dependente de manganês (MnP) tem sua produção limitada em alguns basidiomicetos, e até o presente momento não foi evidenciada em bactérias e leveduras. Essa enzima é uma glicoproteína que atua com isoenzimas, oxidando diretamente Mn (II) a Mn (III), atuando ativamente nos processos de oxidação catalítica, este é quelado por ácido orgânico como o oxalato, formando um complexo estável de alto potencial de oxidorredução; porém a MnP oxida somente estruturas fenólicas (SOUZA & ROSADO, 2009).

A enzima lacase é uma glicoproteína que contém cobre no seu sítio ativo. É um grupo de enzimas encontradas em fungos e plantas. Podem ser consideradas oxidases que catalisam reações de oxidação, na ausência de H₂O₂, utilizando O₂ como oxidante, sendo reduzido a H₂O em um processo de oxidação, envolvendo quatro elétrons. Essas enzimas apresentam uma capacidade ampla quanto à estrutura do substrato, podendo catalisar a oxidação de várias estruturas aromáticas, como as fenólicas (mono, di e polifenóis), também degradam compostos não fenólicos na presença de mediadores específicos (SOARES, 1998; SOUZA & ROSADO, 2009). Um exemplo é a utilização da lacase (benzendodiol: Oxigênio oxidoreductase EC 1.10.3.2) é uma enzima que oxida uma diversidade de compostos aromáticos, catalisando a remoção de elétrons e prótons de grupos hidróxifenólicos e aminoaromáticos. Estas enzimas oxidase de polifenol possuem inúmeras aplicações biotecnológicas, destacando – se o seu uso na confecção de biossensores para detecção de compostos fenólicos, na degradação de compostos aromáticos, como mediador da oxidação de resíduos da indústria de polpa, Kraft e entre outro (MARTINEZ et.a., 2009).

Os compostos aromáticos podem ser degradados pelos fungos basicamente de três maneiras: nas reações de transformações parciais, na mineralização do hidrocarboneto em presença de um segundo substrato, e na utilização do

hidrocarboneto como única fonte de carbono para crescimento (MARTINS et al., 2002).

Nas reações de transformações parciais ocorrem mediante detoxificação de xenobióticos pela via enzimática citocromo P- 450 monoxigenase. Nesse processo, ocorre oxidação do anel aromático por monoxigenases com a formação de óxidos arenos (epóxidos). Estes compostos podem sofrer ação das enzimas epóxido hidrolases convertendo em trans – dihidrodíóis, ou um dos anéis pode ser rearranjado enzimaticamente a fenol e ser conjugado, originando compostos como o-glicosídeos e o - glicoronídeos. O processo de oxidação e conjugação dos compostos fenólicos aumenta a solubilidade do poluente, facilitando a recuperação da área contaminada. Os fungos ascomicetos da ordem *Xylariales* e basidiomicetos da ordem *Aphylophorales* realizam esta via metabólica (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2005).

No processo de mineralização de compostos aromáticos por fungos ligninolíticos, estão envolvidas as enzimas peroxidases extracelulares e enzimas secundárias como lacases e monoxigenases P-450, enzimas não específicas que atuam na degradação da lignina (polímero aromático complexo), que também agem na decomposição de compostos aromáticos. Para ocorrer a degradação destes compostos, é necessária a presença de outros substratos como, por exemplo, a celulose, que atua como fonte de carbono, pois tanto a lignina quanto os compostos aromáticos não são utilizados como fontes únicas de carbono. Desvantagens desse processo são baixas taxas de degradação e necessidade de um co – substrato e acumulação de substâncias intermediárias tóxicas (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2005). No fungo *P. chrysosporium*, foi verificado o envolvimento da citocromo P450 monoxigenase nos processo de degradação de compostos aromáticos (TERAMOTO et al., 2004).

A assimilação de hidrocarbonetos aromáticos com únicas fontes de carbono e energia, quando resulta em mineralização dos compostos, constitui a forma de biodegradação ideal para a birremediação de áreas. Linhagens fúngicas capazes de realizar este tipo de via metabólica foram isoladas de solos contaminados e de biofiltros para tratamento de gases tóxicos (PRENAFETA -BOLDÚ et al., 2005; WOERTZ et al., 2001). Prenafeta- Boldú et al, (2002), observaram o crescimento da cepa *Cladophialophora sp. T1*(= ATCCMYA – 2335) retirada do solo em uma fração de gasolina contendo benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p- xileno (

BTEX), sendo capaz de degradar os componentes por assimilação e cometabolismo.

Atualmente, grande atenção tem sido dada à biodegradação de hidrocarbonetos por fungos da podridão branca da madeira. Dentre esses, *P. chrysosporium* tem sido usado como organismo modelo na maioria destes estudos. Embora o substrato natural degradado por este fungo seja a lignina, o complexo enzimático por ele secretado pode degradar grande variedade de poluentes recalcitrantes. Esta habilidade tem sido explicada pela similaridade estrutural destes poluentes por porções da estrutura da lignina e a baixa especificidade das ligninases produzidas por *P. chrysosporium* (BRODKRB & LEGGE, 1992).

7. Biorremediação

A biorremediação pode constituir uma alternativa mais segura do ponto de vista ambiental em relação aos processos físicos e químicos utilizados para eliminar compostos orgânicos contaminantes do solo e da água. A técnica consiste em utilizar sistemas biológicos, como plantas e microorganismos, com a finalidade de remover ou transformar contaminantes em substâncias pouco tóxicas ou sem nenhuma toxicidade (RIZZO et al., 2006).

7.1. Tipos de biorremediação

Há diversas tecnologias sendo desenvolvidas e consolidadas em muitos países como o objetivo de reduzir os impactos ambientais causados por compostos orgânicos, como os derivados do petróleo. Dentre elas, a biorremediação tem se destacado e inclui tecnologias “*in situ* e *ex situ*”. A técnica de biorremediação *in situ* é realizada no local contaminado, sem a necessidade de remoção do material contaminado, evitando assim, distúrbios associados com o movimento do solo ou água para outros locais de tratamento. Outra vantagem é a possibilidade de custo operacional ser baixo. A Biorremediação *in situ* engloba os processos: biorremediação intrínseca, bioestimulação, bioaumentação, bioventilação e fitorremediação.

A biorremediação intrínseca ou atenuação natural é uma forma passiva de remediação, atualmente utilizada em solos e águas subterrâneas. O processo

consiste na utilização de microorganismos endógenos ou autóctones que degradam hidrocarbonetos, resultando na contenção, transformação ou destruição dos produtos químicos indesejáveis no ambiente (OLIVEIRA et. al., 2008).

A biorremediação *in situ*, por exemplo, de solo contaminado por hidrocarbonetos foi descrita por Jorgensen et al. (2000), que observaram reduções significativas da concentração de resíduos desses contaminantes pela compostagem do solo em biopilhas, bioestimulando a microbiota autóctone. A utilização de consórcios de bactérias e leveduras foi bem avaliada por Gallego et al.(2007) que observaram total remoção de resíduos de hidrocarbonetos de fundo de tanques de armazenamento de produtos de petróleo .

O processo de bioestimulação consiste na correção das condições ambientais e envolve a adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos tais, como nitrogênio, fósforo, potássio, oxigênio e umidade para estimular a atividade dos microorganismos degradadores (SPINELLI, 2007). Em um estudo realizado para avaliar a capacidade de linhagens fúngicas dos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Pleorotus* em degradar HPAs sob bioestímulo, foi verificado que a adição de nutrientes promovia uma degradação ativa do composto aromático em aproximadamente em 80% pelas culturas puras. No estudo, também foi observado que culturas mistas foram capazes de degradar o composto mais eficiente, pois a remoção foi de 94,1%, sendo que dentre as linhagens fúngicas, *Pleorotus*, foi o microorganismo com maior potencial em degradar HPAs (ATAGANA et al., 2006).

O processo de bioaugmentação envolve a introdução de microorganismos, cultivados que tenham estabilidade genética, alta atividade enzimática, capacidade de competir com a população intrínseca do solo, e a capacidade de degradar hidrocarbonetos de diferentes estruturas em um sistema contaminado (SARKAR et al., 2005). A bioaugmentação utilizando a inoculação do fungo *Aspergillus versicolor* empregado conjuntamente com bioestímulo, com adição de fontes de nitrogênio em solo arenoso proporcionou uma remoção de hidrocarbonetos de petróleo em cerca de 25% a mais se comparada ao processo de atenuação natural(OLIVEIRA, 2008).

O processo de bioventilação consiste em injetar ar na zona não saturada do solo, fornecendo aos microrganismos condições de transporte de oxigênio adequadas de forma que a degradação possa continuar de maneira eficiente por períodos mais longos (ÖSTERRICHER-CUNHA et al., 2004). Esta técnica é geralmente usada para

remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo.

A técnica de biorremediação *ex situ* é realizada fora do local contaminado, envolve a remoção física do material contaminado, que é encaminhado e tratado em outro local. Esta técnica pode envolver alguns processos como: a compostagem, landfarming, biopilhas, biorreatores (SOARES, 2006).

O processo de compostagem consiste no tratamento termófilico de solos e resíduos contaminados, que utiliza material vegetal como palhas, folhas, galhos e grama com o objetivo de aumentar a permeabilidade do solo e aumentar a taxa de transferência de oxigênio (RIZZO et al., 2009). O material contaminado é normalmente removido do local de origem e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Neste local, será desencadeado um processo em que os micro-organismos aeróbios irão degradar os contaminantes orgânicos, transformando-os em material orgânico estabilizado, CO₂ e água (AHTIAINEN et al. 2002).

O processo Landfarming corresponde a uma técnica que envolve o espalhamento de solos contaminados em uma camada estreita com uma espessura de 50 cm, sobre a superfície do solo, estimulando a atividade microbiana aeróbia através da aeração, seguido da adição de nutrientes e revolvimento periódico. Esta última etapa permite a mistura dos resíduos à camada fértil do solo, com o intuito de que a própria microbiota indígena do solo atue como agente de degradação. Esse processo é empregado com elevada eficiência no tratamento de rejeitos industriais, especialmente na indústria petroquímica (KHUAN et al., 2004; PAUDYN et al., 2008).

O processo de biopilhas é uma técnica que envolve a construção de células ou pilhas de solo contaminado de forma a estimular a atividade microbiana aeróbia dentro da pilha através de uma aeração muito eficiente. A atividade microbiana pode ser aumentada pela adição de umidade e nutrientes como nitrogênio e fósforo. Alguns microorganismos degradam os hidrocarbonetos adsorvidos nas partículas de solo, reduzindo assim, suas concentrações (ABBAS, 2003). As biopilhas são aplicadas em solos contaminados com óleo, visando à redução deste contaminante no meio ambiente. Para tal é necessário o controle do teor da umidade e de nutrientes, controle do pH, monitorar o calor nas pilhas, a vazão de ar e a concentração de microrganismos (BAPTISTA, 2003).

Atualmente, trabalhos envolvendo a utilização de biorreatores no tratamento de

solos contaminados e resíduos sólidos têm aumentado. Os biorreatores são sistemas que apresentam várias configurações e arranjos, compostos por microorganismos e por outros agentes catalíticos, que agem cooperando como os microorganismos. O sistema de biorreatores pode ser dividido em dois grupos: sistema de biomassa em suspensão e sistema de biomassa aderida em suporte (MELLO, 2007).

Biorreatores com sistema de biomassa em suspensão são aqueles em que os microorganismos se encontram dispersos no meio. Segundo Brandão (2002), é necessário que os microorganismos sejam separados da fase líquida, no final do processo, podendo, ou não, voltar ao biorreator. Estes sistemas podem trabalhar em condições de aerobiose ou anaerobiose. Exemplos de reatores aeróbios são: lagoa aerada agitada (tanque com agitação), lodos ativados (tanque com agitação e reciclo de biomassa), reatores biológicos com membranas com módulo interno ou externo; já as lagoas anaeróbias, biofiltros anaeróbios, reatores UASB são exemplos de reatores que operam em condições de anaerobiose.

Prenafeta-Boldu et al., (2002) avaliaram a degradação dos componentes da mistura de BTEX pelo fungo de podridão branca, *Cladophialora sp.*, strain T1, em cultura em batelada com biomassa dispersa. No estudo de degradação, os autores verificaram que tolueno e etilbenzeno foram eliminados em 17 dias, m-xileno e p-xileno em 13 dias. Entretanto, a concentração inicial do benzeno permaneceu constante durante o período do ensaio. Também utilizando biofiltro inoculado com fungo *Paecilomyces variotii*, para o tratamento de água contaminada com BTEX, Garcia-Pena et al., (2008) obtiveram altas taxas de degradação de tolueno seguido de etilbenzeno, benzeno e por último os xilenos. Segundo Arriaga et al., (2006), a utilização de fungos em biofiltros tem sido vantajosa, pois aparentemente estes microorganismos exibem maiores taxas de degradação de contaminantes do que bactérias. Tem sido demonstrado que as hifas aéreas dos fungos filamentosos possibilitam o tratamento direto dos gases, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos. Os fungos filamentosos apresentam vantagens em relação às bactérias no processo de degradação de solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos. Pois conseguem sobreviver em ambientes com baixos índices de umidade, pH e limitação de nutrientes. Vários estudos foram realizados com fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium* e outros (ATAGANA, 2006).

Biorreatores com sistema de biomassa aderida são reatores biológicos em que a biomassa, ou seja, o conjunto de células microbianas disposto em biofilmes juntamente com as substâncias poliméricas por elas excretadas, encontra-se fixado a suportes sólidos. Os substratos e nutrientes, incluindo o oxigênio, são transportados por mecanismo difuso ao longo do biofilme (COSTERTON et al., 1995). Há relatos da aplicação de cepas de leveduras negras em biorreatores para tratamento de gases contendo hidrocarbonetos monoarômáticos e alcanos.

8. Conclusão

A contaminação resultante do lançamento de compostos derivados do petróleo (hidrocarbonetos) no ambiente tornou – se um agravante ambiental. Os hidrocarbonetos são incorporados pelas plantas, animais e são transferidos para o ser humano através de cadeia alimentar, prejudicando assim o equilíbrio do ecossistema.

Inúmeras tentativas para remediar áreas contaminadas foram sugeridas, mas muitas delas são onerosas e de resultado insuficiente. Nessa perspectiva, as técnicas de biorremediação baseadas na utilização de sistemas biológicos, apresentam-se como instrumento inovador, com a possibilidade de remediar áreas contaminadas a um menor custo e com menores danos ao ambiente.

O uso de microorganismos pode ser conveniente, principalmente em função da dispensa de reagentes químicos adicionais, da freqüente auto-sustentabilidade do processo e da natureza pouco poluente dos processos biológicos. A aplicação de fungos no processo de biorremediação tem sido um instrumento de grande importância para o desenvolvimento de novas tecnologias no tratamento de áreas contaminadas com hidrocarbonetos presentes nos derivados do petróleo. A capacidade de degradação dos fungos possibilita a remoção desses compostos do ambiente, transformando-os em substâncias inertes, gás carbônico e água, diminuindo, assim, os impactos negativos causados por esses contaminantes.

9. Referências Bibliográficas

ABBAS, M. Z. M. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais**. Piracicaba. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz” Curso De Especialização Em Gerenciamento Ambiental. 2003.

ATAGANA, H.I; HAYNES, R.J. & WALLIS, F.M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil; a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soild Pollution**. V. 172, p. 201-219.

ATLAS, R. M. Effects of temperature and crude oil composition on petrole um biodegradation. **Applied Microbiology**, v.30, p.396-403,1975.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbial**. v. 45, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spills. **Journal Chem. Tech. Biotechnol**. v.52, p.149-156, 1991.

AHTIAINEN,J.et al. Microbial toxicilty test and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosote-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.53, p.323-329,2002.

ARAÚJO, F.SM. e LEMOS, J.L.S. **Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo**. In: X Jornada de Iniciação Científica. Centro de Tecnologia Mineral- CETEM/MCT. 2002.

ARRIAGA, S; MUNHOZ, R; HERNANDEZ S; QUIEYSSE,B;REVAH,S. Gaseous Hexane Biodegradation *by Fussarium solandin* in two liquidphase Packed-Bed and Stirred-Tank Bforeactors, **Environmental Science Technology**, v.40, p.2390-2395, 2006.

AMFORTH,S; SINGLETON,I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons:current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Techonology and biotechnology**,Sussex, v.80, p.723-736, 2005.

BAAL, H.A; Johnson, M. Reinhard; A.M. Spormann. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. **Journal Bacteriol.** V. 178 , p. 5755-5761, 1996.

BAAL, H.A; Reinhard. M. Monoaromatic Hydrocarbon transformation under anaerobic conditions at Seal Beach. **Environmental Toxicol.** California: laboratory studies. v.45, p. 114 – 122, **1997.**

BACKETT, G.D; HUNTLEY, D. Presistence of LNAPL sources: relationship between risk reduction and LNAPL recovery. **Journal of Contaminant Hydrology.** San Diego, v. 59, p.3-26, 2002.

BARKER, J.; CHATZIS, J; OLIVEIRA, E. **Petrochemical contamination in the subsurface: processes, site assessment, remediation.** CENPES/ PETROBRAS Rio de Janeiro, 1995.

BAPTISTA, S.J. **Seleção das Melhores Condições de Biodegradação de Petróleo em Solo Argiloso.** 2003. 178f. Dissertação (em Mestrado de Química) - Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2003.

BARBOSA, B.C.A; SIQUEIRA,J.P; MOREIRA,I.C.Q; MARINHO.G.RODRIGUES,K A. **Remoção *niger* AN400. de compostos BTX em água residuária sintética por *Aspergillus*.** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará. 2009.

BATISTA, S.B; MOUNTEER, A.H; AMORIM, F.R; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.

BELLER.H.R; SPORMANN. A.M. Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. **Journal Bacteriol.** v. 180 , p. 5454-5457,1996.

BENTO, F.M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Oxon, v.96, p. 1049-1055, 2005.

BENTO, F.M; CAMARGO, F.A.O; OKEKE, B.C; FRANKENBERGER JR., W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological research**, v.160, p. 249-255,2005.

BIEGERT. T; G. HEIDER. J. Evidence that oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation o benzylsuccinate from toluene and fumarate. **Journal. Biochem.** Eur. v. 238, p. 661-668.

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

BORDEN, R, C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, v.33, p.18-189,1995.

BRANDÃO, H.L. **Transferência de massa no processo de biodegradação de efluentes líquidos em reatores com biofilme.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano.** Portaria n°1469, de 29 de dezembro de 2000.

BRODKORB, T. S; LEGGER, R. Enhanced biodegradation of phenantrene in oil tarte contaminated soils supplemented with *Phanerochae chryso sporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.58, p.3117-3121,1992.

CARVALHO, W; CANILHA, L; FERRAZ, A; MILAGRES, A.M.F. **Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira.** São Paulo. **Revista Química Nova.** v. 32, p. . 2009.

CALDWELL, M.E.;GARRET, R.C.PRINCE, R.C; SUFLITA, J.M. Anaerobic biodegradation of long-chain n- alkanes under sulfate-reducing conditions . **Environmental Science Technology.** v.32, p. 2191 -2195, 1998.

CALDWELL, M.E.; SUFLITA, J.Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions. **Environmental Science Technology.** v. 34, p. 1216-1220, 2000.

CARDINI, G.; URTSHUK, P. Cytochrome P-450 Involvement in the Oxidation of *n*-Octane by Cell-Free Extracts of *Corynebacterium* sp. Strain 7E1C. **Journal. Biol. Chem.**,v.243, p.6070-6072, 1968.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Disponível em: < www.cetesb.sp.gov.br > Acesso em: 18 julho 2010.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG ,Y.; GRIMONT, P.;SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Res. Microbiol,** v.155, p.587-595, 2004.

CHAÎNEAU C.H; MOREL, J; DUPONT, J; BURY, E; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **Sci. Tot. Environ.**, v.227, p. 237-247, 1999.

CHAKRABORTY, R. & COATES, J.D., Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 64, p. 437-446, 2004.

CHIRAG, G, P; MENDONZA, E.A. Determination of total mycophenolic acid and its glucuronide metabolite using liquid chromatography with ultraviolet detection and unbound mycophenolic and using tandem mass spectrometry. **Journal. of chromatography B.** v. 813, p. 287-294, 2004.

CHRZANOWSKI, L.; BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; OWSIANIAK, M.; AURICH, A; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Phenol and *n*-alkanes (C12 and C16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1943-1949, 2008.

CLICK MACAÉ, **O Refino – Passo a Passo**. Disponível em: <www.Clickmacae.com.br/?sec=368pag=pagina&cód=215>. acesso em 11 nov.2009.

COATES, J.D.; CHAKRABORTY, R.; MCINERNEY, M.J. Anaerobic benzene biodegradation – a new ear. **Res. Microbiol.** v. 153, p. 621-628, 2002.

COLBERG. P.J.S; YOUNG, L.Y. Anaerobic degradation of nonhagenated homocyclic aromatic compounds coupled with nitrate, iron, or sulfate reduction. New York. **Wiley-Liss.** p. 307-330.1995.

CONNELL, W; HAWKER, D.W. Use of polynomial expressions to describe the bioconcentration of hydrophobic chemicals by fish. **Ecotoxicology and Enviromental Safety.** Australia. V.13, p. 242-250. 1998.

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

CORSEUIL, H. X.; MARTINS, M. D. M. Contaminação de Águas Subterrâneas por Derramamento de Gasolina: O Problema é Grave. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, p.50-54, 1997.

CÔRREA, O.L.S. Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia. Rio de Janeiro: **Interciência**. p.90. 2003. v

CORSEUIL, H. X; ALVAREZ, P.J.J. Natural biorrediation perspective for BTX. Contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sel.Tech**, v. 34, p.331-318,1996. .

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z. DE BEER, D.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; JAMES, G. A. Biofilms: the customized microniche. **Journal of Bacteriology**. v.176. p 2173-2142,1994.

COSTERTON, J.W; LEWANDOWSKI Z; CADWELL, D.E; KORBER D. R; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Microbiol.** v.49, p.711-745,1995.

CULLEN, D.W; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil & Biochemistry**. v. 30, p.983-993, 1998.

CROSS, W.H; POHLAND, F.G; CHIAN, E.S.K; HARPER, S.R; LU, F; GAO,H; SAUNDERS, F.M; HAVASH, J; WANG, E. Anaerobic treatment of gasifier effluent: Final report. Atlanta(USA).Georgia inst.,Of Tech. **School of Civil Engineering**. 1986.

DEL'ARCO, J. P. **Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso**. 171f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.1999.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. **Int. Microbiol.** v. 7, p. 173-180, 2004.

DURÁN, N; ESPOSITO, E. Biodegradação de Lignina e Tratamento de Efluentes por Fungos Ligninolíticos. In: Melo, I.S.: AZEVEDO, J.L.(Ed.) **Microbiologia Ambiental** . CNPMA/EMBRAPA Editora. p. 269-292,1997.

DUARTE, K, S. **Avaliação de risco relacionado á contaminação dos solos pro hidrocarbonetos no Distrito Federal**. 2003. 259f. Teses de (Doutorado em Engenharia civil). Departamento de Engenharia Civil e Ambiental - Universidade de Brasília, DF. 2003.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Disponível em: <<http://www.epa.gov/>. Acesso em 08 junho 2007.

EVANS, P.J.; MANG, D.T.; KIM, K.S.; YOUNG, L.Y. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 57, p. 1139-1145, 1991.

FABIANO, M. **Simulação Estacionária e Dinâmica do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo Para o Tratamento de Água Residuárias**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

FETTER, C.W. **Contaminant hidrogeology**. New York, Macmillan Publishing Company, 1993.

FERREIRA, A.B.H. Aurélio século XXI: O minidicionário da Língua Portuguesa. 3. ed.rev. e ampl.. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 2001.

FERREIRA, J.; ZUQUETTE, L. V. Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os componentes do meio físico. **Geociências: São Paulo**, v.17, p.527-557, 1998.

GALLEGO, J.L.R.; MARTÍNEZ, M J.G.; LLAMAS, J.F.; BELLOCH, C.; PELÁEZ, A.I.; SÁNCHEZ, J. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. **Biodegradation**, v.18, p.269-281, 2007.

GOLOVLEVA, L.A.; AHARONSON, N.; GREENHALGH, R.; SETHUNATHAN, N.; VPNK, J.W. The Role and Limitations of Microorganisms in the Conversion of

Xenobiotics. **Pure and Applied Chemistry**, v.62, p. 351-364,1990.

GUSMÃO, V. R.; MARTINS, T.H.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I.K.; THIEMANN;O.H.; VARESHE, M.B.A. BTEX and Etanol Removal in Horizontal – flow Anaerobic Immobilized Biomass Reactors, under Denitrifying Condition. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1391-1400,2006.

GUIGUER, N. Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento. **Water Hydrogeologic Inc.** 356p. 1996. v

GRACIANI, F.S. **Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do metoprolol em ratos.** 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto/UPS. 2009.

GRISHCHENKOV, V.G; TOWNSEND, T.J. MCDONALD, R. L. AUTENRIETH, J.S; BORONIN, A.M. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. **Process Biochem.** v. 35, p.889-896. 2000.

HAMAMURA, N.;STORFA, R.T.; SEMPRINI, L.; ARP, D.J. Diversity in Butane Monooxygenases Among Butane- Grown Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4586-4593, 1999.

HAMAMURA, N.; YEAGER, C. M.; ARP, D. J. Two Distinct Monooxygenases for Alkane Oxidation in *Nocardioides* sp. Strain CF8. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p.4992-4998, 2001.

HENDERSON, R.F. Aromatic Hydrocarbons- Benzene and Other Alkybenzenes. In HARRIS, R. et al. (Ed). *Patty's industrial hygiene and toxicology.* 5 th ed. New York: **Wiley-Interscience.** 2005.

HENDRICKX, B; JUNCA, H; VOSAHLOVA, J; LINDER, A; RUEGG, I; WITSCHHEL, M.B; FABER, F; EGLI, T; MAU, M; SCHLÔMANN, M; BRENNEROVA, M; RENNER, V; PIEPER, D.H; TOP, E.M; DEJONGHE, W; BASTIAENS, L;

SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.250-265, 2006.

HOLLIGER, C.; GASPARD, S.; GLOD, S. Contaminated environments in subsurface and biodegradation: organic contaminants, **FEMS Microbiology Reviews**, v.20, p.517-523, 1997.

JACQUES, J.S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um solo argiloso**. 2005a. 170f.Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. .

JACQUES, J.S; BENTO,F.M; ANTONIOLLI, Z.I; CAMARGO,F.A.O. Biorremediação de Solos Contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Revista Ciência Rural**, v. 37, p.1192- 1021, 2007.

JOHNSON, S.J.; WOOLHOUSE, K.J.; PROMMERA H.; BARRYA, D.A.; HRISTOFI N. Contribution of Anaerobic Microbial Activity to Natural Attenuation of Benzene in Groundwater. **Engineering Geology**, Edinburgh, v. 2186, p. 1-7, 2003.

KANE , M.G; HILL, I.G; HAMMOND,M.S; CAMPI, J; GREENING, B.K. Organic thin-film transistor-driven polymer-dispersed liquid crystal displays on flexible polymeric substrates. New Jersey. **Applied Physisc Letters**, v. 80, n. 6. 2001.

KHUAN, I. R.; HUDSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v.71.p.95-122,2004.

KHERA, S.; SAINI , S. H; SHAMA, D.K; CHADHA, B. S; CHIMNI, S.S; Biodegradation of Azo dye C.1. Acid Red 88 by an Anoxic-Aerobic Sequential Bioreactor. **Dyes and Pigments**, v.70, p.1-7, 2006.

KIM, T.H.; OH, Y. S.; KIM, S.J. The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p. 333-337, 2000.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. **J. Biosci. Bioeng**, v.94, p.187-201, 2002.

KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, T. G.; SAAKI, A.; TAKEYAMA, Y.I.; IDEMOTO, Y.; KOURA, N.; YANAGISHITA, H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosyerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. **Biotechnol. Lett.**, v.23, p.1709-1714, 2001.

LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, **Microbial Review**, v.54, p.305-315, 1990.

LEE, M.D.; THOMAS, J. M.; BORDEN, R. C.; BEDIANT, P.B.; WARD, C.H.; WILSON, J.T. Bioremediation of aquifers contaminated with organic compounds. **CRC Critical Reviews in Environmental control**, v1.p.29-89.1988.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA. A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M; HOFRIKTER, M.; WESENBERG, D; ROGALSKI, J. Fungal laccase: Properties and Activity on Lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v.41.p.185-227.2001.

LEONOWICZ, A; MATUSZEWSKA, M; LUTEREK, J; ZIEGENHAGEN, D; WOJTAS-WASILEWSKA, M; CHO, N.S; HOFRIKTER, M ; ROGALSKI, J. Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. **Fungal Genomics and Biology**, v.27, p.173-183, 1999.

LIDA, T.;SUMITA, T.; OHTA, A.; TAKAGI, M. The Cytochrome P450ALK Multigene Family of an *n*-Alkane- Assimilating Yeast, *Yarrowia lipolytica*: Cloning and Characterization of Genes Coding for New CYP52 Family Members. **Yeast**, v.16,

p.1077-1087, 2000.

MACHADO, K.M.G; MATHEUS, D.R; MONTEIRO, R.T.R & BONONI, V.L.R. Ligininolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R declorizaton by tropical brazilian basidiomycetes fungi Brazilian. **Journal of Microbiology**, v.36, p. 246-252, 2005a.

MACHADO, K.M.G; MATHEUS, D.R; MONTEIRO, R.T.R & BONONI, V.L. Biodegradation of penatachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Bioctechonology**, v.21, p.297-301,2005b.

MADIGAN, M.T.;MARTINKO,JM. Brock biology microorganisms. 11th ed.United States of America. **Prentice-Hall**, v.992p.2006.

MAENG, J.H., SAKAI, Y., TANI, Y., AND KATO, N. Isolation and Characterization of a Novel Oxygenase that Catalyzes the First Step of *n*-Alkane Oxidation in *Acinetobacter* sp Strain M-1. **J. Bacteriol**, v.178, p.3695-3700, 1996.

MARINO, J.B. **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo**. Rio de Janeiro, Ed. Interciência,p.228.2005.

MARIANO, P.A. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162f. Tese (Dourado em Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Rio Claro. 2006.

MARIZ, D.F. **Um estudo sobre mobilização de gasolina residual por vibração em areia saturada**. Tese (Doutorado) COPPE / UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2000.

MARTINEZ, G. C; GIESE, E.C; PEREIRA, J.O; DEKKER, R.F.H; BARBOSA, A.M. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como

produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, 397-406,2009.

MARTINS, M.A.M.; QUEIROZ, M.J.; SILVESTRE, A.J.D.;LIMA. N. Relationship of chemical Structures Médium and potentialities of their Biodegradation. **Research in Microbiology**, v.153, p. 361-368,2002.

MATHEUS, D.R; OKINO, L.K. Utilização de basidiomicetos em processo biotecnológicos. In: BONONI, V.L.R; GRANDI, R.A.P. Zigomicetos, basidiomicetos e deutoremicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica/ SMA. São Paulo. p. 107-139.2000.

MAUERSBERGER, S.;OHKUMA, M.; SCHUNK, W.H. Candida maltosa. In: Wolf K. (Ed) Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook. Springer, Berlin Heidelberg. New York, p. 411-580, 1996.

MAZZUCO,L.M. **Atenuação Natural de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos Contaminados com Óleo Diesel**. Florianópolis. 2004. 86f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina. Química Analítica. 2004.

MELLO, P.S; FABRIN-NETO, J.B; DE MOARES, S.G; ASSALIN, M.R; DURAN, N; HAUN, M. Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblast and the *Algae Slenastrum capricornutum*. **Chemosphere**, v.62, p.1207-1213, 2006.

MELLO, J.M.M. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme**. 05/2007.152f. Dissertação de (Mestrado em Engenharia Química) - **Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis. 2007.

MENDES, R. Exposição ocupacional ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde dos trabalhadores. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 39, p. 249-256,1993.

MENDONÇA, M.C.M. **Caracterização e tratabilidade de resíduos líquidos gerados em terminais de armazenamento de álcool e derivados de petróleo.** 2004. 161f. Dissertação de (Mestrado em Engenharia Civil) - **Universidade Federal de Pernambuco.** 2004.

MOARES, L.M; PAULA JÚNIOR. D.R. Avaliação da Biodegradabilidade anaeróbia de Resíduos da Bovinocultura e da Suinocultura. **Eng. Agrícola**, v.24, p. 445-454, 2004.

MOREIRA, C.A. Aplicação de métodos geofísicos no monitoramento de área contaminada sob atenuação natural. **Eng Sanit Ambient**, v.14, p.257-264. 2009.

MORREIRA,C.A. Aplicação de métodos geofísicos no monitoramento de área contaminada sob atenuação natural. **Engenharia sanitária Ambiental.** v.14, p. 257-264. 2009.

MURRELL, J.C., GILBERT, B., McDONALD, I. R. Molecular Biology and Regulation of Methane Monooxygenase. **Arch. Microbiol.**, v.173, p.325-332, 2000.

MURRELL, J.C., GILBERT, B., McDONALD, I. R. Molecular Biology and Regulation of Methane Monooxygenase. **Arch. Microbiol.**, v.173, p.325-332, 2000.

NEIVA, J. 1986. **Conheça o petróleo.** 1 ed. Rio de Janeiro, Editora ao Livro Técnico.

NEPC- National Environment Protection Council, Guideline on Ecological Risk Assessment,1999. Disponível em:< http://www.ephc.gov.au/pdf/cd/cs_05_era.pdf>. Acesso em 14:jul. 2009.

NUNES, C.C.; CORSEUIL,H.X. Importância do Etanol na Atenuação Natural de Águas Subterrâneas Impactadas por Gasolina. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.** Rio de Janeiro. v. 12, p. 259-265. 2007.

OLIVEIRA, S.D. Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por Petróleo. Rio de Janeiro. Serie Tecnológica Ambiental. v.45. 67p. **CETEM/MCT**. 2008.

ÖSTERREICHER-CUNHA, P; VAGAS JR, E.A; GUIMARÃES, J.R.D; CAMPOS, T.M.P; NUNES, CM.F; COSTA, A; ANTUNES, F.S; SIVA, M.IP; MANO, D.M. Evaluation of bioventing on gasoline-ethanol contaminated disturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 110.p.63-73,2004.

PAN, L.; ADAMS M.; PAWLLSZYN, J. Determination of fatty Acids Using Solid-phase Microextraction. **Analytical Chemistry**. v. 67, p. 4396-4403,1995.

PAUDYN, K; RUTTER,A; ROWE. R.K; POLAND, J.S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. **Cold Regions Science and Technology**. v. 53, p. 102-114, 2008.

PEÑA, G.I; HERNÁNDEZ, S; AURIA, R; REVAH, S. Correlation of Biological Activity and Reactor Performance in Biofiltration of Toluene with the Fungus *Paecilomyces variotii* CBS115145. **Appl. Envir. Microbiol.** v.7, p.4280 - 4285.2005.

PEDROZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO.; M. T; PAIM.; A. P.S. GAVAZZA,S. Remoção Anaeróbia dos Componentes BTEX de Água Contaminada por Gasolina.**Revista Brasileira de Recursos Hídrico**.v.14 p.61-67,2009.

PETERS, K.E; MOLDOWAN, J.M. The Biomarker Guide: interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments. 1.ed. **Englenwood Cliffs**: NeW Jersey Prentice Hall. 1993.

PEDROZO, J.M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL,H.X;SCHNEIDER. M.R.; LINHARES , M.M. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do petróleo. Salvador : Centro de Recursos Ambientais, Governo da Bahia, **Secretaria do Planejamento, Ciência e tecnologia**. Salvador. P. 229,2002.

PETROBRAS. Disponível em: [http:// www.petrobras.com.br](http://www.petrobras.com.br). Acesso em 13 de nov. 2009.

PHELPS, C.D; YOUNG, L.Y. Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. **Adv Agronomy**, v.70, p,329-357, 2001.

PHELPS, C.D; KERKHOF, L.j; YOUNG, L.Y. Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. **FEMS Microbiol Ecol**, v.27, p. 269-279,1998.

PRENAFETA – BOLDU, F. X. Growth of fungi on volatile aromatic Hydrocarbons: **Environmental perspectives**. Thesis Wageningen University, Wageningen. 2002.

PRENAFETA – BOLDU, F. X.; SUMMERBELL, R.; DE HOOG, G. S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. **FEMS Microbiology Ver.**,[S.l.], v.xx, p. 1-22,2005.

POFFO, I.R.F. 2000. **Vazamentos de óleo no litoral norte do estado de São Paulo: análise histórica (1974 a 1999)**. 2000.175f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Ciências Ambientais. (PROCAM). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2000.

POINT,O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) – contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**. Oxford. V,54, p.2004.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: Edunisc. v.2, p. 222,2002.

RABUS, R. & WIDEL, F. Anaerobic degradation of ethylbenzene and aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. **Arch Microbiol**. v. 163, p. 96-103, 1995.

RAIONOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASIL'CHENKO, L.G. Fungal decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A review. **Applied and Biochemical Microbiology**. v.40, p.1-17, 2000.

REDDY, G.V.B; GOLD, M.H. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete Chrysosporium*: intermediates and reactions involved. **Microbiology**, v.146, p.405-413, 1993.

RIBEIRO, R. **Recuperação da qualidade de águas contaminadas por gasolina usando reator anaeróbico de leito fixo**. 2005. 150f. Tese (Ph.D) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

RISER – ROBERTS,EVE.Remediation of Petroleum Contaminated Soils. **Lewis Publishers**. 1998.

RIZZO, A.C.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U.;SANTOS,R.L.C.;SOBRAL, S.G.L. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Belo Horizonte: **CETEM/MCT**. 2006.

RODRIGUES, S; DUARTE, A.C. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A; DUARTE, A; SANTOS, T. (Ed.). O Ambiente e a Saúde. Lisboa. **Instituto Piaget**.p.136-176. 2003

ROBBINS, E. A.; ROBERTSON, M.; STEUBE, G. False identification of BTEX compounds using EPA method 8020. **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**, v.3, p.93-110, 1993.

SÁ, M.C.C.**Tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. 2002. 116f. Tese (M. SC). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química, Rio de Janeiro. 2002.

SAKAKI, T., INOUYE, K. Practical application of mammalian cytochrome P450.

Journal of Bioscience and Bioengineering, v.90, p. 583-590, 2000.

SATOM, M.M. **Avaliação do Método de IWATSU et al., (1981) para isolamanto de leveduras negras do solo, degradadoras de hidrocarbonetos.** 06/2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista. 2008.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental pollution**, v. 136 p. 187-195, 2005.

SHACKELFORD, C.D. Remediation of Contaminated land: An Overview. Proceedings of the 11th Panamerican **Conference of Soil Mechanics and Geotechnics Engineering**, Iguassu Falls, Brazil. p.1-60, 1999.

SILVA, E.F; MAINIER, F.B. Contaminações ambientais provocadas pelo bezeno existente na gasolina automotiva. In: **Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia** – SEGeT2004, Resende, RJ. Associação Educacional Dom Bosco, 2004.

SHIM, H; YANG, S.T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in fibrous-bed bioreactor. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.67,p.99-112,1999.

SMITS, T.H.M.; BALADA, S.B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J.B. Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **J. Bacteriol.**, v.184, p.1733-1742, 2002.

SHIM,S.S; KAWAMOTO,K. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. **Water Research**,v.36,p.4445-4454,2002.

SPINELLI, A.C.C.O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. 174f. Teste de doutorado em (Geociências) – Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

SILVA, P, S. **Degradação anaeróbica de BTEXS em reatores alimentados com água contaminada por gasolina**. 05/2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade de Pernambuco. Recife. 2008.

SILVA, R. R. **Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. 2009.186f. Tese (Doutorado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) - Instituto de botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo. 2009.

SOARES, C.H.L. **Estudos Mecanismos de degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetes degradadores de madeira**. 1998. 133f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.1998.

SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. 8. ed., 2v, Rio de Janeiro, 2005.

SOARES, M. **Aplicação da biofiltração no tratamento de vapores de gasolina**. 2006. 207f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos - área de concentração de saúde) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de Fungos Basidiomicetes em Biodegradação de Efluentes Têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v.2, p. 121-139, 2009.

SUMITA, T.; IIDA, T.; HIRATA, A.; HORIUCHI, H.; TAKAGI, M.; OHTA, A. Peroxisome deficiency represses the expression of *n*-alkane-inducible *YIALK1* encoding cytochrome P450ALK1 in *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology**

Letters, v.214, p. 31-38, 2000.

TERAMOTO, H.; TANAKA,H.;WARIISHI,H.; Fungal Cytochrome P450s Catalyzing Hydroxylation Substituted Toluenes to form their Hydroxymethyl Derivatives. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 255-260, 2004.

TIBURTIUS, E.R.L.; ZAMORA, P.P.; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e Processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Quim. Nova**. v. 27, p. 441-446, 2004.

TRIGUEIRO , D.E.G. **Avaliação da cinética de biodegradação dos compostos tóxicos: benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e fenol.**2008. 157f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná Campus de Toledo. Paraná.2008.

TORTELLA, G.R; DIEZ, M.C; DURÁN, N. Fungal diversity and use in decompositon of environmental pollutants. **Rev. Microbiol.** v. 31, p. 197-212, 2005.

TSAO, C.W; SONG, H.G; BARTHA, R. Metabolism of Benzene, Toluene, and Xylene Hydrocarbons in Soil. **Applied e Environmental Microbiology**,v.64, p.4924-4929, 1998.

TISSOT, B.P; WELTE, D.H. Petroleum formation and occurrence: a new approach to oil and gas expolration. Berlin. 1.ed. **Springer- Verlag Berlin Heidelberg**.1984.

THIELE, S; BRÜMER, G.W. Bioformation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Under oxygen Deficient Conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, p.733-735,2002.

USBERCO, J; SALVADOR. E. **Química orgânica** . São Paulo: Saraiva, 1995.

URURAHY. A.F.P. **Biodegradação do Resíduo Oleoso Proveniente de**

Refinaria de Petróleo. 1998. 334f. Tese (Doutorado em Química) - Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.1998.

VERSCHUEREN,K.Handbook of environmental data of organic chemicals. 4th ed. Chichester, **England:Wiley**,2416p, 2001.

YADAY, J.S.; REDDY, C.A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 59, p. 756-762, 1993.

WATKINSON, R.J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, v.1, p. 79-92, 1990.

WEBER, F.J.; HAGE, K.C.; DE BONT, J.A.M. Growth of the Fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. **Appl. Environ. Microb.**, v.61, p.3562-3566, 1995.

WEINER, J.M; LOVLEY, D.R. Rapid Benzene Degradation in Methanogenic from a Petroleum-Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p. 1937-1939,1998.

WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R. Cytochromes P450: a success story. **Genome Biology**, v.1, p. 3003.1-3003.9, 2000.

WIDDEL, F; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Biotechnol.** v. 12, p. 259-276, 2001.

WOERTZ, J.R; KINNEY, K.A; SZANISZLO, P.J. A. Fungal Vapor-Phase Bioreactor for the biotrickling filter. **Waste Manage.** v. 51, p. 895-902, 2001.

WRENN, A.B. Biodegradation of aromatic Hydrocarbons. Revisado por SWARD, R. E.em abril, 1998. Disponível em: <http://www.cee.umd.edu/~eseagren/bioAHC97.htm> Acesso em 20 de novembro de

2009.

ZHANG, C. & BENNETT, G.N. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 67, p. 600-618, 2005.

ZHANG, G.; WU, Y. X.; MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Hangzhou. v.6B, p. 725-730, 2005.

10. Anexos

10.1. Listas de Figuras

Figura 1 - Estrutura química de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEXS)

Figura 2 - Esquema de clivagem do catecol por meio da via de orto clivagem

Figura 3 - Esquema de clivagem do catecol por meio da via de metaclivagem