

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

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE
Cunninghamella elegans CULTIVADA EM MEIO
CONTENDO NAFTALENO**

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

RECIFE – 2004

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE
Cunninghamella elegans **CULTIVADA EM MEIO**
CONTENDO NAFTALENO

RECIFE - 2004

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE
Cunninghamella elegans **CULTIVADA EM MEIO**
CONTENDO NAFTALENO

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
CURSO DE MESTRADO EM BIOLOGIA
DE FUNGOS DO CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO, COMO PARTE DOS
REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA DE
FUNGOS.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI
CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ALINE ELESBÃO DO NASCIMENTO

RECIFE - 2004

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS DE
Cunninghamella elegans **CULTIVADA EM MEIO**
CONTENDO NAFTALENO

PETRUSK HOMERO CAMPOS MARINHO

Dissertação defendida em 19/02/04 e aprovada pela banca examinadora:

ORIENTADOR: _____
Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

EXAMINADORES: _____
Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Resende

SUPLENTE: _____
Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão

Prof^a. Dr^a. Neiva Tinti

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro Marinho e Kátia Natércia, pelo Amor Incondicional.

À minha irmã Kaline e aos meus sobrinhos Luan e Pedro, pelo mesmo sentimento que nos move - A Virtude por Excelência e único Nome que pode substituir Deus - Amor.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Galba Maria de Campos Takaki, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho;

À Prof^ª. Dr^ª. Aline Elesbão do Nascimento, pela co-orientação, atenção e amizade, e por ter me ajudado em todos os momentos em que precisei;

Aos colegas de trabalho Marcos Lima e Patrícia Mendes, pela amizade e colaboração, no transcorrer deste trabalho, e por todos os momentos em que convivemos;

À Ricardo Kenji, pela amizade de longa data, e por ter me ajudado nos experimentos de CCD e HPLC;

À Raquel Diniz, pelo amor e carinho, durante todo esse tempo em que convivemos juntos;

À Francisco Santiago, por ter me presenteado com um computador, o qual pude escrever a minha dissertação;

Ao Sr. Rufino, pelo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho;

Aos meus colegas do Mestrado em Biologia de Fungos, pelos momentos gratificantes;

Aos professores do Mestrado em Biologia de Fungos, em especial à Prof^ª. Dr^ª. Maria Auxiliadora, pela atenção com que sempre me tratou;

Aos técnicos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Humberto e Salatiel, pela presteza dos seus serviços;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Estudo, e ao CTPETRO, FINEP e PRONEX pelo apoio financeiro;

À Universidade Católica de Pernambuco, pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. O PETRÓLEO NO AMBIENTE.....	15
2.2. O GÊNERO <i>Cunninghamella</i>	21
2.3. ULTRAESTRUTURA.....	23
2.4. SISTEMA DE UBIQUINONAS.....	25
3. OBJETIVOS	30
3.1. GERAL.....	30
3.2. ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. MATERIAIS.....	31
4.1.1. MICRORGANISMO.....	31
4.1.2. MEIOS DE CULTURA.....	31
4.1.2.1. MEIO DE MANUTENÇÃO.....	31
4.1.2.2. MEIO PARA OBTENÇÃO DE ESPOROS.....	31
4.1.2.3. MEIO DE CRESCIMENTO.....	32
4.2. MÉTODOS.....	32
4.2.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	32
4.2.1.1. PRÉ-INÓCULO.....	32
4.2.1.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	33
4.2.1.3. TRATAMENTO COM NAFTALENO.....	33
4.2.1.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	33
4.2.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	34
4.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO pH.....	34
4.2.2.2. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE.....	34
4.2.2.3. EXTRAÇÃO DE UBIQUINONAS.....	35

4.2.2.4. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	35
4.2.2.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	36
4.2.3. ESTUDO ULTRAESTRUTURAL.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1. ANÁLISE DO PERFIL DE CRESCIMENTO.....	39
5.2. ANÁLISE DO SISTEMA DE UBIQUINONAS.....	46
5.3. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS.....	47
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura Geral da Ubiquinona, segundo Dr. Karl Folkers et al., 1958.....	25
Figura 2. O ciclo das Quinonas.....	26
Figura 3. Fluxograma de extração, isolamento, caracterização e identificação das Ubiquinonas, segundo Yamada & kondo 1973.....	36
Figura 4. Perfil de Crescimento da amostra de <i>Cunninghamella elegans</i> em meio SDB sem naftaleno (controle contínuo): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28°C, durante 120 horas.....	34
Figura 5. Perfil de Crescimento da amostra de <i>Cunninghamella elegans</i> em meio SDB sem naftaleno (controle descontínuo): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28°C, durante 120 horas.....	41
Figura 6. Perfil de Crescimento da amostra de <i>Cunninghamella elegans</i> em meio SDB com naftaleno (tratada): pH do meio (A); crescimento e consumo de glicose (B) cultivada a 28°C, durante 120 horas.....	44
Figura 7. Percentual das Ubiquinonas encontradas no isolado de <i>Cunninghamella elegans</i> , cultivada em meio SDB na presença e ausência de naftaleno a 28°C, durante 120 horas.....	45

Figura 8. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB sem naftaleno (controle): Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 72 horas de cultivo 1100X. Clamidosporos (●); Hifas (★).....48

Figura 9. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB em ausência e presença de naftaleno: Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 96 horas de cultivo 900X (controle contínuo); B – 96 horas de cultivo 900X (controle descontínuo); C – 96 horas de cultivo 900X (tratado). Clamidosporos (●); Hifas (★).....50

Figura 10. *Cunninghamella elegans* cultivada em meio SDB em ausência e presença de naftaleno: Eletronmicrografia de Varredura – Método Rotina. A – 120 horas de cultivo 900X (controle contínuo); B – 120 horas de cultivo 900X (controle descontínuo); C – 120 horas de cultivo 900X (tratado). Clamidosporos (●); Hifas (★).....51

RESUMO

O presente trabalho, com o isolado de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), visou à avaliação do comportamento do crescimento da espécie, em presença e ausência do naftaleno, bem como a ultraestrutura e aspectos bioquímicos, através do sistema de ubiquinonas. Os resultados demonstraram a capacidade do isolado em crescer tanto em presença, como na ausência do hidrocarboneto, contudo, exibindo pequenas variações no perfil de crescimento. O estudo cromatográfico, realizado através de camada delgada e líquida de alta eficiência revelou cromatogramas com sutis diferenças no padrão de ubiquinonas. Foi observado, neste estudo, que a amostra de *C. elegans*, cultivada tanto em presença como em ausência de naftaleno, apresentou as ubiquinonas Q6 e ubiquinona Q9, como picos principais. Contudo, foi possível verificar que a amostra controle cultivada na ausência do naftaleno exibiu menor percentual da ubiquinona Q9 (98,1%) quando comparada com a amostra tratada (99,7%) em naftaleno. Com a utilização do método de rotina, utilizando-se microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar diferenças ultraestruturais da amostra de *C. elegans*, cultivada na presença e ausência de naftaleno. Variações relacionadas aos aspectos morfológicos, à eletrondensidade das hifas, organização micelial e presença de clamidosporos foram detectadas.

Palavras Chave: *Cunninghamella elegans*, Ubiquinonas, Ultraestrutura

ABSTRACT

In the present work the isolate of *Cunninghamella elegans* (UCP 542), was studied to evaluate the growth behavior in naphthalene medium. The ultrastructure and the ubiquinone systems were also analyzed. The results demonstrated the capacity of the isolate to grow in the presence of the hydrocarbon, however, exhibiting variations in the growth profile. The naphthalene presence induced an increase in the lag phase of growth, and a reduction in the biomass yield. The chromatographic study, performed by the use of thin-layer and high-pressure liquid chromatography revealed chromatograms with differences in the ubiquinone system pattern. It was observed, in this study, that *C. elegans* presented the ubiquinones Q6 and ubiquinone Q9, as main peaks. However, it was possible to verify that control samples, cultivated in the absence of the naphthalene, exhibited smaller percentage of the ubiquinone Q9 (98,1%) when compared with the sample grown in naphthalene (99,7%). By using the routine method for scanning electron microscopy, it was possible to verify differences in the ultrastructure sample of *C. elegans*. Variations related to the morphological aspects, cell electrondensity, mycelium organization and clamidospores presence were observed.

Key Words: *Cunninghamella elegans*, Ubiquinones, Ultrastructure