

## XII-052 - POTENCIAL DE TOXICIDADE DO 2,4-DINITROFENOL AO *ASPERGILLUS NIGER* AN 400

**Renata Barros Silveira**<sup>(1)</sup>

Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo IFCE (2014). Possui graduação em Licenciatura em Plena em Química pela Universidade Estadual do Ceará (1996) e graduação em Licenciatura em Ciências pela Universidade Estadual do Ceará (1992). Tem experiência na área de tratamento de águas residuais.

**Rossana Barros Silveira**<sup>(2)</sup>

Mestre em Desenvolvimento em Meio Ambiente pela UFC (2006).

**Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa**<sup>(3)</sup>

Mestre em Saneamento Ambiental - Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental pela UFC (1999); Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos - USP (2006).

**Lia Teles**<sup>(4)</sup>

Graduanda do curso Tecnologia em Gestão Ambiental no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE. Bolsista do Laboratório de Tecnologia Ambiental - LATAM - IFCE.

**Glória Marinho**<sup>(5)</sup>

Mestre em Engenharia Civil (Saneamento Ambiental) pela Universidade Federal do Ceará (2001) e Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP (2005).

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Avenida Treze de Maio, 2081 - Benfica - Fortaleza - Ceará - CEP: 60040-531 - Brasil - Tel: +55 (85) 3307-3666/3307-3667 - e-mail: [renatasilveira@ifce.edu.br](mailto:renatasilveira@ifce.edu.br)

### RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a toxicidade do 2,4-dinitrofenol para o fungo *Aspergillus niger* AN 400. Para o teste de toxicidade, realizado em um período de 144h, foram preparadas placas de Petri com meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose Cloranfenicol (ASDC) juntamente com o 2,4-DNF em concentrações variadas de: 300 mg.L<sup>-1</sup>, 200 mg.L<sup>-1</sup>, 100 mg.L<sup>-1</sup>, 90 mg.L<sup>-1</sup>, 80 mg.L<sup>-1</sup>, 60 mg.L<sup>-1</sup>, 50 mg.L<sup>-1</sup>, 40 mg.L<sup>-1</sup>, 20 mg.L<sup>-1</sup>, 10 mg.L<sup>-1</sup> e 5 mg.L<sup>-1</sup>, além do controle que não possuía o 2,4-DNF (0 mg.L<sup>-1</sup>). O número de esporos fúngicos inoculados por placa foi de 2 x 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. O fungo *Aspergillus niger* AN 400 durante o teste de toxicidade em placas contendo a substância 2,4-DNF nas concentrações descritas mostrou-se capaz de crescer.

**PALAVRAS-CHAVE:** Teste de toxicidade, nitrofenóis, fungos.

### INTRODUÇÃO

Uma das preocupações mundiais se refere à grande quantidade de efluentes industriais e domésticos gerados, visto à complexidade de produtos descartados nos mananciais sem tratamento prévio. Estes produtos são geralmente de difícil degradação ou de alta carga poluidora, e que se acumulam e contaminam organismos aquáticos e terrestres afetando os ciclos biológicos. Um destes compostos poluidores são os nitrofenóis, que são produzidos em larga escala e são amplamente usados como material de partida para a síntese de pesticidas, corantes e fármacos (LIU *et al.*, 2007), como intermediários de plásticos, corantes azóicos, pigmentos, preservativos de madeira, produtos químicos de borracha e explosivos (SHE *et al.*, 2012; KULKARNI, 2013).

Os compostos aromáticos nitrogenados são revelados como tóxicos ou mutagênicos e sua liberação para o meio ambiente é assunto de regulamentação governamental (LIU *et al.*, 2007), sendo o 2,4-dinitrofenol considerado “poluente prioritário” e de concentração restrita (GEMINI *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007). Segundo Griffin (1994), o 2,4-DNF é considerado um clássico agente de desacoplamento na bioquímica e foi o primeiro a ser usado como preservativo da madeira, por esse motivo, foi necessária a realização do teste de toxicidade para investigação do crescimento do fungo *Aspergillus niger* AN 400 no meio contendo o 2,4-dinitrofenol. De acordo com os resultados obtidos do teste de toxicidade verificou-se que o fungo foi capaz de crescer em todas as concentrações testadas.

Os testes de toxicidade têm sido cada vez mais utilizados para a determinação de efeitos insalubres em organismos, em virtude, principalmente, do potencial risco da transferência de poluentes do ambiente para os organismos, e avaliação da qualidade da água sobre eles. Os estudos relativos a este assunto podem ser conduzidos através de testes experimentais com metodologias distintas, estabelecidas de acordo com os objetivos que se procura alcançar nessas avaliações (FERREIRA, 2003).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a toxicidade do 2,4-dinitrofenol, em concentrações diversas, para o fungo *Aspergillus niger* AN 400.

## MATERIAS E MÉTODOS

O composto químico 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) foi escolhido mediante pesquisas que direcionavam a utilização deste composto como intermediário na produção de pesticidas. O 2,4-dinitrofenol padrão é da marca Sigma-Aldrich, de grau analítico.

A espécie escolhida para degradar o 2,4-DNF, *Aspergillus niger* AN 400, é um micro-organismo muito usado no campo da biotecnologia, devido às enzimas produzidas tais como amilases, lipases, celulasas, xinalases e proteases (SILVEIRA, 2014).

### Preparo do eluente sintético

Para obtenção do eluente sintético foi preparado 1 litro (1L) de solução padrão de 2,4-DNF com quantidade de soluto suficiente para concentração de 2000 mg.L<sup>-1</sup>. A solução foi estocada em frasco escuro de modo a evitar interferência da luz.

Em função da dificuldade do 2,4-dinitrofenol solubilizar em água, fez-se necessária adição do co-solvente, etanol, com percentual de 2,5% da solução, e utilização de chapa elétrica com rotação e aquecimento.

### Cultivo, produção e contagem do inóculo (*Aspergillus niger* AN 400)

Os esporos de *Aspergillus niger* AN 400 foram cultivados em placas de Petri estéreis contendo 15 mL de meio de cultura *Sabouraud*, meio específico para crescimento dos fungos, o qual foi previamente esterilizado a 121°C, sob pressão entre 1 e 1,5 Kgf.cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos. Adicionou-se ainda às placas, solução de Vishniac na concentração de 1 mL.L<sup>-1</sup> de meio de cultura. Composição da solução de Vishniac - ZnSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O = 4,40 g.L<sup>-1</sup>; MnCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O = 1,00 g.L<sup>-1</sup>; CoCl<sub>2</sub> . 6 H<sub>2</sub>O = 0,32 g.L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> . 4H<sub>2</sub>O = 0,22 g.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O = 1,47 g.L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O = 1,00 g.L<sup>-1</sup>, adaptado de Sampaio (2005).

Após a solidificação do meio de cultura, os esporos foram inoculados nas placas e estas foram mantidas sob temperatura de 28°C ±2 em estufa microbiológica por um período de sete dias, até se observar o crescimento do fungo na superfície das placas. Posteriormente, os esporos foram removidos com uso de solução salina isotônica acrescida de Tween 80, transferidos e guardados em frasco estéril e mantidos sob refrigeração a 0°C.

Para a contagem de esporos foi preparada solução utilizando 50 µL da suspensão, previamente agitada em agitador tipo vórtex, acrescidos de 950 µL de solução Tween 80, resultando uma diluição de 1:20. Em seguida foram transferidos 20 µL da solução preparada para câmara de Neubauer para a contagem dos esporos utilizando microscópio óptico da marca com aumento de 40 vezes. Para o cálculo do número de esporos foi empregada a equação (1).

$$\text{Esporos/mL} = \text{esporos contados} \times \text{diluição} \times 2,5 \times 10^5 \quad (1)$$

### Teste de toxicidade do 2,4-dinitrofenol ao *Aspergillus niger* AN 400

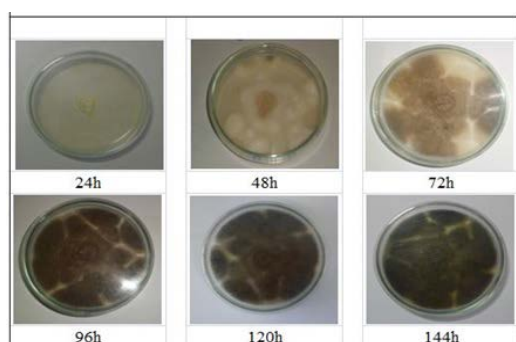
O procedimento experimental foi baseado em Sampaio, (2005). Foram preparadas placas de Petri com meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose Cloranfenicol (ASDC) para o 2,4-DNF em duplicata, em concentrações variadas de: 300 mg.L<sup>-1</sup>, 200 mg.L<sup>-1</sup>, 100 mg.L<sup>-1</sup>, 90 mg.L<sup>-1</sup>, 80 mg.L<sup>-1</sup>, 50 mg.L<sup>-1</sup>, 40 mg.L<sup>-1</sup>, 20 mg.L<sup>-1</sup>, 10 mg.L<sup>-1</sup> e 5 mg.L<sup>-1</sup>, além do controle que não possuía o 2,4-DNF. O número de esporos de *Aspergillus niger* inoculados por placa foi de 2 x 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. 24 placas de Petri foram preparadas, as quais foram

incubadas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante um período de 144 h e observadas diariamente nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h a fim de se verificar o crescimento do fungo.

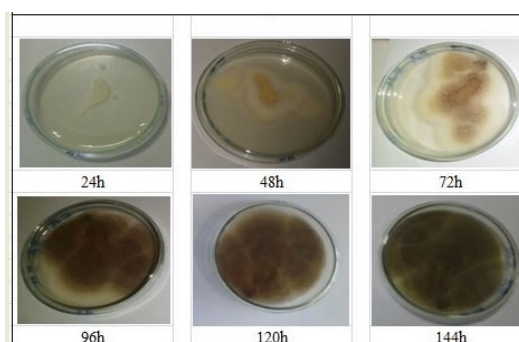
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com os resultados obtidos do teste de toxicidade verificou-se que o fungo foi capaz de crescer em todas as concentrações testadas. Assim sendo, foi decidido dar continuidade a pesquisa sobre degradação do 2,4-dinitrofenol pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400.

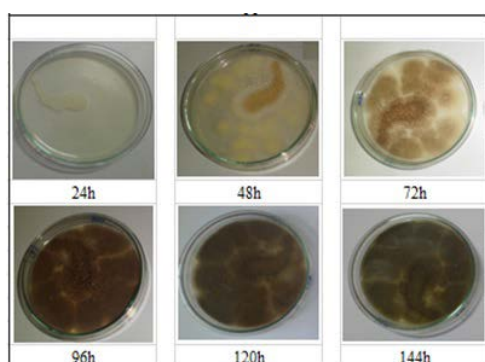
O teste de toxicidade em placas mostrou que a espécie *Aspergillus niger* AN 400 foi capaz de crescer em concentrações de 2,4-DNF de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  até  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ . Nas Figuras de 1 a 12 estão apresentados o crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 no meio em diferentes concentrações de 2,4-DNF.



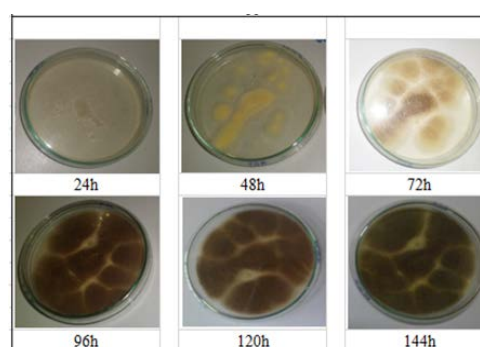
**Figura 1 - Teste de Toxicidade com 0  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400 (controle).**



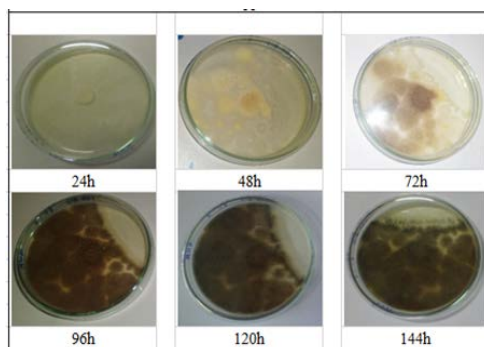
**Figura 2 - Teste de Toxicidade com 5  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**



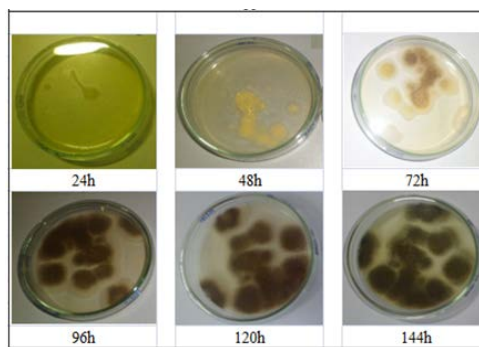
**Figura 3 - Teste de Toxicidade com 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**



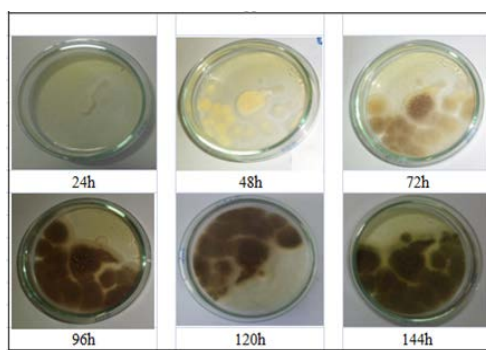
**Figura 4 - Teste de Toxicidade com 20  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**



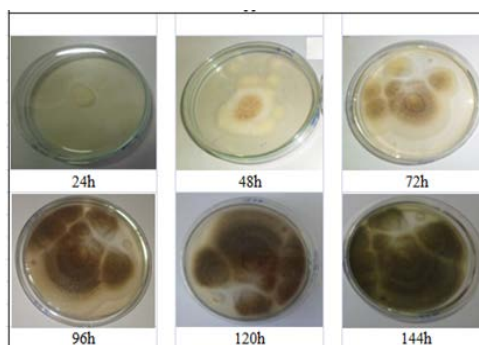
**Figura 5 - Teste de Toxicidade com 40 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.**



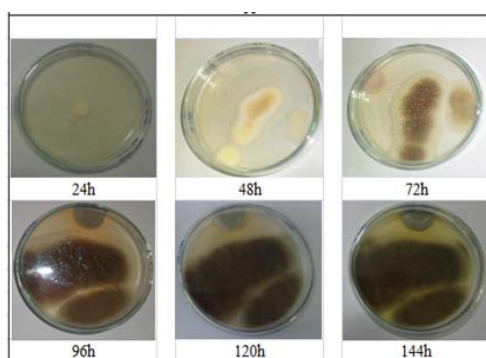
**Figura 6 - Teste de Toxicidade com 50 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *Aspergillus niger* AN 400.**



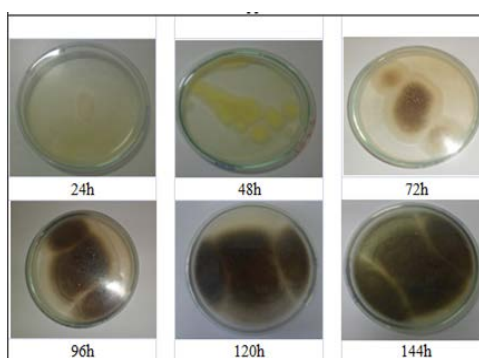
**Figura 7 - Teste de Toxicidade com 60 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**



**Figura 8 - Teste de Toxicidade com 80 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**

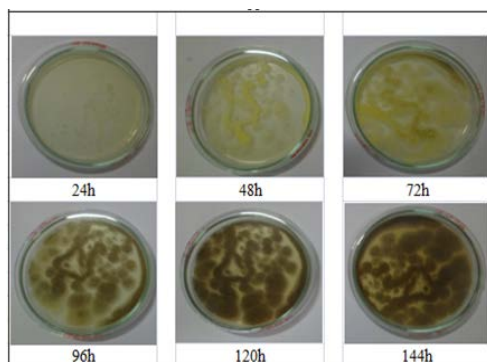


**Figura 9 - Teste de Toxicidade com 90 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**

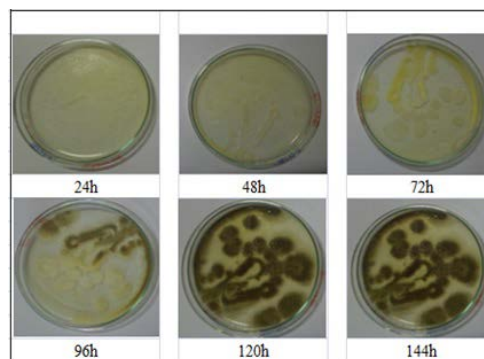


**Figura 10 - Teste de Toxicidade com 100 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**





**Figura 11 - Teste de Toxicidade com 200 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**



**Figura 12 - Teste de Toxicidade com 300 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-DNF ao *A. niger* AN 400.**

Na primeira observação 24 horas após a incubação, não foi verificado crescimento de esporos de *Aspergillus niger* AN 400 em nenhuma placa. Após 48 h de incubação ocorreu um discreto crescimento de esporos nas placas de concentrações de 2,4-DNF de: 5 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup>. Nas demais concentrações houve maior crescimento do micélio.

Completada às 72 horas de incubação todas as placas, exceto a de 200 mg.L<sup>-1</sup> e 300 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram esporos de *Aspergillus niger* AN 400 na metade da superfície das placas. Com 96 horas de incubação, as placas de 200 mg.L<sup>-1</sup> e 300 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram esporulação em alguns pontos da superfície. Após 120 horas de incubação as placas de 200 mg.L<sup>-1</sup> e 300 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram superfície quase totalmente coberta por esporos de *Aspergillus niger* AN 400.

Portanto, o fungo examinado não teve seu crescimento inibido por nenhuma concentração. Nesta pesquisa, pode ser observado no teste de toxicidade que à medida que as concentrações do 2,4-DNF aumentavam, a esporulação diminuía ocorrendo inibição no crescimento microbiano, corroborando com que Alexieva *et al.* (2008) relatou em sua pesquisa, na qual maiores concentrações dos tóxicos investigados mostraram um efeito inibitório sobre o crescimento microbiano.

Sampaio (2005) realizou teste de toxicidade do fungo *Aspergillus niger* AN 400 na água sintética contaminada com o pesticida metil paration nas concentrações variando entre 0,075 e 60 mg.L<sup>-1</sup>. Após 19 horas de incubação, não foi observado crescimento de esporos do fungo em nenhuma placa. Nas 43 horas de incubação, percebeu-se o crescimento do micélio nas placas com concentração de metil paration de: 0,075 mg.L<sup>-1</sup>; 0,15 mg.L<sup>-1</sup>; 0,30 mg.L<sup>-1</sup>; 0,75 mg.L<sup>-1</sup>; 1,50 mg.L<sup>-1</sup>; 3,50 mg.L<sup>-1</sup> e 7,5 mg.L<sup>-1</sup>. Após 96 h de incubação todas as placas já apresentavam esporos e foi nesse período que a placa de concentração de 60 mg.L<sup>-1</sup> apresentou esporos de *Aspergillus niger* por toda superfície.

Outro estudo sobre teste de toxicidade foi relatado por Souza Neto (2012), que estudou o grau de toxicidade do fungo *Aspergillus niger* AN 400 na água sintética dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina nas concentrações de 0 mg.L<sup>-1</sup>, 7,5 mg.L<sup>-1</sup>, 15 mg.L<sup>-1</sup>, 22,5 mg.L<sup>-1</sup> e 30 mg.L<sup>-1</sup>, com 216 horas de incubação (9 dias) e observou que as placas apresentaram crescimento do fungo, porém a placa com concentração de 30 mg.L<sup>-1</sup> apresentou crescimento mínimo. Diferentemente da presente pesquisa, com 144 horas de incubação nas placas com concentração 40 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4DNF, o crescimento foi visualizado por toda superfície.

Para Griffin (1994), interrompendo o fluxo metabólico através da glicólise, a via de monofosfato de hexose e o ciclo de ácido tricarboxílico iriam perturbar o maquinário biossintético de base do fungo, privando de ATP e intermediários essenciais. Embora os fungicidas inespecíficos certamente afetem estes processos, não há fungicidas específicos que interagem com estas etapas do metabolismo.

Apesar do meio imposto ao micro-organismo oferecer condições nutricionais adequadas, com fonte de carbono, proteínas, elementos-traço e temperatura ideal ao seu crescimento, a presença de 2,4-DNF em concentrações elevadas não impediu a reprodução da espécie.

## CONCLUSÕES

O 2,4-DNF não inibe o crescimento do fungo *Aspergillus niger* AN 400. Em sendo assim, o micro-organismo poderá ser utilizado como agente biodegradador do tóxico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXIEVA, Z.; GERGINOVA, M.; ZLATEVA, P.; MANASIEV, J.; IVANOVA, D.; DIMOVA, N. **Monitoring of aromatic pollutants biodegradation**. Biochemical Engineering Journal, v. 40, p. 233-240, 2008.
2. GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1994.
3. SILVEIRA, R. B. **Degradação de 2,4-dinitrofenol por *Aspergillus niger* AN 400 em reatores em bateladas**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 99f, 2014.
4. SOUZA NETO, A. **Remoção de matéria orgânica em matriz aquosa dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina empregados em reatores em batelada inoculados com a *Aspergillus niger* AN 400**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 82f, 2012.
5. FERREIRA, C. M. **Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental**. Biológico, São Paulo, v.65, n.1/2, p.17-18, jan./dez., 2003.
6. GEMINI, V.L.; GALLEGO, A.; TRIPODI, V.; CORACH, D.; PLANES, E.I.; KOROL, S.E. **Microbial degradation and detoxification of 2,4-dinitrophenol in aerobic and anoxic processes**. International Biodeterioration e Biodegradation, v. 60, p. 226-230, 2007.
7. KULKARNI, P. **Nitrophenol removal by simultaneous nitrification denitrification (SND) using *T. pantotropha* in sequencing batch reactors (RSB)**. Bioresource Technology, v. 128, p. 273-280, 2013.
8. LIU, X-Y.; WANG, B-J.; JIANG, C-Y.; ZHAO, K-X.; DRAKE, H.L.; LIU, S-J. **Simultaneous biodegradation of nitrogen-containing aromatic compounds in a sequencing batch bioreactor**. Journal of Environmental Sciences, v. 19, p. 530-535, 2007.
9. SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos**. 2006. 113f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
10. SHE, Z.; XIE, T.; ZHU, Y.; LI, L.; TANG, G.; HUANG, J. **Study on the aerobic biodegradability and degradation kinetics of 3-N, 2,4-DNF and 2,6-DNF**. Journal of Hazardous Materials, v. 241-242, p. 478 - 485, 2012.