

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS BACTERIANAS DE  
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS  
POLICÍCLICOS**

**Andréa Scaramal da Silva  
(Dissertação)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS BACTERIANAS DE  
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS  
POLICÍCLICOS**

ANDRÉA SCARAMAL DA SILVA  
Bióloga (UNIFIL)

Dissertação apresentada como  
um dos requisitos à obtenção do  
Grau de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Abril de 2008



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pois sem ele nada teria alcançado, por ter guiado meus passos. Por ter me proporcionado a vida, e nela ter encontrado pessoas maravilhosas.

À minha mãe que teve uma jornada difícil para me oferecer a oportunidade de estudo, pela coragem, dedicação e amizade.

Ao Alexandre, por sua persistência e por sempre ter acreditado em mim. Por seu amor, carinho, dedicação e extrema paciência.

Ao Professor Flávio, pela orientação e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Rodrigo, por sua orientação, incentivo e amizade mesmo estando longe.

As minhas grandes amigas, Cátia, Chris, Daiana, Dani blu, Dani ctba, por estarem sempre presente, por todo companheirismo, carinho e amizade, certamente são um presente de Deus.

Aos amigos do Laboratório de Biorremediação de Solos, Kelly, Cátia, Patrícia, Robson, Andressa e ao seu Valdir, pela convivência, pelos favores e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Química e Fertilidade/LAS, Analú, Regilene e Leandro, pela amizade e auxílios.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

# CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS BACTERIANAS DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS<sup>1</sup>

Autor: Andréa Scaramal da Silva  
Orientador: Flávio A. de Oliveira Camargo  
Co-Orientador: Rodrigo J. S. Jacques

## Resumo

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos mutagênicos e carcinogênicos aos humanos e aos animais que são introduzidos no ambiente em grandes quantidades, devido às atividades relacionadas à extração, ao transporte, ao refino, à transformação e à utilização do petróleo e de seus derivados. A utilização de enzimas para a biodegradação HAPs em efluentes líquidos é uma tecnologia promissora, porém existem vários problemas práticos na utilização das enzimas na forma livre, entre eles a instabilidade da sua estrutura. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para aumentar a estabilidade enzimática, sendo a técnica de imobilização a de maior sucesso. Esse trabalho teve como objetivos obter e determinar as condições ambientais que interferem na atividade das enzimas, livres e imobilizadas, de degradação dos HAPs. Isolados de *Mycobacterium fortuitum*, de *Gordonia polyisoprenivorans* e de *Naphtalene-utilizing bacterium* foram crescidos em meio mineral e caldo LB contendo 250 mg L<sup>-1</sup> antraceno ou fenantreno e suas células rompidas por sonicação. Com o extrato celular livre e imobilizado em alginato de sódio determinou-se as condições ótimas de pH (4,0-9,0, nos tampões acetato, fosfato e tris-HCl), de temperatura (5-80°C) e de tempo de reação (10-90 min.) para as enzimas catecol 1,2-dioxigenase (C1,2O), catecol 2,3-dioxigenase (C2,3O) e protococatecol 3,4-dioxigenase (P3,4O). Avaliou-se também o efeito do Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, K<sup>+</sup> e NH<sup>4+</sup> na atividade destas enzimas. Para a obtenção das enzimas, o caldo LB foi mais eficiente. A enzima C1,2O presente no extrato celular de *M. fortuitum* e de *G. polyisoprenivorans* apresentou maior atividade em pH 8,0 a 25°C e manteve esta atividade durante 60min. A enzima C2,3O presente no extrato celular de *M. fortuitum* e *G. polyisoprenivorans* apresentou maior atividade em pH 7,0 a 30 e 35°C e manteve esta atividade durante 90min. A enzima P3,4O apresentou maior atividade em pH 8,0 a 35°C e manteve esta atividade durante 60min. O Fe<sup>3+</sup> e Mn<sup>2+</sup> aumentaram a atividade das três enzimas. A atividade das três enzimas foi reduzida na presença dos íons Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e NH<sup>4+</sup>, com exceção da enzima C1,2O que apresentou aumento de atividade na presença de Hg<sup>2+</sup>. O extrato celular imobilizado contendo as enzimas C1,2O, C2,3O e P3,4O apresenta maior estabilidade às variações de pH, temperatura, tempo de reação, em relação ao extrato celular livre.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (73 p.) - Abril, 2008.

# CHARACTERIZATION OF BACTERIAL ENZYMES OF AROMATIC POLYCYCLIC HYDROCARBONS DEGRADATION<sup>1</sup>

Author: Andréa Scaramal da Silva  
Adviser: Flávio A. de Oliveira Camargo  
Co-Adviser: Rodrigo J. S. Jacques

## Abstract

The polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) are mutagenic and carcinogenic composites to the human beings and the animals that are introduced in the environment in great amounts, to its activities related to the extraction, the transport, the refining, the transformation and the use of the oil and of its derivatives. The enzyme use for the biodegradation HAPs in effluent liquids is a promising technology, however some practical problems in the use of enzymes in its free form exist, between them the instability of its structure. Many methods have been developed to increase the enzymatic stability, being the technique of immobilization of greater success. This work had as objective to get and to determine the environmental conditions that intervene with the enzymes activity, free and immobilized, of HAPS degradation. Isolated of *Mycobacterium fortuitum*, of *Gordonia polyisoprenivorans* e of *Naphthalene-utilizing bacterium* had been grown in half mineral and 250 broth LB I contend mg L<sup>-1</sup> anthracene or phenanthrene e its cells breached for sonication. With the free and immobilized cellular extract in alginate of sodium one determined the excellent conditions of pH (4,0-9,0, in the drain plugs acetate, phosphate and tris-HCl), of temperature (5-80°C) and time of reaction (10-90 min.) for enzymes catechol 1,2-dioxigenase (C1,2O), catechol 2,3-dioxigenase (C2,3O) and protocatechol 3,4-dioxigenase (P3,4O). It was also evaluated the effect of the Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, K<sup>+</sup> e NH<sup>4+</sup> in the activity of these enzymes. For the attainment of enzymes, broth LB was more efficient. Present enzyme C1,2O in the cellular extract of *M. fortuitum* e of *G. polyisoprenivorans* 25°C presented greater activity in pH 8,0 and kept this activity during 60min. Present enzyme C2,3O in the cellular extract of *M. fortuitum* e *G. polyisoprenivorans* presented greater activity in pH 7,0 the 30 and 35°C and kept this activity during 90min. Enzyme P3,4O presented greater activity in pH 8,0 35°C and kept this activity during 60min. The Fe<sup>3+</sup> e Mn<sup>2+</sup> had increased the activity of three enzymes. The activity of three enzymes was reduced in the presence of ions Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e NH<sup>4+</sup>, with exception of enzyme C1,2O that presented increase of activity in the presence of Hg<sup>2+</sup>. The immobilized cellular extract having enzymes C1,2O, C2,3O and P3,4O present greater stability to the variations of pH, temperature, reaction time, comparing to the free cellular extract.

<sup>1</sup>Master Dissertation in Soil Science. Post Graduation Programe in Soil Science, Agronomic University, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre (73 p.) - April, 2008.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	03
2.1.1 Caracterização.....	03
2.1.2 Toxicidade e legislação.....	04
2.1.3 Geração, contaminação e remediação.....	06
2.2 Biorremediação de HAPs.....	07
2.2.1 Microrganismos degradadores dos HAPs.....	07
2.2.2 Metabolismo microbiano de degradação dos HAPs.....	09
2.2.3 Enzimas de fissão.....	12
2.3 Biorremediação de HAPs no ambiente.....	14
2.3.1 Definições e estratégias.....	14
2.3.2 Uso de enzimas livres e imobilizadas para biorremediação de HAPs.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 Microrganismos degradadores de HAPs.....	17
3.2 Crescimento das bactérias para obtenção das enzimas.....	18
3.3 Efeito da concentração de HAPs para obtenção das enzimas .....	18
3.4 Efeito da sonicação para obtenção das enzimas.....	19
3.5 Atividade enzimática.....	19
3.6 Otimização do pH, temperatura e tempo de reação das enzimas...	20
3.7 Efeito do íons na atividade enzimática.....	21
3.8 Imobilização do extrato celular.....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
4.1 Condições ótimas para obtenção da enzima.....	22
4.1.1 Condições ótimas de crescimento bacteriano para obtenção das enzimas.....	22
4.1.2 Efeito da concentração de HAPs para obtenção das enzimas .....	25
4.1.3 Efeito da sonicação para obtenção da enzimas.....	27

4.2	Caracterização de enzimas produzidas por <i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	28
4.2.1	Determinação do pH ótimo para atividade enzimática.....	30
4.2.2	Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática.....	31
4.2.3	Determinação do tempo de reação na atividade enzimática..	33
4.2.4	Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	34
4.3	Caracterização da enzima catecol 1,2 dioxigenase no extrato imobilizado de <i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	36
4.3.1	Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	36
4.3.2	Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	37
4.3.3	Determinação do tempo de reação na atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	39
4.3.4	Efeito de íons sobre a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	40
4.4	Caracterização de enzimas produzidas por <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	42
4.4.1	Determinação do pH ótimo para atividade enzimática.....	42
4.4.2	Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática.....	44
4.4.3	Determinação do tempo de reação na atividade enzimática..	45
4.4.4	Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	46
4.5	Caracterização da enzima catecol 3,4 dioxigenase no extrato imobilizado de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	48
4.5.1	Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	48
4.5.2	Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	49
4.5.3	Determinação do tempo de reação na atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	50
4.5.4	Efeito de íons sobre a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	51
4.6	Caracterização de enzimas produzidas por <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	52
4.6.1	Determinação do pH ótimo para atividade enzimática.....	53
4.6.2	Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática.....	54
4.6.3	Determinação do tempo de reação na atividade enzimática..	55
4.6.4	Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	56
4.7	Caracterização da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase no extrato imobilizado de <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	58
4.7.1	Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	58



4.7.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	59
4.7.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	60
4.7.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática no extrato celular imobilizado.....	61
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
<b>7. VITA.....</b>	<b>73</b>

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1.</b> Fórmula estrutural do antraceno e do fenantreno.....	04
<b>FIGURA 2.</b> Degradação do antraceno por bactérias aeróbias.....	10
<b>FIGURA 3.</b> Clivagem extradiol (via meta) do catecol pela enzima catecol 2,3-dioxigenase e clivagem intradiol (via orto) do catecol pela enzima catecol 1,2-dioxigenase .....	13
<b>FIGURA 4.</b> Clivagem intradiol (via orto) do protocatecol pela enzima protocatecol 3,4-dioxigenase .....	14
<b>FIGURA 5.</b> Curvas de crescimento (linhas) e atividade das enzimas (barras) C1,2O (A e B), C2,3O (C e D) e P3,4O (E e F) em isolados bacterianos crescendo sob agitação de 150 rpm e 30°C de temperatura em meio mineral, avaliados durante 25 dias (A, C e E) e em caldo LB, avaliados durante 72 horas (B, D e F).....	23
<b>FIGURA 6.</b> Atividade das enzimas C1,2O, C2,3O e P3,4O de <i>M. fortuitum</i> , <i>G. polyisoprenivorans</i> e <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> crescidas por 36 horas em caldo LB, na ausência e na presença das concentrações de 50, 150 e 250 mg L <sup>-1</sup> de antraceno ou fenantreno.....	27
<b>FIGURA 7.</b> Atividade das enzimas P3,4O e C1,2O e conteúdo de proteínas solúvel no extrato celular dos isolados <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> (A) e <i>M. fortuitum</i> (B) obtido após diferentes potências de sonicação.....	29
<b>FIGURA 8.</b> Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de <i>M. fortuitum</i> . Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (7,0 a 9,0).....	30
<b>FIGURA 9.</b> Efeito da temperatura na atividade da catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de <i>M. fortuitum</i> .....	32

<b>FIGURA 10.</b> Duração da atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presentes no extrato celular de <i>M. fortuitum</i> .....	33
<b>FIGURA 11.</b> Efeito dos íons na atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presentes no extrato celular de <i>M. fortuitum</i> .....	35
<b>FIGURA 12.</b> Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>M. fortuitum</i> . Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0).....	37
<b>FIGURA 13.</b> Efeito da temperatura na atividade da catecol 1,2-dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>M. fortuitum</i> .....	38
<b>FIGURA 14.</b> Duração da atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado do isolado de <i>M. fortuitum</i> .....	40
<b>FIGURA 15.</b> Efeito dos íons na atividade da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>M. fortuitum</i> .....	41
<b>FIGURA 16.</b> Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> . Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (7,0 a 9,0).....	43
<b>FIGURA 17.</b> Efeito da temperatura na atividade da catecol 1,2dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	45
<b>FIGURA 18.</b> Duração da atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presentes no extrato celular de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	46
<b>FIGURA 19.</b> Efeito dos íons na atividade da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular do isolado <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	47
<b>FIGURA 20.</b> Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> . Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0).....	49
<b>FIGURA 21.</b> Efeito da temperatura na atividade da catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	50

<b>FIGURA 22.</b> Duração da atividade da enzima catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de um isolado de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	51
<b>FIGURA 23.</b> Efeito dos íons na atividade enzimática relativa (%) da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> .....	52
<b>FIGURA 24.</b> Efeito do pH na atividade da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular de <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> . Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (7,0 a 9,0).....	54
<b>FIGURA 25.</b> Efeito da temperatura na atividade da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular de <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	55
<b>FIGURA 26.</b> Duração da atividade das enzimas protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular do isolado <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	56
<b>FIGURA 27.</b> Efeito dos íons na atividade enzimática da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular do isolado <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	57
<b>FIGURA 28.</b> Efeito do pH na atividade da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> . Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0).....	58
<b>FIGURA 29.</b> Efeito da temperatura na atividade da protocatecol 3,4-dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	59
<b>FIGURA 30.</b> Duração da atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	60
<b>FIGURA 31.</b> Efeito dos íons na atividade enzimática da protocatecol 3,4 dioxigenase presentes no extrato celular livre e imobilizado do isolado <i>Naphtalene-utilizing bacterium</i> .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Os HAPs são poluentes gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de resíduos orgânicos, mas a contaminação do solo por estes compostos é um típico efeito da atividade antropogênica relacionada aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados. Devido à complexidade estrutural e a baixíssima solubilidade em água, estes compostos tornam-se recalcitrantes no solo e permanecem por longos períodos neste ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição aos humanos e animais aos HAPs. O metabolismo dos HAPs nos animais gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido a presença destes compostos.

Como situação específica de fontes geradoras de efluentes contaminados por HAPs na região metropolitana de Porto Alegre/RS pode-se destacar uma refinaria de petróleo, várias indústrias petroquímicas, os postos de combustíveis e os estacionamento e garagens, de pequeno e grande porte. Assim, inevitavelmente, estas atividades geram efluentes líquidos contaminados com hidrocarbonetos, que se dispostos inadequadamente podem contaminar o ambiente e a população.

Entre as estratégias para a eliminação de efluentes líquidos contaminados com hidrocarbonetos, pode-se utilizar a biorremediação, em que os microrganismos degradam os HAPs, utilizando-os como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. A degradação dos HAPs é catalisada por complexos enzimáticos conhecidos como oxigenases, que adicionam átomos

de oxigênio ao anel aromático, desestabilizando as ligações químicas e permitindo a abertura deste anel. A biorremediação de ambientes contaminados com HAPs pode ser realizada por enzimas microbianas, que comparativamente aos microrganismos apresentam as vantagens de não serem afetadas por inibidores do crescimento microbiano, atuarem em diversas condições ambientais e não serem susceptíveis a competição microbiana. No entanto as enzimas livres apresentam instabilidade sob certas condições, por isso o interesse pela tecnologia da imobilização tem aumentado durante as últimas décadas. Já foi citado na literatura o efeito benéfico da imobilização na eficiência catalítica das enzimas, bem como das suas propriedades cinéticas e de estabilidade.

Para que as enzimas microbianas possam ser utilizadas na degradação dos HAPs presentes em resíduos líquidos, é necessário haver grande produção destas enzimas em laboratório, além do conhecimento das principais condições ambientais, como pH, temperatura, compostos ativadores e inibidores, que interferem na sua atividade. Com este conhecimento é possível utilizar estas enzimas em biorreatores, sistemas completamente fechados que permitem o controle de emissões e possibilita, na maioria dos casos, a redução do tempo de processo de remediação de resíduos contaminados com estes compostos.

Para determinar as condições ótimas para atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de degradação dos HAPs, esse trabalho teve como objetivo a caracterização de enzimas a partir bactérias com potencial de degradação dos HAPs e a determinação das condições que interferem na atividade destas enzimas, livres e imobilizadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclico

#### 2.1.1 Caracterização

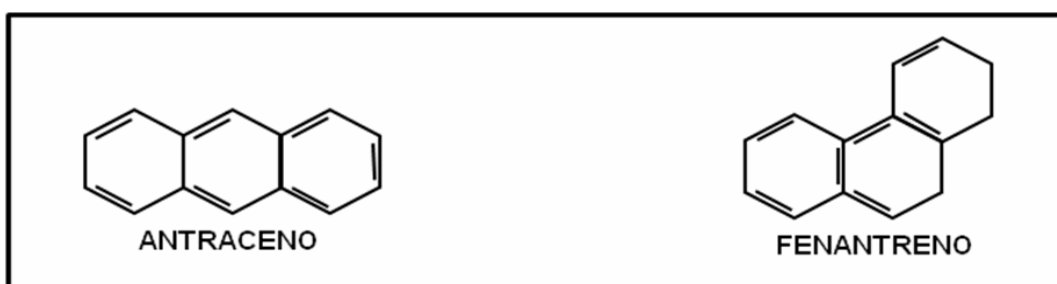
Os hidrocarbonetos aromáticos policíclico (HAPs) são poluentes orgânicos liberados no ambiente em grandes quantidades. Estes compostos são formados unicamente por átomos de carbono e hidrogênio arranjados na forma de dois ou mais anéis benzênicos, ligados em diferentes posições lineares, angulares ou em arranjos. Estas características conferem aos HAPs uma grande variação nas propriedades químicas e físicas, principalmente na massa molecular e na solubilidade em água (Jhonsen et al., 2005).

Devido a possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Dentre estes, somente 18 são considerados em função das características químico-físicas, toxicológicas, ambientais e industriais existentes. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(e)pireleno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pireleno, benzo(j)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(um,2,3-c,d) pireno, naftaleno e pireno (Potin et al., 2004).

O antraceno é um dos poucos HAP produzido industrialmente (Figura 1). É obtido a partir do carvão, numa fração conhecida como “óleo de antraceno” ou “óleo verde”. O antraceno ( $C_{14}H_{10}$ ), também conhecido como antracin ou paranaftaleno, é formado por três anéis aromáticos, arranjados de forma linear, apresentando massa molecular de 178,2 g e solubilidade em água de 0,076 mg L<sup>-1</sup> (Verschueren, 2001). O antraceno é usado na produção de

corantes, de fibras sintéticas e como diluentes de preservantes de madeira (Hawley, 1993). Devido a sua menor toxicidade em relação aos demais HAPs, o antraceno tem sido utilizado como modelo para estudo envolvendo a dinâmica destes compostos no ambiente (Weigand et al., 2002).

O fenantreno também é utilizado industrialmente para a produção de corantes e de explosivos (Figura 1). Este composto é um isômero do antraceno ( $C_{14}H_{10}$ ) com um dos três anéis aromáticos não arranjados linearmente em relação aos demais. Este também é conhecido como fenantrin, apresenta massa molecular de 178,2 g e solubilidade em água de  $1,29 \text{ mg L}^{-1}$  (Verschueren, 2001).



**FIGURA 1.** Fórmula estrutural do antraceno e do fenantreno (Verschueren, 2001).

### 2.1.2 Toxicidade e legislação

Os HAPs são considerados resíduos perigosos aos seres vivos e ao ambiente. A exposição de humanos e animais aos HAPs ocorre por inalação, exposição oral ou dérmica (Samanta et al., 2002). A quantidade absorvida por inalação depende do grau de contaminação atmosférica, que está diretamente relacionado a urbanização, tráfego de veículos e industrialização do local. A absorção dérmica é importante em pessoas que trabalham em atividades relacionadas ao petróleo e a petroquímica (Netto et al., 2000).

O metabolismo dos HAPs ocorre em diferentes tecidos do organismo por várias rotas, em quase todas há formação de compostos epóxidos, com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatado inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido a presença destes compostos (Goldman et al., 2001).

As monoxigenases dependentes do citocromo P450 são responsáveis pela oxidação enzimática dos HAPs. Estas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou na região angular da



molécula do HAP, formando óxidos de arenos (epóxidos primários). Estes podem espontaneamente formar fenóis, ou, por ação das epóxido hidrolases, produzirem di-hidrodióis, que serão oxidados à quinonas, que podem sofrer nova epoxidação, levando à formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolépóxidos). Tanto os epóxidos primários quanto os secundários podem reagir covalentemente com as bases nucleofílicas do DNA, notadamente a guanina, formando os denominados adutos HAP-DNA, que eventualmente, podem dar início a um processo mutagênico. Reações semelhantes são observadas com outras macromoléculas tais como a albumina e a hemoglobina (Netto et al., 2000).

No Brasil, somente o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos HAPs. Nesta legislação, o naftaleno apresenta um Valor de Referência de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que significa que, em concentrações iguais ou menores a esta, o solo pode ser considerado “limpo” e possível de ser utilizado para qualquer finalidade. O Valor de Intervenção indica que há riscos para a saúde humana e para o ambiente, sendo que a ultrapassagem desse valor em um volume de solo de  $25 \text{ m}^3$  ou em  $100 \text{ m}^3$  de água subterrânea impõem a necessidade de implementação, na área avaliada, de ações de remediação. Para o naftaleno, o Valor de intervenção é de  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos agrícolas, de  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos residenciais e de  $90 \text{ mg kg}^{-1}$  em solos industriais. Na água subterrânea, o valor de intervenção para este HAP é de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (CETESB, 2005).

Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre HAPs nos Estados Unidos está sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), e na União Européia, da Comissão das Comunidades Européias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea. As concentrações máximas permitidas dizem respeito principalmente ao benzo(a)pireno, que é o HAP cujo metabolismo em mamíferos é mais estudado. Para o ar, a Comissão das Comunidades Européias (2003) determinou a concentração máxima de  $0,001 \mu\text{g m}^{-3}$  de benzo(a)pireno, enquanto a USEPA limita este valor em  $100 \mu\text{g m}^{-3}$ . Para a água potável, a USEPA estabeleceu o valor máximo de  $0,0028 \mu\text{g L}^{-1}$  de HAP e para meios não específicos, estabeleceu as doses diárias de referência para o antraceno ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), acenafteno ( $0,06 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), fluoranteno

(0,04 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>), fluoreno (0,04 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) e pireno (0,03 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) (USDHS, 1995).

### 2.1.3 Geração, contaminação e remediação

Os HAPs são gerados tanto por processos naturais quanto por antropogênicos. Resultam principalmente da combustão incompleta de resíduos orgânicos, como carvão vegetal e mineral, geração de fuligem a partir de motores de veículos e da cadeia de extração, transporte, refino e transformação do petróleo e seus derivados (Zhang et al., 2006). Como exemplo desta última fonte, podemos citar a borra oleosa gerada por duas grandes fontes geradoras e consumidoras de HAPs, a Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP - Canoas/RS) e o Pólo Petroquímico do Sul (Triunfo/RS). Durante o processo de tratamento de efluentes gerados pelas refinarias de petróleo e indústrias petroquímicas é produzido um resíduo sólido, com elevada carga orgânica, denominado de borra oleosa. A composição deste resíduo sólido é variável devido à quantidade e a qualidade dos produtos que o geraram, aos processos a que o resíduo é submetido, aos vazamentos contínuos e os que ocorrem durante o processo industrial (Mielniczuk, 1991).

O Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquido do SITEL-CORSAN (SICECORS) do Pólo Petroquímico de Triunfo, RS, gerava anualmente 2.500 m<sup>3</sup> de um lodo oleoso (ou borra oleosa), contendo 40,3% de carbono, em uma mistura complexa de HAP (Santos et al., 2004). Este resíduo é tratado pelo processo de *landfarming*, onde havia indícios de que a biodegradação de resíduos neste sistema é um processo lento e, em curto prazo, incompleto, com acúmulo dos resíduos mais recalcitrantes no solo, quando há reaplicações sucessivas. Entre os vários compostos orgânicos presentes na borra oleosa incluem-se os alcanos, cicloalcanos, aromáticos, benzeno, xileno, além de outros compostos como fenóis e os HAPs. Durante o processo industrial, os HAP podem sofrer substituições do carbono do anel aromático por nitrogênio, oxigênio ou enxofre, potencializando a toxicidade e representando um grande risco à segurança das populações adjacentes (Cerniglia, 1993).

Os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação de HAPs, sendo que os resíduos produzidos pelos postos de combustíveis representam a maior fonte geradora de HAPs, responsável pela contaminação do ar, do solo, do subsolo e das águas subterrâneas. Além dos postos de combustíveis, destacam-se ainda pela contaminação ambiental nos centros urbanos, as oficinas mecânicas, as lavagens e as garagens de automóveis (Lima et al., 1998). Assim, devido a estas atividades, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos HAPs que, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos.

Apesar da recalcitrância dos HAPs, é possível a remediação desses compostos no ambiente pela degradação abiótica. Entre os processos abióticos pode-se destacar a degradação química e física, que ocorre pela interação de moléculas e íons, ou por excitação da molécula por efeitos da luz e temperatura, que diminuem a estabilidade estrutural da molécula, conduzindo ao rompimento de ligações. Entretanto, processos abióticos são lentos e muitas vezes geram compostos intermediários com características mais indesejáveis que as substâncias originais, havendo a necessidade de se buscar alternativas mais eficientes para eliminação dos HAPs do ambiente (Assalin et al, 2006)

## **2.2 Biorremediação de HAPs**

### **2.2.1 Microrganismos degradadores dos HAPs**

Os microrganismos do solo, tanto em termos de biomassa como em diversidade fisiológica, são reservatórios catalíticos potenciais e quando expostos a determinadas moléculas orgânicas exibem enriquecimento seletivo de forma a possibilitar a conversão destes em fontes de C e energia e, conseqüentemente, a levar a sua degradação. Deste modo o solo é um ambiente relativamente favorável a biodegradação de resíduos orgânicos, como os HAPs (Alexander, 1999).

Os HAPs são degradados por um grupo específico de microrganismos, ao contrário dos compostos alifáticos (Watkinson, 1990) e de hidrocarbonetos não aromáticos, que são degradados por um número maior de microrganismos do solo. Por outro lado, quando as populações microbianas são expostas a esses compostos, pode ocorrer o crescimento seletivo, tornando-os mais eficientes para a utilização destes compostos (Kanaly et al., 1997).

A contagem microbiana de células viáveis em solos férteis varia entre  $10^7$  e  $10^8$  por grama de solo, sendo as bactérias, o grupo mais numeroso de microrganismos, com os fungos apresentando a maior biomassa, entre outros grupos de actinomicetos, algas e protozoários (Mielniczuk, 1991). Todavia, a degradação de resíduo oleoso, contendo HAP, é resultado quase que exclusivo da atividade bacteriana, em condições aeróbias (Richard e Vogel, 1999).

Desde a década de 50, vários trabalhos buscaram selecionar microrganismos em culturas puras com capacidade de degradar HAPs, sendo isoladas bactérias pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbaccterium*, *Gordonia*, entre outros (Zhang et al., 2004; Jacques et al., 2007), e vários fungos dos gêneros *Cunnighamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Cândida*, *Penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera* e *Chrysosporium*, entre outros (Cerniglia, 1997; Jacques et al., 2005). Somente nos últimos anos têm sido dada atenção aos consórcios microbianos degradadores de HAPs, que comparativamente às culturas puras, têm se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos, devido a capacidade de utilizar um maior número de HAPs como fonte de C, pela maior taxa de degradação e principalmente pela maior mineralização destes compostos, o que aumenta a possibilidade de um processo de biorremediação mais efetivo onde os contaminantes têm maiores chances de serem completamente eliminados do ambiente (Boonchan et al., 2000; Ghazalli et al., 2004).

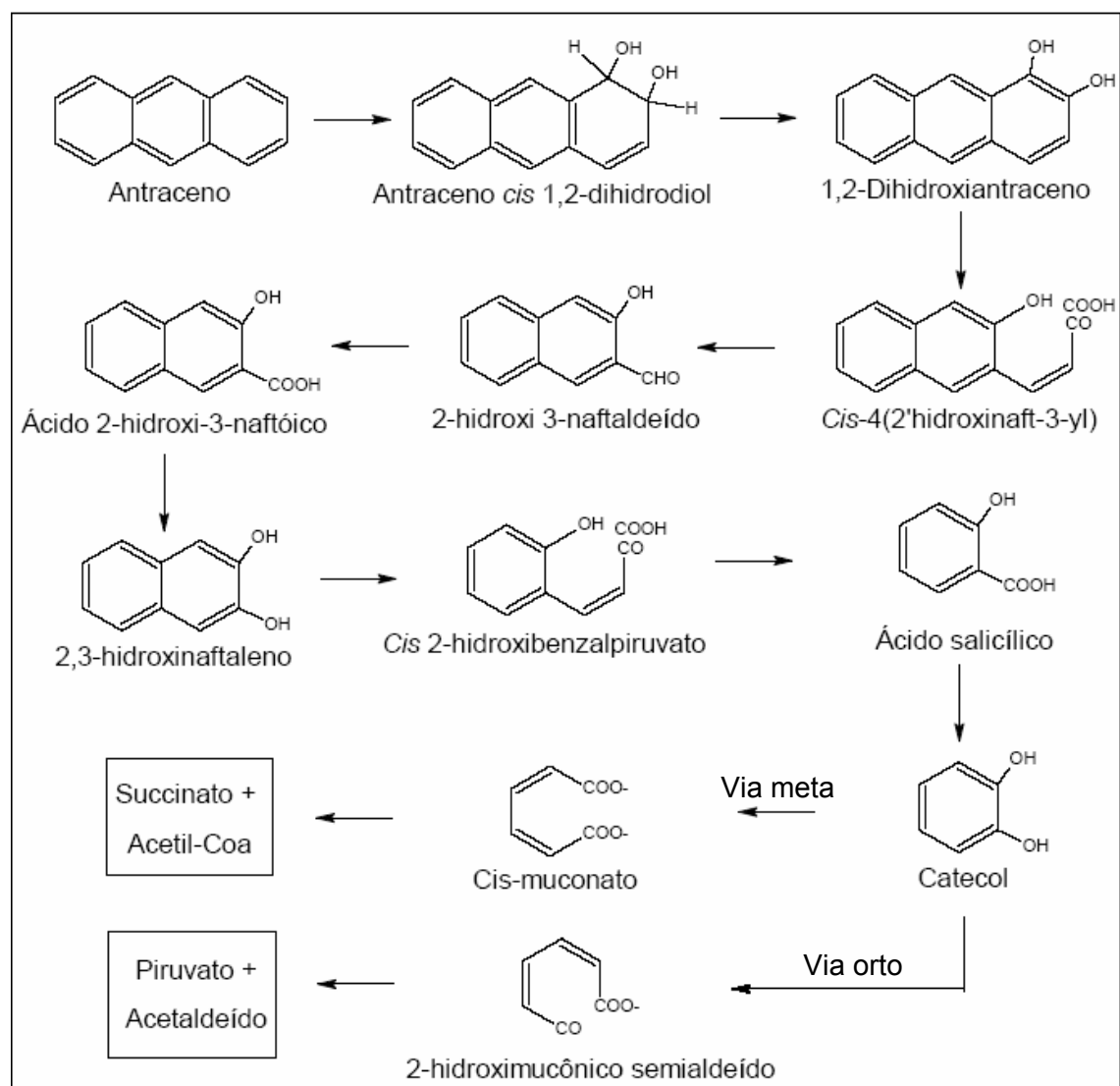
### 2.2.2 Metabolismo microbiano de degradação dos HAPs

A biodegradação aeróbica dos HAPs pelos microrganismos é catalisada por complexos enzimáticos conhecidos como oxigenases, que adicionam átomos de oxigênio ao anel aromático, desestabilizando as ligações químicas e permitindo a abertura deste anel. As oxigenases podem ser divididas em monoxigenases e dioxigenases (Bertini et al., 1995). As monoxigenases têm a função de oxidase e de redutase, adicionando um átomo de dióxigênio atmosférico ( $O_2$ ) no anel aromático, reduzindo o excesso de  $O_2$  à água (Mason, 1988). As dioxigenases adicionam dois átomos de oxigênio no anel aromático, havendo a necessidade de cofatores como NADH e NADPH, os quais recebem elétrons provenientes de uma flavoproteína contendo ferro-enzofre e os transferem para uma ferredoxina 2Fe e 2S. A redução da proteína ferro-enzofre terminal irá catalisar a oxidação do composto aromático (Haigler & Gibson, 1990). Uma vez clivados, os HAPs serão transformados em intermediários das rotas comuns do metabolismo microbiano, que possibilitarão aos microrganismos utilizarem compostos aromáticos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (Bamforth & Singleton, 2005).

As enzimas de degradação dos HAPs podem ser divididas em dois grupos: as periféricas e as de fissão. As enzimas periféricas têm a função de reconhecer e converter os HAPs em moléculas degradáveis pelas enzimas de fissão, que farão com que estas moléculas possam entrar nas rotas comuns de geração de energia e do carbono nas células microbianas (Mishra et al., 2001).

O metabolismo bacteriano dos HAPs já há algum tempo tem sido quimicamente estudado, com a determinação de vários intermediários das rotas de degradação (Evans et al., 1965), porém a identificação dos genes e das enzimas envolvidas necessitam de um maior entendimento (Mishra et al., 2001). Alguns estudos, no entanto, têm possibilitado a identificação de boa parte destas rotas metabólicas, ainda que seja difícil senão impossível, prever a maneira exata em que um composto aromático em particular será catabolizado (Caldwell, 2000). Para demonstrar as principais transformações pelas quais os HAPs são submetidos após absorção pelas células bacterianas, utilizaremos como exemplo a rota de degradação do antraceno (Figura 2).

Durante a biodegradação aeróbica do antraceno, o primeiro passo é o reconhecimento e a incorporação de dois átomos de oxigênio na molécula. Isto é realizado por uma enzima dioxigenase, originando um intermediário com duas hidroxilas, denominado antraceno *cis* 1,2-dihidrodiol. Este por sua vez, terá dois átomos de hidrogênio retirados da sua molécula por uma enzima dehalogenase, originando um composto denominado 1,2 dihidroxiantraceno, que será substrato de uma oxidase Fe-dependente, que o transformará em um intermediário com dois anéis fechados e um aberto, o *cis*-4(2'hidroxinaft-3-yl). Por ação de uma aldose, este composto é convertido em piruvato e em uma molécula com dois anéis aromáticos fechados, denominada 2-hidroxi 3-naftaldeído. Ou seja, até este passo da rota de degradação, um dos anéis foi aberto e houve a formação de uma molécula de piruvato (Evans et al., 1965).



**Figura 2.** Degradação do antraceno por bactérias aeróbicas (Evans et al., 1965; Cerniglia, 1984; Caldwell, 2000).

O 2-hidroxi 3-naftaldeído é convertido por uma desidrogenase em ácido 2-hidroxi-3-naftóico, que pela ação de uma aldolase gera o 2,3 dihidroxinaftaleno. Este último composto será substrato de dioxigenases que o transformarão primeiro em *cis* 2-hidroxibenzalpiruvato e depois, em piruvato e salicilato. A salicilato hidrolase converterá este composto monoaromático em catecol (Cerniglia, 1984).

As células bacterianas utilizam duas rotas diferentes para a degradação do fenantreno. Nas duas rotas o primeiro passo é o reconhecimento e a incorporação de dois átomos de oxigênio na molécula. Isto é realizado por uma enzima dioxigenase, originando um intermediário com duas hidroxilas, denominado ácido 1-hidroxi-2-naftóico. Em uma das rotas este composto terá um átomo de oxigênio retirado da sua molécula por uma enzima desidrogenase, originando um composto denominado 1,2-dihidroxinaftaleno, o qual agora faz parte da rota de degradação do naftaleno. Este último composto será substrato de dioxigenases que o transformará em salicilato. A salicilato hidrolase converterá este composto monoaromático em catecol e/ou gentisato. Na outra rota, o composto ácido 1-hidroxi-2-naftóico é convertido por uma desidrogenase a ácido protocatecóico, formando o intermediário central protocatecol (Evans et al., 1965; Zhang et al., 2006). A transformação do catecol, gentisato e protocatecol em intermediários comuns das rotas metabólicas dos microrganismos é realizada pelas enzimas de fissão, conforme discutido a seguir.

Devido a este complexo aparato enzimático, os HAPs presentes no meio de cultura podem ser mineralizados em elevadas proporções pelas bactérias. Os trabalhos de Zhang et al. (1997) e de Jonhson e Karlson (2004) obtiveram mineralização próximas a 100% quando o fenantreno foi utilizado como única fonte de carbono pela *Pseudomonas putida* e pela *Sphingobium* sp., respectivamente. Jacques et al. (2007) observaram mineralizações próximas a 100% do antraceno no solo inoculado com um consórcio microbiano. Observa-se que, apesar da complexidade estrutural dos HAPs, as bactérias apresentam capacidade de transformar estes compostos em intermediários comuns das rotas do seu metabolismo, ou seja, utilizam os HAPs como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, que em última análise, representa a produção de biomassa. No ambiente edáfico, esta

biomassa será posteriormente transformada em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O ou será incorporada, na forma de moléculas inertes do ponto de vista toxicológico ao húmus, representando um processo completo de eliminação dos HAPs do ambiente.

### 2.2.3 Enzimas de fissão

As enzimas microbianas que são utilizadas na degradação dos poluentes estão envolvidas na proteção das células contra substâncias que lhes seriam tóxicas e/ou permitindo a utilização de carbono como fonte de energia. A detoxificação pode resultar na completa mineralização do poluente ou em decomposição parcial associada com a perda da atividade biológica. Várias enzimas não são completamente específicas aos substratos e agem sobre compostos recém sintetizados e liberados pelas atividades humanas na biosfera (Mars et al., 1999).

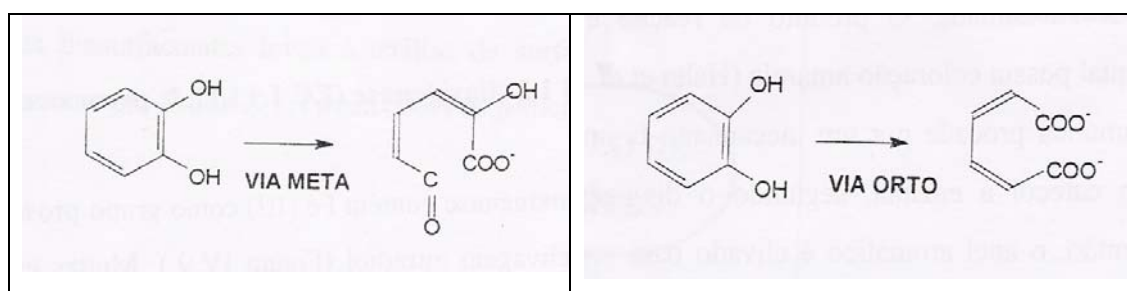
Com a incorporação de oxigênio nos compostos aromáticos pelas dioxigenases é produzido um composto *cis*-dihidrodiol que servirá de substrato para outras enzimas desidrogenases que farão a rearomatização do composto, formando intermediários centrais da rota de degradação de hidrocarbonetos aromáticos: catecol, protocatecol e gentisato. Esta é a função das enzimas periféricas. A partir de então, atuam as denominadas enzimas de fissão, que converterão os intermediários centrais em compostos que possam ser utilizados no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs), como succinato, piruvato e acetil-CoA (Loh et al., 2002).

As enzimas de fissão podem ser divididas em dois grupos, conforme o local da clivagem no intermediário central. As enzimas intradiol abrem o anel aromático entre os dois átomos de carbono hidroxilados, ou seja, por via orto, originando o *cis*-muconato, que por passos sucessivos será convertido em succinato e acetil-CoA. A catecol 1,2-dioxigenase é a enzima que fará a clivagem do anel aromático se o intermediário central for o catecol. A enzima protocatecol 3,4-dioxigenase fará a clivagem do anel aromático se o intermediário central formado for o protocatecol. As enzimas extradiol fazem abertura do anel aromático adjacente aos átomos de carbono hidroxilados, ou seja, por via meta, originando o 2-hidroximucônico semialdeído, que por passos



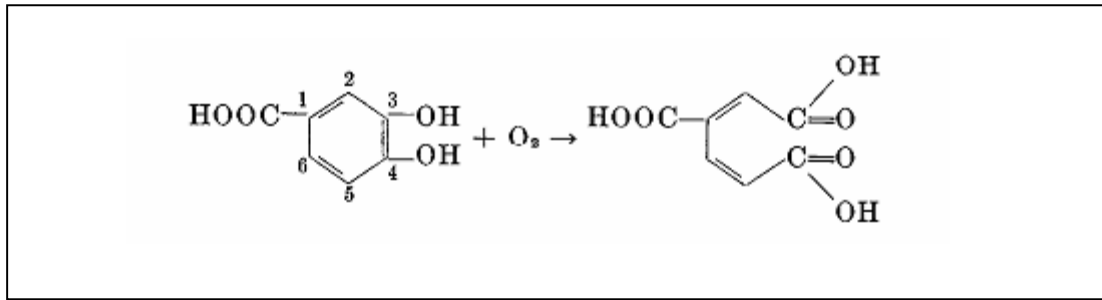
sucessivos será transformado em piruvato e acetaldeído. Nesta via, a catecol 2,3-dioxigenase é a enzima que fará a clivagem do anel aromático se o intermediário central for o catecol, e a protocatecol 4,5-dioxigenase fará a clivagem se o composto formado for o protocatecol (Caldwell, 2000).

A catecol 2,3-dioxigenase (EC 1.13.11.2) faz parte das enzimas de clivagem extradiol (Figura 3). Consiste de quatro subunidades idênticas de 32KDa e contém um íon ferro [Fe(II)] catalítico por subunidade. O produto de reação é o semialdeído 2-hidroxiácido, o qual possui coloração amarela (Hahn et al., 1991). A reação enzimática procede por um mecanismo bi-unidimensional, onde primeiro ocorre a ligação do catecol à enzima, seguindo o dioxigênio para formar um complexo ternário, e finalmente, o anel aromático é clivado para produzir o semialdeído hidroximucônico.



**FIGURA 3.** Clivagem extradiol (via meta) do catecol pela enzima catecol 2,3-dioxigenase e clivagem intradiol (via orto) do catecol pela enzima catecol 1,2-dioxigenase (Caldwell, 2000).

A catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1) contém Fe (III) como grupo prostético e pertence às enzimas que fazem clivagem intradiol (Figura 3). Muitas espécies bacterianas apresentam subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  não idênticas ( $\alpha\beta$ -Fe<sup>3+</sup>)<sub>n</sub>. Já outras, possuem polipeptídeo simples ( $\alpha$   $\alpha$ -Fe<sup>3+</sup>), bem como possuem pouca ou nenhuma atividade aos clorocatecóis. A protocatecol 3,4-dioxigenase (EC 1.13.11.3) pertence às enzimas que realizam clivagem intradiol (Figura 4). Contém Fe (III) como grupo prostético e numerosas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que formam diferentes estruturas quaternárias de ( $\alpha\beta$ )<sub>n</sub>, onde n varia de 3 a 12 (Harayama et al., 1992).



**FIGURA 4.** Clivagem intradiol (via orto) do protocatecol pela enzima protocatecol 3,4-dioxigenase (Harayama et al., 1992).

## 2.3 Biorremediação dos HAPs no Solo

### 2.3.1 Definição e estratégias

A biorremediação é por definição a utilização de processo ou de atividade biológica para a transformação de contaminantes em substâncias inertes (Hollinger et al., 1997). Esta biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (Bamforth & Singleton, 2005). Por outro lado, a degradação dos HAPs no solo pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar eficientemente esses compostos, pela falta de nutrientes à microbiota degradadora ou pela baixa biodisponibilidade dos HAPs aos microrganismos degradadores, devido a sorção à fase sólida mineral e orgânica do solo (Johnsen et al., 2005).

Como estratégias usadas para superar estas limitações e promover uma eficiente remoção dos contaminantes do ambiente, podem ser utilizadas técnicas de biorremediação *in situ*, sem remoção do solo, sendo a biorremediação realizada no próprio local contaminado, dentre estas se destacam: adição de nutrientes (bioestímulo) para aumentar a atividade metabólica microbiana; adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras (bioaumento); e adição de surfatantes, que auxilia a metabolização dos compostos poluentes, facilitando o transporte destes substratos orgânicos para o interior das células microbianas ou diminuindo as

interações superficiais contaminante/solo. As técnicas *ex situ*, em que há necessidade de remoção do solo, sendo a biorremediação realizada em outro local, utilizando a compostagem e biorreator (Nano et al., 2003).

Existem uma infinidade de tipos e configurações de biorreatores que ilustrativamente podem ser comparadas a tanques aéreos fechados. O solo contaminado é misturado com água, de modo a formar uma suspensão com 10 a 40% de sólidos, que é mecanicamente aerada através de rotações. A formação desta suspensão no interior do biorreator possibilita o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos degradadores. Os biorreatores apresentam maior aplicabilidade no tratamento de efluentes líquidos, permitindo o monitoramento efetivo do processo, maior controle das variáveis (valor de pH, temperatura, umidade, etc.) e melhor incorporação de aditivos. Além disso, os biorreatores são sistemas completamente fechados que permitem o controle de emissões e possibilita, na maioria dos casos, a redução do tempo de processo (Macleod & Daugulis, 2005). A adição de enzimas livres ou imobilizadas em sistemas de biorreatores é uma técnica de biorremediação que tem ganhado grande destaque nos últimos anos, para o tratamento de efluentes líquidos contaminados com HAPs (Fernandez-Lafuente et al., 2000; Kalogeris et al., 2006).

### **2.3.2 Uso de enzimas livres e imobilizadas para biorremediação de HAPs**

Enzimas podem ser uma boa alternativa para recuperação de ambientes contaminados com HAPs, pois podem ser utilizadas para tratar poluentes com muita especificidade. Possuem muitas vantagens quando comparado a tratamentos convencionais, incluindo aplicação em materiais recalcitrantes, com concentrações variáveis do contaminante (Durán & Esposito, 2000). Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar a possibilidade biotecnológica e ambiental da utilização das enzimas. Seu uso efetivo pode ser amparado por suas propriedades particulares como sendo um material protéico ou peptídico que não gera subprodutos indesejáveis, mas elas apresentam instabilidade para serem utilizadas sob condições ambientais, por isso o interesse pela tecnologia da imobilização tem aumentado durante as

últimas décadas. Já foi citado na literatura o efeito benéfico da imobilização na eficiência catalítica das enzimas, bem como das suas propriedades cinéticas e de estabilidade (Degaldillo & Rodriguez-Nogales, 2005).

A imobilização enzimática é uma técnica que oferece algumas vantagens na biorremediação (Fernandez-Lafuente et al., 2000). As enzimas imobilizadas comparadas com as enzimas livres têm a atividade enzimática reduzida e a constante de Michaelis aumentada. Essas alterações são resultantes de trocas estruturais introduzidas na enzima pela aplicação do carreador criando um microambiente o qual a enzima trabalha. A imobilização em partículas é um processo pelo qual enzimas produzidas pelo cultivo *in vitro* de microrganismos são retidas dentro de esferas poliméricas semi-permeáveis, com as enzimas distribuídas uniformemente dentro delas. O processo consiste da mistura das enzimas com uma solução pré-polimérica, aplicando uma força que separa enzima/polímero em partículas, geralmente esféricas, seguido de solidificação do material. Os polímeros que são comumente utilizados incluem o alginato, goma gelana, carragenana, agarose, poliuretano, poliacrilamida e metacrilato. Dependendo do polímero e da técnica de formação utilizada, as partículas podem variar de tamanho, de muito pequenas (aproximadamente 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro) a muito grandes (aproximadamente 3 mm). O tipo de polímero e o tamanho das partículas irão influenciar na atividade enzimática, retenção, difusão de nutrientes e estabilidade da partícula (Knaebel et al., 1997).

Para implementação de um processo comercial os efeitos benéficos da catálise enzimática devem superar os da catálise química levando-se em consideração a sua atuação em relação aos aspectos de saúde pública e ambiental, viabilidade econômica e facilidade de utilização, devido a estas características, enzimas imobilizadas têm sido implementadas em grande escala (Krajewska, 2004).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos degradadores de HAPs

Os microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte de um consórcio formado por cinco bactérias e um fungo degradadores de HAPs, isolados por Jacques et al. (2007). O isolamento foi realizado em amostras de solo provenientes do *landfarming* do SICECORS (Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul), onde desde 1989 é tratado o lodo oleoso produzido pelas indústrias deste Pólo, localizado em Triunfo/RS, e mais recentemente os resíduo petroquímicos gerados pela Refinaria Alberto Pasqualini, localizada em Canoas/RS.

O consórcio microbiano foi preservado em temperatura de 4°C em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio mineral líquido Tanner com a seguinte constituição em g L<sup>-1</sup>: CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,04; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1; NaCl, 0,8; NH<sub>4</sub>Cl, 1,0; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,2 e KCl, 0,1. Os micronutrientes foram adicionados na concentração, em mg L<sup>-1</sup>: CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,1; MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,425; ZnCl<sub>2</sub>, 0,05; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0,015; NiCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0,01; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,01; Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>, 0,01 e Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Shuttleworth & Cerneglia,1996), acrescido de 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno. Neste meio, os microrganismos encontravam-se todos misturados na forma de consórcio. Em intervalos mensais o consórcio era repicado para o mesmo meio e incubado durante 7 dias sob agitação de 150 rpm e a 30°C de temperatura.

Uma alíquota de 1 mL deste meio com o consórcio crescido foi diluída em solução salina (NaCl 0,85%) e plaqueada em meio ágar nutritivo com a seguinte constituição: extrato de carne, 3 g; peptona, 5 g; agar, 15 g; água destilada 1L; à pH 7,0), acrescido de 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, sendo as placas incubadas por 72 horas a 30°C. As colônias de bactérias crescidas nas

placas que apresentaram diferenças visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia, foram estriadas no mesmo meio até a purificação dos isolados e armazenadas neste meio sólido sob refrigeração a 4°C. Deste procedimento selecionou-se três bactérias *Mycobacterium fortuitum*, *Gordonia polyisoprenivorans* e *Naphtalene-utilizing bacterium*, que já haviam sido identificadas através do seqüenciamento do gene do rRNA 16S (Jacques et al., 2007).

### **3.2 Crescimento das bactérias para obtenção da enzima**

Para avaliação do crescimento das bactérias e obtenção do extrato celular com maior atividade das enzimas foram realizados experimentos com diferentes meios de cultura. Os isolados foram incubados separadamente em frascos com meio mineral Tanner com 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno ou fenantreno. A incubação ocorreu sob agitação de 150 rpm e a 30°C de temperatura, e em intervalos de 5 dias uma alíquota de 1 mL era diluída em solução salina, plaqueada em meio ágar nutritivo, onde era realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Neste intervalo também era realizada a quantificação da atividade das enzimas catecol 1,2, catecol 2,3 e protocatecol 3,4 dioxigenase.

O outro meio utilizado foi o caldo Luria Bertani (LB) com a seguinte constituição: extrato de levedura, 5 g; triptona, 10g; NaCl, 10g; água destilada, 1L com 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno ou fenantreno e incubados sob agitação de 150 rpm e 30°C de temperatura. Para este meio, a contagem de células por UFC e a quantificação da atividade das mesmas enzimas foi realizada em intervalos de 12 horas.

### **3.3 Efeito da concentração de HAPs na obtenção das enzimas**

Para a indução das enzimas de degradação dos HAPs, os isolados foram inoculados em 500 mL de caldo LB com 0, 50, 150 e 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno ou fenantreno. Foram incubados sob agitação de 150 rpm e a 30°C de temperatura. Após 36 horas foi obtido o extrato celular e quantificado a proteína e a atividade enzimática, conforme descrito a seguir.

### 3.4 Efeito da sonicação para obtenção das enzimas

Para aperfeiçoar a obtenção da enzima foram realizados testes para determinar o melhor tempo de sonicação para o rompimento das células bacterianas, uma vez que este processo gera calor, o que pode desnaturar as proteínas. Este teste foi realizado a partir da inoculação dos isolados em um litro de caldo LB. Após a obtenção das células por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, estas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (50 mM pH 7,0) e ressuspensas em 10 mL do mesmo tampão. Para a sonicação em banho de gelo foram aplicados três ciclos de 40s, com intervalos de um minuto para o resfriamento da sonda, variando-se a potência de sonicação de 50, 60, 70 e 80 W. As frações obtidas em cada potência foram centrifugadas e o sobrenadante avaliado quanto à atividade enzimática e concentração de proteína no extrato celular, através do método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

### 3.5 Atividade enzimática

Para verificar a atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase (C1,2O) e catecol 2,3 dioxigenase (C2,3O) quanto a oxidação do antraceno a catecol foi utilizado o extrato celular dos isolados *M. fortuitum* e *G. polyisoprenivorans*. Para verificar a atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase (P3,4O) quanto a oxidação do fenantreno a protocatecol foi utilizado o extrato celular do isolado *Naphtalene-utilizing bacterium*. O cálculo da atividade enzimática foi realizado de acordo com as equações 1 e 2.

$$\varepsilon = \frac{A}{c.L}$$

**Equação 1**

Em que:

$\varepsilon$  = coeficiente de extinção molar;

A = absorvância (260 nm);

c = concentração do substrato mM;

L = caminho percorrido pela luz (cm)

$$A = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot V^*}$$

**Equação 2**

Em que:

$\Delta A$  = variação de absorvância;

$V$  = volume total da reação (mL);

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar;

$V^*$  = volume da amostra (mL)

A atividade da catecol 1,2 dioxigenase foi determinada pelo aumento da absorvância a 260 nm pela formação de cis-muconato. A mistura da reação foi composta por 1 mL de catecol 0,1 mM, 0,8 mL de tampão tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 0,2 mL de 2-Mercaptoetanol 0,1mM e 1 mL do extrato celular conforme descrito por Hegman (1966).

A atividade da catecol 2,3 dioxigenase foi determinada pelo aumento da absorvância a 375 nm pela formação de hidroximucônico semialdeído. A mistura da reação foi composta por 1 mL de catecol 0,3 mM, 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e 1 mL do extrato celular, conforme Baggi et al. (1987)

A atividade da protocatecol 3,4 dioxigenase foi determinada pelo decréscimo da absorvância a 290 nm devido a formação de cis-muconato. A mistura de reação é composta por 1 mL ácido protocatecólico 0,12 mM, 1 mL de tampão tris-HCl (pH 7,5) e 1 mL do extrato celular, conforme descrito por Fujisawa & Hayaishi (1987).

### **3.6 Otimização do pH, temperatura e tempo de reação das enzimas**

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado em diferentes tampões: tampão acetato 50 mM para pH 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5; tampão fosfato 50 mM para pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 e tampão Tris-HCl para pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0. O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado em 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C. Para a determinação do tempo necessário para o substrato ser convertido em produto verificou-se a atividade enzimática por 90 min, com determinações em intervalos de 10 min.



### **3.7 Efeito dos íons na atividade enzimática**

Neste teste foi avaliado o efeito de diferentes íons na atividade enzimática, utilizando um controle sem a adição de íons, a não ser os presentes na composição original do tampão. Os íons a serem testados foram adicionados em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) para a enzima catecol 2,3 dioxigenase e em tampão tris-HCl (50 mM, pH 7,5 e 8,0) para as enzimas protocatecol 3,4 e catecol 1,2 dioxigenase, respectivamente. Os íons testados foram  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , adicionados a mistura de reação na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês, acetato de potássio, cloreto de ferro e cloreto de mercúrio, todos na concentração de 1 mM, e sulfato de amônio, na concentração de 10 mM.

### **3.8 Imobilização do extrato celular**

Para a imobilização extrato celular foi utilizado 9 mL de alginato de sódio 2% (v/v), o qual foi misturado a 1 mL de extrato celular (9000U). As esferas de alginato de sódio de cerca de 3 mm de diâmetro foram obtidas por gotejamento, em uma solução de 100 mL de cloreto de cálcio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . As esferas permaneceram por 1 hora nesta solução, a  $4^\circ\text{C}$ , em seguidas for lavadas duas vezes com água destilada estéril (Kalogeris et. al., 2006).

Todos os parâmetros avaliados para a atividade enzimática no extrato livre, como pH, temperatura, tempo de reação e efeitos dos íons na atividade enzimática, foram avaliados quando o extrato estava imobilizado, utilizando-se as mesmas condições e procedimentos discutidos anteriormente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

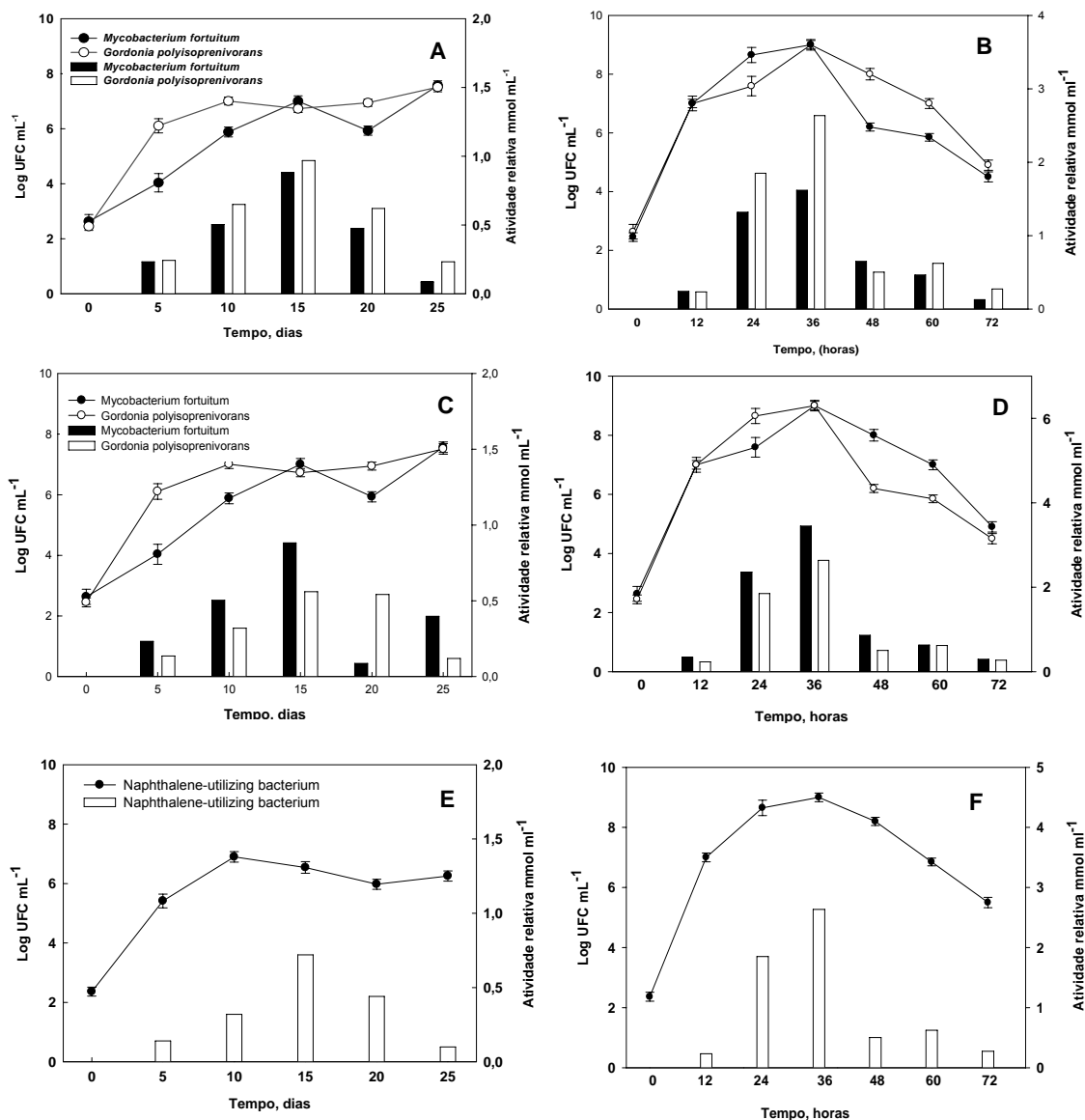
### 4.1 Condições ótimas para obtenção da enzima

#### 4.1.1 Condições ótimas de crescimento bacteriano para obtenção das enzimas

Para avaliação do crescimento dos isolados e obtenção do extrato celular com maior atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase (C1,2O), catecol 2,3 dioxigenase (C2,3O) e protococatecol 3,4 dioxigenase (P3,4O) foram realizadas curvas de crescimento em meio mineral (MM), tendo somente como fonte de carbono e energia, 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno e fenantreno e, caldo LB contendo as mesmas concentrações destes HAPs. Nos meios MM e LB que continham antraceno foram incubados os isolados *Mycobacterium fortuitum* e *Gordonia polyisoprenivorans* e nos meios MM e LB que continham fenantreno foi incubado o isolado *Naphtalene-utilizing bacterium*. Em intervalos determinados, às células eram rompidas e avaliadas quanto à atividade das enzimas C1,2O, C2,3O e P3,4O.

Conforme mostrado na Figura 5, o crescimento celular dos isolados mostrou ser maior quando estes estavam em caldo LB, quando comparado com meio mineral livre de qualquer fonte alternativa de carbono.

Os três isolados que cresceram nos dois meios de cultura apresentaram curvas características do crescimento microbiano em meios de cultura líquidos com agitação e temperatura controlada. A fase lag praticamente não foi observada porque estes microrganismos já estavam crescendo em meio mineral contendo antraceno como fonte de carbono. Segundo Chen et al (2002), a adaptação ao contaminante tóxico, aumenta a velocidade de degradação, tornando mais eficiente o processo biológico, iniciando a fase exponencial logo após a inoculação.



**FIGURA 5.** Curvas de crescimento (linhas) e atividade das enzimas (barras) C1,2O (A e B), C2,3O (C e D) e P3,4O (E e F) em isolados bacterianos crescendo a 150 rpm e 30°C em meio mineral, avaliados durante 25 dias (A, C e E) e em caldo LB, avaliados durante 72 horas (B, D e F).

Destaca-se nesta figura, a grande diferença de taxa de crescimento entre as bactérias que crescem em meio mineral e em caldo LB. A taxa de crescimento da *Mycobacterium fortuitum* foi de 0,0024 h<sup>-1</sup> no meio mineral enquanto que no caldo LB a taxa foi de 0,0138 h<sup>-1</sup>. Para a *Gordonia polyisoprenivorans*, a taxa de crescimento em meio mineral foi 0,0027 h<sup>-1</sup> enquanto que no caldo LB a taxa foi de 0,0126 h<sup>-1</sup>. O mesmo foi observado para a *Naphthalene-utilizing bacterium* que apresentou taxa de crescimento de

0,0012 h<sup>-1</sup> em meio mineral e 0,0193 h<sup>-1</sup> em caldo LB. Este comportamento provavelmente se deva a utilização de fontes de carbono solúveis e de estrutura química simples presentes no meio LB, como triptona e extrato de carne, que propiciaram rápido crescimento, enquanto que o crescimento em meio mineral foi sustentado somente pela utilização do antraceno e fenantreno, que são pouco solúveis em água (0,076 mg L<sup>-1</sup> para o antraceno e 1,29 mg L<sup>-1</sup> para o fenantreno) (Verschueren, 2001), o que resulta em baixa biodisponibilidade de fonte de C aos microrganismos.

Em meio mineral o final da fase exponencial ocorreu aproximadamente aos 15 dias quando o antraceno foi à fonte de C adicionado e aos 10 dias quando o fenantreno foi adicionado. Esta diferença provavelmente se deve a diferença de solubilidade entre estes dois HAPs, onde o fenantreno é mais solúvel e pode estar mais biodisponível aos microrganismos. Em caldo LB a curva de crescimento apresentou fase exponencial até atingir 36 horas, tanto na presença do antraceno quanto na presença do fenantreno. As células que se encontram em fase exponencial geralmente apresentam maior atividade metabólica e condições mais estáveis, sendo por essas razões frequentemente utilizadas para estudos enzimáticos.

Observou-se tendência de maior atividade enzimática quando as células eram crescidas em caldo LB, se comparado com aqueles que cresciam em meio mineral. A expressão da enzima catecol 1,2 dioxigenase em meio mineral tendo somente como fonte de carbono antraceno, foi verificada a partir do 5º dia, sendo que o máximo de atividade foi verificado no 15º dia, onde *Mycobacterium fortuitum* apresentou uma atividade enzimática específica de 0,8 mmol mL<sup>-1</sup> e *Gordonia polyisoprenivorans* de 0,9 mmol mL<sup>-1</sup> (Figura 5A). Em caldo LB a enzima catecol 1,2 dioxigenase apresentou atividade logo nas 12 primeiras horas, aumentando esta até atingir seu máximo em 36 horas, que foi de 1,6 mmol mL<sup>-1</sup> para o isolado *Mycobacterium fortuitum* e de 2,6 mmol mL<sup>-1</sup> para o isolado *Gordonia polyisoprenivorans* (Figura 5B). O mesmo comportamento em relação à atividade enzimática nos meios de cultura foi verificado para a enzima catecol 2,3 dioxigenase, variando somente em relação aos isolados, onde *Mycobacterium fortuitum* sempre apresentou maior atividade em relação a *Gordonia polyisoprenivorans* (Figuras 5C e 5D).

A atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase em meio mineral, onde a única fonte de carbono era o fenantreno, foi observada a partir do 5º dia, sendo que o máximo de atividade foi constatado no 15º, onde o isolado *Naphtalene-utilizing bacterium* apresentou uma atividade enzimática específica de 0,7 mmol mL<sup>-1</sup> (Figura 5E). Em caldo LB esse isolado apresentou atividade nas 12 primeiras horas, aumentando esta até atingir seu máximo 2,6 mmol mL<sup>-1</sup> em 36 horas (Figura 5F). Surpreendentemente, estes resultados demonstram que os três isolados apresentaram comportamento muito semelhante, tanto em meio mineral como no caldo LB, o que facilitou a escolha do meio e do tempo de crescimento das bactérias para obtenção das enzimas.

Verifica-se deste modo, que a adição de fontes de C de fácil degradação no meio de cultura contendo xenobióticos de alta recalcitrância, como os HAPs, apresenta favorecimento da expressão das enzimas. Em estudos realizados por Wang et al. (2006) verificaram um aumento de atividade da catecol 1,2 e catecol 2,3 dioxigenase em *Pseudomonas aeruginosa* TKU002 quando o crescimento era em meio de cultura com outra fonte de carbono junto ao xenobiótico. A baixa expressão enzimática dos isolados que cresceram em meio mineral pode ser consequência da baixa solubilidade dos HAPs, que conduz a uma baixa taxa de crescimento e desta forma, baixa quantidade de enzimas expressas. Nesta lógica, seria dispendioso metabolicamente à célula expressar grande quantidade de enzimas de degradação dos HAPs se a absorção celular destes compostos é baixa. Outro fator que poderia inibir a atividade das dioxigenases poderia ser a presença de sais como zinco e cálcio, conforme verificado por Cai et al. (2007). Mas este fator pode não ter grande influencia no nosso estudo uma vez que o caldo LB também possui sais de zinco e cálcio, sendo que a baixa atividade foi observada somente no meio mineral.

#### **4.1.2 Efeito da concentração de HAPs na obtenção das enzimas**

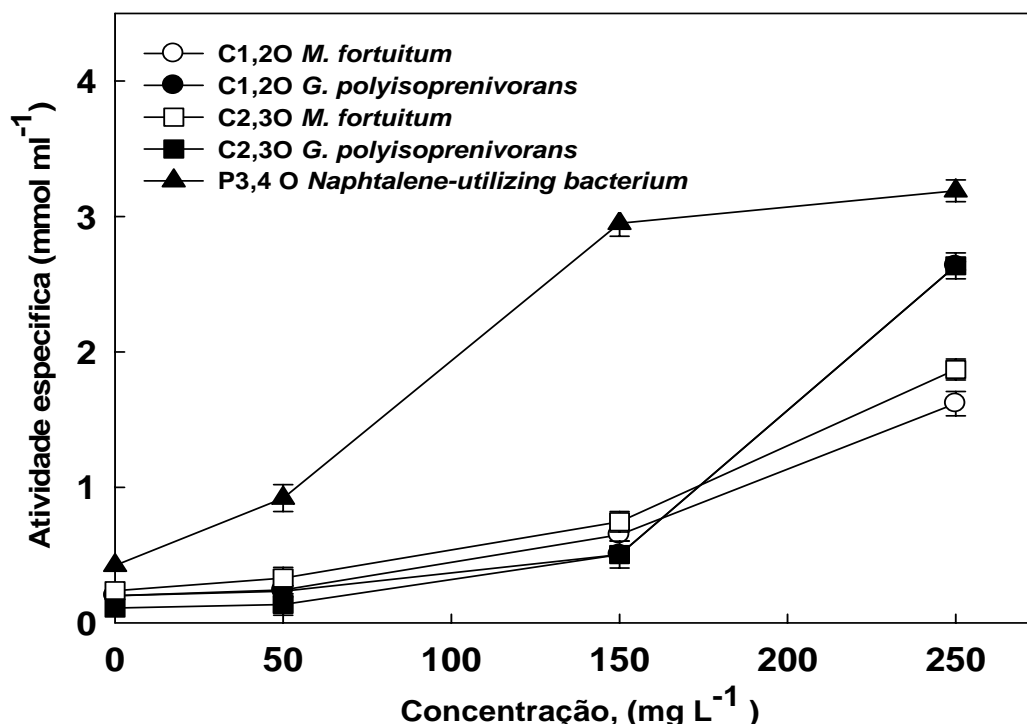
Para avaliar se a atividade das enzimas é estimulada pela presença de diferentes concentrações de HAPs os isolados foram incubados em caldo LB contendo 50, 150 e 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno ou fenantreno, e na ausência dos mesmo. Após 36 horas de crescimento sob agitação de 150 rpm e 30°C de

temperatura as células foram rompidas e avaliadas quanto as atividades de C1,2O, C2,3O e P3,4O.

Foi possível observar que quanto maior a concentração de antraceno e fenantreno no caldo LB, maior a atividade das três enzimas, sendo que as menores atividades foram observadas na ausência do HAPs (Figura 6). Wick et al. (2001) observaram que quanto maiores as concentrações de antraceno no meio de cultura, maior o crescimento celular. Segundo modelos matemáticos desenvolvidos por estes autores, quanto maior a concentração de antraceno no meio de cultura, maior será o coeficiente de transferência de massa da fase sólida (HAP) para a líquida (dissolução), maior o fornecimento de antraceno para as células e maior a taxa de crescimento.

Assim, é provável que quanto maior a concentração do HAP no meio de cultura, mais antraceno está disponível para as células e maior será a expressão das enzimas de degradação. A produção das enzimas na ausência dos HAPs poderia ser explicada pelo fato de que as enzimas indutivas são produzidas em nível basal, mesmo na ausência do fator de indução (Conceição et al., 2006).

As baixas atividades de algumas das enzimas podem ser atribuídas ao fato de que o metabolismo microbiano dos HAPs ocorre em dois estágios. No primeiro ocorre oxidação inicial do anel benzênico, para formar os *cis*-dihidrodióis, e no segundo estágio ocorre rearomatização para formar um derivado hidroxilado (Caldwell, 2000). Nesta rearomatização, pode haver a formação de outros compostos intermediários que não sejam catecol ou protocatecol. Estes foram os substratos essenciais para as enzimas aqui estudadas. Portanto, a baixa atividade dessas enzimas, não significa necessariamente que não ocorra a degradação do substrato, uma vez que, outros compostos intermediários podem estar se formando e outras enzimas podem estar sendo expressas.



**FIGURA 6.** Atividade das enzimas C1,2O, C2,3O e P3,4O de *M. fortuitum*, *G. polyisoprenivorans* e *Naphtalene-utilizing bacterium* crescidas por 36 horas em caldo LB, na ausência e na presença das concentrações de 50, 150 e 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno ou fenantreno (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.1.3 Efeito da sonicação para obtenção das enzimas

Para a obtenção do extrato celular as células foram submetidas à sonicação em banho de gelo, para o rompimento da célula, uma vez que se trata de uma enzima intracelular. Durante a sonicação ocorre grande liberação de calor e o aquecimento gerado pode acarretar inativação e desnaturação da enzima de interesse. Foi então avaliado a potência de sonicação que possibilitasse a maior atividade das enzimas dioxigenases no extrato celular. Para esta avaliação foram utilizados os isolados *Naphtalene-utilizing bacterium* e *Mycobacterium fortuitum*. Para os cálculos foi convencionado como 100% a atividade de catecol 1,2 dioxigenase e protococatecol 3,4 dioxigenase na voltagem que apresentou maior atividade, a qual apresentaria o maior número de células integras, e a última sonicação, com a maior concentração de proteínas como 100% de proteínas solúveis (Figura 7).

Com a aplicação de 50 W de sonicação, observou-se baixa atividade enzimática e baixa concentração de proteínas para todos os isolados, provavelmente devido à pequena quantidade de células que foram rompidas. A sonicação com 60 W resultou em aumento da concentração de proteínas e a maior atividade enzimática para o isolado *Naphtalene-utilizing bacterium* (Figura 7A). Já na potência de 80 W obteve-se maior rompimento das células devido à alta concentração de proteína, porém uma atividade enzimática extremamente baixa foi observada, provavelmente devido a desnaturação das enzimas pelo calor. O isolado *Mycobacterium fortuitum* apresentou extrato celular com maior atividade enzimática quando foi aplicada a potência de 80 W e maior concentração de proteína a 70 W (Figura 7B).

Desta forma, para obtenção do extrato celular padronizou-se a potência de sonicação de 60 W para *Naphtalene-utilizing bacterium* e de 80 W para *Mycobacterium fortuitum* onde se obteve maior atividade enzimática.

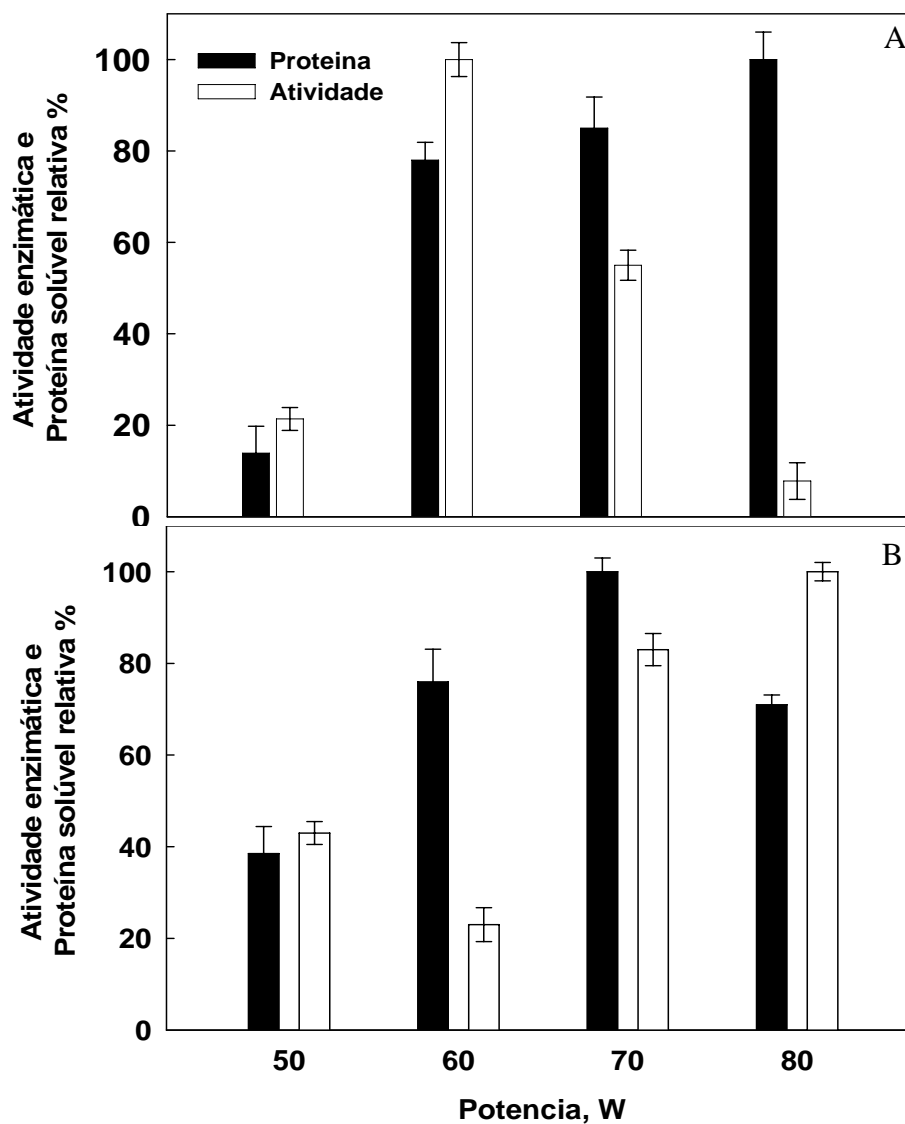
#### **4.2 Caracterização de enzimas produzidas por *Mycobacterium fortuitum***

O gênero *Mycobacterium* tem sido extensivamente utilizado nos estudos de biodegradação de HAPs (Wick et al., 2002; Miyata et al., 2004; Leys et al., 2005; Mutnuri et al., 2005). Segundo Johnsen et al. (2005) a degradação dos HAPs no solo é dominada por alguns poucos gêneros, entre os quais o *Mycobacterium*. A bactéria estudada demonstrou ampla versatilidade metabólica, crescendo em pireno, antraceno, fenantreno, naftaleno, além de outros compostos alifáticos e monoaromáticos (Jacques et al., 2007).

A oxidação intermediária do antraceno à catecol é verificada através da atividade de enzimas dioxigenases, capazes de romper o anel aromático do composto por via meta e/ou orto. A bactéria *M. fortuitum* quando cultivada em antraceno produziu tanto catecol 1,2 dioxigenase quanto catecol 2,3 dioxigenase, conforme será verificado a seguir nos resultados. O metabolismo desses compostos foi investigado por vários pesquisadores, onde é verificada a atividade de uma ou mais enzimas em uma única bactéria. Monohar et al. (1999) isolaram linhagem de *Pseudomonas* sp. NGKI, capaz de degradar antraceno, formando intermediários de 1,2-dihidroxiantraceno, salicilato e



catecol, e produzir a enzima catecol 1,2 dioxigenase. Cenci et al. (1999) isolou dez diferentes linhagens de *Pseudomonas* capazes de expressar diferentes dioxigenases (catecol 1,2 dioxigenase; catecol 2,3 dioxigenase e protocatecol 2,3, 3,4 e 4,5- dioxigenase).

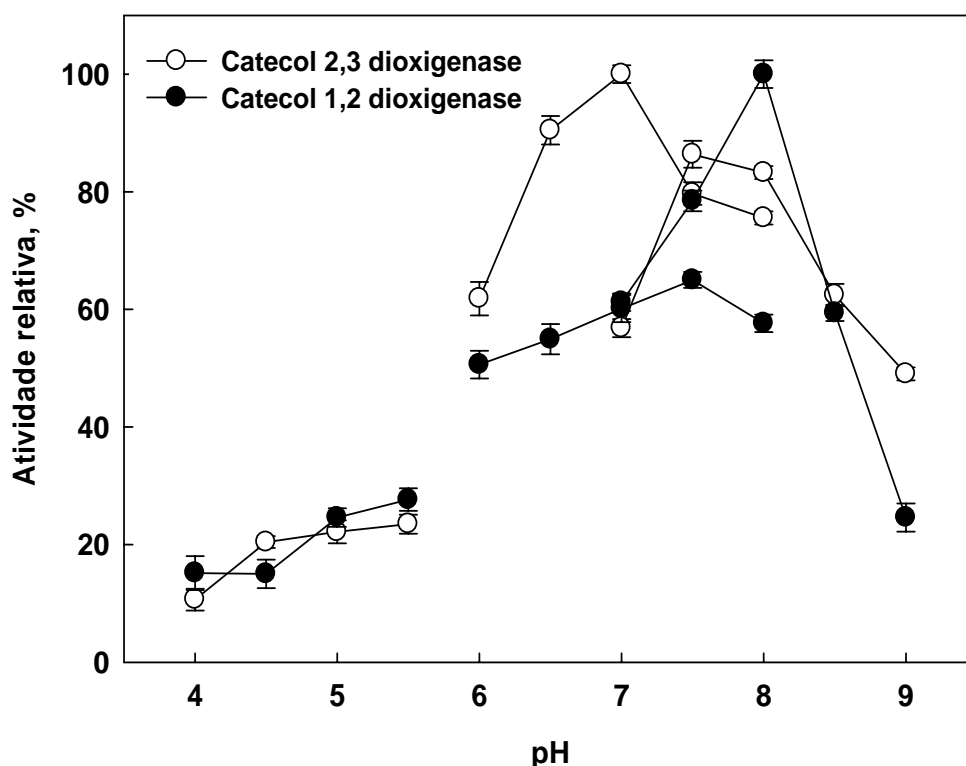


**FIGURA 7.** Atividade das enzimas P3,4O e C1,2O e conteúdo de proteínas solúvel no extrato celular dos isolados *Naphtalene-utilizing bacterium* (A) e *M. fortuitum* (B) obtido após diferentes potências de sonicação (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.2.1 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática

Para determinar o pH ótimo de atividade das enzimas catecol 1,2 e catecol 2,3-dioxigenase foram avaliados três tampões: tampão acetato (pH 4,0 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tampão tris-HCl (pH 7,0 a 9,0).

A atividade da C1,2O presente no extrato celular de *M. fortuitum* foi elevada entre a faixa de pH 7,5 a 8,0 (Figura 8), sendo que o pH com maior atividade desta enzima foi 8,0, em tampão Tris-HCl. Valores semelhantes foram determinados por Briganti et al. (1997) em estudos de purificação e propriedades bioquímicas da enzima catecol 1,2 dioxigenase, onde as condições ótimas de atividade foram em pH 6,0 a 8,0. No pH 4,0 a 5,5 (tampão acetato) houve grande redução da atividade enzimática. Em tampão fosfato a atividade enzimática foi maior em pH 7,5, porém bem abaixo das atividades detectadas no tampão Tris-HCl.



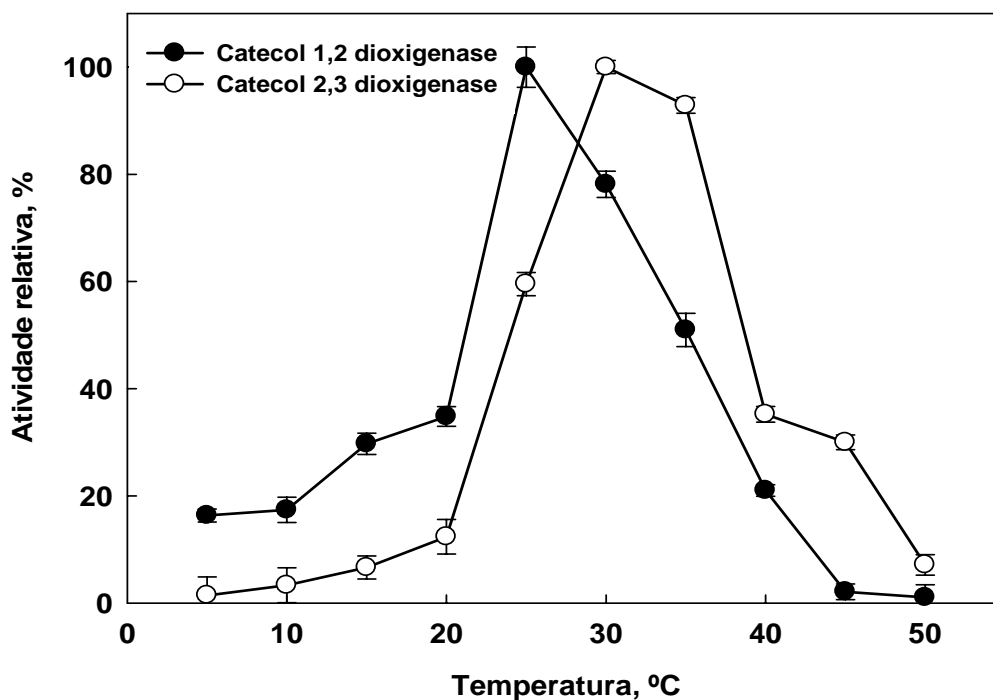
**FIGURA 8.** Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de *Mycobacterium fortuitum*. Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (7,0 a 9,0) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

A atividade da enzima C2,3O foi ótima em pH 7,0 no tampão fosfato (Figura 8). Em tampão Tris-HCl a atividade enzimática foi maior em pH 7,5. Em tampão acetato a atividade foi semelhante a encontrada para C1,2O e manteve-se inferior a 30% do valor máximo, indicando que estas enzimas apresentam sensibilidade ao H<sup>+</sup>. Assim o aumento da concentração de H<sup>+</sup> na reação pode levar a desnaturação das enzimas, uma vez que a estrutura da molécula de proteína cataliticamente ativa depende do caráter iônico das cadeias de aminoácidos (Whiteley et al., 2006).

Como observado na figura 8, as duas enzimas tiveram uma tendência muito semelhante em resposta à variação do pH do meio de reação, o que pode ser consequência da homologia entre estas enzimas em relação a sua seqüência de aminoácidos. Segundo Briganti et al. (1997), os genes que codificam as dioxigenases apresentam seqüências muito conservadas e por isso atividades semelhantes em resposta às variações ambientais. De qualquer modo, estes resultados indicam que o pH é um fator muito importante e deve ser considerado quando se procura aumentar a atividade das enzimas de degradação de HAPs, em solos ou em biorreatores no tratamento de efluentes contaminados.

#### **4.2.2 Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática**

As enzimas foram avaliadas em diferentes temperaturas (Figura 9), para verificar a influência deste fator abiótico na atividade enzimática. A enzima C1,2O apresentou atividade relativa de 16% quando incubado a 5°C, essa atividade foi subindo até atingir o seu ótimo que foi a 25°C. Em 35°C a atividade já era de 50%, apresentando atividade relativa próximo à zero em temperatura acima de 45°C. As mesmas condições foram verificadas por Kalogeris et al. (2006) avaliando atividade enzimática de C1,2O em *Pseudomonas putida*. A enzima C2,3O apresentou baixa atividade relativa quando foi testada entre 5 a 20°C, a atividade foi ótima em 35°C. Em 40° C apresentou 35% de atividade chegando a 7% em 50°C.



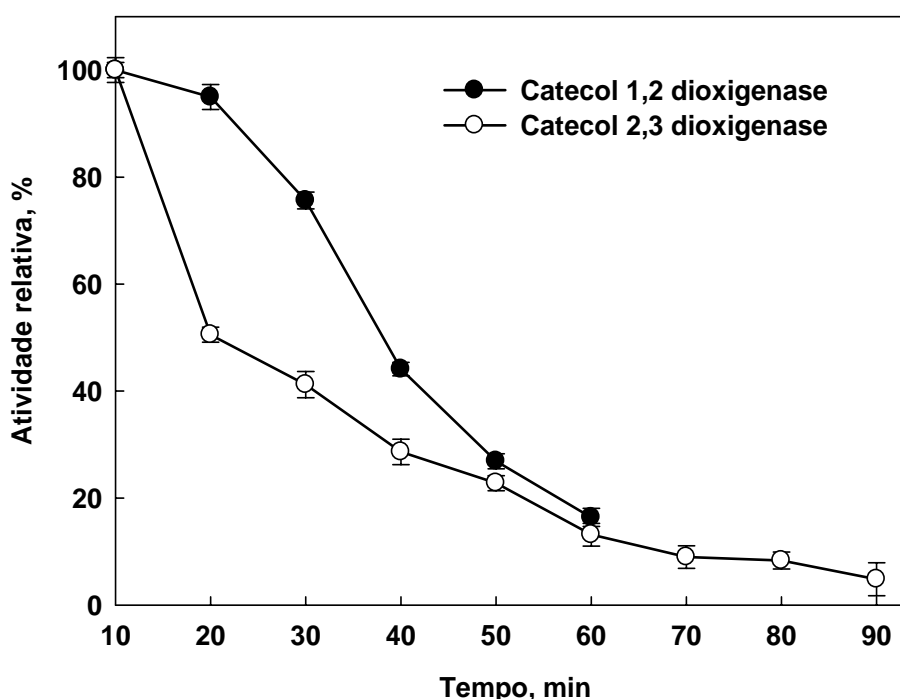
**FIGURA 9.** Efeito da temperatura na atividade da catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de *Mycobacterium fortuitum* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

A maioria das enzimas tem uma temperatura ótima que pode ser relacionada à temperatura do ambiente em que os microrganismos foram isolados. Fernandez-Lafuente et al. (2000) determinaram como condição ótima para atividade da catecol 2,3 dioxigenase a temperatura de 10° a 50°C presente em *Bacillus stearothermophilus*, que apresenta crescimento ótimo a 55°C. Santos et al. (2004) avaliaram a capacidade de crescimento de isolados bacterianos de solo em meio mineral com antraceno, como única fonte de carbono e energia, sob temperaturas de 20° a 40°C. A temperatura com maior crescimento foi 30°C, sendo que o presente solo foi coletado em janeiro, período em que as temperaturas médias do solo se aproximaram da temperatura ótima de crescimento determinada em laboratório. A temperatura varia no ambiente em função das estações do ano, causando mudanças na taxa metabólica da comunidade microbiana do solo.

O efeito da temperatura ao longo do ano foi verificado por Atlas & Bartha (1972), os quais observaram que microrganismos isolados no inverno possuíam maior capacidade de degradar petróleo a 5°C. Deste modo, é necessário ter o conhecimento das condições ambientais em que o microrganismo foi isolado, para assim ter uma informação prévia da temperatura ótima de atividade das enzimas deste organismo.

#### 4.2.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática

Para avaliar a estabilidade das enzimas na reação enzimática e determinar o tempo necessário para o substrato ser convertido em produto, verificou-se a atividade enzimática da C1,2O e C2,3O durante 90 minutos, a 30°C em pH 8,0 (tampão tris-HCl) e em pH 7,0 (tampão fosfato), respectivamente (Figura 10). Para os cálculos foi determinado como 100% a atividade do tempo inicial. A enzima C1,2O apresentou atividade durante 60 minutos. Durante os primeiros 20 minutos manteve elevada estabilidade, tendo perdido somente 10% da atividade relativa. Após 35 minutos a atividade relativa já era menor que 50%, ocorrendo a partir daí forte decréscimo até os 60 minutos. A enzima C2,3O demonstrou a maior estabilidade, apresentando atividade durante os 90 minutos em que foi realizado o teste (Figura 10). Porém aos 20 minutos de reação já havia ocorrido à perda de 40% da atividade enzimática e após 60 minutos foi verificada atividade relativa muito baixa, que se manteve até os 90 minutos.



**FIGURA 10.** Duração da atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presentes no extrato celular do isolado *Mycobacterium fortuitum* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Kalogeries et al. (2006) encontraram padrões semelhantes a estes, da figura 10, de estabilidade no estudo da enzima catecol 1,2 dioxigenase. O mesmo foi verificado por Fernandez-Lafuente et al. (2000) em estudos com a enzima C2,3O. Outros autores porém obtiveram padrões diferentes com a alteração das condições como pH e temperatura. Wang et al. (2006) testaram a estabilidade da enzima C1,2O em diferentes pH, e obtiveram padrões muito diferentes em relação a cada pH estabelecido. O mesmo foi verificado por Milo et al. (1999) que caracterizaram a enzima C2,3O de um *Bacillus* termofílico, em altas temperatura. Como a estabilidade enzimática é determinada através da meia-vida de uma enzima em certas condições, estudos prévios em relação as melhores condições de pH e temperatura devem ser verificados para então se verificar qual a melhor estabilidade, visando o melhor aproveitamento destas enzimas na degradação de compostos xenobióticos.

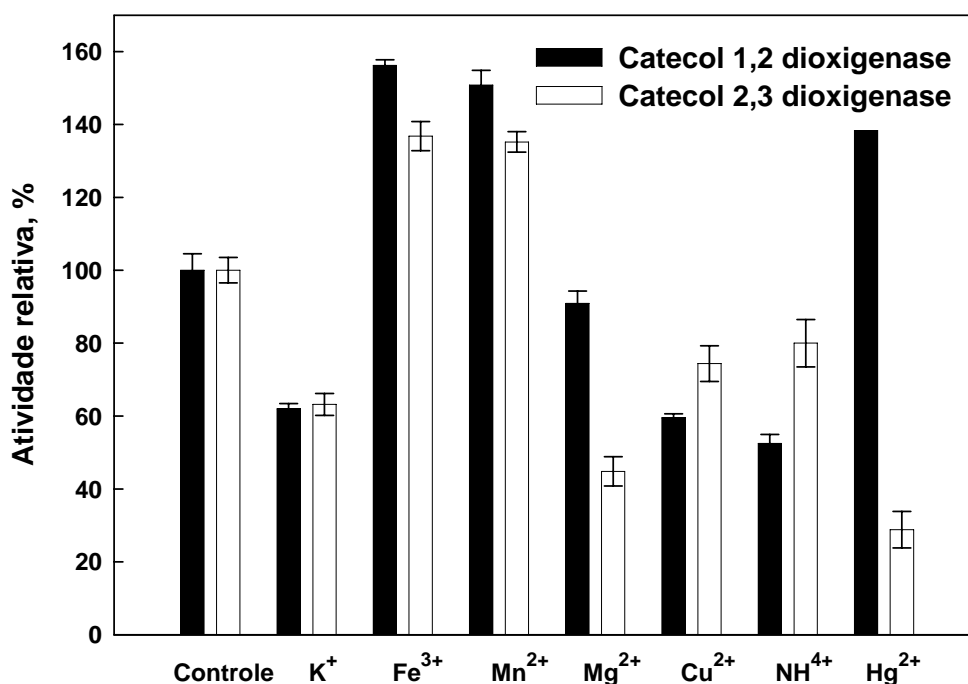
#### 4.2.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Na figura 11 são apresentados os efeitos causados na atividade das enzimas C1,2O e C2,3O pela adição de cátions na mistura de reação. Neste teste foi utilizado um controle sem a adição do referido íon no tampão e  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , adicionados isoladamente à mistura de reação na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês, acetato de potássio, cloreto de ferro e cloreto de mercúrio na concentração de 1 mM e sulfato de amônio na concentração de 10 mM, respectivamente. O controle (100%) refere-se à atividade da enzima na ausência do íon.

Para a enzima C1,2O presente em *M. fortuitum* a atividade foi inibida pela presença dos íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{NH}_4^+$ , sendo que as maiores inibições ocorreram pelo amônio (47%), seguidas por cobre e potássio (aproximadamente 40%). O magnésio apresentou a menor inibição (10%). Já a presença de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  estimularam grandemente a atividade da enzima, ocorrendo um aumento relativo de aproximadamente 60%. A atividade relativa da enzima C2,3O em *M. fortuitum* foi inibida na presença dos cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , sendo que as maiores inibições ocorreram pelo mercúrio (72%) e magnésio (66%), seguido por potássio (37%), cobre (26%) e

amônio (20%). Na presença de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  houve aumento na atividade relativa de aproximadamente 35%, quando comparado ao controle.

A presença de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{NH}_4^+$  na mistura de reação inibiram a atividade das duas enzimas avaliadas. Este comportamento também foi observado por Wang et al. (2006) nos cátions divalentes como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e provavelmente se deve a ligação destes cátions à enzima, funcionando como inibidores. Eles não competem com o substrato pelo sítio ativo, mas vão ocupar outro sítio da enzima (sítio regulativo ou de inibição), formando complexos EI e também complexos do tipo enzima-inibidor-substrato (EIS). Desta forma, a enzima é inativada quando o inibidor está ligado, com ou sem a presença do substrato (Lehninger et al., 1995).



**FIGURA 11.** Efeito dos íons na atividade enzimática relativa da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presentes no extrato celular de *Mycobacterium fortuitum* (o controle refere-se a atividade da enzima na ausência do íon; Dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

As duas enzimas foram estimuladas por  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . O ferro é um elemento que desempenha funções celulares essenciais que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAPs, como a participação na estrutura das enzimas do sistema multicomponente das dioxigenases (periféricas) e participação como cofator enzimático nas enzimas de fissão

(Harayama, 1999). Dinkla et al. (2001) verificaram que o aumento da disponibilidade do ferro no meio mineral aumentou a degradação do tolueno. Este estímulo provavelmente se deve ao fato que as enzimas envolvidas na degradação dos compostos aromáticos apresentam o ferro como importante componente estrutural e/ou como cofator. Estes autores verificaram um aumento da demanda por ferro no momento da expressão dos genes que codificam estas enzimas. Em outro estudo, o suprimento de ferro em quantidades adequadas aumentou significativamente a atividade das seguintes enzimas de degradação do tolueno: tolueno monooxigenase (56%), benzoato 1,2 dioxigenase (82%), catecol 2,3 dioxigenase (97%) e 2-hidroxi-mucônico semialdeído hidrolase (77%) (Dinkla & Janssen, 2003).

Poucos estudos estão disponíveis sobre a presença de  $Mn^{2+}$  na estrutura das enzimas. Geralmente são os íons  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$  essenciais para atividade catalítica, mas algumas enzimas contendo  $Mn^{2+}$  também são conhecidas (Briganti et al., 1995). O manganês assim como o ferro está presente na estrutura das enzimas dioxigenase, exercendo funções celulares essenciais no metabolismo enzimático em especial das enzimas que fazem a clivagem intradiol.

### **4.3 Caracterização da enzima Catecol 1,2 dioxigenase no extrato imobilizado de *Mycobacterium fortuitum***

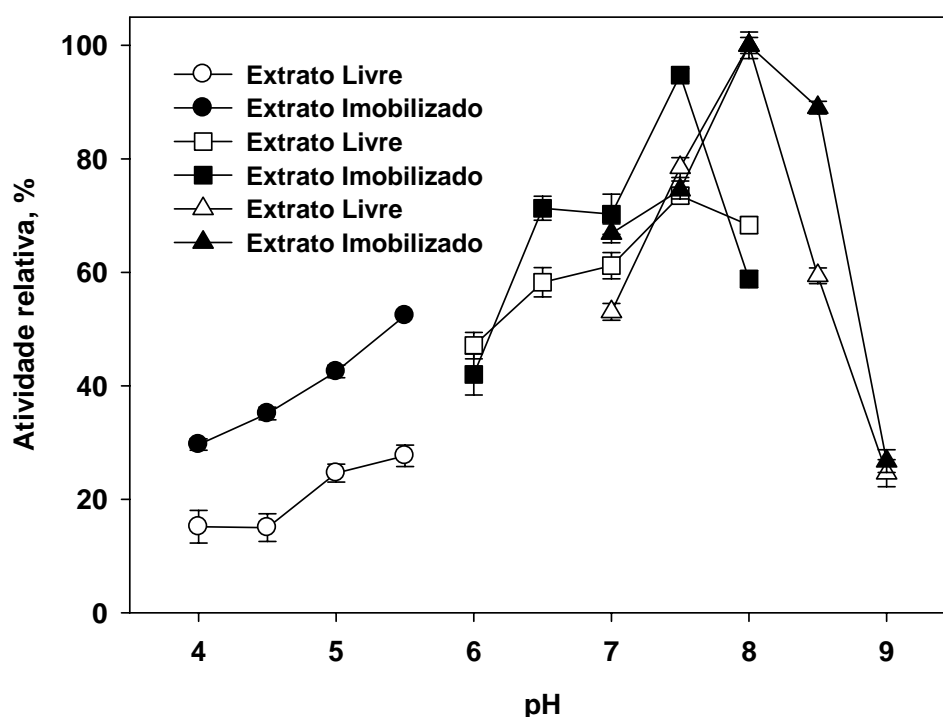
#### **4.3.1 Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado**

A incubação do extrato celular imobilizado durante 30 minutos a 30°C em diferentes tampões aumentou a atividade da enzima C1,2O, apresentando atividade em uma faixa de pH maior, em comparação ao extrato livre que foi incubado da mesma forma (Figura 12). Tanto o extrato livre quanto o extrato imobilizado exibiram sua atividade ótima em valores próximos de pH 8,0 com tampão Tris-HCl. A maior diferença observada foi que a enzima C1,2O presente no extrato livre apresentou redução drástica na atividade quando incubada em pH 4,0 a 5,5, mostrando-se muito sensível as altas concentrações de  $H^+$ . Já no extrato imobilizado esta enzima apresentou atividade



aproximadamente duas vezes maior (superior a 30% da atividade máxima) quando incubado nestes pH ácidos.

Desta forma, a imobilização da enzima resultou em maior atividade da enzima, principalmente em pH mais ácidos. De forma geral, para todos os pH avaliados, o extrato imobilizado mostrou maior atividade das enzimas em relação ao extrato livre. Esta maior atividade é especialmente importante quando da utilização no ambiente, que exige a manutenção de alta atividade em períodos prolongados de tempo, sob efeito de variações climáticas intensas (Karam et al., 1997).

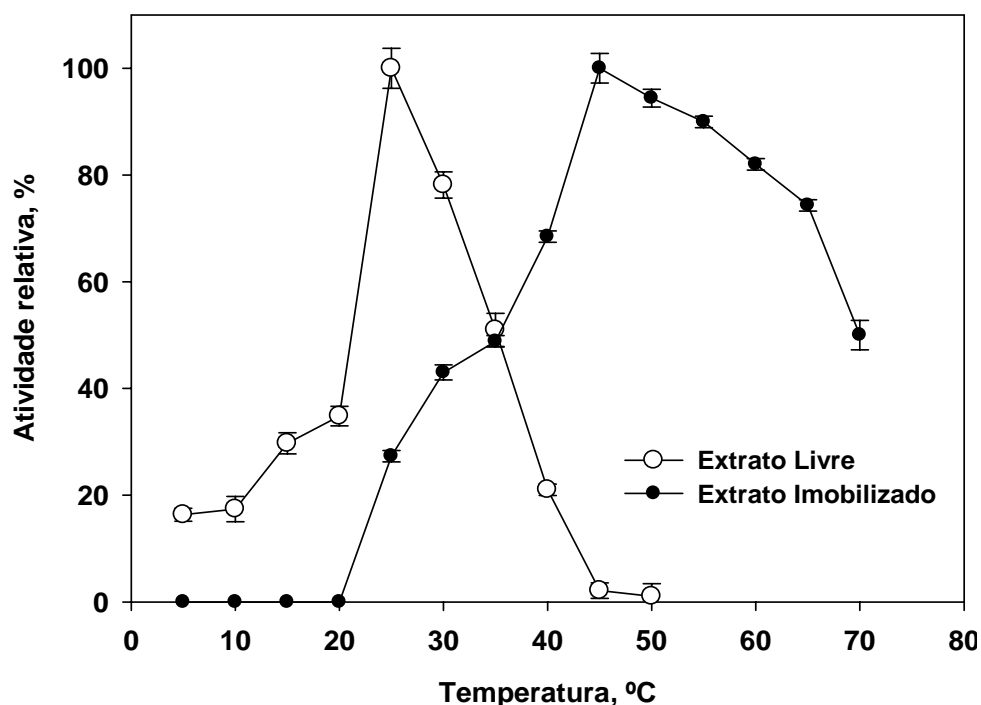


**FIGURA 12.** Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Mycobacterium fortuitum*. Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0) (dados são médias de duas repetições e as representam o erro padrão).

#### 4.3.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado

A imobilização do extrato celular modificou muito o padrão de atividade da enzima C1,2O de *M. fortuitum*, havendo o aumento da temperatura ótima (de 25°C para 45°C), proporcionando manutenção de alta

atividade enzimática em temperaturas elevadas, mas provocando redução da atividade em temperaturas abaixo de 35°C (Figura 13). O extrato celular imobilizado do isolado *M. fortuitum* apresentou a maior atividade da enzima C1,2O a 45°C, que é 20°C mais elevado do que a temperatura ótima quando o extrato não estava imobilizado. Este valor está de acordo com trabalhos de Kalogeris et al. (2006) e de Doumeche et al. (2002), que também observaram que a temperatura ótima para as enzimas imobilizadas ocorre em valores mais elevados, se comparado ao extrato livre. Nestes trabalhos, a imobilização também proporcionou atividade enzimática em elevadas temperaturas, apresentando cerca de 50% da atividade em 70 °C.



**FIGURA 13.** Efeito da temperatura na atividade da catecol 1,2-dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Mycobacterium fortuitum* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Na Figura 13 observa-se que a reação catalítica da enzima no extrato livre aumenta progressivamente com o aumento da temperatura, até 25°C e a partir deste a atividade começa a diminuir devido à desnaturação. A atividade da enzima no extrato livre reduz-se bruscamente acima da temperatura ótima, sendo que a 45°C praticamente não há mais atividade. Já no extrato imobilizado, observa-se que após a temperatura de 50°C, onde a

enzima apresenta 100% de atividade, a redução da atividade é gradual, fazendo com que na maior temperatura avaliada (70°C) a enzima ainda permaneça com mais de 40% da sua atividade relativa. Segundo Krajewska (2004), a condição de imobilização proporciona minimização ou prevenção de mudanças conformacional na estrutura terciária da proteína, fazendo com que, mesmo em altas temperaturas a enzima apresente atividade. Da mesma forma pode se verificar menor atividade da enzima imobilizada em temperaturas abaixo dos 35°C em comparação com a enzima presente no extrato livre. Este comportamento provavelmente se deve a barreira sólida que a envolve, dificultando assim a passagem de calor.

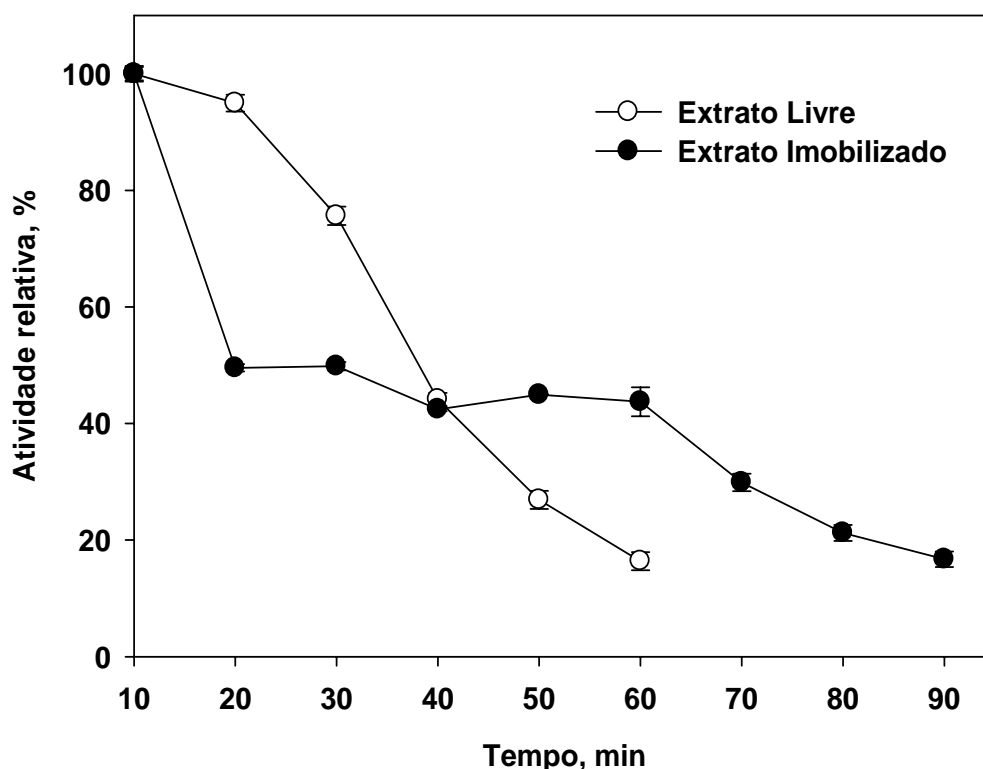
Observa-se neste teste que a imobilização proporcionou que a enzima mantivesse atividade relativamente alta numa faixa maior de temperatura (30 a 70°C) que a enzima não imobilizada (20 a 40°C). Além disto, esta manutenção de atividade em maiores temperaturas irá tornar esta enzima mais adequada para aplicações em processos realizados em temperaturas elevadas, onde a solubilidade da maioria dos substratos (em especial dos hidrocarbonetos) é maior, acelerando os processos de absorção celular e degradação (Dodor et al., 2004).

#### **4.3.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática no extrato celular imobilizado**

Na figura 14 são apresentados os tempos em que a enzima permanece ativa em condições ótimas de pH e temperatura. Os extratos celulares livres e imobilizados do isolado de *M. fortuitum* foram incubados por 90 minutos a 25 e 50°C, respectivamente. O extrato livre apresentou atividade durante 60 minutos, porém demonstrou uma redução de mais de 50% somente após 20 minutos de reação. O extrato imobilizado manteve-se ativo por 90 minutos, sendo que após 40 minutos de incubação apresentava aproximadamente 45% da atividade, que foi gradualmente sendo perdida.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalizador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo de biodegradação, em comparação a sua forma livre. Segundo Degadillo e Rodriguez-Nogales (2005), as maiores atividades enzimáticas no

início do teste são resultantes de prazos curtos de incubação, que geram números baixos de ligações cruzadas, insuficientes para atingir a estrutura das enzimas, que estão protegidas em suporte sólido como o alginato de sódio, fazendo com que ocorra maior estabilidade. Assim, mesmo com menores atividades em relação ao extrato livre, enzimas imobilizadas apresentam maior estabilidade. Essa estabilidade será mantida e favorecida em pH e temperatura ideais para que ocorra a reação, uma vez que a estabilidade está diretamente ligada a esses fatores (Krajewska, 2004).

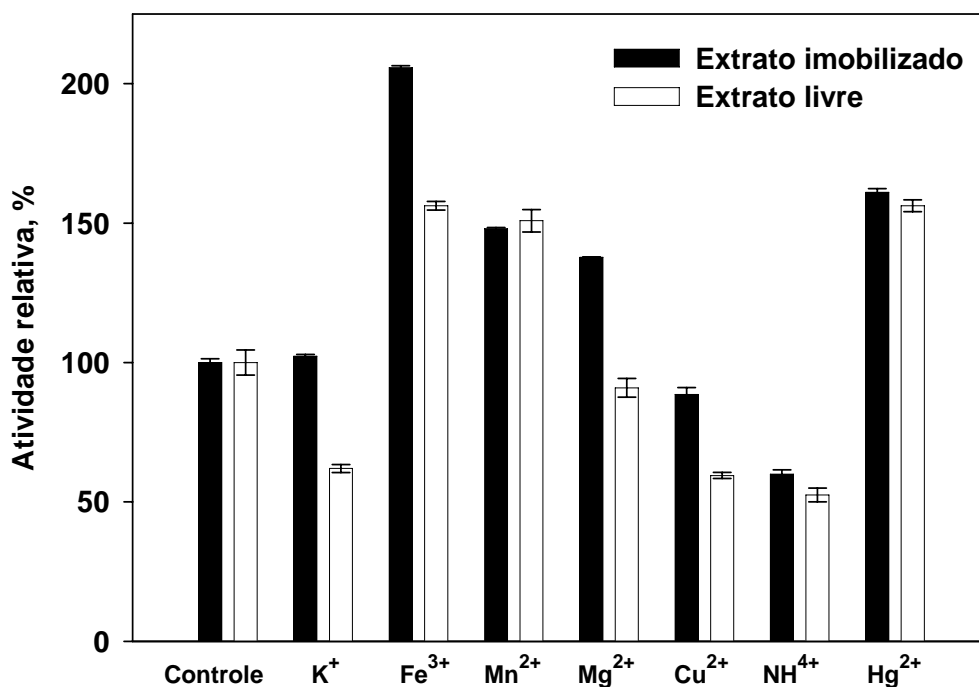


**FIGURA 14.** Duração da atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado do isolado de *Mycobacterium fortuitum* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.3.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática no extrato imobilizado

Para a enzima C1,2O presente no extrato livre de *M. fortuitum* a atividade foi inibida pela presença dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $NH_4^+$ , sendo que as maiores inibições ocorreram pelo amônio (47%) seguidas por cobre e potássio (aproximadamente 40%) (Figura 15). O manganês apresentou a menor inibição (10%). No extrato imobilizado deste isolado, a enzima C1,2O foi

inibida somente pelo cobre (21%) e pelo amônio (40%). O potássio deixou de interferir na reação apresentando as mesmas atividades do controle. A presença de  $Mg^{2+}$ , que no extrato livre inibia a atividade enzimática, agora aumentou a atividade em 37%.  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Hg^{2+}$  estimularam a atividade para ambos os tratamentos, extrato livre e imobilizado.



**FIGURA 15.** Efeito dos íons na atividade enzimática relativa da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Mycobacterium fortuitum* (o controle refere-se à atividade da enzima na ausência do íon; dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Segundo Krajewska (2004) a imobilização das enzimas reduz os benefícios do estímulo causado pela aplicação de íons, pois a difusão dos íons através da barreira sólida constituída pelo substrato é menor. Da mesma forma ocorre com os íons inibidores, que também tem menor capacidade de interferência na enzima imobilizada. Outro fato é que os cátions presente no tampão como neste trabalho  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $NH_4^+$  podem desestruturar a conformação do suporte (alginato de sódio) fazendo com que ocorra o mesmo comportamento no extrato livre. Como resultado disto, enzimas imobilizadas podem apresentar menores atividades, porém maiores estabilidades, sendo menos afetadas pelos inibidores durante os processos de catalise em comparação a sua forma livre.

#### **4.4 Caracterização de enzimas de degradação de HAPs produzidas por *Gordonia polyisoprenivorans***

A bactéria *Gordonia polyisoprenivorans* foi inicialmente isolada degradando polímeros de borracha de pneus (Linos et al., 1999). Trata-se de um actinomiceto que forma hifas, que ao se romperem resultam em células com forma de bastonetes ou cocos. Vários estudos têm relatado a utilização desta espécie na degradação hidrocarbonetos alifáticos (Linos et al., 2000), petróleo (Chaillan et al., 2004) e HAPs (Mutnuri et al., 2005).

No estudo da atividade enzimática deste isolado foram identificados duas rotas de degradação do antraceno, via orto e via meta, uma vez que, quantificou-se a atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase. De acordo com os resultados que serão apresentados, observa-se predominância na atividade enzimática, da catecol 2,3 dioxigenase neste isolado de *Gordonia polyisoprenivorans*. Este fato pode estar relacionado à economia energética da bactéria que diminui a produção da enzima que faz parte de uma rota mais complexa de degradação, neste caso a catecol 1,2 dioxigenase (Burlage et al., 1989).

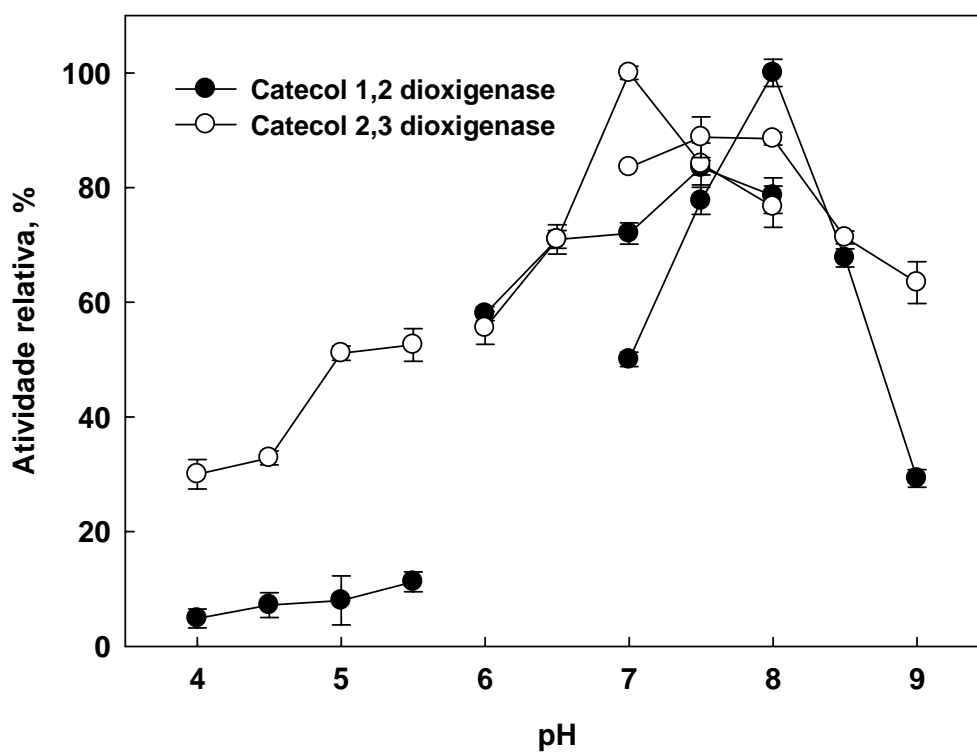
##### **4.4.1 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática**

O pH que propiciou maior atividade para a enzima C1,2O foi 8,0 em tampão Tris-HCl (Figura 16). Em tampão fosfato a atividade enzimática foi maior em pH 7,5, chegando próximo ao pH de maior atividade (8,0). A atividade foi baixa em pH menores que 5,5 (tampão acetato), demonstrando sensibilidade ao H<sup>+</sup> presente na reação.

A atividade da enzima C2,3O foi ótima em pH 7,0 no tampão fosfato. Em tampão Tris-HCl a atividade enzimática foi maior em pH 7,5. Em tampão acetato a atividade de C2,3O presente em *Gordonia* foi superior a 30%, demonstrando a capacidade desta enzima em adaptar-se a uma condição adversa e promover a degradação do substrato.

A atividade da enzima C2,3O foi ótima em pH 7,0, no tampão fosfato. Em tampão Tris-HCl a atividade enzimática foi maior em pH 7,5. Em tampão acetato a atividade de C2,3O presente em *Gordonia* foi superior a 30%

e muito maior que aquela apresentada pela C1,2O demonstrando a capacidade daquela enzima em adaptar-se a uma condição adversa e promover a degradação do substrato.



**FIGURA 16.** Efeito do pH na atividade da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de *Gordonia polyisoprenivorans*. Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (7,0 a 9,0) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Como observado na figura 16, a atividade da enzima C2,3O foi superior a atividade da enzima C1,2O em todos os tampões. A concentração de  $H^+$  afeta a atividade enzimática de várias formas. Uma das formas a ser considerada é que o processo catalítico requer que a enzima tenha grupos catalíticos específicos em um estado ionizado ou não-ionizado para poder interagir com o substrato, sem alterar a sua conformação ativa e a estabilidade das enzimas e, por conseqüência, não reduzindo drasticamente sua atividade (Whiteley et al., 2006).

#### 4.4.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática

A atividade enzimática depende da temperatura. Em baixas temperaturas os movimentos das moléculas são lentos, não ocorrendo à atividade necessária para converter o substrato em produto, enquanto que em temperaturas altas, o movimento térmico das moléculas é muito alto para a enzima assegurar sua conformação, provocando assim sua desnaturação e perda da sua atividade (Whiteley et al., 2006). O efeito da temperatura na atividade das enzimas C1,2O e C2,3O no extrato celular da bactéria *Gordonia* estão apresentados na Figura 17.

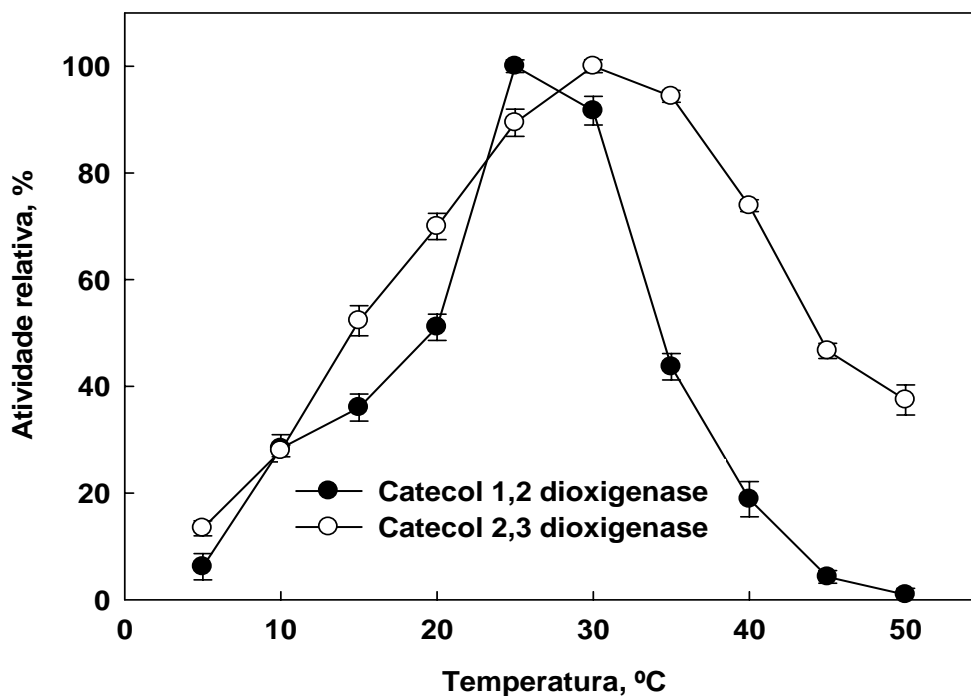
A enzima C1,2O apresentou atividade bastante reduzida quando se encontrava a 5°C. Essa atividade foi aumentando até atingir uma temperatura ideal que foi a 25°C. Em 35°C a atividade já era de 40%, apresentando atividade relativa próximo à zero em temperatura acima de 45°C. Isto demonstra que esta enzima tem uma temperatura ótima bem definida e que com pequenas variações acima ou abaixo deste valor já ocorrem perdas significativas da atividade. Resultados muito semelhantes a estes foram verificados por Kalogeris et al. (2006) avaliando atividade enzimática de catecol 1,2 dioxigenase em *Pseudomonas putida*.

Como já relatado anteriormente, a maioria das enzimas tem uma temperatura ótima que pode ser relacionada à temperatura do ambiente em que os microrganismos foram isolados. Fernandez-Lafuente et al. (2000) determinaram como condição ótima para atividade da catecol 2,3 dioxigenase a temperatura de 50°C para a enzima do *Bacillus stearothermophilus* que apresenta crescimento ótimo a 55°C. Esse resultado também foi encontrado neste trabalho, onde a temperatura ideal da enzima C2,3O foi igual a temperatura ideal de crescimento da bactéria *Gordonia*, que foi de 30°C (Figura 17).

Quando comparadas as enzimas C1,2O e C2,3O, observa-se que a enzima C2,3O, apresentou maior atividade relativa em todos os pontos de temperatura avaliados, sendo diferente somente no ponto ideal de atividade da enzima C1,2O. A 45°C obteve-se 45% de atividade chegando a 37% em 50°C.



Demonstrando a capacidade da enzima C2,3O em oxidar o anel aromático em altas temperaturas.



**FIGURA 17.** Efeito da temperatura na atividade da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular de *Gordonia polyisoprenivorans* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

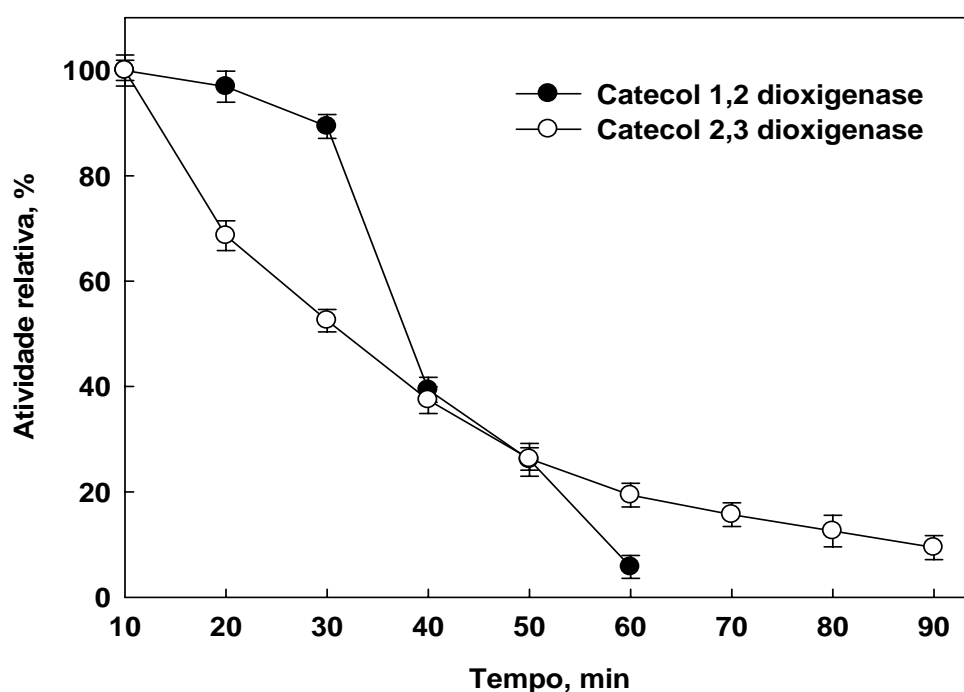
#### 4.4.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática

Para avaliar a estabilidade das enzimas na reação enzimática e determinar o tempo necessário para o substrato ser convertido em produto, verificou-se a atividade enzimática da C1,2O e C2,3O foi verificada durante 90 minutos, sendo realizada leituras de 10 em 10 minutos a 30°C (Figura 18). Para os cálculos foi determinado como 100% a atividade do tempo inicial.

A enzima C1,2O apresentou atividade durante 60 minutos. Durante os primeiros 30 minutos manteve elevada estabilidade, tendo perdido somente 10% da atividade relativa. Após 40 minutos a atividade relativa já era menor que 40%, ocorrendo a partir daí forte decréscimo até os 60 minutos. A enzima C2,3O demonstrou a maior estabilidade, apresentando atividade durante os 90 minutos em que foi realizado o teste (Figura 18). Porém aos 30 minutos de reação enzimática já havia ocorrido à perda de 48% da atividade enzimática e

após 60 minutos foi verificada atividade relativa muito baixa, que se manteve até os 90 minutos.

O tempo de duração da atividade das enzimas é um aspecto importante e de grande aplicação prática, uma vez que através dessa avaliação é possível determinar o tempo necessário para o substrato ser convertido em produto (Whiteley et al., 2006). Como já descrito para as enzimas C1,2O e C2,3O presentes no extrato celular de *M. fortuitum*, vários autores encontraram padrões semelhantes aos vistos neste trabalho. Há que se considerar também que para a avaliação da estabilidade das enzimas é necessário oferecer condições ideais de pH e temperatura uma vez que a estabilidade está diretamente ligada a esses fatores (Krajewska, 2004).



**FIGURA 18.** Duração da atividade das enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presentes no extrato celular do isolado *Gordonia polyisoprenivorans* (dados são médias de duas repetições e barras representam erro padrão).

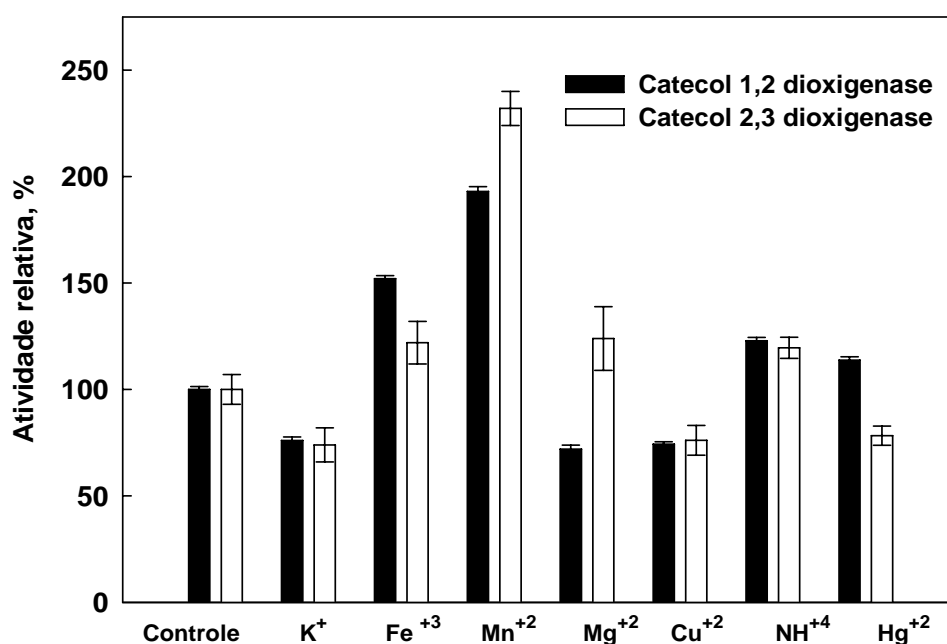
#### 4.4.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Os efeitos causados na atividade das enzimas C1,2O e C2,3O pela adição de cátions na mistura de reação são apresentados na Figura 19. Neste teste foi utilizado um controle sem a adição do referido íon no tampão e  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , adicionados isoladamente à mistura de

reação na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês, acetato de potássio, cloreto de ferro e cloreto de mercúrio na concentração de 1 mM e sulfato de amônio na concentração de 10 mM, respectivamente. O controle (100%) refere-se à atividade da enzima na ausência do íon.

A atividade das enzimas C<sub>1,2</sub>O e C<sub>2,3</sub>O foi inibida em aproximadamente 25% na presença dos cátions K<sup>+</sup> e Cu<sup>2+</sup> na reação (Figura 19). O mercúrio inibiu a atividade da enzima C<sub>2,3</sub>O em 22%, sendo que para a enzima C<sub>1,2</sub>O este cátion estimulou a atividade em 13%. A presença de magnésio inibiu a atividade da enzima C<sub>1,2</sub>O em 28%, porém estimulou a atividade da C<sub>2,3</sub>O em 23%.

A adição dos cátions Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e NH<sup>4+</sup> estimulou a atividade das duas enzimas (Figura 19). O ferro aumentou a atividade em 22 e 52% para C<sub>2,3</sub>O e C<sub>1,2</sub>O respectivamente. O manganês foi o cátion que mais estimulou a atividade das enzimas, sendo que para a C<sub>2,3</sub>O o aumento na atividade foi de 132%



**FIGURA 19.** Efeito dos íons na atividade enzimática da catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular do isolado *Gordonia polyisoprenivorans* (o controle refere-se à atividade da enzima na ausência do íon; dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

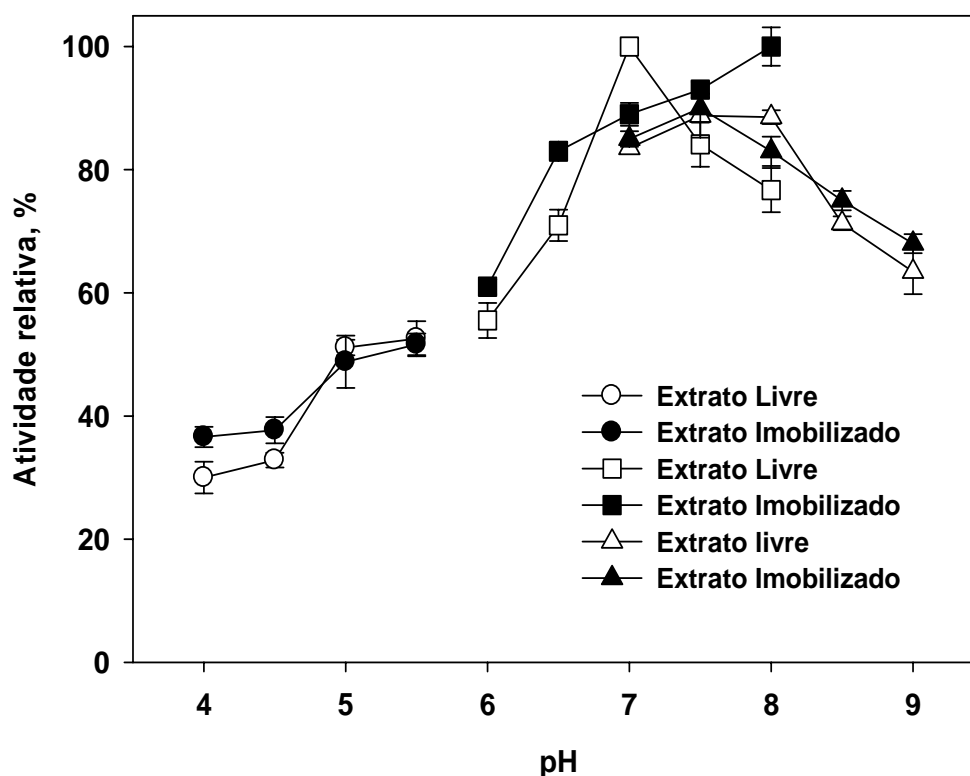
O manganês assim como o ferro estimularam a atividade das enzimas C1,2O e C2,3O, porém na presença de manganês a atividade foi maior. Estudos mostram que esse cátion divalente está presente na estrutura das enzimas dioxigenases assim como o ferro, porém em menores proporções, em especial para enzimas que fazem clivagem intradiol, ou seja catecol 1,2 dioxigenase e protocatecol 3,4 dioxigenase (Whiting et al., 1995). Esse fato pode ser explicado a partir das propriedades químicas do manganês em comparação ao ferro II ou ferro III, propriedades essas que faz deste íon elemento central que irá indicar o local determinado da adição de O<sub>2</sub>, fazendo a abertura do anel aromático (Gibello et al., 1994).

#### **4.5 Caracterização da enzima catecol 2,3 dioxigenase no extrato imobilizado de *Gordonia polyisoprenivorans***

##### **4.5.1 Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado**

A atividade da enzima C2,3O do isolado de *Gordonia polyisoprenivorans* no extrato livre apresentou maior atividade em pH 7,0 no tampão fosfato. Diferentemente do extrato imobilizado que apresentou maior atividade desta enzima em pH 8,0 também no tampão fosfato, (Figura 20). Conforme Gianfreda et al. (2002) quando a enzima é imobilizada em um suporte sólido, como o alginato de sódio, o pH ótimo tende a aumentar duas unidades, isso se deve ao fato de que na superfície da enzima imobilizada a concentração de íons H<sup>+</sup> é maior do que a concentração de íons H<sup>+</sup> na solução, onde o pH é quantificado.

Fernandez-Lafuente et al. (2000) realizaram avaliações preliminares da C2,3O parcialmente purificada, onde houve uma perda de atividade de 40% do tempo inicial até 60 minutos de incubação, quando em pH 10. Após a imobilização, esta perda foi inferior a 20%. Segundo estes mesmos autores, as enzimas imobilizadas mantêm sua atividade em uma faixa mais ampla de pH quando comparado com enzimas livres (Fernandez-Lafuente et al., 1995), conforme observado na Figura 20, no tampão fosfato, quando a C2,3O apresentou alta atividade na faixa de pH de 6,5 a 8,0.



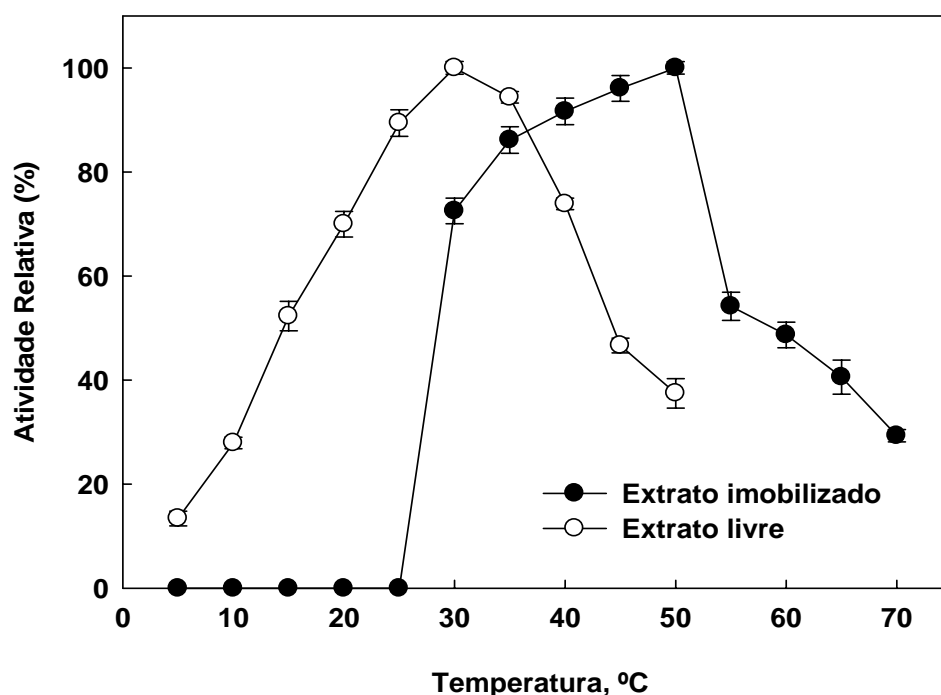
**FIGURA 20.** Efeito do pH na atividade da catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Gordonia polyisoprenivorans*. Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.5.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado

A enzima C2,3O no extrato imobilizado da bactéria *Gordonia polyisoprenivorans* apresentou maior atividade a 50°C, que é 20°C mais elevado do que a temperatura ótima quando o extrato não estava imobilizado (Figura 21). Conforme já descrito acima, outros autores observaram essas mesmas condições para enzimas imobilizadas. Fernandes-Lafuente et al. (2000) verificaram como temperatura ideal para C2,3O 70°C, porém no presente trabalho a enzima perdeu aproximadamente 70% de atividade quando se encontrava nesta temperatura.

Novamente observa-se com este teste que a temperatura ideal de uma enzima está relacionada como o ambiente ao qual o microrganismo foi isolado ou cultivado em laboratório. Porém com a imobilização foi possível verificar aumento de atividade com o aumento da temperatura, uma vez que

ocorre uma minimização ou prevenção de mudanças conformacional na estrutura terciária da proteína, devido à proteção assegurada pelo suporte que atua como uma cobertura protetora contra mudanças de temperatura (Krajewska, 2004). Este efeito protetor é importante quando se necessita acelerar os processos de degradação, em substratos (em especial dos hidrocarbonetos), que aumenta sua solubilidade com o aumento da temperatura (Dodor et al., 2004).



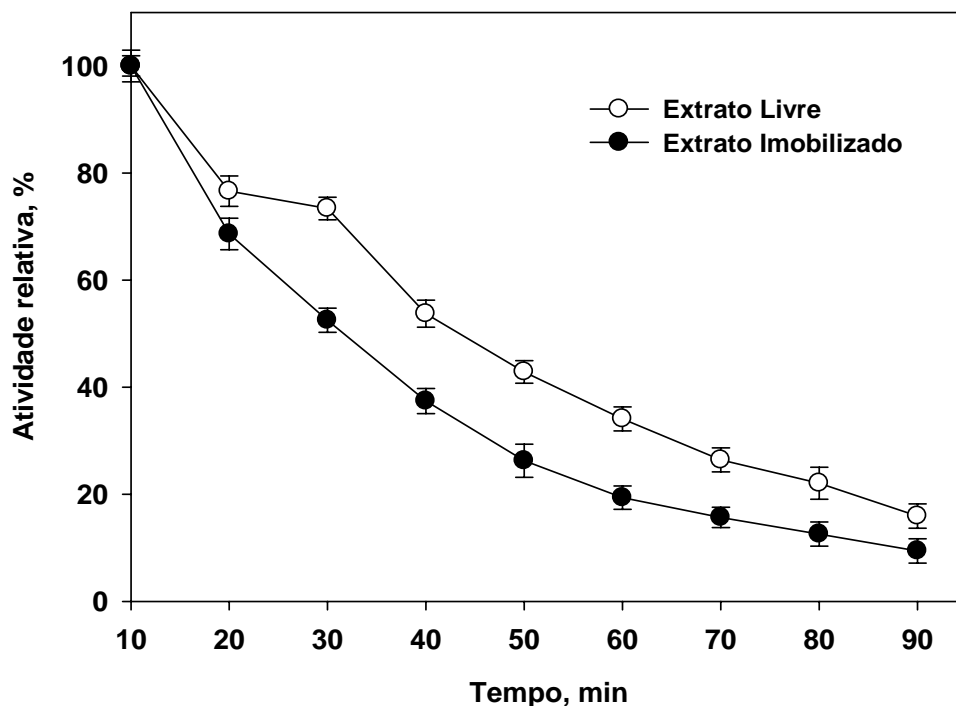
**FIGURA 21.** Efeito da temperatura na atividade da catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular livre (símbolos brancos) e imobilizado (símbolos pretos) de *Gordonía polyisoprenivorans* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.5.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática no extrato celular imobilizado

O extrato livre e imobilizado do isolado *Gordonía polyisoprenivorans* exibiram atividades da enzima C2,3O muito semelhantes, permanecendo com atividade enzimática por 90 minutos (Figura 22).

Como pode ser observado na Figura 22 a atividade no extrato livre foi superior ao do extrato imobilizado. Esta característica segundo Krajewska (2004) é devido a aplicação do suporte que modifica o microambiente no qual a

enzima trabalha. Porém como já mencionado, as enzimas imobilizadas comparadas com as enzimas livres podem ter a atividade enzimática reduzida e a constante de Michaelis aumentada, permitindo maior eficiência catalítica das enzimas, bem como da suas propriedades cinéticas e de estabilidade (Degaldillo e Rodriguez-Nogales, 2005).

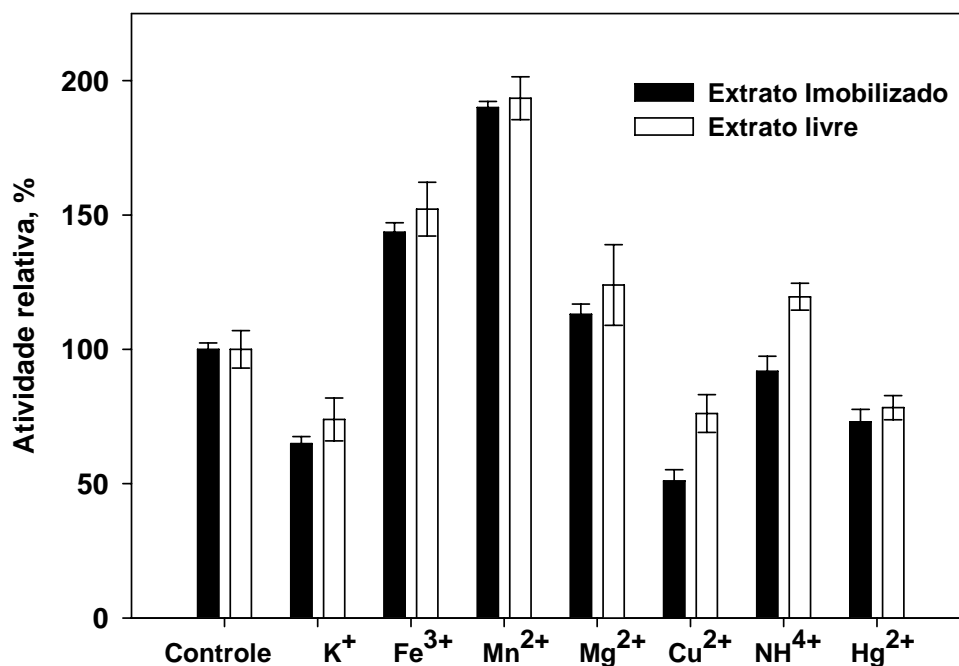


**FIGURA 22.** Duração da atividade da enzima catecol 2,3 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado *Gordonia polyisoprenivorans* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.5.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática no extrato celular imobilizado

A atividade da enzima C2,3O de *Gordonia polyisoprenivorans* na presença dos cátions  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  não sofreu grandes alterações no extrato imobilizado, em comparação ao extrato livre (Figura 23). Para estes os cátions houve pequena redução na atividade quando o extrato se encontrava imobilizado. A maior diferença observada refere-se ao  $Cu^{2+}$ , que, em relação ao controle, reduziu em 51 % a atividade da enzima imobilizada e em 76% a atividade da enzima livre.

Assim, a aplicação de nutrientes não aumentou a atividade do extrato imobilizado, provavelmente devido a menor difusão através da barreira sólida (alginato), o mesmo correu com os inibidores, comprovando a teoria de que enzimas imobilizadas podem apresentar menor atividade, devido a menor disponibilidade de nutrientes, porém maior estabilidade por serem menos afetadas pelos inibidores, em comparação a sua forma livre (Krajewska, 2004).



**FIGURA 23.** Efeito dos íons na atividade enzimática relativa (%) da catecol 1,2 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Gordonia polyisoprenivorans* (o controle refere-se à atividade da enzima na ausência do íon, dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.6 Caracterização de enzimas de degradação de HAPs produzidas por *Naphtalene-utilizing bacterium*

Quando realizado a identificação desta bactéria por Jacques et al. (2007), obteve-se 98% de similaridade com uma bactéria que foi isolada de um local utilizado na estocagem de carvão mineral e que cresceu em meio mineral utilizando naftaleno como única fonte de carbono e energia. A bactéria estudada apresentou crescimento nos HAPs: pireno, antreceno, fenatreno, naftaleno, além de crescer em compostos monocromáticos como o tolueno. O metabolismo microbiano no processo de degradação dos HAPs, opera em dois

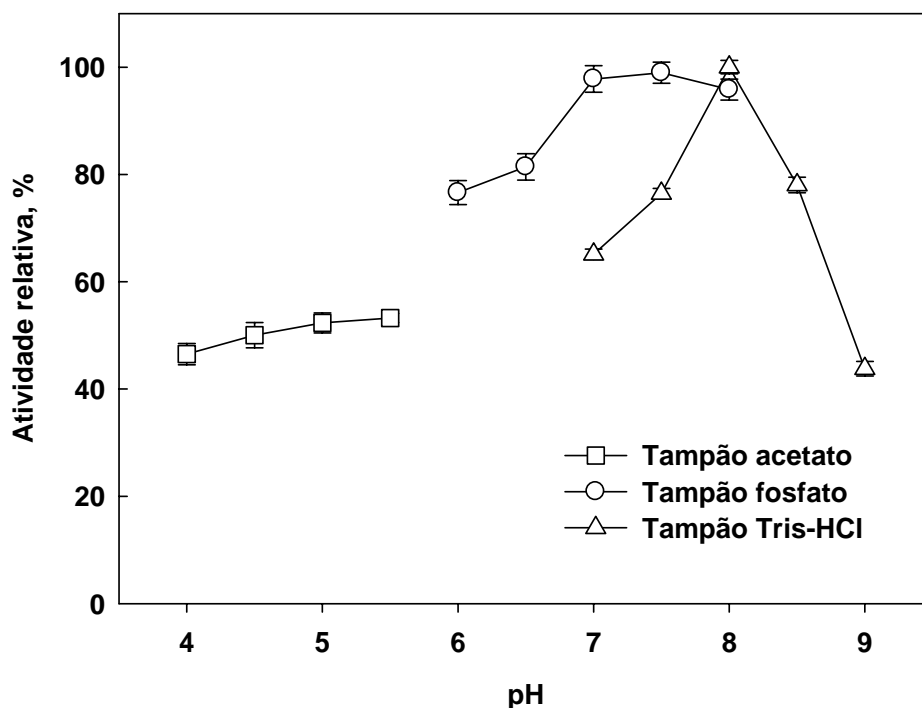


estágios. No primeiro ocorre oxidação inicial do anel aromático, para formar *cis*-dihidrodióis, no segundo estágio ocorre rearomatização para formar um derivado hidroxilado. Embora os passos iniciais de conversão sejam semelhantes para muitos compostos aromáticos, o número de intermediários formados após a rearomatização é limitado. Nesta rearomatização, pode haver a formação de compostos intermediários como a catecol, protocatecol e gentisato (Caldwell, 2000). No entanto para este isolado foi caracterizada somente a enzima protocatecol 3,4 dioxigenase, capaz de oxidar o fenantreno a um composto intermediário denominado protocatecol. Este foi o substrato essencial para a enzima aqui estudada.

#### **4.6.1 Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática**

A atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase presente em *Naphtalene-utilizing bacterium* foi maior em pH 8,0 no tampão Tris-HCl (Figura 24), sendo que neste tampão esse foi o único pH que apresentou uma boa atividade enzimática. Em tampão fosfato obteve-se atividade alta em uma maior faixa de pH, sendo superior a 80% para os pH 6,5 a 8,0. A atividade em pH (4,0 a 5,5) em tampão acetato apresentou atividade relativa superior a 40%, demonstrando ser uma enzima com potencial de degradação em ambientes adversos.

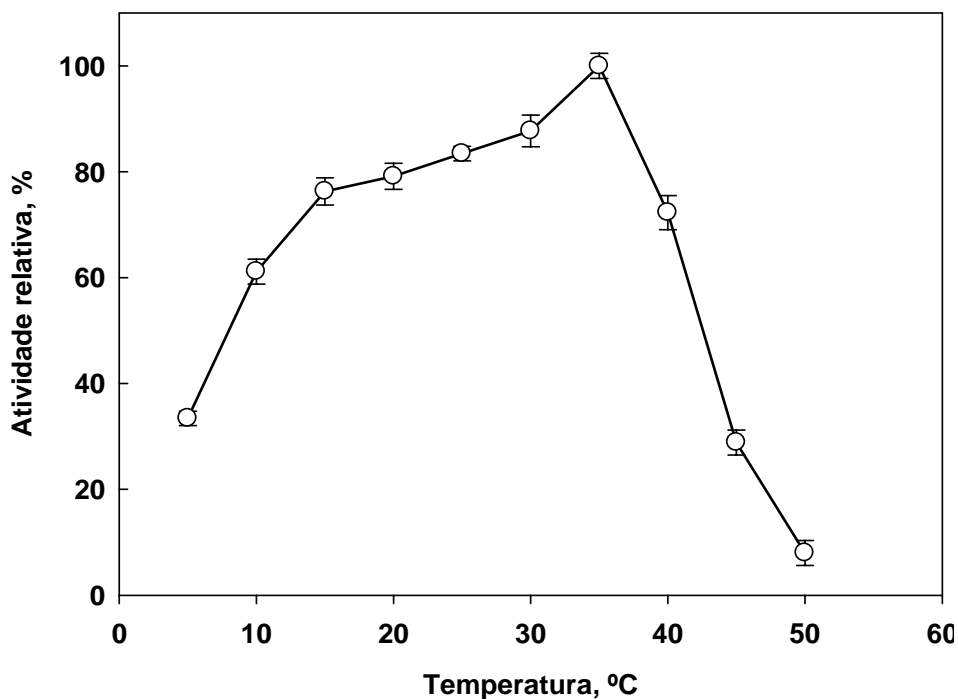
Ao contrário das outras enzimas, para a protocatecol 3,4 dioxigenase, o pH ótimo foi próximo a 7,0 para o tampão fosfato e próximo a 8,0 para o tampão tris- HCl, ou seja, a máxima atividade foi influenciada não só pela mudança de pH, mas também pela mudança de tampão. Bull & Ballou (1981) e Buchan et al. (2000) encontraram ótima atividade para esta enzima em pH 8,0 em tampão fosfato e entre 8,0 e 9,0 no tampão tris-HCl. Para esta enzima não temos como determinar o pH para uma atividade ótima sem mencionar o tampão, uma vez que este influencia a atividade, provavelmente, através do tipo e da quantidade de íons dissolvidos na solução.



**FIGURA 24.** Efeito do pH na atividade da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular de *Naphtalene-utilizing bacterium*. Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e Tris-HCl (7,0 a 9,0) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.6.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática

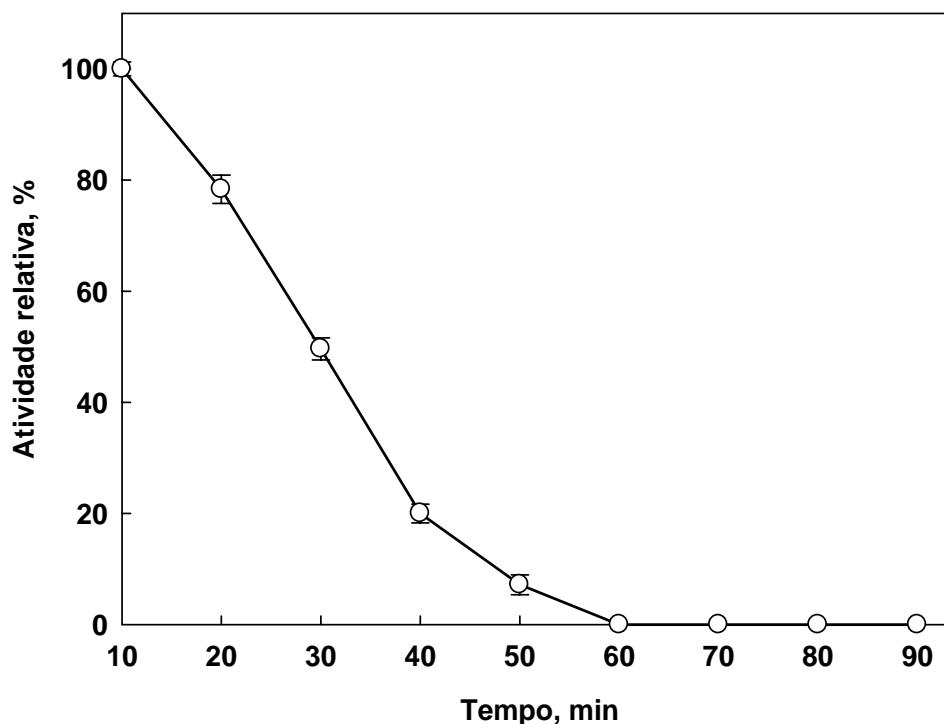
A atividade relativa máxima da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase ocorreu a 35 °C. Porém o que se destaca na Figura 25 é a elevada atividade relativa, próxima a 80%, com somente 15°C de temperatura e que seguiu aumentando até os 35°C. Isto indica que esta enzima apresenta grande potencial biotecnológico para ser utilizada no tratamento de efluentes contaminados com HAPs, uma vez que apresenta elevada atividade em temperaturas entre 15 e 40°C. O aumento da temperatura para valores superiores a 35°C proporcionou brusca queda da atividade, sendo que a 50°C observou-se atividade muito pequena, possivelmente pela desnaturação da enzima.



**FIGURA 25.** Efeito da temperatura na atividade de protocatecol 3,4 dioxigenase no isolado *Naphtalene-utilizing bacterium*, avaliado entre 5° a 50°C durante 30 min (dados são médias de duas repetições e as barras representam erro padrão).

#### 4.6.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática

A estabilidade da enzima P3,4O foi determinada durante 90 minutos, realizando leituras de 10 em 10 minutos a 30°C (Figura 26). Para o cálculo foi convencionado como 100% a atividade do tempo inicial. Entre as enzimas avaliadas neste trabalho, a P3,4O demonstrou ser a enzima com menor estabilidade. Em 30 minutos de reação já havia ocorrido 50% de perda na atividade relativa, sendo que a enzima apresentou atividade somente até 60 minutos de reação.



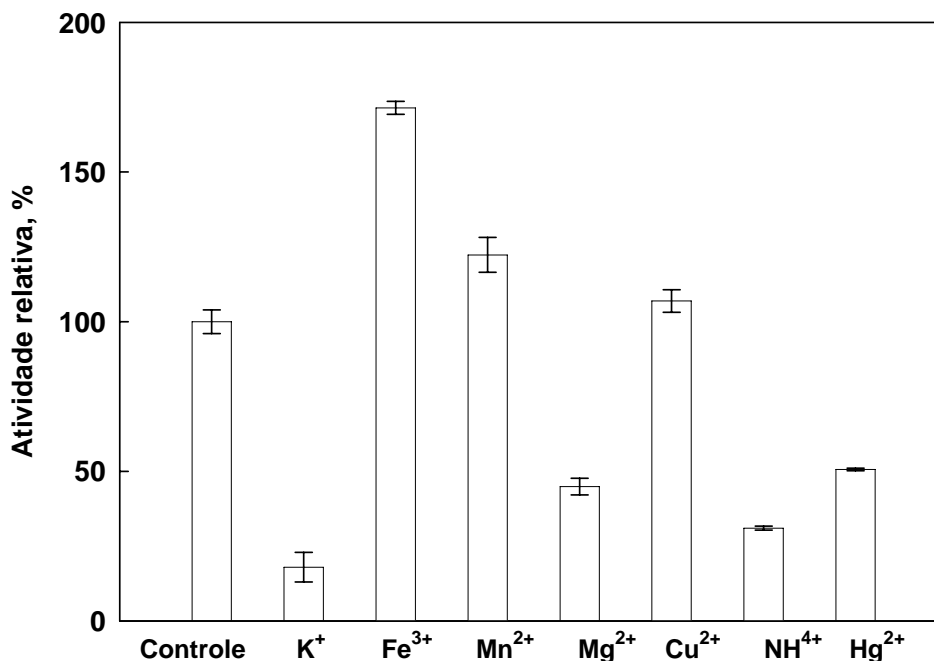
**FIGURA 26.** Duração da atividade das enzimas protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular do isolado *Naphtalene-utilizing bacterium*. (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.6.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Os efeitos causados na atividade da enzima P3,4O pela adição de cátions na mistura de reação são apresentados na Figura 27. Neste teste foi utilizado um controle sem a adição do referido íon no tampão e  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , adicionados isoladamente à mistura de reação, na forma de sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês, acetato de potássio, cloreto de ferro e cloreto de mercúrio na concentração de 1 mM e sulfato de amônio na concentração de 10 mM, respectivamente. O controle (100%) refere-se à atividade da enzima na ausência do íon.

A atividade da enzima P3,4O apresentou alta inibição na presença dos cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ , com perdas de 83, 69, 66 e 50% respectivamente na atividade relativa (Figura 27). Como para a enzima intradiol C1,2O presente no extrato celular *M. fortuitum*, a enzima P3,4O também apresentou inibição aos cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{NH}_4^+$ . Conforme já descrito anteriormente, outros autores obtiveram as mesmas condições (Wang et al.,

2006; Hatta et al., 2003). Isto provavelmente é devido à ligação destes cátions à enzima, funcionando como inibidores.



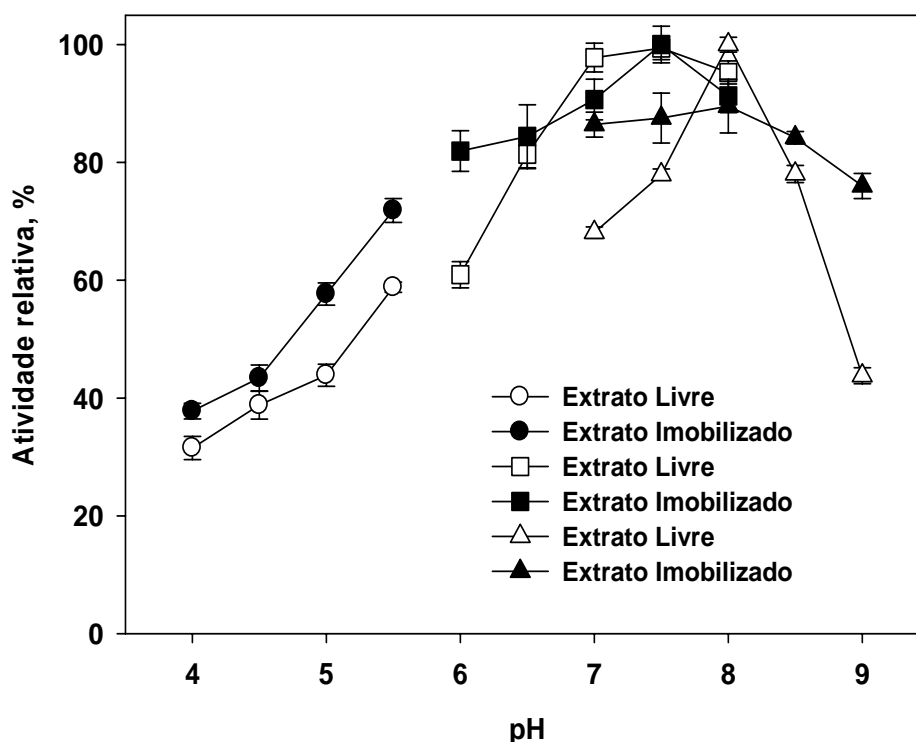
**FIGURA 27.** Efeito dos íons na atividade enzimática da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular do isolado *Naphtalene-utilizing bacterium* (o controle refere-se à atividade da enzima na ausência do íon; dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

A presença dos cátions divalentes Mn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> estimularam a atividade em 22 e 6% respectivamente, no entanto a presença de Fe<sup>3+</sup> na reação aumentou a atividade em 71%. Como já foi descrito anteriormente o ferro é responsável por desempenhar funções celulares, que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAPs, participando na estrutura das enzimas dioxigenases. Muitos estudos já foram realizados sobre a estrutura e o processo de clivagem do anel aromático para as enzimas intradiol como a P3,4O (Bertini et al., 1995). Através destes estudos foi possível observar que a presença de Fe<sup>3+</sup> aumentou a atividade destas enzimas de degradação, por orientar a posição de clivagem do anel aromático e por fazer parte da estrutura molecular destas enzimas, tanto como cofator, como grupo prostético (Harayama et al., 1999).

#### 4.7 Caracterização da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase no extrato imobilizado de *Naphtalene-utilizing bacterium*

##### 4.7.1 Determinação do pH ótimo para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado

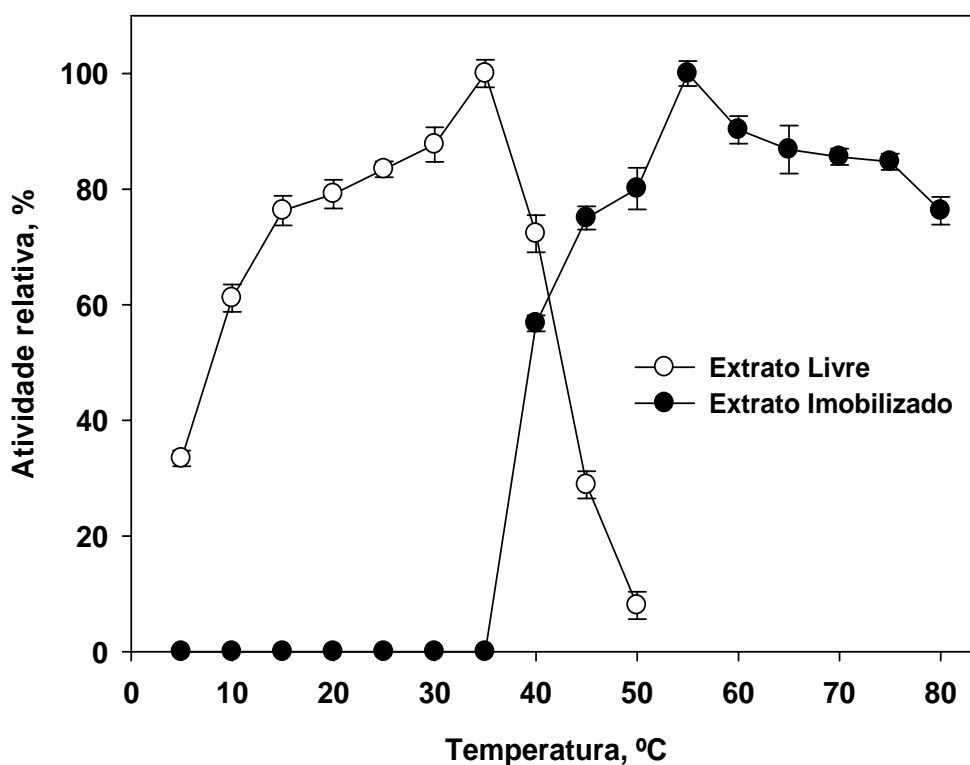
A atividade da enzima P3,4O de *Naphtalene-utilizing bacterium* foi maior em pH 7,5, no tampão fosfato, tanto no extrato celular livre quanto no imobilizado (Figura 28). A atividade em pH 4,0 a 6,5, foi superior no extrato imobilizado. No intervalo de 6,5 a 8,0 não houve grandes diferenças entre as atividades enzimáticas do extrato imobilizado ou livre. Porém no intervalo de pH de 8,0 a 9,0, novamente o extrato imobilizado apresentou maior atividade. Neste caso, a imobilização mostrou-se de fundamental importância para melhorar a eficiência da enzima em condições ambientais distintas do ótimo, como acontece na prática do tratamento de efluentes em escala comercial.



**FIGURA 28.** Efeito do pH na atividade da protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Naphtalene-utilizing bacterium*. Tampões utilizados: acetato (pH 4,0 a 5,5), fosfato (pH 6,0 a 8,0) e tris-HCl (7,0 a 9,0) (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

#### 4.7.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática no extrato celular imobilizado

O extrato celular imobilizado do isolado *Naphtalene-utilizing bacterium* apresentou a maior atividade da enzima P3,4O a 55°C, que foi 20°C mais elevado do que a temperatura ótima da enzima presente no extrato não imobilizado (Figura 29). No extrato imobilizado não ocorreram grandes perdas na atividade até a temperatura de 80°C, que apresentou ainda 75% de atividade máxima, enquanto que no extrato livre a atividade reduziu-se drasticamente acima da temperatura ótima e não apresentou atividade em temperaturas maiores que 50°C.



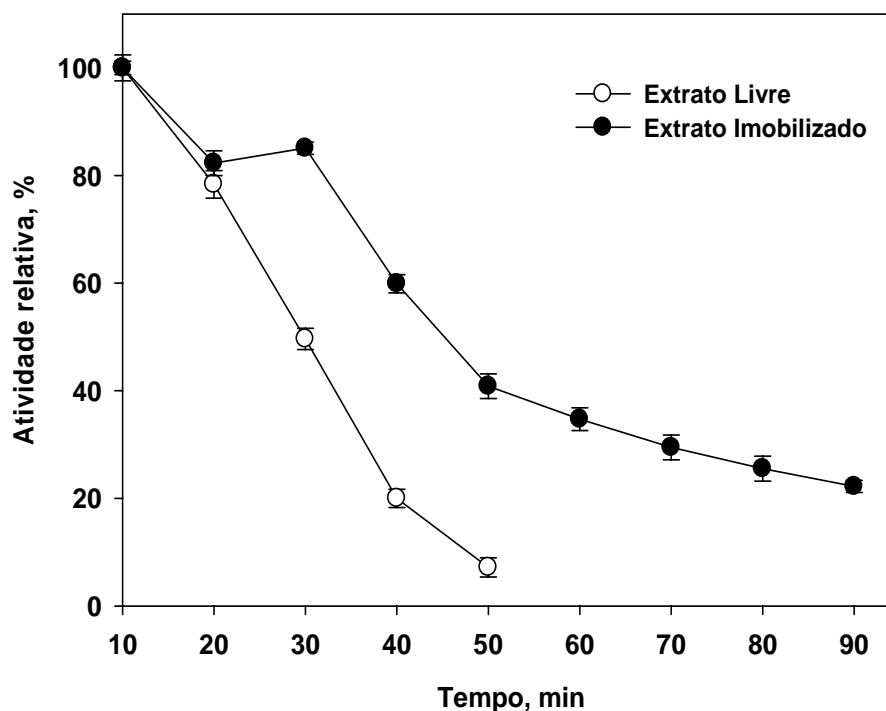
**FIGURA 29.** Efeito da temperatura na atividade da protocatecol 3,4-dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado de *Naphtalene-utilizing bacterium* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

Como para os outros isolados o extrato imobilizado manteve a atividade enzimática em 50% ou mais na ampla e elevada faixa de temperatura de 40 a 80°C, o que reforça a possibilidade de aplicação desta enzima em processos realizados em temperaturas elevadas. Porém, há que se destacar que em temperaturas abaixo de 35°C o extrato imobilizado não apresentou

atividade, sendo a enzima imobilizada não indicada para o tratamento de efluentes líquidos com temperatura menor que a acima citada.

#### 4.7.3 Determinação do tempo de reação na atividade enzimática no extrato celular imobilizado

A enzima P3,4O do isolado de *Naphtalene-utilizing bacterium* demonstrou a menor estabilidade no extrato livre (Figura 30). Com 30 minutos de reação já havia ocorrido 50% de redução da atividade, sendo que a enzima apresentou atividade somente por 50 minutos. No extrato imobilizado a P3,4O apresentou atividade de aproximadamente 90% até 30 minutos de reação, a qual foi caindo gradualmente até atingir 30% com 90 minutos de reação.



**FIGURA 30.** Duração da atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase presente no extrato celular livre e imobilizado do isolado *Naphtalene-utilizing bacterium* (dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

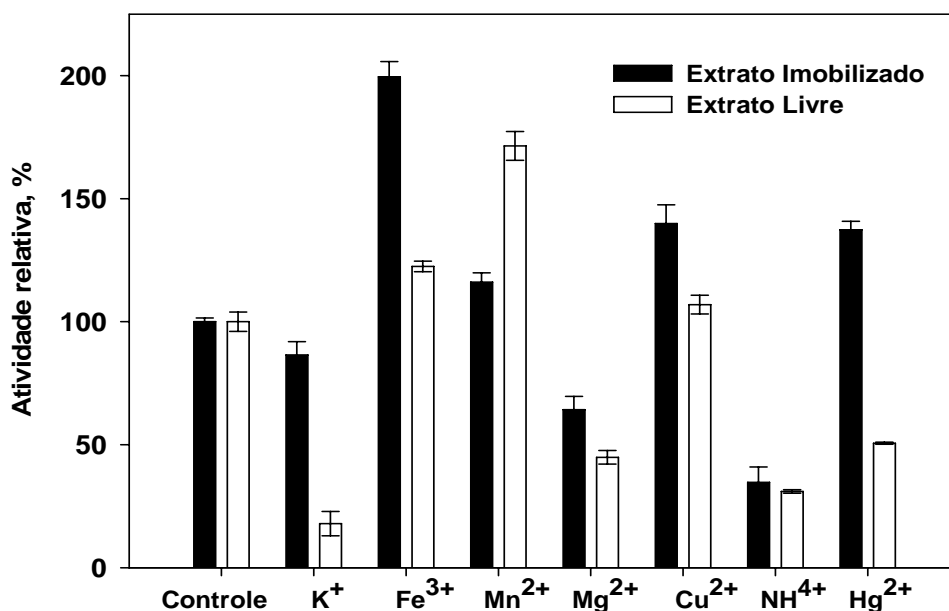
Embora a utilização das enzimas seja promissora existem vários problemas práticos no uso de formas livres, entre eles a instabilidade da sua estrutura uma vez retirada de seu ambiente natural e sua sensibilidade para processar em condições diferentes da ótima, o que provoca baixa estabilidade e ocasiona curto tempo de duração da atividade. Com a imobilização, o



sistema estabiliza a estrutura das enzimas tornando-as mais resistentes as alterações ambientais. As enzimas imobilizadas são de fácil recuperação e podem ser reusadas em processos enzimáticos de operação contínua, tendo uma grande variedade de usos em diferentes modelos de biorreatores (Krajewska, 2004).

#### 4.7.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática no extrato celular imobilizado

A enzima P3,4O presente no extrato livre apresentou alta inibição na presença dos cátions  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Hg^{2+}$ , sendo estas de aproximadamente 83, 69, 66 e 50% respectivamente (Figura 31). Porém com a imobilização a inibição foi menor, sendo de 14% para o  $K^+$  e 36% para o  $Mg^{2+}$ . Para o amônio, a perda de atividade foi aproximadamente a mesma no extrato livre e no imobilizado. O mercúrio, que no extrato livre inibiu a atividade da enzima, aumentou a atividade no extrato imobilizado em 37%. No extrato livre, a atividade na presença de  $Fe^{3+}$  teve um aumento de 16%, porém quando este foi imobilizado, a atividade aumentou 99%. Na presença de  $Mn^{2+}$  o extrato livre apresentou maior aumento de atividade em relação ao extrato imobilizado.



**FIGURA 31.** Efeito dos íons na atividade enzimática relativa (%) da protocatecol 3,4 dioxigenase presentes no extrato celular livre e imobilizado do isolado *Naphtalene-utilizing bacterium*, (o controle refere-se a atividade da enzima na ausência do íon, dados são médias de duas repetições e as barras representam o erro padrão).

A forte inibição causada pelo sulfato de amônio mesmo com o extrato imobilizado está relacionado com o fato de que, o sulfato de amônio pode desestruturar a conformação do alginato devido a presença dos íons dissolvidos, fazendo com que ocorra o mesmo comportamento no extrato livre. Provocando inibição na atividade, resultado da desnaturação das proteínas provocado pelo rompimento das pontes de hidrogênio e dissulfeto, que dão a conformação tridimensional das proteínas. Este efeito inibitório foi relatado em *Pseudomonas putida* por Ishbashi et al. (1990).

## 5. CONCLUSÕES

- 1) Foi possível estudar os parâmetros que influenciam a maior produção de enzimas a partir de bactérias isoladas de solos contaminados com HAPs, verificando as variáveis que influenciavam para um aumento da atividade enzimática e estabilidade.
- 2) Todos os isolados apresentaram maior atividade enzimática quando cresceram em meio mais rico, contendo outras fontes de carbono além dos HAPs onde a atividade foi maior quanto maior era a concentração do contaminante.
- 3) Os isolados *Mycobacterium fortuitum* e *Gordonia polyisoprenivoram* expressaram tanto a catecol 1,2 dioxigenase quanto a catecol 2,3 dioxigenase sendo que esta última apresentou maior atividade para a enzima extradiol.
- 4) No estudo dos parâmetros a serem utilizados, para promover uma maior atividade enzimática, observou-se diferença nas condições requeridas pelas diferentes enzimas estudadas, onde as variáveis temperatura e pH foram semelhantes para as mesmas enzimas, independente da bactéria que a expressou.
- 5) A enzima catecol 2,3 dioxigenase apresentou maior estabilidade em relação as outras enzimas estudadas.
- 6) Todos os isolados são estimulados por ferro e manganês, sendo que os outros íons avaliados apresentam diferentes níveis de inibição na atividade enzimática.

7) O extrato celular imobilizado contendo as enzimas catecol 1,2 dioxigenase, catecol 2,3 dioxigenase e protococatecol 3,4 dioxigenase houve aumento da estabilidade às variações de pH, temperatura, tempo de reação, em relação ao extrato celular livre.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ASSALIN, M.R., SILVA, P.L., DURÁN, N. Comparison of the efficiency of ozonation and catalytic ozonation (Mn II and Cu II) in phenol degradation. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.24-27, 2006.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamental and applications**. 4 ed. Menlo Park, CA: Academic Press, 1998. 694p.
- BAGGI, G. et al. Isolation of *Pseudomonas struzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.10, p.2129-2132, 1987.
- BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology, Sussex*, v.80, n.7, p. 723-736, 2005.
- BERTINI, I. et al. Biophysical investigation of bacterial aromatic extradiol dioxygenases involved in biodegradation processes. **Coordination Chemistry Reviews**, Sydney, v.144, p.321-345, 1995.
- BEWLWY, R.J.F. Field implementation of in situ bioremediation: Key physicochemical and biological factors. In: STOTZKY, G.; J.M. **Soil Biochemistry**, New York: Marcel Dekker, 1996, v.9, p.473-542.
- BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

- BRIGANTI, F. et al. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.416, n.1, p.61-64, 1997.
- BUCHAN, A. et al. Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3,4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p.4662-4672, 2000.
- BURLAGE, R. S. et al. The tol (pww0) catabolic plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.6, p.1323-1328, 1989.
- BULL, C.; BALLOU, D.P. Purification and properties of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.256, n.24, p.12673-12680, 1981.
- CAI, W. et al. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.148,n.1-2, p.38-42, 2007.
- CALDWELL, D.R. **Microbial physiology and metabolism**. 2nd ed. Belmont: Star, 2000. 403p.
- CENCI, G. et al. Dioxygenase activity relative behaviour of *Pseudomonas* strains from soil in the presence of different aromatic compounds. **World Journal Microbiology Biotechnology**, New York, v.15, n.1, p.47-52, 1999.
- CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.5-6, p.324–333, 1997.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, New York, v. 4, n.4, p. 331-338, 1993.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.30, n.1, p.31-71, 1984.
- CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/relacao\\_areas.as](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.as)>. Acesso em: 10 dez. 2007.
- CHAILLAN, F. et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.155, n.7, p.587-595, 2004.
- CHEN, K.C., LIN, Y.H., CHEN, W.H., LIN, Y.C. Degradation of phenol by PAA – immobilized *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, n.4, p.490-497, 2002.

- CONCEIÇÃO, D.P. **Isolamento de bactérias resistentes a cromo hexavalente e purificação parcial da enzima redutora de cromo do *Bacillus sp.* ES29.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 94f. 2006.
- DEGALDILLO, R.; RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated  $\beta$ -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Netherlands, v.33, n.1, p.15-21, 2005.
- DINKLA, I.J.T.; JANSSEN, D.B. Simultaneous growth on citrate reduces the effects of iron limitation during toluene degradation in *Pseudomonas*. **Microbial Ecology**, New York, v.45, n.1, p.97-107, 2003.
- DINKLA, I.J.T. et al. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3406-3412, 2001.
- DODOR, D.E. et al. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, n.3, p.210-217, 2004.
- DOUMECHE, B. et al. Enzymatic catalysis in gel-stabilized two-phase systems: improvement of the solvent phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Netherlands, v.18, n.1, p.19-27, 2002.
- DURÁN, N., ESPOSITO, E. Potencial applications of oxidative enzyme and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, Oxford, v.28, p.83-99, 2000.
- EVANS, W. C. et al. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads-rings-fission mechanism. **Biochemical Journal**, London, v.95, n.3, p.819-831, 1995.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of functionally unstable catechol-2,3-dioxygenase greatly improves operational stability. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.26, n.8, p.568-573, 2000.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.17, n.6, p.517-523, 1995.
- FUJISAWA, H.; HAYAISHI, O. Protochatechuate 3,4- Dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.243, n.10, p.2673-2681, 1968.
- GHAZALLI, F.M. et al. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.54, n.1, p.61-67, 2004.

- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.M. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: Burns RG, Dick RP, editors. **Enzymes in the environment: activity, ecology, and application**. New York, p. 495–583, 2002.
- GIBELLO, A. et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae*, a  $Mg^{+2}$  containing dioxygenase involved in aromatic catabolism. **Biochemical journal**, London, v.301, n.1, p.145-150, 1994.
- GOLDMAN, R. et al. Smoking increase carcinogenic polycyclic hydrocarbons in human lung tissue. **Cancer Research**, Philadelphia, v.61, n.17, p.6367-6371, 2001.
- HAHN, D.R. et. al. Tn5099 a xylE promoter probe transposon for *Sterptomyces* spp. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.173, n.17, p.5573-5577, 1991.
- HAIGLER, B.E.; GIBSON, D. T. Purification and properties of ferredoxin NAP, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v.172, n.3, p.465-468, 1990.
- HARAYAMA, S. Functional and evolutionary relationship among diverse oxygenases. **Annual Review Microbiology**, Washington, v.46, p.565-601, 1992.
- HATTA, T. et al. Characterization of a Novel Thermostable Mn(II)-dependent 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase from a Polychlorinated Biphenyl and Naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, n.24, p.21483-21492, 2003.
- HAWLEY, G.G. **The condensed chemical dictionary**. New York: Van Nostrand Reinhold, 563p. 1993.
- HEGMAN, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.91, n.3, p.1140-1154, 1966.
- HOLLINGER, C. et al. Contaminated environment in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**. Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.
- ISHIBASHI, Y.; CERVANTES, C.; SILVER, S. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.7, p.2268-2270, 1990.
- JACQUES, R.J.S. et al. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.11, n.1, p.1–11, 2007.



- JACQUES, R.J.S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a Petrochemical Sludge Landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**. London, v.56, n.3, p.143-150, 2005.
- JOHNSEN, A.R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**. Oxford, v.133, n.1, p.71–84, 2005.
- JOHNSEN, A.R.; KARLSON, U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.63, n.3, p.452-459, 2004.
- KNAEBEL, D.B. et al. Immobilization of bacteria in macro and microparticles. *Methods in Biotechnology*, **Bioremediation Protocols**, Totowa, v.2, p.3-22, 1997.
- KANALY, R.A. et al. Biodegradation of [<sup>14</sup>C] Benzo[a]pirene added in crude oil to uncontaminated soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.1, p.4511-4515. 1997.
- KALOGERIS, E. et al. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hydrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, New York v.39, n.5, p.1113-1121, 2006.
- KARAM J.; NICELL, J.A. Potential application of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, London, v.69, n.2, p.141-153, 1997.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. New York, v. 35/2-3, n.2, p. 126-139, 2004.
- LEHNINGER, A.L. et al. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. New York: Worth Publishers, 1995. 839p.
- LEYS, N.M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726–736, 2005.
- LIMA, C.B.S. et. al. Efluentes: A qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et. Al. (Ed.) **Atlas ambiental de porto Alegre**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1998. p.157-158.
- LINOS, A. et al. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.4, p.1639-1645, 2000.

- LINOS, A. et al. *Gordonia polyisoprenivorans* sp nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 49, n.4, p.1785-1791, 1999.
- LOH, K.-C. et al. Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.30, n.5, p.620-626, 2002.
- MACLEOD, C.T.; DAUGULIS, A.J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. **Process Biochemistry**, Oxon, v.40, n.5, p.1799-1805, 2005.
- MARS, A.E. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenase and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. **Journal bacteriology**, Baltimore, v.181, n.14, p.1309-1318, 1999.
- MASON, J.R. Oxygenase catalyzed hydroxylation of aromatic compounds simple chemistry by complex enzymes. **International Industrial Biotechnology**, London, v.8, p.19-24, 1988.
- MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo**. 1991. 134p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, 1991. 134p.
- MILO, R.E. et al. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. **Extremophiles**, Tokio, v.3, p.185-190, 1999.
- MISHRA, V. et al. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.27, n.2 p.133-166, 2001.
- MIYATA, N. et al. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-153. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.363-369, 2004.
- MONOHAR, S. et al. Degradation of anthracene by *Pseudomonas* strain, NGK1. **Journal Microbiology**, Seoul, v.37, p.73-79, 1999.
- MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, n.4, p.569-576, 2005.
- NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid phase bioremediations of diesel contaminated soil. **Journal Hazardous Materials**. Amsterdam, v.100, n.1, p.79-94. 2003.

- NETTO, A. D. P. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 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, n.1, p.45-52, 2004.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.
- SAMANTA, S. K. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, n.6, p.243–248, 2002.
- SANTOS, E.C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- SHUTTLEWORTH, K.L.; CERNIGLIA, C.E. Practical methods for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading microorganisms and biodegradation intermediates. In: HURST, J. et al. (ed.) **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM, 1996. p.766-775.
- USDHS. **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**. In: U.S. Department of health and human services. ATSDR, Atlanta, GE, august 1995. 454p.
- VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data of organic chemicals**. 4th ed. Chichester, England: Wiley, 2001. 2416p.
- WANG, C.-L. et al. Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. **Process Biochemistry**, Oxon, v.41, n.7, p.1594–1601, 2006.
- WATKINSON, R.J. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, London, v.1, n.2-3, p.79-92, 1990.
- WEIGAND, H. et al. Fate of anthracene in contaminated soil: transport and biochemical transformation under unsaturated flow conditions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v.53, n.1, p.71-81, 2002.
- WHITELEY, C.G.; LEE, J.D. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.38, n.3, p.291–316, 2006.

- WHITING, A.K. et al. Manganese(II)-dependent extradiol cleaving catechol dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2. **Biochemistry**, Atlanta, v.35, p.160-170, 1995.
- WICK, L.Y. et al. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.35, n.2, p.354-361, 2001.
- ZHANG, X.-X. et al. Microbial PAH-degradation in soil: Degradation pathways and contributing factors. **Pedosphere**, Beijing, v.16, n. 5, p.555-565, 2006.
- ZHANG, H. et al. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.65, n.1, p.124-131, 2004.
- ZHANG, Y. M. et al. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.31, n.8, p.2211-2217, 1997.

## **7. VITA**

Andréa Scaramal da Silva, filha de Joel da Silva e Rosalice Scaramal, nasceu em 26 de junho de 1981, em Londrina-PR. Estudou no Colégio Estadual Marcelino Champagnat, onde completou o primeiro e segundo grau. Em 2002, ingressou no Centro Universitário Filadelfia onde foi graduada em Licenciatura em Biologia em 2006. Em 2006 iniciou o curso de Mestrado no curso de Pós Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.