

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**Potencial de degradação de clorofenóis por
*Trichosporon beigelii***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Lindomar Caciatore Junior

Florianópolis - SC


1997

**Potencial de degradação de clorofenóis por
*Trichosporon beigelii***

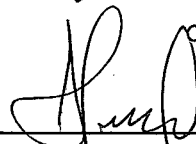
por

Lindomar Caciatore Junior

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química
especialidade **Engenharia Química**
área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**
e aprovada em sua forma final pelo curso de Pós-Graduação.

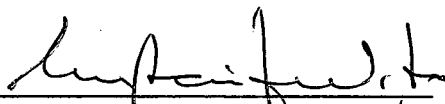


Prof. Ernesto Raizer Neto, Dr.
Orientador

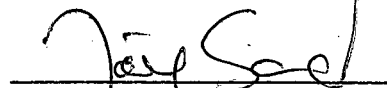


Prof. Leonel Teixeira Pinto
Coord. do CPGENQ

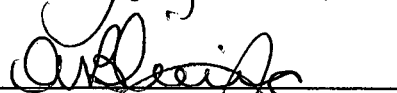
Banca Examinadora



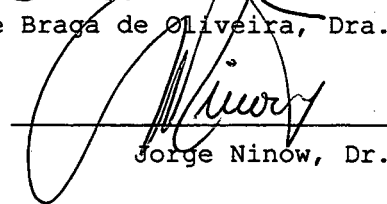
Prof. Ernesto Raizer Neto, Dr. (Presidente)



Jörg Henri Saar, Dr.



Alaíde Braga de Oliveira, Dra.



Jorge Ninow, Dr.

Florianópolis, 12 de dezembro de 1997

A parte experimental deste trabalho
foi inteiramente desenvolvida nos
laboratórios do Centro de
Desenvolvimento Biotecnológico em
Joinville

Agradecimentos

Aos Professores e Amigos Dr. Ernesto e Jörg pelo apoio técnico e moral na condução dos trabalhos relativos a tese;

A toda minha família pela constante presença em todos os momentos;

Aos Diretores e Corpo Técnico do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico de Joinville, onde foi realizada a parte experimental do trabalho;

À Capes, pelo apoio financeiro dado durante todo o período da realização da tese;

Aos Amigos de Joinville, Regina, Ricardo, Rômulo, Celso Luis, Marco Fábio e Alexandre;

Aos Amigos de Florianópolis, Dariva, Silvia, Débora, José Vladimir, Luis, Denise e Ciumara;

A colega Eliane da UFMG pelo apoio na compreensão dos espectros de massa;

E, finalmente a DEUS.

Nomenclatura

ϵ - Coeficiente de extinção molar;

τ - Tempo necessário para a degradação de 50% da concentração inicial de determinado substrato;

$\Delta S = S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}$;

$\Delta X = X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}$;

2,4 DCP - 2,4 Diclorofenol;

2,4,6 TCP - 2,4,6 Triclorofenol;

A - Acetato;

EDTA - Etileno Diamina Tetra-Acetato

F - Fenol;

G - Glicose;

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa;

GSH - Glutathiona reduzida;

GSSG - Glutathiona dimérica;

*m*CP - *meta*clorofenol;

*o*CP - *orto*clorofenol;

*p*CP - *para*clorofenol;

PCP - *penta*clorofenol;

S_{final} - Concentração do substrato ao final do experimento;

S_{inicial} - Concentração inicial de substrato;

t - tempo necessário para que todo substrato seja consumido;

TMS - N,O bis(trimetilsilil)acetoamida;

V.U.S. - Velocidade de utilização do substrato;

$X_{\text{adição,cos}}$ - Concentração da biomassa quando da adição do co-substrato, para o ensaio em condições de co-metabolismo;

$X_{\text{adição,f}}$ - Concentração da biomassa quando da adição do co-substrato, para o ensaio com fenol apenas;

$X_{f,cos}$ - Concentração da biomassa final para o experimento em condições de co-metabolismo;

$X_{f,f}$ - Concentração da biomassa final para o experimento em com fenol apenas;

X_{final} - Concentração de biomassa ao final do experimento (fase estacionária de crescimento);

X_{inicial} - Concentração de biomassa no início do experimento.

Sumário

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMO	1
SUMMARY	2
I INTRODUÇÃO	3
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
II.1 Microrganismo	9
II.2 Vias metabólicas de compostos aromáticos	13
II.3 Substratos	21
<i>II.3.1 Paraclorofenol</i>	23
<i>II.3.2 Ortoclorofenol</i>	24
<i>II.3.3 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol</i>	25
<i>II.3.4 Pentaclorofenol</i>	27
III MATERIAIS E MÉTODOS	29
III.1 Substratos	29
<i>III.1.1 Fenol</i>	29
<i>III.1.2 Clorofenóis</i>	29
<i>III.1.3 Glicose</i>	29
III.2 Microrganismo	29
III.3 Meios de cultura	30
<i>III.3.1 Meio de manutenção do microrganismo</i>	30
<i>III.3.2 Meio mineral</i>	30
<i>III.3.3 Meio de ativação (G20YE05)</i>	30
<i>III.3.4 Pré-inóculos</i>	31
<i>III.3.4.1 Pré-inóculo A</i>	31
<i>III.3.4.2 Pré-inóculo B</i>	31
<i>III.3.4.3 Pré-inóculo C</i>	31
<i>III.3.5 Meio contendo fenol como única fonte de carbono</i>	31

III.3.6 Meio contendo paraclorofenol como única fonte de carbono	31
III.3.7 Meio usado nos ensaios em condições de co-metabolismo	32
III.3.8 Meios usados nas biotransformações	32
III.3.9 Meios usados nos testes enzimáticos	32
III.3.10 Tampões utilizados nos testes enzimáticos	32
III.3.10.1 Tampão para teste enzimático de catecol 1,2 dioxigenase.....	33
III.3.10.2. Tampão para teste enzimático de catecol 2,3 dioxigenase.....	33
III.3.10.3 Tampão para teste enzimático de protocatecuato 2,3, protocatecuato 3,4 e protocatecuato 4,5 dioxigenases..	33
III.4 Equipamentos	34
III.4.1 Cromatógrafo HPLC e detector ultra violeta	34
III.4.2 Espectrofotômetro	34
III.4.3 Centrífugas	35
III.4.4 Incubadoras (Shakers)	35
III.4.5 Cromatógrafo gasoso acoplado a espectroscopia de massa (GC-MS)	35
III.5 Métodos	35
III.5.1 Manutenção e conservação do microrganismo	36
III.5.2 Determinação da relação peso seco e absorbância	36
III.5.3 Determinação da concentração celular	38
III.5.4 Metodologia utilizada nos experimentos	38
III.5.4.1 Experimentos tendo como fonte de carbono apenas um substrato.....	38
III.5.4.2 Experimentos em condições de co-metabolismo.....	39
III.5.4.3 Experimentos de biotransformação.....	39
III.5.4.4 Testes enzimáticos.....	41
III.5.5 Determinação da concentração de compostos aromáticos por espectrofotometria com luz ultravioleta.	45
III.5.5.1 Fenol.....	46
III.5.5.2 Paraclorofenol.....	47

III.5.6 Dosagem de compostos aromáticos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	47
III.5.6.1 Dosagem de fenol e paraclorofenol.....	48
III.5.5.2 Dosagem de fenol e ortoclorofenol.....	48
III.5.6.3 Dosagem de fenol e 2,4 Diclorofenol.....	48
III.5.6.4 Dosagem de fenol e 2,4,6 Triclorofenol.....	48
III.5.6.5 Dosagem de fenol e pentaclorofenol.....	48
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
IV.1 Crescimento de <i>T. beigelii</i> em uma única fonte de carbono .	50
IV.1.1 Fenol como única fonte de carbono	50
IV.1.1.1 Fenol como única fonte de carbono na ausência de vitaminas.....	50
IV.1.1.2 Fenol como única fonte de carbono na presença de vitaminas.....	52
IV.1.2 Crescimento de <i>T. beigelii</i> em paraclorofenol como única fonte de carbono	54
IV.1.3. Ensaio de biotransformação	57
IV.1.3.1. Biotransformação de fenol.....	57
IV.1.3.2. Biotransformação de paraclorofenol.....	58
IV.2 Degradação de fenol e clorofenóis em condições de co-metabolismo por <i>Trichosporon beigelii</i>	58
IV.2.1. Crescimento de <i>T. beigelii</i> em fenol e paraclorofenol	59
IV.2.2 Crescimento de <i>T. beigelii</i> em fenol e ortoclorofenol .	62
IV.2.3 Crescimento de <i>T. beigelii</i> em fenol e 2,4 Diclorofenol, 2,4,6 Triclorofenol e pentaclorofenol	67
IV.3. Testes enzimáticos	73
IV.3.1. Determinação da atividade enzimática de catecol 1,2 e catecol 2,3 dioxigenase	74
IV.3.2. Determinação da atividade enzimática de protocatecuato 2,3 , protocatecuato 3,4 e protocatecuato 4,5 dioxigenase ...	75
V CONCLUSÃO.....	78
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

ANEXOS	83
Anexo A - Figuras	84
Anexo B - Tabelas com os resultados experimentais	95
Anexo C - Memória de cálculo	105
<i>C.1 Metodologia para cálculo da formação de biomassa (ΔX)</i> ..	106
<i>C.2 Método gráfico para a obtenção de τ</i>	107
<i>C.3 Metodologia para o cálculo do % de inibição</i>	108
<i>C.4 Metodologia para o cálculo da atividade enzimática</i>	109

Lista de Tabelas

TABELA I.1 - COMPOSTOS AROMÁTICOS SUBSTITUÍDOS E SUAS PRINCIPAIS FONTES. . .	7
TABELA II.1 - VELOCIDADES DE UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATO (V.U.S.) POR <i>T. CUTANEUM</i> TENDO COMO SUBSTRATO GLICOSE (G), FENOL (F) E ACETATO (A).	11
TABELA II.2 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS RELATIVAS DE FENOL HIDROXILASE E CATECOL 1,2 DIOXIGENASE PARA FENOL, ORTO (oCP), META (MCP) E PARAFLOROFENOL (pCP) (NEUJAHN E GAAL, 1979).	12
TABELA III.1 - MEIOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS E SUAS COMPOSIÇÕES.	33
TABELA III.2 - VALORES OBTIDOS PARA DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIA E PESO SECO.	37
TABELA III.3 - RESUMO DOS TESTES ENZIMÁTICOS REALIZADOS, EVIDENCIANDO O PRODUTO QUE ERA DETECTADO E EM QUE COMPRIMENTO DE ONDA ERA OBSERVADO A FORMAÇÃO DO MESMO.	44
TABELA III.4 - RESUMO DOS EXPERIMENTOS, EVIDENCIANDO O TIPO DE ATIVAÇÃO E PRÉ-INÓCULO UTILIZADO PARA CADA EXPERIMENTO.	45
TABELA IV.1 - VALORES DE ΔX E τ PARA AS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL, PARA OS EXPERIMENTOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FONTE DE VITAMINAS.	54
TABELA IV.2 - PERCENTUAIS DE DEGRADAÇÃO DE PARAFLOROFENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO POR <i>T. BEIGELII</i> . VALORES APÓS 31,5 HORAS DE INCUBAÇÃO DO MICROORGANISMO EM MEIO MINERAL SEM SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS.	56
TABELA IV.3 - VALORES PERCENTUAIS DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARAFLOROFENOL E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOMASSA EM RELAÇÃO AO FENOL.	62
TABELA IV.4 - VALORES DE BIOMASSA, OBTIDOS POR DENSIDADE ÓTICA E POR PESO SECO AO FINAL DO EXPERIMENTO, RELACIONADO COM A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE ORTOFLOROFENOL.	64
TABELA IV.5 - PERCENTUAIS DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E ORTOFLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> , EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	67
TABELA IV.6 - VALORES PERCENTUAIS DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARAFLOROFENOL E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO FENOL.	71
TABELA IV.7 - COMPARATIVO ENTRE EXPERIMENTOS DE CRESCIMENTO EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO E EM FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO.	72
TABELA IV.8 - RESULTADOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA CATECOL 1,2	

DIOXIGENASE PARA FENOL E PARAFLOROFENOL.	75
TABELA IV.9 - VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA AS DIOXIGENASES QUE REALIZAM A RUPTURA DO PROTOCATECUATO.	75
TABELA B.1.A - RESULTADOS DO CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> PARA O EXPERIMENTO COM FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO NA AUSÊNCIA DE EXTRATO DE LEVEDURA.	96
TABELA B.1.B - RESULTADOS DA DEGRADAÇÃO DE FENOL POR <i>T. BEIGELII</i> PARA O EXPERIMENTO TENDO FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO SEM EXTRATO DE LEVEDURAS.	96
TABELA B.2.A - RESULTADOS DO CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> PARA O EXPERIMENTO COM FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO COM FONTE DE VITAMINAS.	97
TABELA B.2.B - RESULTADOS DA DEGRADAÇÃO DE FENOL POR <i>T. BEIGELII</i> PARA O EXPERIMENTO TENDO FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO COM EXTRATO DE LEVEDURA.	97
TABELA B.3.A - RESULTADOS DO CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> PARA O EXPERIMENTO COM PARAFLOROFENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO.	98
TABELA B.3.B - RESULTADOS DA DEGRADAÇÃO DE PARAFLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> PARA O EXPERIMENTO COM PARAFLOROFENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO.	98
TABELA B.4.A - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO FENOL COMO SUBSTRATO E PARAFLOROFENOL COMO CO-SUBSTRATO.	99
TABELA B.4.B - DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARAFLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	99
TABELA B.5.A - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO FENOL COMO SUBSTRATO E ORTOCLOROFENOL COMO CO-SUBSTRATO.	100
TABELA B.5.B - DEGRADAÇÃO DE FENOL E ORTOCLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	100
TABELA B.6.A - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO FENOL COMO SUBSTRATO E 2,4 DICLOROFENOL COMO CO-SUBSTRATO.	101
TABELA B.6.B - DEGRADAÇÃO DE FENOL E 2,4 DICLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	101
TABELA B.7.A - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO FENOL COMO SUBSTRATO E 2,4,6 TRICLOROFENOL COMO CO-SUBSTRATO.	102
TABELA B.7.B - DEGRADAÇÃO DE FENOL E 2,4,6 TRICLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	102
TABELA B.8.A - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO,	

TENDO FENOL COMO SUBSTRATO E PENTACLOROFENOL COMO CO-SUBSTRATO.....	103
TABELA B.8.B - DEGRADAÇÃO DE FENOL E PENTACLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	103
TABELA B.9 - RESULTADO DO EXPERIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CATECOL 1,2 DIOXIGENASE OBTIDA A PARTIR DE CÉLULAS CRESCIDAS EM FENOL.....	104
TABELA B.10 - RESULTADO DO EXPERIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTOCATECUATO 2,3 DIOXIGENASE OBTIDA A PARTIR DE CÉLULAS CRESCIDAS EM PARAFLOROFENOL.....	104

Lista de Figuras

FIGURA II.1 - ALGUNS COMPOSTOS UTILIZADOS POR <i>TRICHOSPORON</i> . A - FENOL; B - ÉTER DIFENÍLICO; C - RESORCINOL; D - FURFURAL; E - FENANTRENO.	10
FIGURA II.2 A - COMPOSTOS AROMÁTICOS QUE, QUANDO OXIDADOS BIOLÓGICAMENTE, SÃO LEVADOS A CATECOL	14
FIGURA II.2 B - COMPOSTOS AROMÁTICOS QUE QUANDO OXIDADOS BIOLÓGICAMENTE SÃO LEVADOS A PROTocatecuato	15
FIGURA II.3 - VIA METABÓLICA PARA O FENOL EM <i>T. BEIGELII</i> . OS NÚMEROS NAS SETAS INDICAM A ENZIMA QUE CATALISA A REAÇÃO. (1) - FENOL HIDROXILASE, (2) - CATECOL 1,2 OXIGENASE, (3) - CIS,CIS MUCONATO LACTONASE (4) - MUCONOLACTONA ISOMERASE (5) - ENOL LACTONA HIDROLASE.	16
FIGURA II.4 - TRÊS DIFERENTES RUPTURAS DE ANEL QUE O PROTocatecuato PODE SOFRER. A LINHA ONDULADA REFERE-SE AO PONTO DE RUPTURA DO ANEL E OS NÚMEROS REFEREM-SE AS ENZIMAS QUE ATUAM NA REAÇÃO. 1 - PROTocatecuato 2,3 DIOXIGENASE, 2 - PROTocatecuato 3,4 DIOXIGENASE E 3 - PROTocatecuato 4,5 DIOXIGENASE.	17
FIGURA II.5 - VIA DE DEGRADAÇÃO DE 3 CLOROBENZOATO POR <i>PSEUDOMONAS</i> SP. ...	19
FIGURA II.6 - ESBOÇO DAS DUAS VIAS METABÓLICAS DE DEGRADAÇÃO DO 3 CLOROBENZOATO POR <i>ALCALIGENES</i> , LEVANDO A PROTocatecuato E GENTISATO.	20
FIGURA II.7 - MECANISMO DE DEGRADAÇÃO DE PARAclorofenol POR <i>RHODOTORULA GLUTINIS</i>	21
FIGURA II.8 - ÁREAS DE INTERESSE NO CAMPO DA "DEGRADAÇÃO MICROBIANA DE COMPOSTOS AROMÁTICOS CLORADOS".	22
FIGURA II.9 - AÇÃO CONJUNTA DE PROCESSOS ANAERÓBIO E AERÓBIO NA MINERALIZAÇÃO DE DE 2,4,6 TRICLOROFENOL.	26
FIGURA II.10 - MECANISMO PROPOSTO PARA DEGRADAÇÃO DE PENTAClOROFENOL POR <i>FLAVOBACTERIUM</i> SP. ATCC 39723. 1 - PENTAClO-rofenol; 2 - TETRAclOROHIDROQUINONA; 3 - 2,3,6 TRIClOROHIDRO-QUINONA; 4 - 2,6 DIClOROHIDROQUINONA; 5 - 2 CLOROHIDROQUINONA. GSH - GLUTATIONA REDUZIDA, GSSG - GLUTATIONA DIMÉRICA OXIDADA.	28
FIGURA III.1 - GRÁFICO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO ENTRE PESO SECO E ABSORBÂNCIA.	37

FIGURA III.2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO FENOL VIA LUZ ULTRAVIOLETA.	46
FIGURA III.3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO PARACLOROFENOL VIA LUZ ULTRAVIOLETA.	47
FIGURA IV.1 - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E O MEIO MINERAL SEM COMPLEMENTO DE DE VITAMINAS. A LEGENDA MOSTRA AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL.	51
FIGURA IV.2 - DEGRADAÇÃO DE FENOL POR <i>T. BEIGELII</i> . A LEGENDA MOSTRA AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL.	52
FIGURA IV.3 - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL, TENDO EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE DE VITAMINAS.	53
FIGURA IV.4 - DEGRADAÇÃO DE FENOL POR <i>T. BEIGELII</i> , EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL.	53
FIGURA IV.5 - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE PARACLOROFENOL.	55
FIGURA IV.6 - DEGRADAÇÃO DE PARACLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i>	56
FIGURA IV.7 - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO COMO SUBSTRATO FENOL E COMO CO-SUBSTRATO PARACLOROFENOL.	60
FIGURA IV.8 - DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARACLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO. CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PARACLOROFENOL DE 50 (A), 100 (B) E 200 MG/L (C).	61
FIGURA IV.9 - CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO COMO SUBSTRATO FENOL E COMO CO-SUBSTRATO ORTOCLOROFENOL. A LEGENDA INDICA A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE ORTOCLOROFENOL.	63
FIGURA IV.10 - PERFIS DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E ORTOCLOROFENOL EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE ORTOCLOROFENOL DE 50 (A), 100 (B) E 200 MG/L (C).	66
FIGURA IV.11 (A) CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE 2,4 DICLOROFENOL. (B) PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E 2,4 DICLOROFENOL.	68
FIGURA IV.12 (A) CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE 2,4,6 TRICLOROFENOL. (B) PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E 2,4,6 TRICLOROFENOL.	69
FIGURA IV.13 (A) CRESCIMENTO DE <i>T. BEIGELII</i> NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE PENTAFLOROFENOL. (B) PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E PENTAFLOROFENOL.	70

FIGURA IV.14 - ESBOÇO DA DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARAFLOROFENOL POR <i>T. BEIGELII</i>	76
FIGURA A.1 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS TENDO UMA FONTE DE CARBONO APENAS.	85
FIGURA A.2 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.	86
FIGURA A.3 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.	87
FIGURA A.4.A - ESPECTRO DE GC-MS DO FENOL DERIVATIZADO COM OS PRINCIPAIS PICOS INDICADOS E COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.	88
FIGURA A.4.B - ESPECTRO DE GC-MS DO CATECOL DERIVATIZADO COM OS PRINCIPAIS PICOS INDICADOS E COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.	89
FIGURA A.4.C - ESPECTRO DE GC-MS DO PARAFLOROFENOL DERIVATIZADO COM OS PRINCIPAIS PICOS INDICADOS E COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.	90
FIGURA A.4.D - ESPECTRO DE GC-MS CARACTERÍSTICO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO FENOL, TENDO O FENOL E O CATECOL DERIVATIZADOS INDICADOS E OS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.	91
FIGURA A.4.E - ESPECTRO DE GC-MS CARACTERÍSTICO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO PARAFLOROFENOL, TENDO O PARAFLOROFENOL E O PROTOCATECUATO DERIVATIZADOS INDICADOS E OS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.	92
FIGURA A.4.F - SEQUÊNCIA DE FRAGMENTAÇÃO PROPOSTA PARA O PROTOCATECUATO..	93
FIGURA A.5 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS PARA OS TESTES ENZIMÁTICOS.	94

Resumo

O presente trabalho demonstrou que a degradação do fenol pela levedura *Trichosporon beigelii* ocorre via catecol e a abertura do anel aromático se dá através de orto-clivagem. A degradação do paraclorofenol por outro lado ocorre via protocatecuato seguido de uma meta-clivagem do anel aromático.

Ensaio em shaker mostraram que o crescimento de *T. beigelii* em fenol é influenciado pela presença de uma fonte de vitaminas, no caso extrato de levedura (YE). Nos experimentos em que houve suplementação de YE o crescimento da levedura foi maior, e o tempo de degradação de 50% da concentração inicial de substrato, τ , foi menor que nos ensaios sem YE. Quando o substrato é o paraclorofenol, *T. beigelii* mostrou-se hábil em degradá-lo, porém nas três concentrações iniciais testadas (20, 50 e 100 mg/L) não foi observado crescimento da levedura.

O potencial de degradação de 5 clorofenóis (oCP, pCP, 2,4 DCP, 2,4,6 TCP e PCP) foi testado em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato (500 mg/L) e o clorofenol como co-substrato. oCP e pCP foram testados em três concentrações iniciais (50, 100 e 200 mg/L) e houve degradação parcial em todos os experimentos, com exceção das concentrações iniciais de 50 e 200 mg/L de pCP, onde a degradação chegou a 100% ou não houve degradação, respectivamente. Os policlorados não apresentaram degradação.

Ensaio de biotransformação utilizando fenol e pCP foram realizados. Os produtos das biotransformações foram analisados em cromatografia gasosa acoplado à espectroscopia de massa. Os testes mostraram que *T. beigelii* degrada fenol via catecol e pCP via protocatecuato. Ambos, catecol e protocatecuato são intermediários considerados substratos de partida para a degradação de compostos aromáticos.

Foram realizados testes enzimáticos com 5 enzimas chaves na degradação de catecol e protocatecuato, utilizando como homogenato células crescidas em fenol e pCP. Os testes revelaram que as células crescidas em fenol apresentaram atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase responsável pela abertura do anel aromático (catecol) na posição orto, enquanto que as células crescidas em pCP revelaram atividade da enzima protocatecuato 2,3 dioxigenase que é responsável pela abertura do anel (protocatecuato) na posição meta.

Summary

This study demonstrates the degradation by *Trichosporon beigelii* of phenol via catechol and the breakdown of the aromatic ring system via *ortho*-cleavage. On the other hand, degradation of *parachlorophenol* occurred via *protocatechuate* followed by *metacleavage* of the aromatic ring.

Shaker experiments evidenced the influence of a vitamin source (yeast extract, YE) on the growth of *T. beigelii* with phenol.

When supplemented with YE, growth of yeast was better and the time needed to degrade 50% of initial substrate concentration, τ , was smaller than in experiments without addition of YE. *T. beigelii* was efficient in degrading *parachlorophenol* as a substrate. However, growth of the microorganisms was not observed on the three initial substrate concentrations tested (20, 50 and 100 mg/L).

The capacity to decompose 5 chlorophenols (*o*CP, *p*CP, 2,4 DCP, 2,4,6 TCP and PCP) was tested in conditions of co-metabolism, using phenol as a substrate (500mg/L) and chlorophenol as a co-substrate. *o*CP and *p*CP were tested in three initial conditions (50, 100 and 200 mg/L). Partial degradation of the co-substrates was observed in all cases, with the exception of 50 and 200 mg/L initial substrate concentration for *p*CP, where degradation was complete or where no degradation occurred respectively. The bi and polychlorophenols were not attacked by the microorganism.

Biotransformation using phenol and *p*CP as substrates, revealed that *T. beigelii* mineralizes phenol via catechol and degrades *p*CP via *protocatechuate*. Both intermediates, catechol and *protocatechuate* are considered "starting substrates" for the degradation of aromatic compounds. Intermediates of the biotransformations were analyzed by gas chromatography.

Enzyme assays with five key enzymes of catechol and *protocatechuate* degradation were performed, using homogenates of cells grown in phenol and *p*CP as an enzyme source. The tests demonstrated that cells grown in phenol showed activities of catechol 1,2 dioxygenase, responsible for the aromatic ring cleavage in the *ortho* position. Cells grown in *p*CP, on the other hand, revealed activity of *protocatechuate* 2,3 dioxygenase, responsible for the aromatic ring cleavage of *protocatechuate* in *meta* position.

I Introdução

O progressivo desenvolvimento de tecnologias associado ao rápido obsolescimento causados pela incessante busca de novos produtos, fizeram com que nos últimos anos milhares de novos compostos químicos fossem desenvolvidos. A mesma ênfase não foi dada no sentido de se estudar as conseqüências destes novos produtos no ambiente.

A capacidade de assimilação de produtos antropogênicos pelo meio ambiente é limitada e seletiva, sendo esta a principal função econômica do ambiente num processo, pois determinará o tempo de vida útil de um projeto, medido pelo tempo disponível para a completa deposição e degradação dos materiais não recicláveis produzidos.

Além do desenvolvimento de novos produtos muitos processos sofreram alterações por exigência de qualidade e principalmente pelo aumento da demanda de certos bens de consumo, como por exemplo, papel, plásticos, explosivos, pesticidas, entre outros.

Esta expansão quantitativa e qualitativa da indústria, aliada ao crescimento populacional, afeta diretamente a qualidade de vida, pois se nenhuma medida de prevenção ou de tratamento for adotada tem-se como conseqüência um aumento da geração da poluição.

Diante deste quadro, agências, governamentais ou não, num primeiro tempo, tem controlado e reprimido a ação de poluir o meio ambiente. Uma política ambiental mais séria vem sendo praticada também pelas próprias indústrias e como conseqüência várias tecnologias limpas tem surgido nos últimos cinco anos.

Uma TECNOLOGIA LIMPA, consiste no desenvolvimento de um processo ou de um produto, reduzindo os riscos, pela sua deposição, ao homem e ao ambiente. Para o processo, o objetivo principal é a conservação de materiais e energia, eliminação de materiais tóxicos e redução de quantidade e toxicidade dos resíduos sólidos, líquidos ou gasosos, antes da emissão.

A comunidade científica e de desenvolvimento tecnológico tem também envidado esforços para a melhoria de processos de tratamento e principalmente na otimização dos materiais aplicados no processo industrial, evitando perdas no sistema produtivo, forma mais econômica de se otimizar a capacidade assimilativa do ambiente

O domínio tecnológico nas áreas de processos, análises e equipamentos, são os fatores determinantes do grau de sustentabilidade de qualquer processo produtivo. Os resultados obtidos pela indústria de papel no Japão apontam no sentido de que a redução da Demanda Química de Oxigênio dos efluentes no período de 1970 a 1989 foi de 84 % devido a melhorias no processo, contra apenas 16% pelo aumento de eficiência no sistema de tratamento dos efluentes.

Além desta preocupação, intrínseca aos setores industriais, existe outro fator que tem contribuído com a redução na geração e melhoria do sistema de tratamento de efluentes, relacionado com a comercialização dos produtos, que é a criação de barreiras comerciais para as indústrias que não possuem uma política de gestão ambiental.

A partir de 1992 a comunidade internacional tem demonstrado interesse na condução dos assuntos ambientais do setor público e privado. Este interesse tem-se refletido num esforço de colaboração internacional para resolver os problemas ambientais. O Protocolo de Montreal e a Conferência Mundial sobre o Meio Ambiente, realizada no Rio de Janeiro em 1992, são dois exemplos do sucesso desta cooperação.

Outro indicativo de sucesso foi a prática de estabelecimento de normas internacionais para a conservação do meio ambiente. Face ao sucesso obtido pela International Organization for Standardization (ISO) com a ISO 9000, criou-se o Comitê Técnico para estabelecer a Série ISO 14000. A ISO 14000, é composta de um conjunto de normas aceitas internacionalmente para a prática de gestão e auditoria ambiental, Selo Verde (Eco-labeling) e

ciclo global do produto. Estas normas terão um papel fundamental na preservação do meio ambiente, pois a tendência é que as indústrias sejam levadas a aderir às normas por razões de estratégia empresarial e de marketing, e não mais unicamente por ação da fiscalização das agências governamentais. Mais de 120 países participam como membros votantes deste comitê, sendo o Brasil representado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Existem inúmeras maneiras de se contribuir para a preservação do meio ambiente afim de amenizar os efeitos de compostos tóxicos. Uma delas é o tratamento dos resíduos gerados no processo fabril. A aplicação dos processos de tratamento de resíduos está ligada a quantidade, natureza, toxicidade do resíduo gerado, bem como ao custo do tratamento.

Em virtude do baixo custo, o tratamento biológico leva vantagem sobre os demais, e, além deste fator, deve-se ressaltar que os processos biológicos de tratamento de efluentes são eficientes e relativamente estáveis. Os processos físico-químicos de tratamento superam os biológicos em estabilidade e eficiência, porém, são em geral mais dispendiosos.

Existem compostos que não são eliminados pelos processos clássicos de tratamento biológico, entre eles pode-se citar os metais pesados (chumbo, cromo, ferro, titânio, mercúrio), hidrocarbonetos de elevado peso molecular e os aromáticos substituídos (azoaromáticos, clorofenóis, cloroligninas, etc.).

Para o tratamento dos compostos xenobióticos algumas técnicas diferenciadas podem ser aplicadas.

Técnicas como **bioaumento**, que consiste no incremento constante de massa de microrganismos, aumentando assim a relação entre estes e os compostos a serem eliminados, facilitando a sua degradação; **co-metabolismo** onde um substrato similar ao que se deseja eliminar pode ser adicionado ao tratamento afim de que eles possam ter enzimas comuns na via metabólica; A **biorremediação** que consiste no tratamento de solos contaminados

com xenobióticos, seja pelo enriquecimento dos microrganismos do próprio solo ou pela inoculação de microrganismos já aclimatados; E ainda sistemas de **tratamento enzimático** onde não há utilização de microrganismos e sim enzimas, que catalisam as etapas de degradação dos compostos tóxicos.

Os aromáticos substituídos constituem um grande grupo de poluentes, e são utilizados em diversos ramos da indústria. Um panorama dos principais compostos aromáticos substituídos e suas fontes industriais pode ser visto na Tabela I.1. Para a eliminação dos aromáticos substituídos há necessidade de se desenvolver tecnologias microbianas, e para tanto, alguns gêneros de bactérias e fungos tem se tornado importantes para degradação dos mesmos. Os compostos aromáticos são degradados por um pequeno número de microrganismos, dentre eles pode-se citar *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Acinetobacter* e *Trichosporon*.

Estes são os gêneros mais conhecidos, porém, variações de pH, temperatura, a presença de um segundo substrato podem fazer com que haja mineralização de compostos aromáticos por outros microrganismos.

A utilização de microrganismos para a eliminação de compostos aromáticos substituídos é uma forma eficiente e, o que é mais importante, pouco dispendiosa. Alguns aspectos, entretanto, devem ser levados em consideração, como por exemplo, a toxicidade dos metabólitos formados. Alguns metabólitos formados durante o processo de degradação podem ser extremamente tóxicos, levando a inativação dos microrganismos. Estes metabólitos podem ser evitados se o processo de tratamento for controlado, já que muitas vezes a formação dos metabólitos tóxicos é uma consequência de parâmetros externos (pH, oxigênio dissolvido, agitação, temperatura, outros substratos etc.).

Tabela I.1 - Compostos aromáticos substituídos e suas principais fontes.

Compostos Aromáticos	Fonte Industrial
BTEX*	Combustíveis fósseis, solventes
Estireno	Plásticos
PAH**	Combustíveis fósseis, preservação de madeira
Alquilfenóis	Surfactantes e detergentes
Aromáticos sulfonados	Surfactantes, detergentes, tintas
Aminas Aromáticas	Pesticidas, tintas, pigmentos, compostos farmacêuticos
Azo Aromáticos	Tintas
Nitroaromáticos	Explosivos, fármacos, pesticidas, tintas
Clorofenóis e dioxinas	Preservação de madeira, pesticidas, efluentes de branqueamento de polpa
HC*** aromáticos,	e Pesticidas, solventes, fluidos
PCB****	dielétricos e hidráulicos

*BTEX-Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno; ** PAH-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; ***HC-hidrocarbonetos e ****PCB Bifenis policlorados.

A formação de biomassa, que posteriormente deve ser tratada, é outro fator importante a ser considerado. Os tratamentos dependem da natureza da biomassa formada. Em geral, compostagem, digestão anaeróbia ou ainda processos de desidratação da biomassa através de filtros prensa ou evaporação natural e posterior incineração, são os processos mais utilizados.

Neste trabalho foi enfatizado o estudo da degradação de organoclorados, em especial os clorofenóis, utilizando a levedura *Trichosporon beigelii*.

O crescimento de *T. beigelii* foi investigado em ensaios com fenol como única fonte de carbono, na presença e na ausências de um fonte de vitaminas, neste caso extrato de leveduras. A degradação de paraclorofenol como única fonte de carbono por *T. beigelii* também foi estudado.

O potencial de degradação de 5 clorofenóis (*paraclorofenol*, *ortoclorofenol*, *2,4 Diclorofenol*, *2,4,6 Triclorofenol* e *pentaclorofenol*) por *Trichosporon beigelii* foi investigado em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e o clorofenol como co-substrato.

Foram realizados também testes enzimáticos e ensaios de biotransformação com a finalidade de verificar as vias catabólicas utilizadas por *T. beigelii* quando este utiliza fenol e paraclorofenol como única fonte de carbono.

II Revisão Bibliográfica

II.1 Microrganismo

Este trabalho utilizou a levedura *Trichosporon beigelii*, anteriormente denominada *Trichosporon cutaneum* (SCHAUER *et al*, 1995), em todos os experimentos. A cepa foi isolada de um sistema de tratamento de efluentes de uma usina de gaseificação de carvão. A planta de tratamento de efluentes operava com um sistema de lodo ativado, onde a concentração de fenol na entrada do sistema era aproximadamente 1 g/L. Nenhuma modificação genética foi feita no microrganismo, portanto trata-se de uma cepa selvagem. A posição taxonômica do microrganismo, identificada com base nos testes bioquímicos, é a seguinte:

Domínio: Eukaryotae;

Reino: Fungi;

Classe: Basidiomycota;

Ordem: Hymenomycetos;

Família: Tremellales.

Gênero: *Trichosporon*

Espécie: *T. beigelii*

Após o isolamento, alguns testes preliminares foram realizados em um sistema de alimentação contínuo. O sistema operava com alimentação de 50 mg/L de paraclorofenol e sais minerais, vazão de 66 mL/h (reator de 4,0 L). Foi observado uma diminuição brusca na demanda química do oxigênio (DQO), sugerindo que a cepa poderia degradar paraclorofenol.

A utilização de leveduras do gênero *Trichosporon* como microrganismo degradador de compostos aromáticos é pouco comum, apesar da sua extraordinária flexibilidade metabólica com respeito a fontes de carbono. (SPAANING e NEUJAHN, 1989). Na Figura II.1 pode-se observar alguns dos compostos aromáticos utilizados por leveduras do gênero *Trichosporon*.

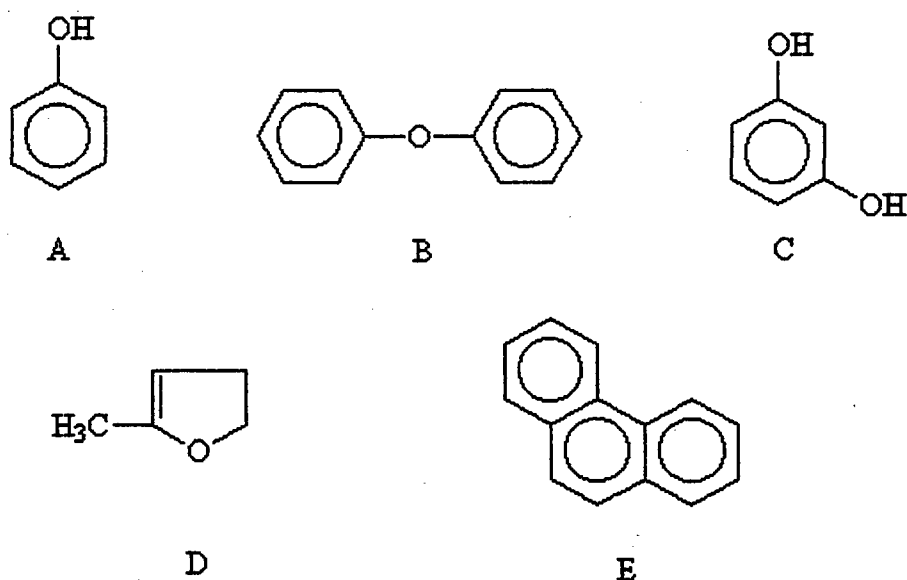


FIGURA II.1 - ALGUNS COMPOSTOS UTILIZADOS POR *TRICHOSPORON*. A - FENOL; B - ÉTER DIFENÍLICO; C - RESORCINOL; D - FURFURAL; E - FENANTRENO.

Na mesma publicação os autores trabalhando em cultura contínua, demonstraram que *T. cutaneum* é capaz de utilizar glicose e fenol simultaneamente, sendo que, para o fenol, *T. cutaneum* apresenta um mecanismo de degradação onde as enzimas somente são sintetizadas quando o microrganismo está na presença do fenol. O mesmo acontece em presença de fenol e acetato. A Tabela II.1 mostra os valores de velocidade de utilização de substrato (V.U.S.) obtidos pelos autores quando do crescimento de *T. cutaneum* em glicose (G), fenol(F) e acetato(A).

Tabela II.1 - Velocidades de utilização de substrato (V.U.S.) por *T. cutaneum* tendo como substrato glicose (G), fenol (F) e acetato (A).

	V.U.S. (g/g*h) para células crescidas em:					
	(g/L)					
	F	G	A	F + G	F + A	G + A
	(0,4)	(20)	(1,0)	(0,4+20)	(0,4+0,9)	(5,7+0,4)
Fenol	0,17	-	-	0,07	0,11	-
Glicose	-	0,27	-	0,24	-	0,21
Acetato	-	-	0,71	-	0,25	0,05

Os valores obtidos revelam que quando *T. cutaneum* está na presença de apenas um substrato tem uma velocidade de utilização de substrato sempre maior, para os substratos testados, que quando está na presença de dois substratos. Por exemplo, os valores de velocidade de utilização de fenol e glicose separados são 0,17 e 0,27 g/g*h respectivamente, enquanto que, juntos os valores de velocidade de utilização de substrato para fenol e glicose são 0,07 e 0,24 g/g*h respectivamente. O mesmo acontece com os demais pares de substratos testados.

GAAL e NEUJHR (1979), determinaram a via metabólica que *T. cutaneum* utiliza quando tem como única fonte de carbono fenol e resorcinol. Além destes resultados, serão discutidos na seção II.2, dados publicados relativos a atividade enzimática de duas enzimas chave na degradação de fenol, a fenol hidroxilase e a catecol 1,2 dioxigenase, tendo como substrato fenol, orto, meta e paraclorofenol. Os resultados podem ser vistos na Tabela II.2. Pode-se observar que a atividade de catecol 1,2 dioxigenase é, para os três monoclorofenóis testados, menor que 1%, o que leva a concluir que se houver degradação destes compostos ocorre pela ação de outra enzima.

Tabela II.2 - Atividades enzimáticas relativas de fenol hidroxilase e catecol 1,2 dioxigenase para fenol, orto (oCP), meta (mCP) e paraclorofenol (pCP) em *T. cutaneum* (NEUJAHN e GAAL, 1979).

Substrato primário	Atividade Enzimática Relativa	
	Fenol hidroxilase	catecol 1,2 dioxigenase
fenol	100	100
oCP	10	≤ 1
mCP	26	≤ 1
pCP	29	≤ 1

A mineralização de furfural (Figura II.1 D) por *T. cutaneum*, imobilizada em grãos de celulose, foi estudada por IVANOVA e IOTOVA (1993). As células imobilizadas foram inoculadas em fermentador em meio mineral e, após 1,5 horas de incubação, 627 mg/L de furfural foram adicionadas. Com 4 horas de incubação, uma nova carga de furfural foi dada, elevando a concentração de furfural a 940 mg/L. Ao final de 8 horas 150 mg/L de furfural restavam no meio, sendo a degradação de 84%.

T. beigelii é capaz de mineralizar éter bifenílico (Figura II.1 B), sendo o primeiro passo da degradação biológica uma monooxigenação resultando na mistura de éter 4-hidroxibifenílico éter 2- hidroxibifenílico e éter 3- hidroxibifenílico (48:47:5). No próximo passo da degradação, há formação do éter 3,4 dihidroxibifenílico O produto característico da clivagem do anel aromático é o ácido 2-hidroxi-4-fenoximucônico. O mecanismo da clivagem do anel para estes compostos ainda é discutido (SCHAUER et al, 1995).

MACGILLIVRAY e SHIARIS (1993), relataram que após 120 horas de incubação, *Trichosporon penicillatum* é capaz de biotransformar fenantreno (Figura II.1 E) numa relação de 8,15

$\mu\text{mol/g}$ de células. Os mesmos autores acreditam, que em função dos bons resultados encontrados na literatura e pela demonstração independente do potencial de degradação de fenantreno, leveduras do gênero *Trichosporon* podem ser utilizadas como modelo para a utilização em tecnologias de biorremediação.

II.2 Vias metabólicas de compostos aromáticos

Grande número de compostos aromáticos são convertidos por bactérias a catecol e protocatecuato (GOTTSCHALK, G., 1988), que são chamados "substratos de partida" (starting substrates). Estes intermediários sofrem posteriores oxidações que levam a ruptura do anel aromático. As figuras II.2 A e II.2 B mostram as estruturas de alguns compostos que são degradados através da formação de substratos de partida.

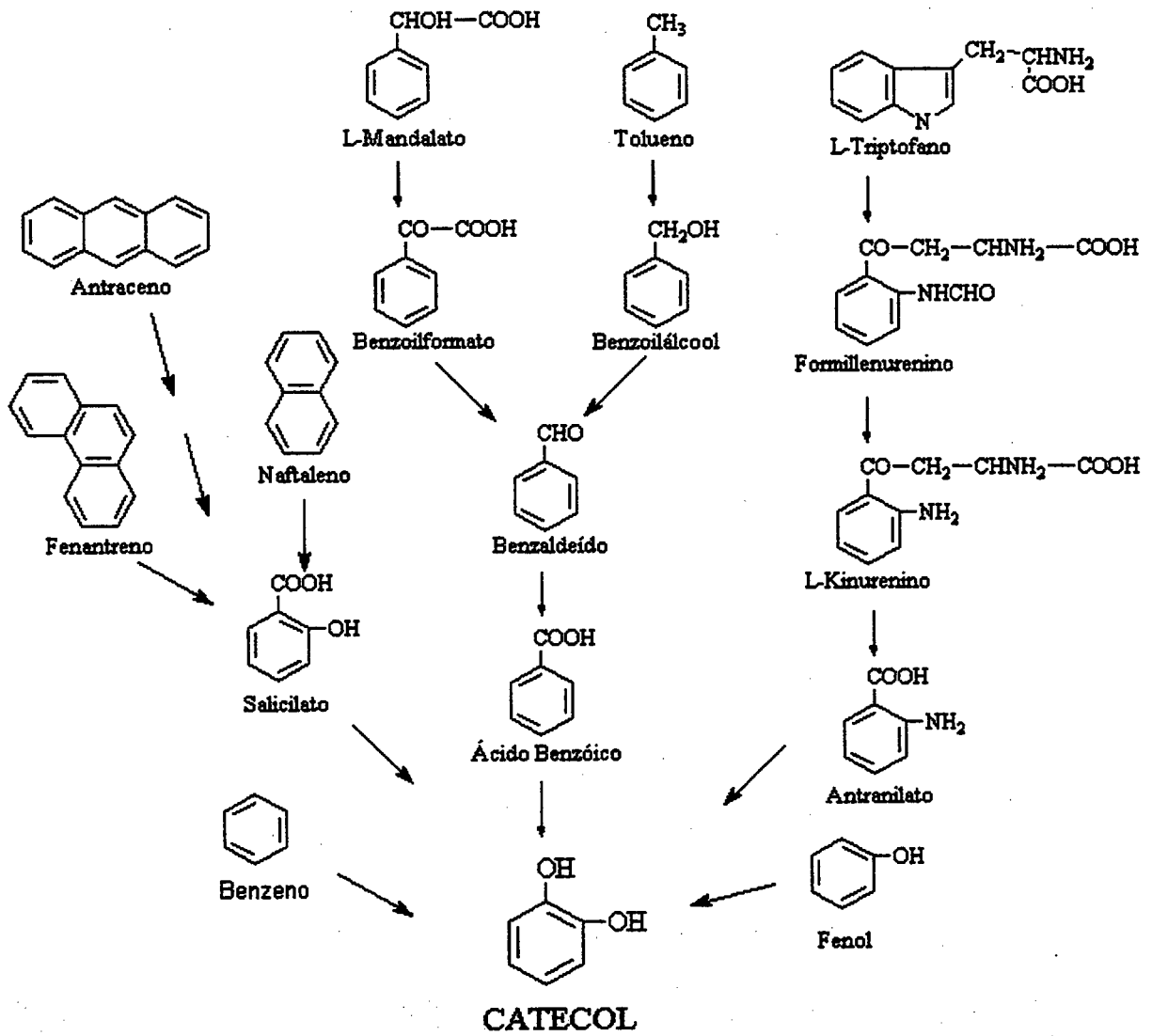


FIGURA II.2 A - COMPOSTOS AROMÁTICOS QUE, QUANDO OXIDADOS BIOLÓGICAMENTE, SÃO LEVADOS A **CATECOL**.

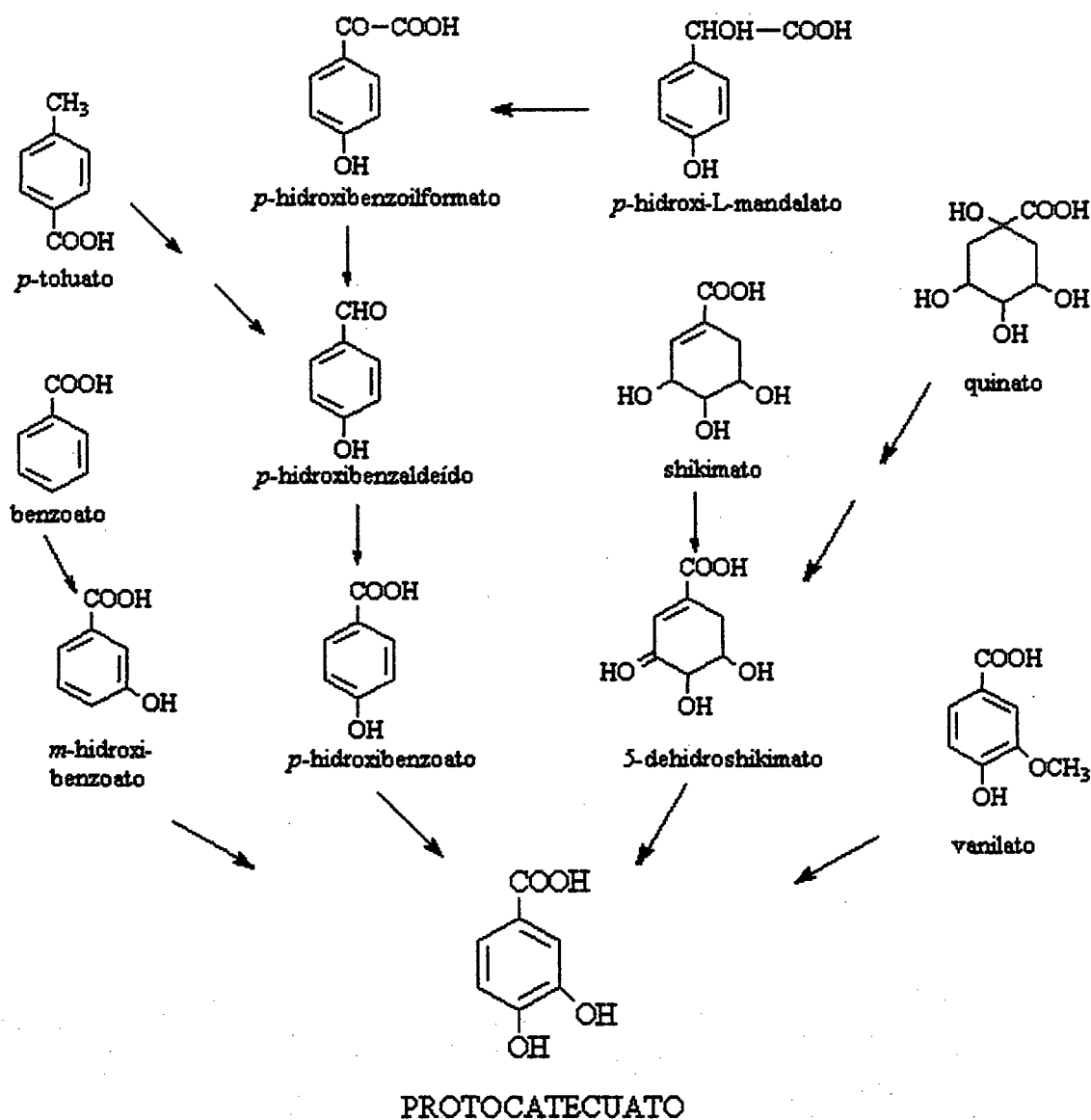


FIGURA II.2 B - COMPOSTOS AROMÁTICOS QUE QUANDO OXIDADOS BIOLÓGICAMENTE SÃO LEVADOS A **PROTOCATECUATO**.

A metabolização de compostos aromáticos pela via do catecol ocorre em duas vias catabólicas diferentes, a *orto* e a *meta*-clivagem. A *orto*-clivagem, assim chamada pois o ponto de ruptura do anel é na posição *orto* em relação a hidroxila, é a via metabólica utilizada por *T. cutaneum* quando a única fonte de carbono é o fenol (representada na figura II.3) (GAAL e NEUJHR, 1979). A degradação do fenol inicia-se com uma hidroxilação,

seguido da fissão do anel na posição orto, referente as hidroxilas. Após estas etapas ocorre a lactonização fornecendo mucanolactona e uma delactonização ao 3-oxoadipato.

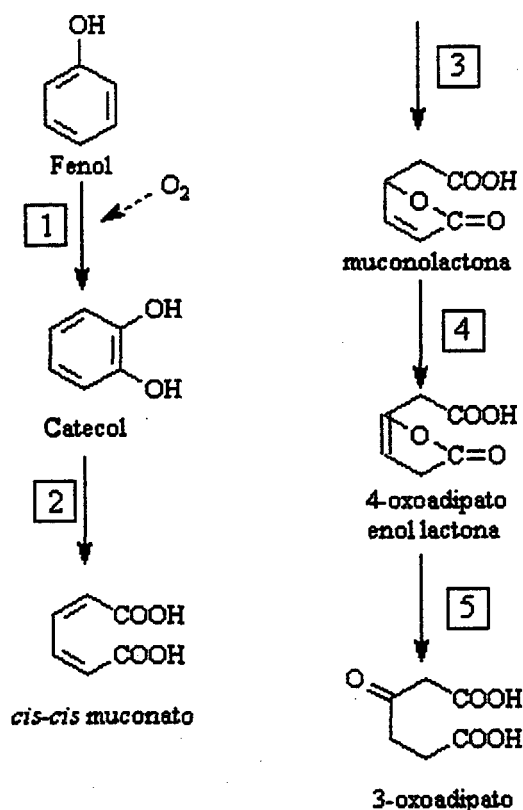


FIGURA II.3 - VIA METABÓLICA PARA O FENOL EM *T. BEIGELII*. OS NÚMEROS NAS SETAS INDICAM A ENZIMA QUE CATALISA A REAÇÃO. (1) - FENOL HIDROXILASE, (2) - CATECOL 1,2 OXIGENASE, (3) - CIS,CIS MUCONATO LACTONASE (4) - MUCONOLACTONA ISOMERASE (5) - ENOL LACTONA HIDROLASE.

O protocatecuato pode sofrer três tipos de abertura do anel aromático e estas são catalisadas por três enzimas diferentes. A protocatecuato 2,3 dioxigenase, que catalisa a reação de quebra da ligação C2-C3, a protocatecuato 3,4 dioxigenase, que catalisa a reação de ruptura da ligação C3-C4, e a protocatecuato 4,5 dioxigenase, que é responsável pela reação que leva à quebra da ligação C4-C5. Um esboço das três possíveis rupturas de anel que o protocatecuato pode sofrer é apresentado na Figura II.4.

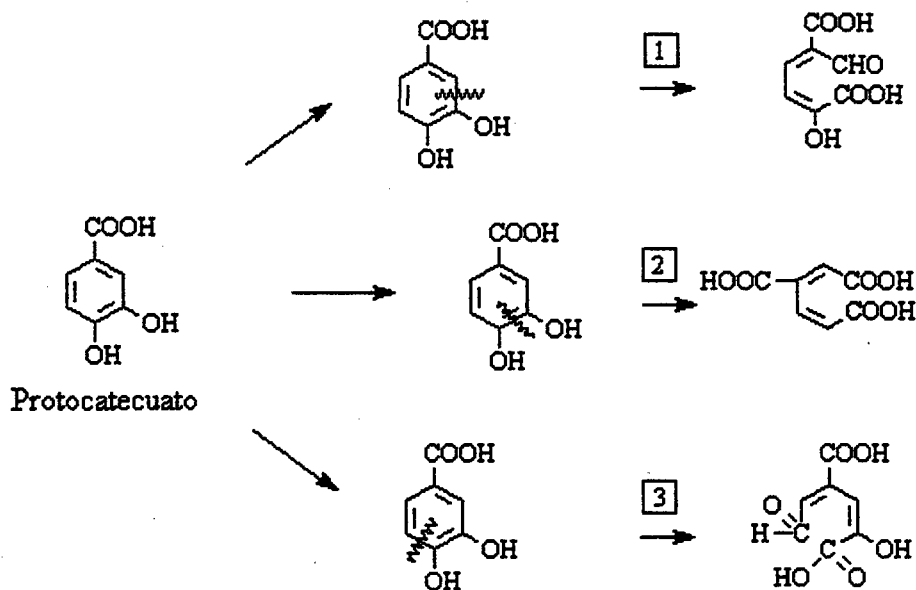


FIGURA II.4 - TRÊS DIFERENTES RUPTURAS DE ANEL QUE O PROTOCATECUATO PODE SOFRER. A LINHA ONDULADA REFERE-SE AO PONTO DE RUPTURA DO ANEL E OS NÚMEROS REFEREM-SE AS ENZIMAS QUE ATUAM NA REAÇÃO. 1 - PROTOCATECUATO 2,3 DIOXIGENASE, 2 - PROTOCATECUATO 3,4 DIOXIGENASE E 3 - PROTOCATECUATO 4,5 DIOXIGENASE.

Os compostos orgânicos halogenados constituem um grande grupo de poluentes devido a sua aplicação como herbicidas, inseticidas, fungicidas, solventes, fluidos hidráulicos, isolantes térmicos etc. Por causa da sua toxicidade e persistência, a distribuição onipresente dos compostos halogenados na biosfera tem causado discussão no que diz respeito aos efeitos que tais compostos podem causar no ambiente e, conseqüentemente na qualidade de vida. (FETZNER e LINGENS, 1994).

A recalcitrância destas substâncias está relacionada com o número, tipo e posição do halogênio substituinte. Como regra geral, a ligação entre o carbono e o halogênio é considerada como altamente recalcitrante, sendo esta recalcitrância diretamente proporcional a eletronegatividade do halogênio

substituente. Os compostos com um, dois ou até três substituintes halogenados são mais facilmente degradados que os compostos altamente clorados (FETZNER e LINGENS, 1994).

Em função da elevada toxicidade, os compostos halogenados vem sendo muito estudados. REINEKE e KNACKMUSS (1988), investigaram a degradação de 3 clorobenzoato utilizando *Pseudomonas* sp.. Um esboço da via metabólica pode ser visto na Figura II.5.

A degradação de 3 clorobenzoato, neste caso, passa por uma etapa, onde há a formação de clorocatecóis (2 e 3 clorocatecol) pela ação de dioxigenases. A formação de 1 e 2 cloromuconolactona, leva a perda espontânea do cloro, pois tais compostos são instáveis quimicamente.

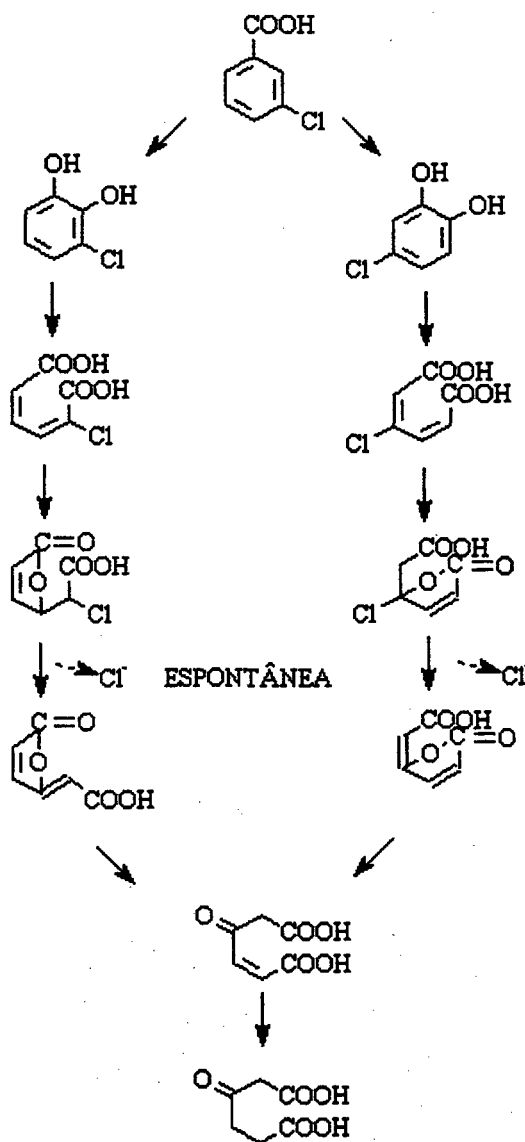


FIGURA II.5 - VIA DE DEGRADAÇÃO DE 3 CLOROBENZOATO POR *PSEUDOMONAS* SP.

O microrganismo *Alcaligenes* sp. é capaz de degradar 3 clorobenzoato em baixas concentrações de oxigênio. Porém, a via metabólica não passa pela formação de clorocatecóis, e sim pela formação de protocatecuato e gentisato. Um esboço desta via de degradação pode ser visto na Figura II.6 (KROONEMAN et all, 1996).

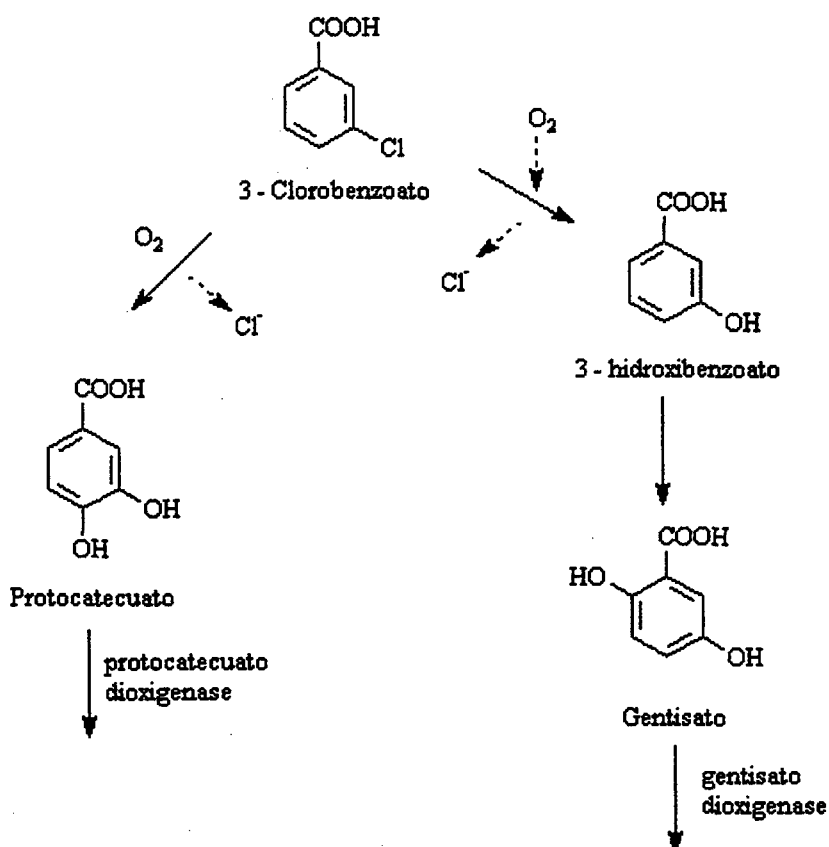


FIGURA II.6 - ESBOÇO DAS DUAS VIAS METABÓLICAS DE DEGRADAÇÃO DO 3 CLOROBENZOATO POR *ALCALIGENES*, LEVANDO A PROTOCATECUATO E GENTISATO.

Porém, na presença de oxigênio a degradação de 3 clorobenzoato ocorre via clorocatecóis, formados via ação de oxigenases (REINEKE e KNACKMUSS, 1988). Portanto, diferentes concentrações de oxigênio tem um papel importante na degradação de 3 clorobenzoato. Quando *Pseudomonas* sp. cepa B13 utiliza 3 clorobenzoato como fonte de crescimento, um acúmulo tóxico de clorocatecol ocorre quando a concentração de oxigênio é muito baixa (DORN e KNACKMUSS, 1978). Mais recentemente, descobriu-se, que em *Pseudomonas putida*, a indução da catecol 1,2 dioxigenase é amplamente reduzida quando se opera com baixas concentrações de oxigênio (VILIESID e LILLY, 1992).

A degradação de *paraclorofenol* por *Rhodotorula glutinis* foi investigada por KATAYAMA-HIRAYAMA, TOBITA e HIRAYAMA (1994), e

uma via metabólica similar ao da degradação de fenol por *T. cutaneum* foi observada, onde ocorre a clivagem do anel aromático na posição orto em relação a hidroxila, passando pela formação de clorocatecol. Um esboço deste mecanismo pode ser visto na Figura II.7.

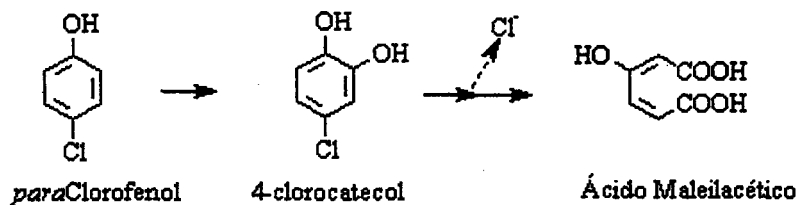


FIGURA II.7 - MECANISMO DE DEGRADAÇÃO DE PARA-CLOROFENOL POR *RHODOTORULA GLUTINIS*.

II.3 Substratos

Todos os substratos utilizados neste trabalho são caracterizados por sua alta toxicidade. Em processos industriais, onde há emissão de compostos aromáticos xenobióticos, há uma preocupação muito grande com relação a concentração dos aromáticos substituídos, pois estes podem vir a inviabilizar o processo de tratamento biológico.

Nos processos de gaseificação de carvão por exemplo, onde o gás gerado passa por uma lavagem com a finalidade de eliminar compostos nitrogenados e aromáticos, é comum a concentração de compostos aromáticos substituídos na água de lavagem ser elevada. Neste caso, uma das formas de resolver o problema é diluir o efluente, elevando o custo de tratamento, pois o volume de água chega a ser duas vezes maior que o volume de efluente gerado.

Como já citado anteriormente, a toxicidade e a recalcitrância de compostos haloaromáticos se deve ao halogênio ligado ao anel aromático. A persistência dos compostos

aromáticos depende da localização do halogênio na molécula, do tipo do halogênio envolvido e da extensão da halogenação (FETZNER e LINGENS, 1994).

Existem muitas áreas de interesse no campo da degradação microbiana de compostos aromáticos clorados. Um panorama destas áreas pode ser visto na Figura II.8 (SAHASRABUDHE e MODI, 1987).



FIGURA II.8 - ÁREAS DE INTERESSE NO CAMPO DA "DEGRADAÇÃO MICROBIANA DE COMPOSTOS AROMÁTICOS CLORADOS".

II.3.1 Paraclorofenol

São poucos os microrganismos capazes de degradar organoclorados, e a degradação destes compostos extremamente recalcitrantes geralmente é feita por um consórcio de microrganismos, onde cada um é responsável por uma ou mais etapas da degradação. Porém, existem casos onde algumas espécies de microrganismos tem a capacidade de degradar totalmente alguns organoclorados, levando a sua mineralização.

KATAYAMA-HIRAYAMA, TOBITA e HIRAYAMA (1994), trabalhando com a levedura *Rhodotorula glutinis*, pré-adaptada em fenol (1 mM) e orto, meta e paraclorofenol (0,2 mM), observaram, que após 24 horas de incubação o paraclorofenol era totalmente degradado, e a descloração era completa.

KOROL *et al* (1991) trabalhando com cepas do gênero *Pseudomonas* (isoladas de rios da região de Buenos Aires) pré-inoculadas em paraclorofenol (50-100 mg/L), observaram que após 50 horas de incubação o percentual de degradação foi de 95,4 e 46,6% para as concentrações iniciais de 100 e 150 mg/L respectivamente. Ao tratar da influência do pH, os autores observaram que o aumento do pH leva a um aumento na degradação de paraclorofenol. Após 24 horas de incubação em pH 5,0 apenas 27,5% de paraclorofenol foi degradado enquanto que a pH 9,0 o percentual foi de 84,2. A degradação de paraclorofenol está ligada a sua dissociação, pois num pH 5,0, mais de 99% do paraclorofenol está na sua forma não-dissociada, enquanto que a pH 9,0 apenas 49,0% encontra-se não-dissociado.

ARBUCKLE e KENNEDY (1989), trabalhando com um sistema de lodo ativado, observaram que a velocidade de degradação de paraclorofenol decresce após este ser retirado da alimentação (alimentação composta por sais minerais, extrato de levedura, extrato de carne, bacto peptona e farinha de peixe), chegando em certos casos a ser nula. As velocidades de degradação eram

restabelecidas dois ou três dias depois de feita a realimentação de *paraclorofenol* no sistema.

A técnica de bioaumento, quando aplicada a sistemas contínuos de tratamento, revela bons resultados para efluentes que tem na sua composição *paraclorofenol*. Porém, há necessidade de células pré-adaptadas sempre, pois, há uma perda na habilidade de degradação de *paraclorofenol*. Outra particularidade, é que grande quantidade de células são necessárias para manter o bioaumento (KENNEDY, GRAMMAS e ARBUCKLE, 1990).

SHIMP e PFAENDER (1987), observaram que a degradação de *paraclorofenol*, *meta-cresol* e *aminofenol*, por uma cultura mista, pode ser sensivelmente melhorada quando ela é pré-adaptada com *fenol* em um sistema contínuo. A similaridade estrutural dos compostos aromáticos, podem levar estas estruturas a ter sistemas similares de transporte através da membrana, bem como similares vias catabólicas. Assim, a degradação de um substrato tóxico (*paraclorofenol*), pode ser melhorada se as células forem pré-adaptadas a um substrato de estrutura similar de menor toxicidade.

II.3.2 *Ortochlorofenol*

Assim como o *paraclorofenol*, o *ortochlorofenol* também é um substrato de difícil mineralização, e, em alguns casos realizada por consórcios de microrganismos.

A molécula de *ortochlorofenol* tem uma particularidade importante, que a diferencia muito dos isômeros *meta* e *para*. O *Ortochlorofenol* apresenta o cloro ligado ao carbono subsequente ao carbono ligado a hidroxila. Tal constituição dificulta a ação das hidroxilases (*fenol hidroxilase*), já que o primeiro passo para a degradação dos *monochlorofenóis* é, em geral, uma hidroxilação no carbono vicinal ao ligado a hidroxila (KATAYAMA-HIRAYAMA, TOBITA e HIRAYAMA, 1994). Os mesmos autores observaram

que a degradação de ortoclorofenol por *Rhodotorula glutinis*, adaptada em fenol a uma concentração de 1 mM e ortoclorofenol 0,2 mM, é sempre menor que a degradação de metaclorofenol e paraclorofenol, não ultrapassando 22%, nas condições experimentais escolhidas.

A mesma dificuldade em degradar ortoclorofenol apresentada por *Rhodotorula glutinis* também foi observada quando da utilização de um consórcio de microrganismos suplementado com uma cultura de *Alcaligenes* sp., ambos microrganismos degradadores de monoclorofenóis. Num reator de leito fixo, com consórcio de microrganismos juntamente com o *Alcaligenes* sp. suportados em vidro sinterizado, SCHÖLLHORN, STUCKI e HANSELMAN (1994) estudaram a degradação dos três monoclorofenóis alimentados juntamente. Os autores observaram que, tanto em condições limitantes, quanto em condições de excesso de oxigênio houve uma maior dificuldade em degradar ortoclorofenol que os outros dois clorofenóis.

Experimentos conduzidos em batelada, tendo como inóculo um consórcio de microrganismos, também comprovam a dificuldade da biodegradação do ortoclorofenol. O mesmo inóculo foi utilizado para degradar fenol, orto, meta e paraclorofenol, 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol. Em todos os casos, houve degradação total, exceto para orto e metaclorofenol, onde a degradação não passou de 75% para ambos (LU e TSAI, 1993).

II.3.3 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol

Os compostos aromáticos policlorados representam um importante grupo de poluentes que persistem em ambientes aeróbicos. Estes compostos, podem ser parcialmente degradados anaerobicamente, porém, não são mineralizados. Os produtos desta degradação parcial, por outro lado, tornam-se susceptíveis ao ataque de microrganismos aeróbicos. (FIELD et al 1995).

A presença de 2,4 Diclorofenol (como segunda fonte de carbono), acentua a degradação de ortoclorofenol em sistemas anaeróbios de degradação. Esta melhora é proporcional à concentração inicial de 2,4 Diclorofenol. A melhora na biodegradação de compostos recalcitrantes se deve a concorrente utilização da segunda fonte de carbono ou a formação de enzimas comuns, com ação em compostos diferentes. A presença de monoclorofenóis (orto, meta e paraclorofenol) retarda a degradação de compostos mais clorados como por exemplo 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol (LU e TSAI, 1993).

Estudos realizados comprovam que a associação dos processos anaeróbio e aeróbio, é um caminho eficiente para a degradação de 2,4,6 Triclorofenol. Um primeiro passo anaeróbio leva o 2,4,6 Triclorofenol a paraclorofenol, através de uma descloração redutiva. Nesta reação há a transferência de 2 elétrons e a perda do cloro na forma iônica colocando no lugar do halogênio um hidrogênio. Como o paraclorofenol é um substrato que é degradado preferencialmente em ambientes aeróbicos, um passo aeróbio subsequente é necessário para que haja mineralização total da molécula de 2,4,6 Triclorofenol (LaFOND e FERGUNSON, 1991). Na Figura II.9 pode-se observar um esboço dos processos anaeróbio e aeróbio acoplados.

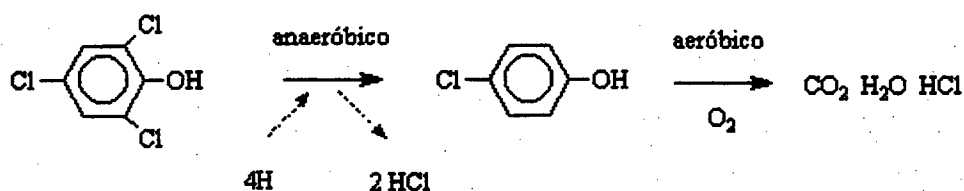


FIGURA II.9 - AÇÃO CONJUNTA DE PROCESSOS ANAERÓBIO E AERÓBIO NA MINERALIZAÇÃO DE DE 2,4,6 TRICLOROFENOL.

II.3.4 Pentaclorofenol

Pentaclorofenol (PCP) é um biocida com grande aplicação na agricultura e na indústria madeireira, para a preservação. Mais de 80% do pentaclorofenol produzido nos EUA é destinado a preservação de madeira. É considerado um poluente por causa da sua elevada toxicidade e sua persistência no solo (ARSENAULT, 1976).

STANLAKE e FINN (1982), utilizando bactérias do gênero *Arthrobacter* em culturas em batelada, com concentrações de pentaclorofenol variando entre 50 e 300 µg/L e temperatura de 30°C, mostraram que a velocidade específica de crescimento tem o seu máximo quando a concentração de pentaclorofenol é de 130 µg/L. Observaram também que a fase de adaptação (fase lag) é diretamente proporcional a concentração inicial de pentaclorofenol.

O mecanismo de degradação de aromáticos altamente clorados geralmente passa por uma dehalogenação redutiva. O mecanismo anaeróbico da dehalogenação redutiva é conhecido, e pode ser encontrado também em microrganismos aeróbios. De modo geral a degradação destes compostos é feita por consórcios de microrganismos (FETZNER e LINGENS, 1994).

No caso do pentaclorofenol, a bactéria estritamente aeróbia *Flavobacterium* sp. ATCC 39723, é capaz de degradá-lo. No mecanismo proposto para a degradação, o primeiro passo da dehalogenação é feito por uma PCP monoxigenase, conhecida por PcpB, que catalisa a formação de tetraclorohidroquinona. Nos passos subsequentes uma dehalogenase redutiva, dependente de glutatona, converte a tetraclorohidroquinona em 2,3,6 triclorohidroquinona, 2,6 diclorohidroquinona e em 2 clorohidroquinona. Um esboço deste mecanismo pode ser visto na Figura II.10 (XUN, TOPP e ORSER, 1992).

De modo geral, não existe uma regra relacionada a degradação de cloroaromáticos, o que existe são microrganismos que são "especialistas" em decompor determinados compostos. Algumas tendências podem ser observadas, O paraclorofenol de maneira geral, é mais facilmente degradado que o ortoclorofenol, porém isto não se consiste numa regra.

O mesmo acontece com os cloroaromáticos que tem dois ou mais cloros na molécula. Nada pode-se afirmar com relação a facilidade de degradação de 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol, são moléculas parecidas, e o fato do 2,4,6 Triclorofenol ter um cloro a mais na molécula não é suficiente para afirmar que ele sempre será degradado mais lentamente, ou é mais tóxico. O pentaclorofenol é um cloroaromático altamente clorado, e como já fora citado anteriormente a degradação deste composto em geral é realizada por um consórcio de microrganismos.

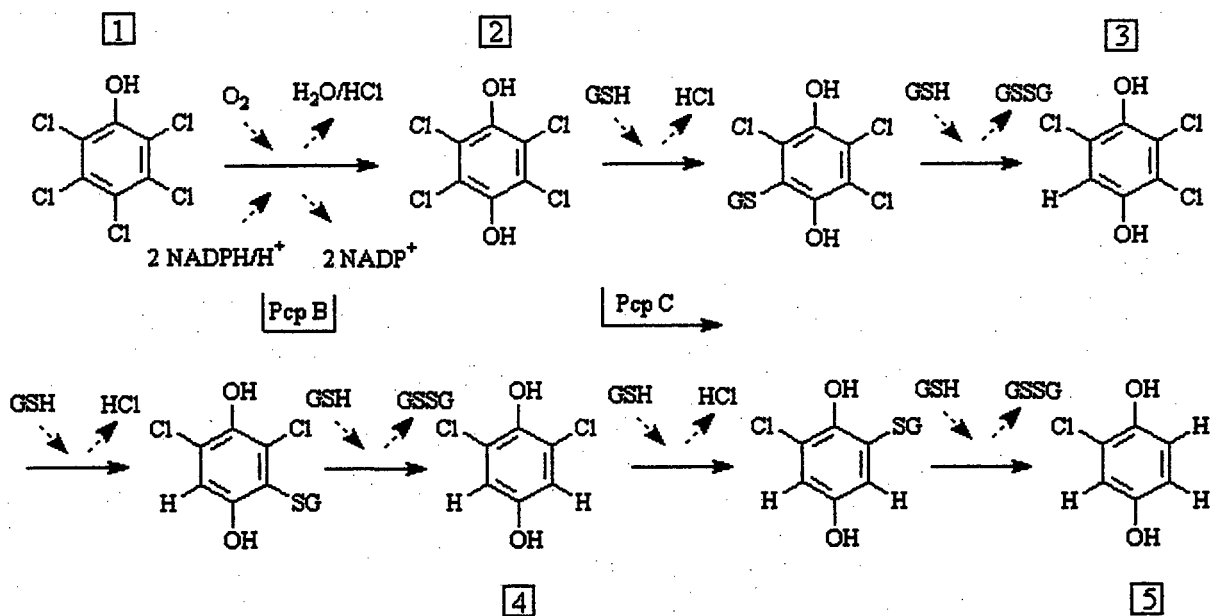


FIGURA II.10 - MECANISMO PROPOSTO PARA DEGRADAÇÃO DE PENTACLO-ROFENOL POR *FLAVOBACTERIUM SP.* ATCC 39723. 1 - PENTACLO-ROFENOL; 2 - TETRACLOROHIDROQUINONA; 3 - 2,3,6 TRICLOROHIDRO-QUINONA; 4 - 2,6 DICLOROHIDROQUINONA; 5 - 2 CLOROHIDROQUINONA. GSH - GLUTATIONA REDUZIDA, GSSG - GLUTATIONA DIMÉRICA OXIDADA.

III Materiais e Métodos

III.1 Substratos

III.1.1 Fenol

O fenol utilizado em todos os experimentos foi de grau de pureza P.A., da marca **Grupo Química**.

III.1.2 Clorofenóis

Os clorofenóis; ortoclorofenol (oCP - C_6H_4OHCl), paraclorofenol (pCP - C_6H_4OHCl), 2,4 Diclorofenol (2,4 DCP - $C_6H_3OHCl_2$), 2,4,6 Triclorofenol (2,4,6 TCP - $C_6H_2OHCl_3$) e Pentaclorofenol (PCP - C_6OHCl_5), todos com grau de pureza 99%, utilizados nos experimentos eram da marca **Aldrich Chemical Company Inc.**

III.1.3 Glicose

A glicose, utilizada no meio de ativação do microrganismo, foi a α -D(+)-glicose-monohidratada ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) da marca **Roth**.

III.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado em todos os experimentos foi a levedura *Trichosporon beigelii*, isolada pelo laboratório de Microbiologia Aquática da Universidade Federal de Santa Catarina, e proveniente de um sistema de tratamento de efluentes líquidos de gaseificação de carvão. A unidade de gaseificação de carvão é de propriedade da Cerâmica Eliane S/A situada no município de Cocal do Sul, Santa Catarina.

III.3 Meios de cultura

III.3.1 Meio de manutenção do microrganismo

O meio utilizado para a manutenção do microrganismo tinha a seguinte composição:

- Tryptic Soy Broth desidratado (TSB), 30 g/L da marca **DIFCO**;
- Ágar-Ágar, 15 g/L da marca **Merck**.

III.3.2 Meio mineral

O meio mineral foi preparado por diluição (1:10), e acrescido aos demais compostos para cada experimento. A solução de sais minerais tinha a seguinte composição (10 X concentrada):

	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,5
NaCl	1
MgSO ₄ *7H ₂ O	2
FeCl ₃	0,01
Kcl	2
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,1
K ₂ HPO ₄	50

O pH da solução era ajustado para 7,0.

III.3.3 Meio de ativação (G20YE05)

Meio utilizado para promover o crescimento de *T. beigelii* a partir do ágar inclinado. A composição do meio era a seguinte:

Glicose	20,0 g/L;
Extrato levedura	0,5 g/L;
Meio mineral	4 mL (descrito seção III.3.2).

III.3.4 Pré-inóculos

III.3.4.1 Pré-inóculo A

O pré-inóculo era composto pelo meio mineral (descrito na seção III.3.2), acrescido de 500 mg/L de fenol proveniente de uma solução estoque de 5 g/L do substrato em água.

III.3.4.2 Pré-inóculo B

Meio com composição idêntica ao pré-inóculo A (seção III.3.4.1), com a suplementação de 0,025 g/L de extrato de levedura, como fonte de vitaminas.

III.3.4.3 Pré-inóculo C

Meio com composição idêntica ao meio de ativação (seção III.3.3), suplementado com 40 mg/L de paraclorofenol, proveniente de uma solução estoque de 500 mg/L em etanol.

III.3.5 Meio contendo fenol como única fonte de carbono

A composição deste meio era idêntica ao pré-inocúlo A (seção III.3.4.1), com variações na concentração inicial de fenol. Para os ensaios realizados com suplementação de vitaminas, foi utilizado extrato de levedura na concentração de 0,025 g/L. As concentrações iniciais de fenol utilizadas foram 100, 200 e 500 mg/L.

III.3.6 Meio contendo paraclorofenol como única fonte de carbono

Este meio era composto pelo meio mineral (seção III.3.2) suplementado com diferentes concentrações iniciais de paraclorofenol. As concentrações iniciais de paraclorofenol utilizadas foram de 20, 50 e 100 mg/L.

III.3.7 Meio usado nos ensaios em condições de co-metabolismo

Os meios para ensaios em condições de co-metabolismo utilizados foram de composição idêntica ao pré-inóculo B (seção III.3.4.2.), onde, durante a fase logarítmica de crescimento da levedura, foram adicionados os co-sustratos (paraclorofenol e ortoclorofenol, nas concentrações iniciais de 50, 100 e 200 mg/L e 2,4 Diclorofenol, 2,4,6 Triclorofenol e pentaclorofenol na concentração inicial de 20 mg/L).

III.3.8 Meios usados nas biotransformações

Este meio era composto por meio mineral (descrito na seção III.3.2), tampão fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4) 50 mM/pH 7,0. Os substratos de biotransformação, fenol e paraclorofenol, foram adicionados na concentração inicial de 1000 mg/L e 200 mg/L, respectivamente.

III.3.9 Meios usados nos testes enzimáticos

O meio de crescimento para produção de biomassa nos testes enzimáticos de degradação de fenol foi o mesmo do pré-inóculo B (descrito na seção III.3.4.2).

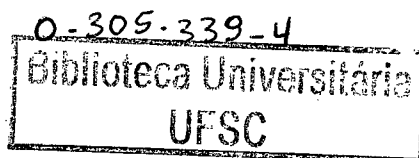
O meio destinado a produção de biomassa para a realização dos testes enzimáticos com paraclorofenol foi o mesmo do pré-inóculo C (descrito na seção III.3.4.3).

III.3.10 Tampões utilizados nos testes enzimáticos

III.3.10.1 Tampão para teste enzimático de catecol 1,2 dioxigenase

A composição do tampão para teste de atividade da catecol 1,2 dioxigenase utilizado foi a seguinte:

880 µL 100 mM de tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,0;



160 μ L 10 mM de EDTA;
120 μ L 1 mM de catecol

III.3.10.2. Tampão para teste enzimático de catecol 2,3 dioxigenase

A composição do tampão utilizado para o teste de atividade da catecol 2,3 dioxigenase foi a seguinte:

1040 μ L de 50 mM tampão tris/HCl pH 7,5;
40 μ L de 10 mM catecol;
10% v/v de acetona.

III.3.10.3 Tampão para teste enzimático de protocatecuato 2,3, protocatecuato 3,4 e protocatecuato 4,5 dioxigenases

A composição do tampão para teste da atividade enzimática da protocatecuato 2,3, protocatecuato 3,4 e protocatecuato 4,5 dioxigenases foi a seguinte:

150 μ L 33 mM tampão tris/HCl pH 8,0;
300 μ L protocatecuato;
1025 μ L água deionizada;

Um resumo dos principais meios utilizados em todos os experimentos é apresentado na Tabela III.1.

Tabela III.1 - Meios utilizados nos experimentos e suas composições.

Meio	Glicose	Extrato	Fenol	pCP
	(g/L)	Levedura (g/L)	(mg/L)	(mg/L)
Ativação (G20YE05)	20	0,5	-	-
Pré-inóculo A	-	-	500	-
Pré-inóculo B	-	0,025	500	-
Pré-inóculo C	20	0,5	-	40
Ensaio de co-metabolismo	-	0,025	500	*
Biotransformação do fenol	-	-	1000	-
Biotransformação do pCP	-	-	-	200
Teste enzimático para fenol	-	0,025	500	-
Teste enzimático para pCP	20	0,5	-	40

Todos os meios tinham na sua composição o meio mineral, descrito na seção III.3.2.

* - Concentrações iniciais de ortoclorofenol e paraclorofenol de 50, 100 e 200 mg/L e, para 2,4 Diclorofenol, 2,4,6 Triclorofenol e pentaclorofenol concentração inicial de 20 mg/L.

III.4 Equipamentos

III.4.1 Cromatógrafo HPLC e detector ultra violeta

O cromatógrafo, utilizado em todos as dosagens de substratos, foi da marca **Merck-Hitachi** modelo L-6200, acoplado a um detector ultra violeta marca **Merck-Hitachi** modelo L-4200 UV/visível.

III.4.2 Espectrofotômetro

As análises de absorvância, para determinação da concentração celular e dosagem de fenol e paraclorofenol, foram realizadas em espectrofotômetro da marca **Shimadzu UV 160-A**.

III.4.3 Centrífugas

Para amostras de pequeno volume (2 mL) foi utilizada uma centrífuga de mesa marca **Eppendorf** modelo 5415-C e, para volumes maiores uma centrífuga modelo Sorvall RC 28 S, marca **Du Pont Company**.

III.4.4 Incubadoras (Shakers)

Dois modelos de incubadoras foram utilizadas nos experimentos, uma rotatória marca **B. Braun Biotech International** e uma recíproca marca **New Brunswick Scientific Co. Inc.** modelo Series 250.

III.4.5 Cromatógrafo gasoso acoplado a espectroscopia de massa (GC-MS)

Os experimentos realizados com objetivo de determinar os metabólitos de fenol e paraclorofenol, foram analisados em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa da marca **VARIAN** Modelo **GC-MS MS 4 A Varian Star Injection 3600 TX**.

III.5 Métodos

III.5.1 Manutenção e conservação do microrganismo

A manutenção do microrganismo era realizada mensalmente por repique em tubos de ensaio com ágar inclinado, no meio Tryptic Soy Broth (de composição descrita na seção III.3.1). Os tubos eram incubados em estufa a 28°C até chegarem na fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 48 horas), e após eram conservados a 4°C.

III.5.2 Determinação da relação peso seco e absorbância

Os meios foram preparados conforme descrito na seção III.3.4.2. Serviram como inóculo células crescidas em meio G20YE05. Da cultura de células, durante a fase logarítmica de crescimento foram retiradas duas amostras. O experimento foi realizado utilizando amostras em duplicata.

Com a primeira foram realizadas diluições sucessivas (s/ diluição, 1:2, 1:4 e 1:8), e registradas as suas respectivas absorbâncias a 600 nm.

A segunda amostra serviu para determinação do peso seco. A amostra, de 20 mL, foi filtrada através de uma membrana de 0,45µm de porosidade, previamente seca e pesada, e lavada com 100 mL de água destilada. Após, a membrana foi secada em estufa por 20 horas a 105°C, e posteriormente pesada. A diferença entre peso final e o peso inicial da membrana dividido pelo volume da amostra resultou no peso seco da amostra.

Obtido o peso seco, foram realizadas divisões que coincidiam com as diluições realizadas nas amostras cujas absorbâncias foram medidas. A partir daí determinou-se a relação existente entre o peso seco e a absorbância.

A relação linear obtida foi a seguinte:

$$\text{Peso Seco (mg/L)} = 383,213 * \text{abs (600nm)} + 0,434 \quad R^2 = 0,9998$$

A Tabela III.2 mostra os valores de absorvância e peso seco que foram utilizados para construir o gráfico, mostrado na Figura III.1.

Tabela III.2 - Valores obtidos para determinação da relação entre absorvância e peso seco.

Diluição	Absorvância	Peso Seco (mg/L)
água	0,000	0,00
1:8	0,072	27,81
1:4	0,142	55,63
1:2	0,289	111,25
s/ diluição	0,580	222,50

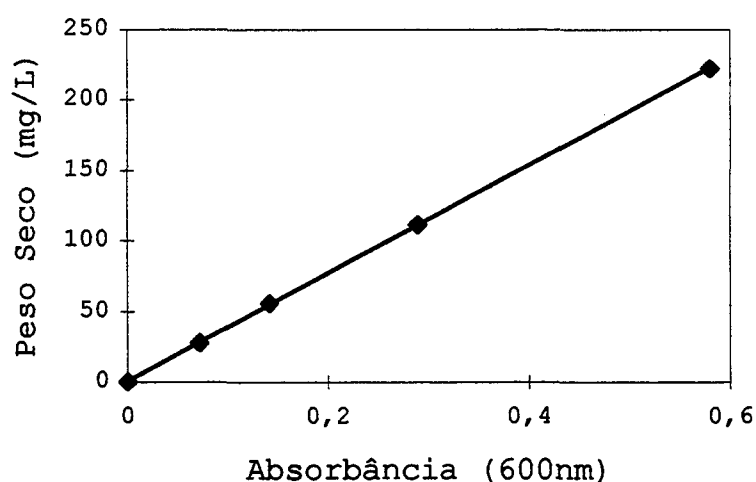


FIGURA III.1 - GRÁFICO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO ENTRE PESO SECO E ABSORVÂNCIA.

III.5.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular era monitorada de maneira indireta utilizando a relação existente com a absorvância. As amostras das culturas eram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, para posterior leitura da absorvância a 600 nm. O valor da absorvância era transformado diretamente em concentração celular através da relação determinada na seção III.5.2.

III.5.4 Metodologia utilizada nos experimentos

Todos os experimentos foram realizados nas seguintes condições:

- Temperatura de 28°C;
- pH 7,0 ± 0,1;
- Agitação de 150 rpm, realizada em shaker recíproco e rotatório;
- Frascos Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio, com excessão da ativação, que era realizada com frasco Erlenmeyer de 250 mL com 40 mL de meio.

Em todos os experimentos a ativação das células a partir do ágar inclinado foi realizada com o meio G20YE05 (descrito na seção III.3.3), por um período de 18 hs.

III.5.4.1 Experimentos tendo como fonte de carbono apenas um substrato

Nesta seção será descrita a metodologia adotada para os experimentos com fenol ou paraclorofenol como única fonte de carbono. Um esboço da metodologia utilizada é apresentada na Figura A.1 do Anexo A.

O pré-inóculo, com composições descritas nas seções III.3.4.1 e III.3.4.2, era inoculado com células provenientes do

meio de ativação (G20YE05) a uma taxa de 5%, e cultivadas por um período de 15 horas.

Os ensaios com uma única fonte de carbono, tinham, para o fenol, a composição descrita na seção III.3.5, e para o paraclorofenol, a composição descrita na seção III.3.6. As células foram incubadas até entrar na fase estacionária. Durante o experimento eram monitorados a concentração celular, através da densidade ótica, e a morfologia celular, através de observação por microscopia ótica.

III.5.4.2 Experimentos em condições de co-metabolismo

Nesta seção será apresentada a metodologia utilizada nos experimentos de co-metabolismo. Um esboço dos experimentos em condições de co-metabolismo é mostrado na Figura A.2 do Anexo A.

O pré-inóculo utilizado em todos os experimentos em condições de co-metabolismo foi o pré-inóculo B, descrito na seção III.3.4.2, com um inóculo de 5% proveniente do meio de ativação (G20YE05). O tempo de cultivo para este pré-inóculo foi de 15 horas.

Os ensaios de co-metabolismo foram realizados com o meio tendo fenol como substrato e o clorofenol como co-substrato, descrito na seção III.3.7. O inóculo utilizado para estes experimentos foi de 5%, e era proveniente do pré-inóculo. Os clorofenóis eram adicionados na fase logarítmica de crescimento. Durante os ensaios foram monitorados o crescimento celular, através da densidade ótica a 600 nm, e a morfologia celular. Os ensaios eram realizados até que as células entrassem na fase estacionária de crescimento.

III.5.4.3 Experimentos de biotransformação

Nesta seção será apresentada a metodologia utilizada nos experimentos de biotransformação de fenol e paraclorofenol. Na

Figura A.3 do Anexo A é mostrado um esboço da metodologia utilizada para os ensaios de biotransformação.

As células que serviram de inóculo para os experimentos de biotransformação foram cultivadas no meio de composição idêntica ao pré-inóculo B (descrito na seção III.3.4.2). A taxa de inoculação utilizada foi de 5%, proveniente do meio de ativação. O tempo de inóculo desta cultura foi de 12 horas. Após esta etapa, 10 frascos Erlenmeyer, com composição idêntica ao pré-inóculo B e com uma taxa de inoculação de 5%, foram cultivados por um período de 12 horas.

As células, separadas por centrifugação (5500 rpm/10 min/4°C), eram lavadas com água deionizada e resuspensas no meio utilizado para biotransformação, contendo os substratos (descrito na seção III.3.8), a uma taxa de 50%. Após 6 horas de incubação, o sobrenadante era separado das células por centrifugação (10 min/5500 rpm/4°C).

A totalidade do sobrenadante (100 mL), sofria uma preparação antes da injeção em GC-MS. O procedimento de preparação das amostras passava por três etapas distintas: extração, derivatização com agente sililante e análise de derivados da degradação por GC-MS.

A extração era realizada 2 vezes com 20 mL de acetato de etila, após acidificação do meio aquoso a pH 2 com ácido sulfúrico. A fase orgânica era secada com sulfato de sódio anidro, e após seca era realizada a evaporação do acetato de etila com auxílio de rotavapor a temperatura de 40 °C.

O resíduo da evaporação era resuspenso em 20 mL de diclorometano. O agente sililante utilizado para a realização da derivatização foi o N,O bis(trimetilsil)acetoamida a uma concentração de 50 mM. Um mililitro do agente sililante era adicionado em 9 mL da amostra, e a reação era realizada por 2 horas a temperatura de 25°C e intensa agitação.

Para análise em GC-MS, eram utilizados 5 µL de amostra derivatizada, que era injetada sob as seguintes condições:

Coluna capilar de sílica fundida (DB-5; 30m; 0,25 mm diâmetro). Temperatura inicial 50°C por 1 minuto, até 140°C a taxa de 25°C/min e de 140°C até 250°C a taxa de 5°C/min.

Um esboço dos espectros obtidos como resultado da biotransformação de fenol e paraclorofenol pode ser observado nas Figuras A.4 D e E do Anexo A.

III.5.4.4 Testes para avaliação da atividade enzimática

Para os testes enzimáticos de fenol, foi utilizado um meio de composição idêntica ao pré-inóculo B (descrito na seção III.3.4.2), com o inóculo de 5% proveniente do meio de ativação (G20YE05), e cultivado por 12 horas. O meio para os testes enzimáticos envolvendo fenol está descrito na seção III.3.9.

Os testes enzimáticos que tiveram paraclorofenol como substrato utilizaram o pré-inóculo C (descrito na seção III.3.4.3), com uma taxa de inoculação de 5%, proveniente do meio de ativação (G20YE05) e, o meio para o crescimento das células é descrito na seção III.3.9. Um esboço da metodologia utilizada para os testes enzimáticos é apresentada na Figura A.5. do Anexo.

Um rompimento celular se fez necessário, pois as enzimas que se desejava testar são intracelulares.

Após 12 horas de cultivo o experimento era cessado, e o meio era centrifugado para a eliminação do sobrenadante. As células eram resuspensas e lavadas em 20 mL de água destilada e colocadas em tubos Eppendorf e, nova centrifugação era realizada. O sobrenadante era descartado.

Às células eram adicionados 0,5 g de pérolas de vidro (ϕ 0,5-0,75 mm) e 0,5 mL de solução tampão (descritas na seção III.3.9). O rompimento celular era realizado por 5 minutos em um moinho de células, na máxima velocidade. Após este procedimento, os tubos de Eppendorf eram centrifugados e o sobrenadante (homogenato) era utilizado para testar a atividade das seguintes enzimas:

- a) Catecol 1,2 dioxigenase;
- b) Catecol 2,3 dioxigenase;
- c) Protocatecuato 2,3 dioxigenase;
- d) Protocatecuato 3,4 dioxigenase, e;
- e) Protocatecuato 4,5 dioxigenase.

a) Teste para avaliação da presença de catecol 1,2 dioxigenase

O método consiste em avaliar a formação do ácido *cis-cis* mucônico, produto da *orto*-clivagem do anel aromático, através da leitura da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (SAAR e RABINOVITCH, 1993).

O tampão utilizado para a realização deste teste enzimático foi descrito na seção III.3.10.1. O volume de homogeinato adicionado foi de 40 µL. Após feita a adição do homogeinato ao tampão, foi acompanhada a variação da absorbância com o tempo a 260 nm.

b) Teste para avaliação da presença de catecol 2,3 dioxigenase

O método consiste em avaliar a formação do 2 hidroximucônico semialdeído, produto da *meta*-clivagem do anel aromático, através de medidas da absorbância a 375 nm (SAAR e RABINOVITCH, 1993).

O tampão utilizado para a realização deste teste foi descrito na seção III.3.10.2. O volume de homogeinato adicionado ao tampão foi de 120 µL, a partir da adição foi observado a variação da absorbância com o tempo a 375 nm.

c) Teste para avaliação da presença de protocatecuato 2,3 dioxigenase

O princípio do teste baseia-se na avaliação da formação de 2-OH-5-carboxi-muconosemialdeído, acompanhando a variação da absorbância a 260 nm com o tempo (KROONEMAN *et al*, 1996).

O tampão utilizado para a realização deste teste foi descrito na seção III.3.10.3, e após a adição de 25 µL de homogeinato, proveniente do rompimento celular, foi realizada a leitura da absorbância a 260 nm.

d) Teste para avaliação da presença de protocatecuato 3,4 dioxigenase

A atividade da enzima protocatecuato 3,4 dioxigenase foi medida a 290 nm, onde o decréscimo na absorbância revela o consumo de protocatecuato e formação do ácido 3-carboxi-*cis-cis* mucônico (KROONEMAN *et al*, 1996).

O teste enzimático para a verificação da atividade da enzima protocatecuato 3,4 dioxigenase, foi realizado nas mesmas condições do teste da enzima protocatecuato 2,3 dioxigenase, no comprimento de onda de 290 nm.

e) Teste para avaliação da presença de protocatecuato 4,5 dioxigenase

A atividade da enzima protocatecuato 4,5 dioxigenase foi medida a 410 nm, onde o aumento na absorbância revela formação de 2-OH-4-carboxi-muconosemialdeído (KROONEMAN *et al*, 1996).

O teste enzimático para a verificação da atividade da enzima protocatecuato 4,5 dioxigenase, foi realizado nas mesmas condições do teste da enzima protocatecuato 2,3 dioxigenase, a exceção do comprimento de onda utilizado, que neste caso foi de 410 nm.

Na Tabela III.3 pode-se observar um resumo dos experimentos relativos a determinação da atividade enzimática.

Tabela III.3 - Resumo dos testes enzimáticos realizados, evidenciando o produto que era detectado e em que comprimento de onda era observado a formação do mesmo.

Enzima	Princípio Detecção do intermediário	λ *
catecol 1,2 dioxigenase	ácido <i>cis-cis</i> mucônico	260
catecol 2,3 dioxigenase	2 - hidroximucônico-semi-aldeído	375
protocatecuato 2,3 dioxigenase	2-OH-5-carboxi-muconosemi-aldeído	260
protocatecuato 3,4 dioxigenase	Ácido 3-carboxi <i>cis-cis</i> mucônico	290
protocatecuato 4,5 dioxigenase	2-OH-4-carboxi-muconosemi-aldeído	410

* - Valor do comprimento de onda (em nm) em que era realizado a detecção do produto formado.

Na Tabela III.4 pode-se observar a seqüência de inoculações que foram realizadas para cada experimento.

Tabela III.4 - Resumo dos experimentos, evidenciando o tipo de ativação e pré-inóculo utilizado para cada experimento.

Experimento	Pré-inóculo	%
		inoculação
Fenol como única fonte de carbono sem vitaminas	A	5
Fenol como única fonte de carbono com vitaminas	B	5
paraclorofenol como única fonte de carbono	C	5
Co - metabolismo	B	5
Biotransformação de fenol	B	50*
Biotransformação de paraclorofenol	B	50*
Teste enzimático para fenol	B	5
Teste enzimático para paraclorofenol	C	5

Todas as ativações foram realizadas com o meio G20YE05, descrito na seção III.3.3.

* - A taxa de inoculação de 50% era obtida através da produção de biomassa em 10 frascos Erlenmeyer de 500 mL.

III.5.5 Determinação da concentração de compostos aromáticos por espectrofotometria com luz ultravioleta.

As amostras submetidas a análise de concentração de aromáticos via espectrofotometria com luz ultravioleta, são isentas de extrato de levedura, que causa interferência na leitura da absorbância.

III.5.5.1 Fenol

As amostras eram centrifugadas por 10 minutos e 12000 rpm, com o objetivo de eliminar as células do meio. O sobrenadante foi retirado e servia para determinação de fenol. A amostra era devidamente diluída e separada em duas aliquotas de 1 mL. Em uma aliquota era adicionado uma gota de ácido clorídrico 5N e na outra, 1 gota de hidróxido de sódio 10N. A primeira servia como padrão (zero do equipamento) e com a segunda era realizada a medida da absorbância. A concentração de fenol era obtida com a leitura da absorbância a 233 nm, confrontado com a curva padrão. Este método foi adaptado ao método desenvolvido por KENNEDY, GRAMMAS e ARBUCKLE, (1990).

A equação da curva de calibração do fenol obtida foi:

$$\text{Fenol (mg/L)} = 10,858 \cdot \text{abs (233nm)} + 0,426 \quad R^2 = 0,9975,$$

e a Figura III.2 mostra a relação linear encontrada.

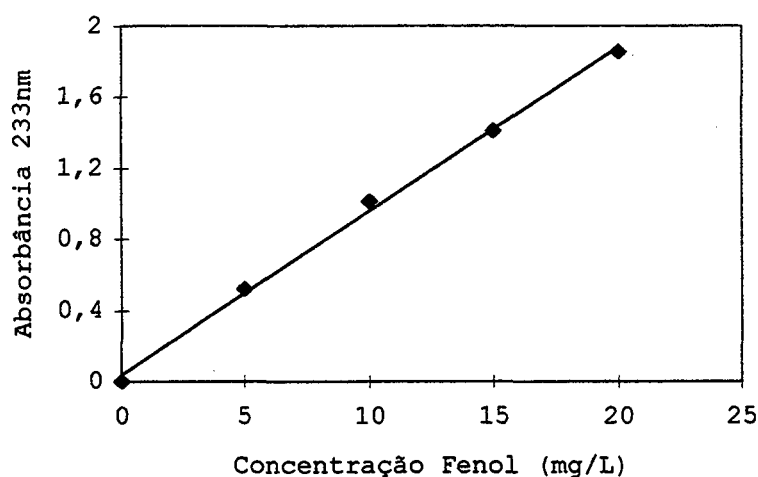


FIGURA III.2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO FENOL VIA LUZ ULTRAVIOLETA.

III.5.5.2 Paraclorofenol

O procedimento para determinação de paraclorofenol foi análogo ao descrito por KENNEDY *et al* (1990), com a adaptação no comprimento de onda utilizado, ao do valor da absorbância ser obtida pela diferença entre 241 e 345 nm fora utilizado a diferença entre 243 e 345 nm.

A equação da curva de calibração do fenol obtida foi:

$$\text{paraclorofenol (mg/L)} = 12,520 \cdot \text{abs (241nm)} + 0,485 \quad R^2 = 0,9989,$$

e a Figura III.3 mostra a relação linear encontrada.

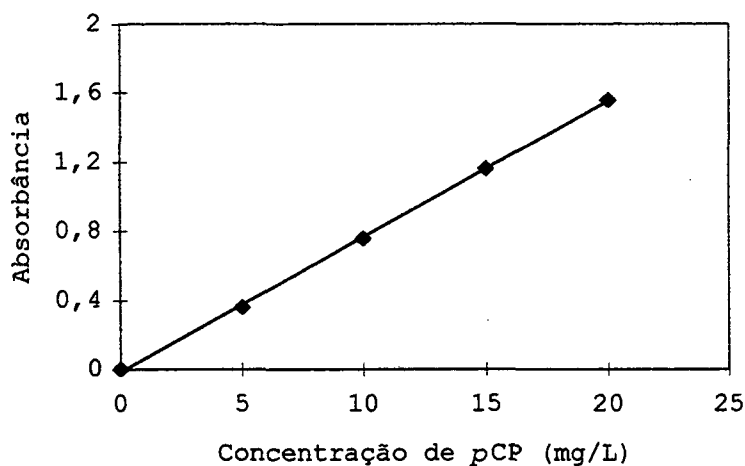


FIGURA III.3 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO PARACLOROFENOL VIA LUZ ULTRAVIOLETA.

III.5.6 Dosagem de compostos aromáticos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Antes da injeção em HPLC, as amostras eram centrifugadas (10min./12000 rpm), e posteriormente filtradas em filtro com porosidade de 0,45 μm , para a retirada de possíveis materiais em suspensão. O volume de amostra injetado foi de 20 μL .

III.5.6.1 Dosagem de fenol e paraclorofenol

As condições para análise de amostras contendo fenol e paraclorofenol foram as seguintes:

Coluna LC 18 Tipo "Vertex Column" (250 X 4,6 mm²), Eluente Metanol/Acetato de Sódio 0,002 M 1:1 (v:v), fluxo isocrático de 0,7 mL/min, Temperatura 30°C Detector UV 280 nm.

III.5.5.2 Dosagem de fenol e ortoclorofenol

A metodologia utilizada para a dosagem de fenol e ortoclorofenol foi a mesma utilizada para a detecção de fenol e paraclorofenol (descrita na seção III.5.5.1).

III.5.6.3 Dosagem de fenol e 2,4 Diclorofenol

A metodologia usada para a dosagem de fenol e 2,4 Diclorofenol foi similar a utilizada na dosagem de fenol e paraclorofenol (seção III.5.5.1). A modificação feita foi a proporção do eluente utilizada, onde a relação metanol/acetato de sódio 0,002 M foi de 1,5:1 (v:v).

III.5.6.4 Dosagem de fenol e 2,4,6 Triclorofenol

A dosagem de fenol e 2,4,6 Triclorofenol foi realizada sob as seguintes condições:

Coluna LC 8 (150 X 4,6 mm²), Eluente Metanol 1% Ácido Acético/Água 1% Ácido Acético com gradiente de 35:65 a 100:0 (v:v) em 18 minutos retornando a 35:65 (v:v) em 3 minutos com fluxo de 1,5 mL/min, Temperatura 30°C Detector UV 280 nm.

III.5.6.5 Dosagem de fenol e pentaclorofenol

A detecção de fenol e pentaclorofenol foi realizada sob as seguintes condições:

Coluna LC 8 (150 X 4,6 mm²), Eluente Metanol 1% Ácido Acético/Água 1% Ácido Acético com gradiente de 35:65 a 100:0 (v:v) em 15 minutos retornando a 35:65 (v:v) em 3 minutos com fluxo de 1,5 mL/min, Temperatura 30°C Detector UV 280 nm.

IV Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios realizados. As Tabelas com os resultados experimentais e os cálculos adicionais são mostrados nos Anexos B - Resultados Experimentais e C - Memória de Cálculo.

IV.1 Crescimento de *T. beigelii* em uma única fonte de carbono

IV.1.1 Fenol como única fonte de carbono

Neste item são discutidos dois ensaios tendo fenol como única fonte de carbono. O objetivo destes experimentos foi verificar a capacidade de *Trichosporon beigelii* degradar fenol, bem como avaliar a influência da presença de uma fonte de vitaminas no meio. O crescimento de *T. beigelii* depende da presença de algumas vitaminas (seção IV.1.1.2). Para suprir esta exigência o extrato de leveduras foi utilizado como fonte de vitaminas. Os resultados são mostrados no Anexo B, nas Tabelas B.1 e B.2.

IV.1.1.1 Fenol como única fonte de carbono na ausência de vitaminas

O crescimento de *T. beigelii* nas três diferentes concentrações iniciais de fenol testadas é mostrado na Figura IV.1. *T. beigelii* cresceu em fenol e, não foi observado nenhum tipo de inibição pelo substrato até a concentração de 500 mg/L.

Algumas particularidades a respeito do crescimento da levedura podem ser evidenciadas. Durante a fase de latência as células apresentavam um formato oval. Na fase exponencial as células iniciavam o processo de duplicação e a morfologia era alterada. Foi observada a formação de uma fissura no meio da

célula, que separava duas células de formato oval. Na fase estacionária as células tinham um formato esférico.

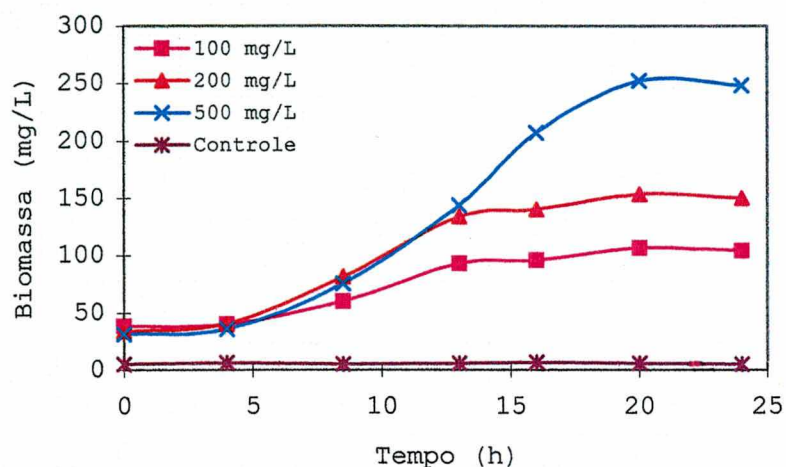


FIGURA IV.1 - CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* EM FENOL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E O MEIO MINERAL SEM COMPLEMENTO DE DE VITAMINAS. A LEGENDA MOSTRA AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL.

A levedura apresentou uma fase de latência de aproximadamente 5 horas para as três concentrações de fenol testadas. A fase logarítmica teve duração diferenciada, para as concentrações de 100 e 200 mg/L de fenol a duração foi de 10 horas e para a concentração de 500 mg/L de fenol a duração foi de 15 horas.

Na Figura IV.2 pode-se observar a degradação de fenol por *T. beigelii* nas três concentrações iniciais testadas. O tempo necessário para que metade da concentração inicial fosse degradada (τ) foi avaliado para as três concentrações iniciais testadas. Os valores de τ encontrados foram 6,2, 8,0 e 11,0 horas para as concentrações iniciais de 100, 200 e 500 mg/L respectivamente.

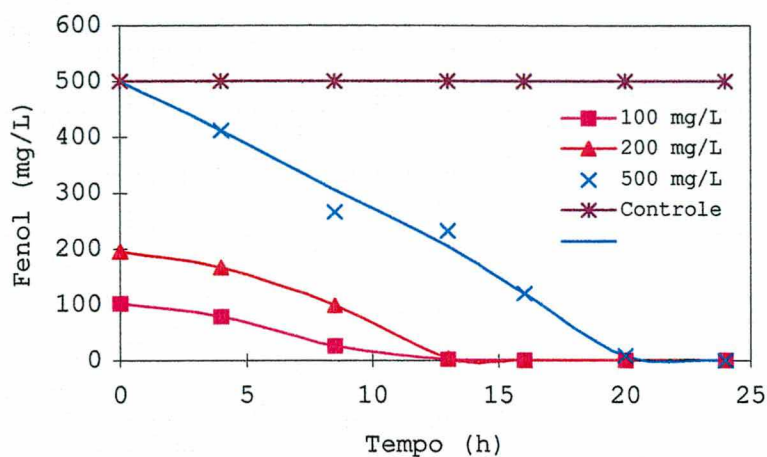


FIGURA IV.2 - DEGRADAÇÃO DE FENOL POR *T. BEIGELII*. A LEGENDA MOSTRA AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL.

IV.1.1.2 Fenol como única fonte de carbono na presença de vitaminas

T. beigelii, para o seu crescimento, depende da presença de vitaminas como biotina, riboflavina e tiamina (SCHAUER, 1996, COMUNICAÇÃO PESSOAL). Portanto, foram realizados ensaios na presença de uma fonte de vitaminas (extrato de levedura), afim de avaliar o crescimento da levedura, e, a degradação de fenol. Na Figura IV.3 pode-se observar o crescimento de *T. beigelii* nas três concentrações iniciais de fenol e na presença de extrato de levedura.

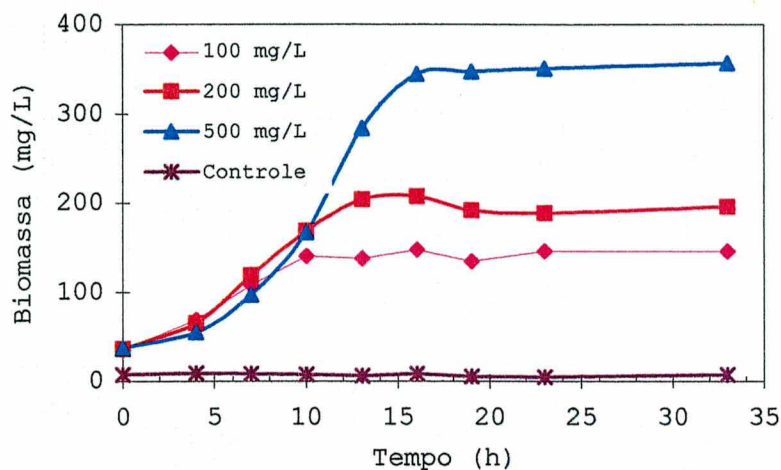


FIGURA IV.3 - CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL, TENDO EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE DE VITAMINAS.

A degradação de fenol pode ser observado na Figura IV.4. Os valores de τ encontrados para as concentrações iniciais de 100, 200 e 500 mg/L de fenol foram respectivamente, 3,8, 6,0 e 9,2 horas.

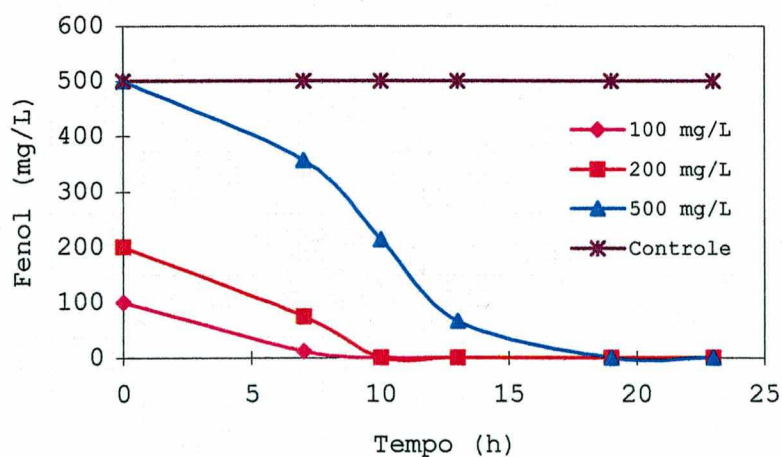


FIGURA IV.4 - DEGRADAÇÃO DE FENOL POR *T. BEIGELII*, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE FENOL.

Um comparativo entre os dois experimentos se faz necessário. Os parâmetros utilizados para a comparação são o τ , tempo

necessário para que 50% do substrato fosse degradado, e a formação da biomassa (ΔX). O τ foi obtido graficamente e a formação da biomassa foi obtida pela diferença entre a concentração final e inicial de microrganismos em cada experimento. Um exemplo de como foram realizados os cálculos para obtenção de ΔX e a obtenção de τ é mostrado no Anexo C, nas seções C.1 e C.2 respectivamente.

Na Tabela IV.1 pode-se observar um comparativo entre os experimentos com fenol, na presença e ausência de fonte de vitaminas.

Tabela IV.1 - Valores de ΔX e τ para as diferentes concentrações iniciais de fenol, para os experimentos na presença e ausência de fonte de vitaminas.

Concentração inicial de fenol (mg/L)	ΔX (mg/L)		τ (h)	
	Sem vitaminas	Com vitaminas	Sem vitaminas	Com vitaminas
100	67,1	111,1	6,2	3,8
200	118,2	159,0	8,0	6,0
500	219,2	318,8	11,0	9,2

Os experimentos que tiveram a suplementação de vitaminas no meio apresentaram valores de τ inferiores aqueles sem fonte de vitaminas. A biomassa formada foi superior nos experimentos que tiveram extrato de levedura como fonte de vitaminas no meio. Portanto, a suplementação com uma fonte de vitaminas proporciona um maior crescimento de *T. beigellii*, e uma diminuição no tempo de degradação de substrato (τ).

IV.1.2 Crescimento de *T. beigelii* em paraclorofenol como única fonte de carbono

A realização deste experimento teve por objetivo verificar a capacidade de *T. beigelii* de crescer em paraclorofenol como única fonte de carbono e energia. Foram utilizadas três concentrações iniciais de paraclorofenol, 20, 50 e 100 mg/L. Os resultados são mostrados nas Tabelas B.3.a e B.3.b do Anexo B.

Verificou-se que não houve crescimento celular. Portanto conclui-se que *T. beigelii* não é capaz de utilizar este substrato como única fonte de carbono e energia. Porém, foi constatada uma degradação parcial de paraclorofenol. Esta degradação foi provocada pela biomassa que serviu de inóculo. A Figura IV.5 mostra o perfil de crescimento de *T. beigelii* em paraclorofenol como única fonte de carbono para as três concentrações iniciais testadas.

A Figura IV.6 mostra a evolução da concentração de paraclorofenol com o tempo.

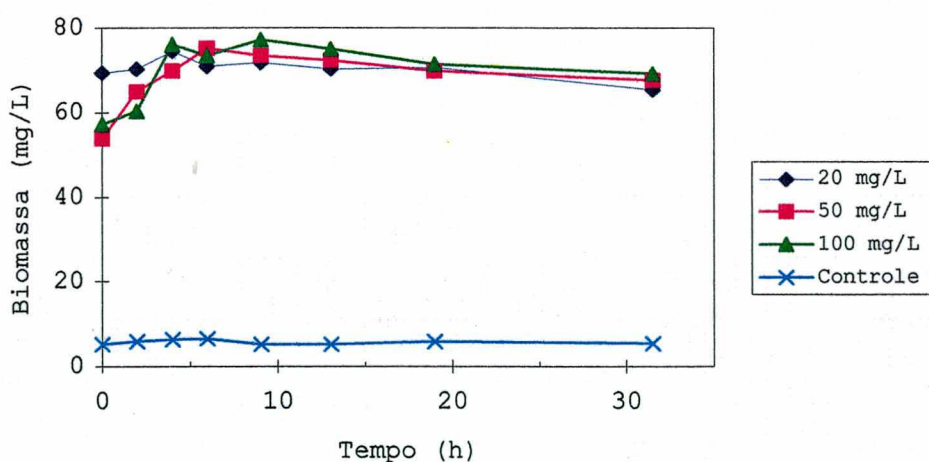


FIGURA IV.5 - CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* EM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE PARACLOROFENOL.

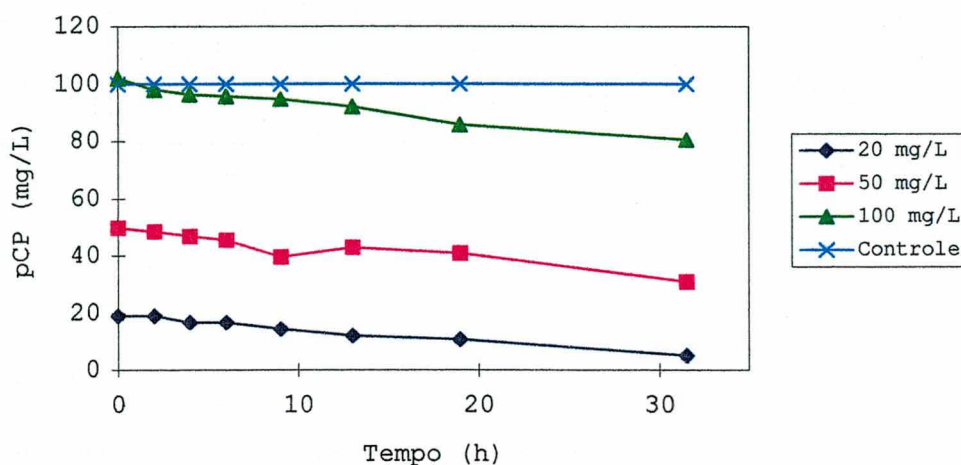


FIGURA IV.6 - DEGRADAÇÃO DE PARAFLOROFENOL POR *T. BEIGELII*.

A Tabela IV.2 mostra o percentual de degradação para as três concentrações iniciais de paraclorofenol testadas após 31,5 horas de incubação. Estes resultados indicam um efeito inibidor provocado pela presença do halogênio na molécula, evidenciando, que paraclorofenol pode ser considerado um composto recalcitrante para o microrganismo estudado.

Tabela IV.2 - Percentuais de degradação de paraclorofenol como única fonte de carbono por *T. beigelii*. Valores após 31,5 horas de incubação do microrganismo em meio mineral sem suplementação de vitaminas.

Concentração Inicial de pCP (mg/L)	% degradação
20	72,5
50	38,1
100	21,3

IV.1.3. Ensaio de biotransformação

Com o objetivo de identificar alguns metabólitos-chave nas vias catabólicas de fenol e paraclorofenol, foram realizados ensaios de biotransformação. A determinação dos metabólitos foi realizada em cromatografia gasosa acoplada em espectroscopia de massa (GC-MS) após extração da fração hidrofóbica com acetato de etila e posterior derivatização com um agente sililante (TMS). Nas Figuras A.4 A, B e C do Anexo A podem ser observados os espectros padrões derivatizados (com o agente sililante) do fenol, catecol e paraclorofenol respectivamente. Os espectros de massa das principais estruturas formadas após a derivatização também são mostradas.

IV.1.3.1. Biotransformação de fenol

Para a realização dos ensaios de biotransformação era necessário uma quantidade elevada de células. Esta quantidade foi obtida crescendo *T. beigelii* em 10 frascos Erlenmeyer de 500 mL tendo fenol como única fonte de carbono, meio idêntico ao pré-inóculo B (seção III.3.4.2). As células, recuperadas por centrifugação, serviram como biocatalisador do fenol, adicionado na concentração de 1 g/L. Após 6 horas de incubação, o sobrenadante era recuperado, feita uma extração da fase hidrofóbica, e, após a derivatização com agente sililante, a amostra era injetada em aparelho cromatógrafo gasoso acoplado a espectro de massa (GC-MS).

A Figura A.4 D do Anexo A mostra o espectro característico da biotransformação do fenol por *T. beigelii*. Nesta figura são indicados dois pontos. No primeiro tem-se o fenol derivatizado, e no segundo (7,5 minutos de injeção) o catecol derivatizado. Em seguida a Figura A.4 D tem-se os espectros de massa dos dois pontos citados.

A presença do catecol, na fase aquosa do meio de biotransformação, confirma os resultados obtidos por GAAL e

NEUJAHN (1979), onde os autores concluíram que *Trichosporon cutaneum* utiliza fenol como única fonte de carbono e a degradação ocorre via catecol, um substrato de partida, como foi descrito na seção II.2.

IV.1.3.2. Biotransformação de paraclorofenol

O procedimento apresentado na seção IV.1.2.1, também foi adotado para o ensaio de biotransformação do paraclorofenol, porém as células eram incubadas em um meio contendo 200 mg/L do substrato. A Figura A.4 E do Anexo A mostra um espectro característico da biotransformação do paraclorofenol por *T. beigelii*, e logo em seguida são mostrados os espectros de massa dos picos indicados na figura. Os dois picos indicados na figura referem-se ao paraclorofenol e o protococatecuato derivatizados. A seqüência de fragmentação proposta para o protococatecuato é mostrada na Figura A.4.F do Anexo A.

A presença do protococatecuato indica que a degradação do paraclorofenol ocorre segundo a via catabólica que passa por protococatecuato, outro substrato de partida (starting substrates) conforme apresentado na seção II.2.

Resultados semelhantes foram obtidos por KROONEMAM et al. (1996) na degradação de 3 clorobenzoato, por *Alcaligenes* sp., onde a via catabólica também passa por protococatecuato quando a concentração de oxigênio é baixa.

IV.2 Degradação de fenol e clorofenóis em condições de co-metabolismo por *Trichosporon beigelii*

Com o intuito de estudar a capacidade de *T. beigelii* de degradar substratos recalcitrantes na presença de um substrato mais facilmente assimilável, foram realizados ensaios em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e os clorofenóis como co-substratos.

A adição de uma fonte de carbono mais facilmente assimilável, e, com uma certa similaridade com os clorofenóis, em determinados casos aumenta a taxa de degradação (SHIMP e PFAENDER, 1987). Dois aspectos seriam favorecidos: a diminuição da relação existente entre a concentração dos clorofenóis e a concentração de microrganismos - o fenol seria responsável pelo crescimento do microrganismo e a possibilidade de haver enzimas em comum no sistema de degradação de fenol e dos clorofenóis.

As Tabelas, contendo os resultados experimentais dos experimentos em condições de co-metabolismo são mostrados no Anexo B - Resultados Experimentais.

IV.2.1. Crescimento de *T. beigelii* em fenol e paraclorofenol

O crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo, teve fenol como substrato, na concentração inicial de 500 mg/L. O co-substrato, paraclorofenol, foi adicionado nas seguintes concentrações iniciais: 50, 100 e 200 mg/L. As Tabelas B.4.a e B.4.b do Anexo B mostram os resultados deste experimento.

A Figura IV.7 mostra o crescimento de *T. beigelii* em fenol e nas três diferentes concentrações iniciais de paraclorofenol.

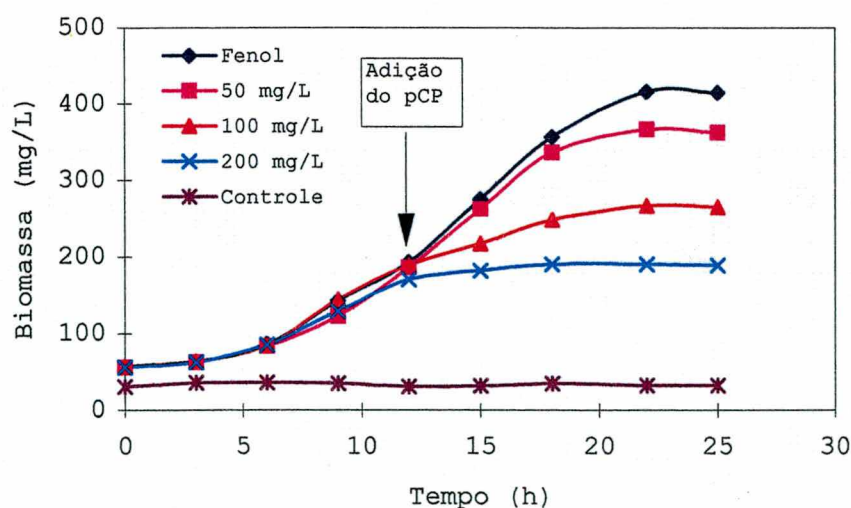


FIGURA IV.7 - CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO COMO SUBSTRATO FENOL E COMO CO-SUBSTRATO PARACLOROFENOL.

Em função da presença do *paraclorofenol*, o crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo apresentou inibição em relação ao crescimento somente com fenol. Matematicamente o percentual de inibição em biomassa final pode ser representado da seguinte maneira:

$$\% \text{ de inibiç ao} = \left(1 - \frac{X_{f,coS} - X_{adiç ao,coS}}{X_{f,f} - X_{adiç ao,f}} \right) * 100 \quad (1)$$

Na seção C.3 do Anexo C é mostrada a metodologia para o cálculo do percentual de inibição.

A inibição observada é diretamente proporcional à concentração inicial de *paraclorofenol*. O % de inibição em biomassa final para concentrações iniciais de 50, 100 e 200 mg/L de *paraclorofenol*, foi, respectivamente, 20,8, 65,4 e 91,4% em relação ao crescimento em fenol apenas.

Os valores de percentuais, de degradação do substrato e co-substrato, e de inibição na formação de biomassa em relação ao fenol são apresentados na Tabela IV.3.

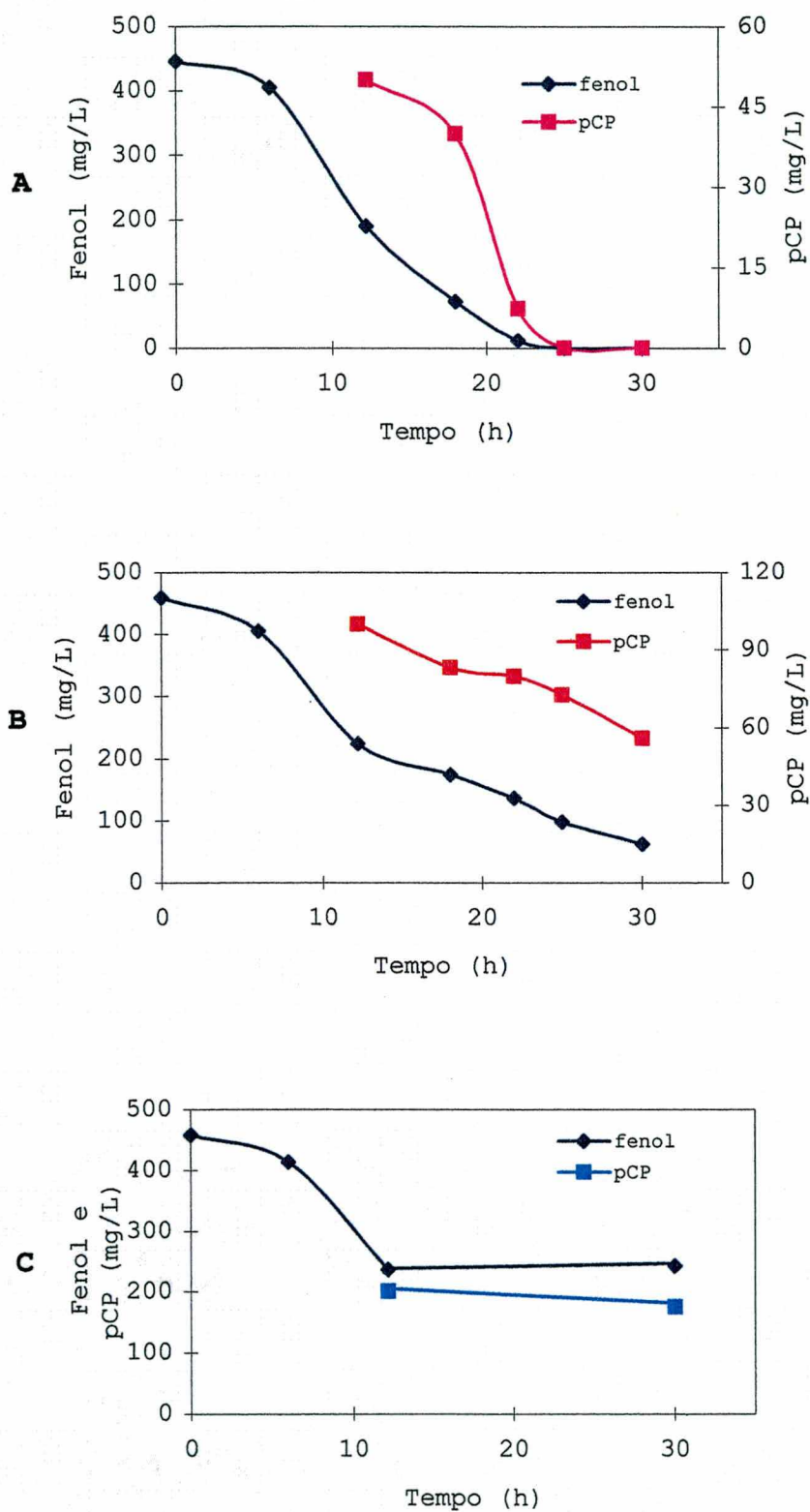


FIGURA IV.8 - DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARAFLOROFENOL POR *T. BEIGELII* EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO. CONCENTRAÇÃO INICIAL DE PARAFLOROFENOL DE 50 (A), 100 (B) E 200 MG/L (C).

O percentual de degradação de fenol e *para*clorofenol, diminuiu com o aumento da concentração inicial do co-substrato. Para a concentração inicial de 200 mg/L de co-substrato a degradação foi nula, assim como o crescimento da levedura (Figura IV.8).

As Figuras IV.8 A, B e C, mostram a variação da concentração de fenol e *para*clorofenol nas concentrações iniciais de 50, 100 e 200 mg/L de co-substrato respectivamente.

Tabela IV.3 - Valores percentuais de degradação de fenol e *para*clorofenol e inibição da formação de biomassa em relação ao fenol.

Concentração inicial de <i>para</i> clorofenol (mg/L)	% Degradação		% Inibição
	fenol	<i>para</i> clorofenol	
0	100	-	0
50	100	100	20,8
100	86,5	44,9	65,4
200	44,8	0	91,4

IV.2.2 Crescimento de *T. beigelii* em fenol e *orto*clorofenol

O crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo foi realizado com fenol na concentração de 500 mg/L, como substrato, e *orto*clorofenol, como co-substrato, nas concentrações iniciais de 50, 100 e 200 mg/L. O co-substrato foi adicionado ao meio 7 horas após o início do experimento. As Tabelas B.5.a e B.5.b o Anexo B mostram os resultados deste experimento.

Na Figura IV.9, pode ser observado o crescimento de *T. beigelii* nas três concentrações iniciais de ortoclorofenol testadas.

A concentração celular, monitorada de forma indireta através da densidade ótica, apresentou valores acima do previsto nos experimentos com concentração inicial de 50 e 100 mg/L de ortoclorofenol. Em função disso foi realizada a determinação do peso seco no final dos experimentos. Os resultados obtidos por ambas as metodologias são mostrados na Tabela IV.4.

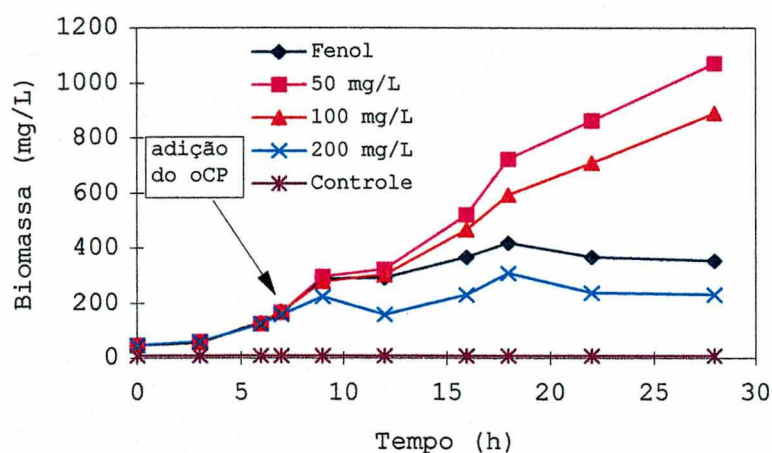


FIGURA IV.9 - CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO, TENDO COMO SUBSTRATO FENOL E COMO CO-SUBSTRATO ORTOCLOROFENOL. A LEGENDA INDICA A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE ORTOCLOROFENOL.

Tabela IV.4 - Valores de biomassa, obtidos por densidade ótica e por peso seco ao final do experimento, relacionado com a concentração inicial de ortoclorofenol.

Concentração Inicial fenol + oCP (mg/L)	Biomassa obtida por densidade ótica (mg/L)	Biomassa determinada por peso seco (mg/L)
500	379	393
500 + 50	1730	1823
500 + 100	1648	1446
500 + 200	239	228

Os valores de biomassa encontrados nos experimentos em condições de co-metabolismo nas concentrações de 50 e 100 mg/L de ortoclorofenol estão acima dos resultados esperados. Considerando uma concentração máxima de 600 mg/L de substratos (500 mg/L de fenol e 100 mg/L de oCP) e um rendimento de substrato em células de no máximo 100%, teríamos uma concentração de células de no máximo 600 mg/L. Esta condição, considerada limite, já que o rendimento de substrato em células para o fenol como única fonte de carbono na concentração inicial de 500 mg/L (seção IV.1.1.2) foi de 63,8%, ainda apresenta valores bem abaixo dos obtidos nos experimentos de co-metabolismo com ortoclorofenol como co-substrato.

Durante todo o experimento as culturas foram observadas em microscópio e nenhuma contaminação foi observada. Ao final dos experimentos foram realizados crescimentos em placas e não foram observadas contaminações. Assim pode-se concluir que o aumento de biomassa não foi provocado por contaminações.

A fixação de gás carbônico (CO₂) pela levedura na presença de uma fonte orgânica carbonácea é pouco provável.

A única hipótese sustentável para explicar este fenômeno seria um processo de entrada de sais constituintes do meio

(seção III.3.1.1) na célula, possivelmente provocada pelo co-substrato modificando a membrana.

Os perfis de degradação de fenol e ortoclorofenol, para as três concentrações iniciais do co-substrato testadas, são apresentados nas Figuras IV.10 A, B e C.

Os percentuais de degradação de fenol e ortoclorofenol por *T. beigelii*, ao final de 28 horas de experimento, são apresentados na Tabela IV.5.

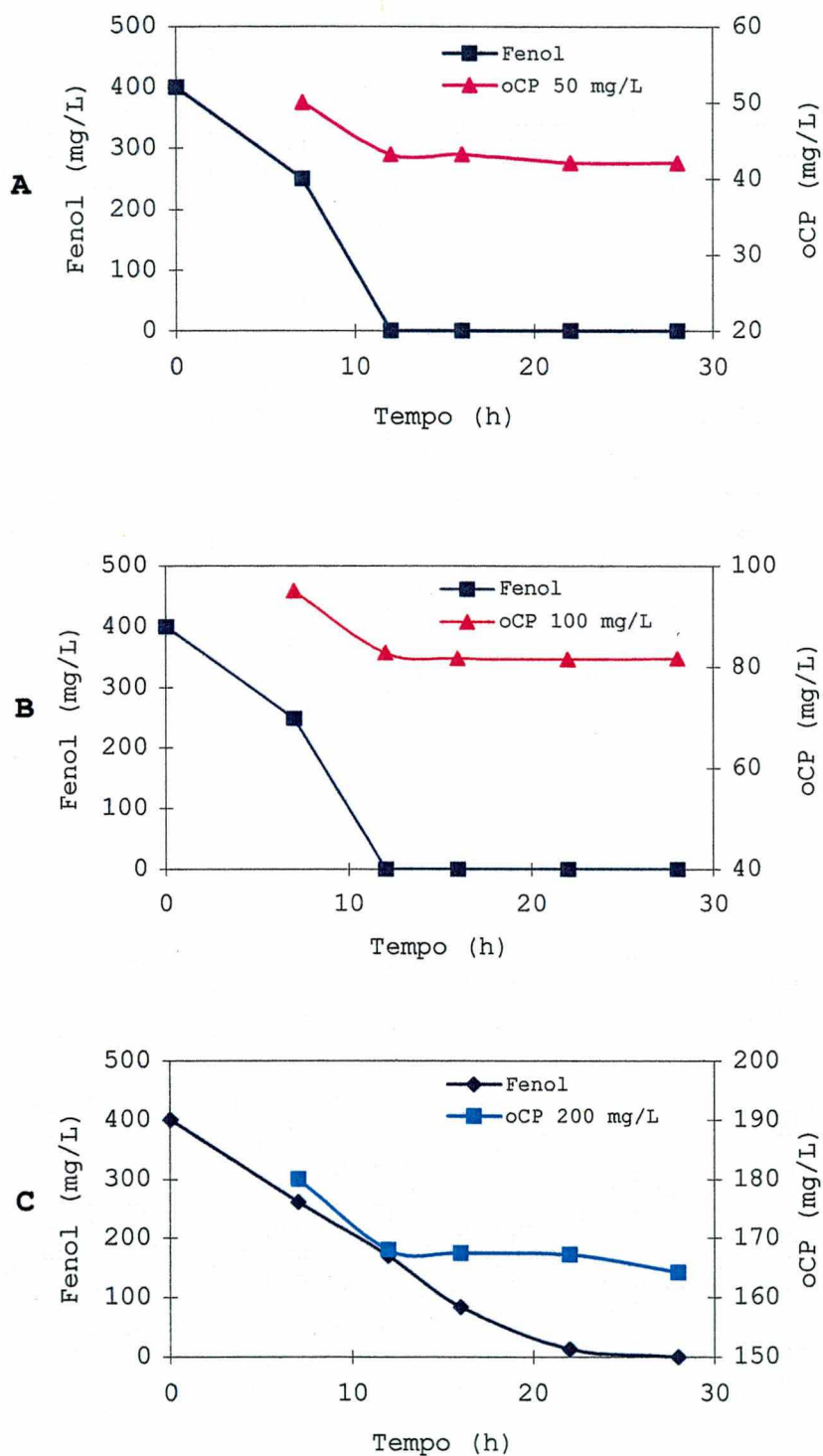


FIGURA IV.10 - PERFIS DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E ORTOCLOROFENOL EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO. CONCENTRAÇÕES INICIAIS DE ORTOCLOROFENOL DE 50 (A), 100 (B) E 200 MG/L (C).

Tabela IV.5 - Percentuais de degradação de fenol e ortoclorofenol por *T. beigelii*, em condições de co-metabolismo.

Concentração inicial de ortoclorofenol (mg/L)	% de degradação	
	fenol	ortoclorofenol
0	100	-
50	100	15,8
100	100	14,0
200	100	8,8

Neste experimento, a degradação de fenol foi completa para as três concentrações iniciais de ortoclorofenol testadas. O mesmo não ocorreu com o paraclorofenol, onde para as concentrações iniciais de 100 e 200 mg/L de co-substrato a degradação do fenol foi de 86,5 e 44,8%, respectivamente.

IV.2.3 Crescimento de *T. beigelii* em fenol e 2,4 Diclorofenol, 2,4,6 Triclorofenol e pentaclorofenol

Os experimentos em condições de co-metabolismo tendo como co-substrato 2,4 Diclorofenol, 2,4,6 Triclorofenol e pentaclorofenol foram realizados com a concentração inicial de 20 mg/L, em função da elevada toxicidade apresentada por estes compostos. O objetivo destes ensaios foi observar o potencial de degradação destes clorofenóis por *T. beigelii*.

As Figuras IV.11 A e B mostram, respectivamente, o crescimento de *T. beigelii* e o perfil de degradação de fenol e 2,4 Diclorofenol em condições de co-metabolismo. As Tabelas B.6.a e B.6.b o Anexo B mostram os resultados deste experimento.

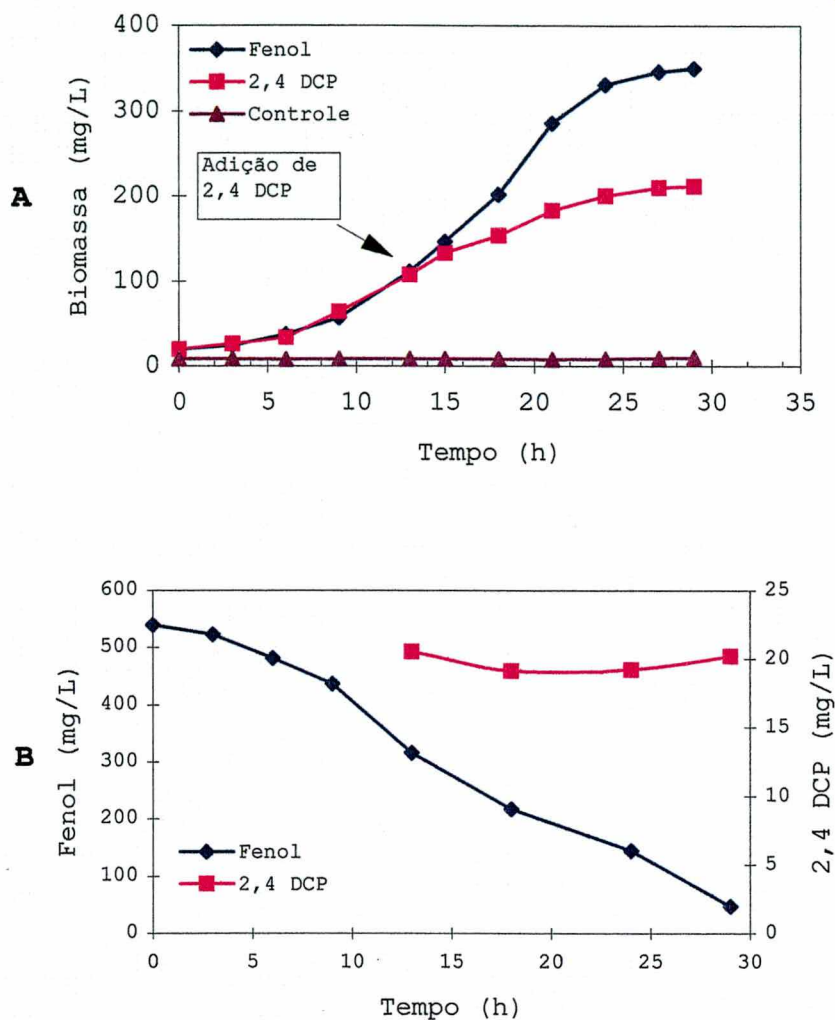


FIGURA IV.11 (A) CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE 2,4 DICLOROFENOL. (B) PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E 2,4 DICLOROFENOL.

Os resultados do experimento em condições de co-metabolismo tendo fenol como substrato e 2,4,6 Triclorofenol como co-substrato são mostrados nas Figuras IV.12 A e B. As Tabelas B.7.a e B.7.b o Anexo B mostram os resultados deste experimento.

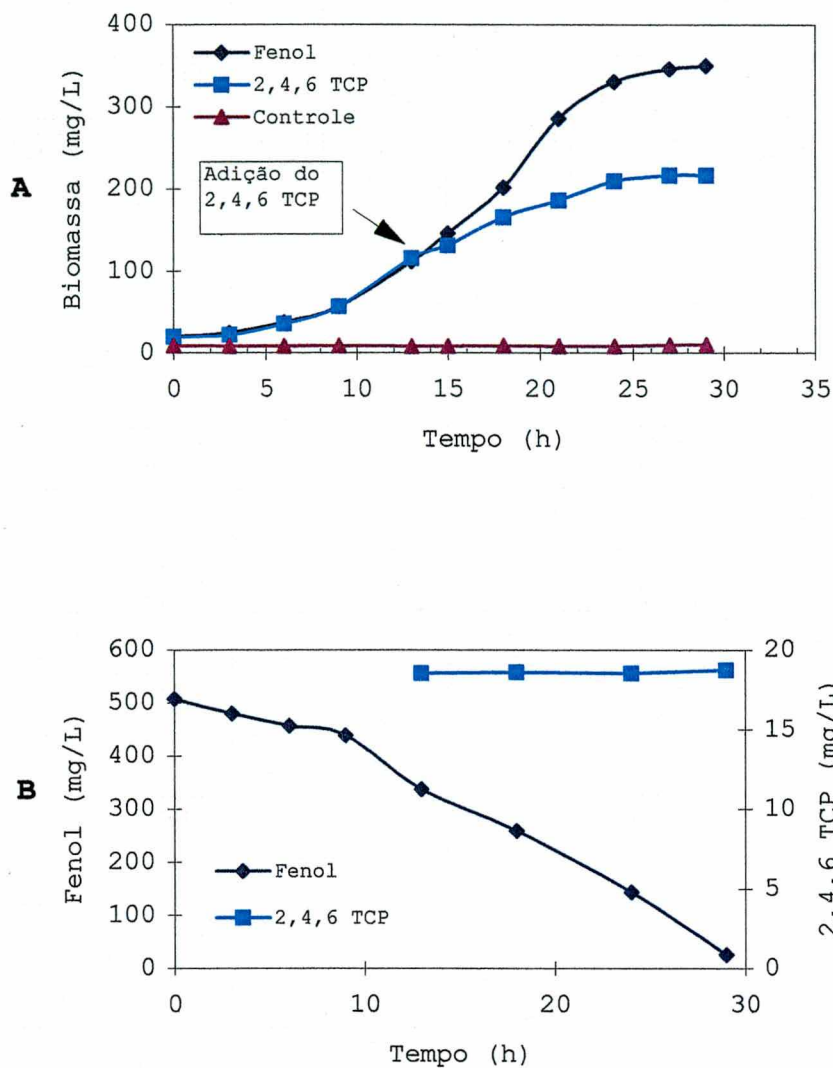


FIGURA IV.12 (A) CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE 2,4,6 TRICLOROFENOL. (B) PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E 2,4,6 TRICLOROFENOL.

As Figuras IV.13 A e B mostram o crescimento de *T. beigelii* e o perfil de degradação respectivamente, para o experimento em condições de co-metabolismo tendo fenol como substrato e pentaclorofenol como co-substrato. As Tabelas B.8.a e B.8.b o Anexo B mostram os resultados deste experimento.

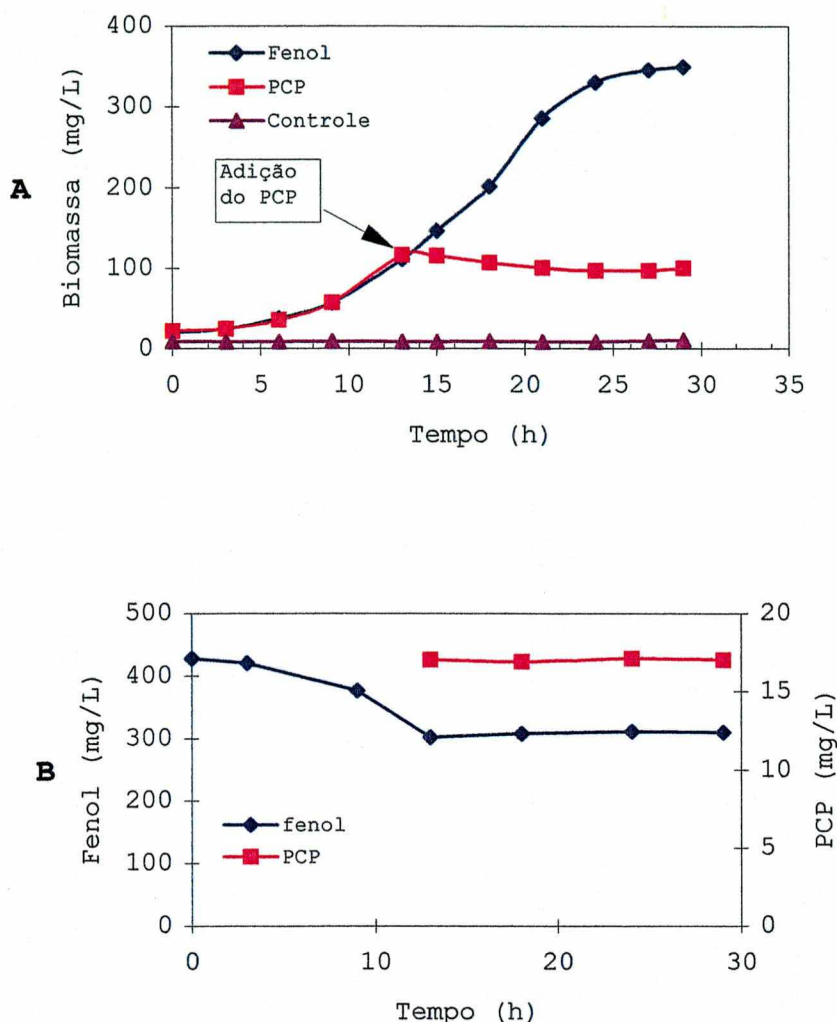


FIGURA IV.13 (A) CRESCIMENTO DE *T. BEIGELII* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE PENTAFLOROFENOL. (B) PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E PENTAFLOROFENOL.

O crescimento de *T. beigelii* em 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol, em condições de co-metabolismo, apresentou resultados semelhantes. Houve uma inibição (em biomassa final), em relação ao crescimento em fenol, de 56,4% para o 2,4 Diclorofenol e de 57,6% para o 2,4,6 Triclorofenol. Esta inibição é consequência da presença do co-substrato halogenado. Para o pentaclorofenol, a inibição foi total. A partir do momento em que o co-substrato foi adicionado ao meio, o crescimento da levedura foi interrompido, levando as células a morte.

Com relação a degradação do substrato e co-substrato, os experimentos com 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol também apresentaram comportamento similar. Em ambos, não houve degradação do co-substrato. Os valores de degradação do fenol foram, 91,2 e 95,1%, para 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol respectivamente. Os percentuais de degradação do substrato e co-substrato, e de inibição de crescimento em relação ao fenol são apresentados na Tabela IV.6. O pentaclorofenol também não foi degradado por *T. beigelii*, e a partir da adição do pentaclorofenol também o fenol deixou de ser consumido. Para o pentaclorofenol houve inibição total no crescimento da levedura e na degradação de fenol.

Tabela IV.6 - Valores percentuais de degradação de fenol e paraclorofenol e inibição do crescimento em relação ao fenol.

Experimento	% Degradação		% Inibição
	fenol	co-substrato	
Fenol 500 mg/L	100	-	0
2,4 Diclorofenol 20 mg/L	91,2	0	56,4
2,4,6 Triclorofenol 20 mg/L	95,1	0	57,6
Pentaclorofenol 20 mg/L	27,4	0	100

A Tabela IV.7 mostra um comparativo dos experimentos de crescimento em condições de co-metabolismo e o experimento de crescimento de *T. beigelii* em fenol como única fonte de carbono (seção IV.1.1.2).

Tabela IV.7 - Comparativo entre experimentos de crescimento em condições de co-metabolismo e em fenol como única fonte de carbono.

Experimento	% inibição do crescimento	% degradação de fenol	%degradação co-substrato
Fenol *	0,00	100	-
pCP 50 mg/L	20,4	100	100
pCP 100 mg/L	65,4	86,5	44,9
pCP 200 mg/L	91,4	44,8	0,0
oCP 50 mg/L	Nd**	100	15,8
oCP 100 mg/L	Nd**	100	14,0
oCP 200 mg/L	Nd**	100	8,8
2,4 DCP 20 mg/L	56,4	91,2	0,0
2,4,6 TCP 20 mg/L	57,6	95,1	0,0
PCP 20 mg/L	100	27,4	0,0

* seção IV.1.1.2.

** não determinado

A concentração inicial de co-substrato influencia diretamente no crescimento da levedura. Isto pode ser observado no experimento utilizando *para*clorofenol como co-substrato, onde o aumento da concentração inicial acarreta num aumento do percentual de inibição de crescimento. Com relação aos fenóis di e triclorados, pode-se afirmar que mostraram um comportamento similar com relação ao crescimento do microrganismo. O pentaclorofenol mostrou-se extremamente tóxico inibindo completamente o crescimento da levedura a partir do momento em que foi adicionado ao meio.

A degradação do substrato e do co-substrato mostrou alguns resultados interessantes, principalmente para os monoclorofenóis.

O *para*clorofenol apresentou uma diminuição no percentual de degradação inversamente proporcional a concentração inicial do

co-substrato, o mesmo acontecendo com o substrato. Assim, a redução da taxa de degradação do fenol pode ter sido causada pelo próprio co-substrato ou de um intermediário, que provocou a inibição de alguma enzima da via catabólica do fenol.

O ortoclorofenol apresentou resultados diferentes do paraclorofenol. A degradação de ortoclorofenol foi pequena, enquanto o fenol foi completamente degradado nas três concentrações iniciais testadas. Neste caso, o co-substrato aparentemente não inibiu a ação de enzimas que catalisam a degradação do fenol.

Os policlorados, 2,4 Diclorofenol e 2,4,6 Triclorofenol, apresentaram um comportamento semelhante, permitindo um alto percentual de degradação de fenol (91,2% e 95,1% respectivamente), porém o co-substrato não foi degradado. Nestes dois casos houve uma inibição na degradação do fenol provocada pelos clorofenóis, sendo que uma maior quantidade de substrato foi utilizada para energia de manutenção, já que o crescimento também foi inibido.

Não houve degradação do pentaclorofenol como co-substrato, sendo que o fenol sofreu uma degradação de 27,4%. Porém, esta degradação ocorreu antes da adição do pentaclorofenol no meio, demonstrando que este co-substrato teve um efeito letal para as células.

IV.3. Testes enzimáticos

Neste item são discutidos os testes enzimáticos de enzimas chaves realizados afim de caracterizar a via metabólica de degradação do fenol e paraclorofenol por *T. beigellii*. Na seção C.4 é mostrada a metodologia para o cálculo da atividade enzimática. As enzimas testadas, segundo a metodologia apresentada na seção III.5.3.4, foram as seguintes:

catecol-1,2-dioxigenase

catecol-2,3-dioxigenase

protocatecuato-2,3-dioxigenase

protocatecuato-3,4-dioxigenase e
protocatecuato-4,5-dioxigenase.

IV.3.1. Determinação da atividade enzimática de catecol 1,2 e catecol 2,3 dioxigenase

O catecol é, juntamente com o protocatecuato, um substrato comum na degradação biológica de uma série de compostos aromáticos, e, portanto ambos recebem o nome de substratos de partida ("starting substrates"). As Figuras II.2.1 A e II.2.1 B mostram compostos que são levados a catecol e protocatecuato, respectivamente.

A partir do catecol duas enzimas podem agir para realizar a abertura do anel aromático, a catecol 1,2 dioxigenase, que leva a formação de ácido *cis-cis* mucônico (via catabólica conhecida como *orto-clivagem*), e a catecol 2,3 dioxigenase, que leva a formação de 2-hidroximucônato semialdeído (via catabólica conhecida como *meta-clivagem*).

T. cutaneum (reclassificada como *T. beigelii*) quando utiliza fenol realiza uma *orto-clivagem* no anel aromático. Por outro lado a ação da catecol 1,2 dioxigenase sobre *paraclorofenol* é nula (GAAL e NEUHJAR, 1979).

Com o intuito de verificar se a cepa utilizada neste trabalho apresentava o mesmo comportamento, foram realizados testes enzimáticos de catecol 1,2 dioxigenase e de catecol 2,3 dioxigenase com o homogenato de células crescidas em fenol e *paraclorofenol*, respectivamente.

Os resultados da atividade enzimática de catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase para fenol e *paraclorofenol* podem ser observados na Tabela IV.8. O valor do coeficiente de extinção molar (ϵ_{260}) utilizado para o cálculo da atividade de catecol 1,2 dioxigenase, é de 16900.

Tabela IV.8 - Resultados de atividade enzimática da enzima catecol 1,2 dioxigenase para fenol e *paraclorofenol*.

Substrato	Atividade expressa em nmol/(mL*min)	
	catecol 1,2 dioxigenase	catecol 2,3 dioxigenase
Fenol	81,4	0,0
<i>paraclorofenol</i>	0,0	0,0

O microrganismo apresentou atividade da enzima catecol 1,2 dioxigenase. A atividade de 81,4 nmol/(mL*min) e está de acordo com os resultados obtidos por GAAL e NEUJHR (1979), levando a concluir que a cepa utilizada nos experimentos faz a clivagem do anel na posição *orto* quando utiliza fenol como fonte de carbono. Porém esta via não é utilizada no caso do microrganismo crescido em *paraclorofenol*.

IV.3.2. Determinação da atividade enzimática de protococatecuato 2,3 , protococatecuato 3,4 e protococatecuato 4,5 dioxigenase

Assim como o catecol pode sofrer diferentes rupturas no anel, a *orto* e a *meta*-clivagem, também o protococatecuato pode sofrer diferentes rupturas do anel aromático. Estas rupturas são mostradas na seção II.2, na Figura II.4.

Os testes enzimáticos das dioxigenases, que catalisam a ruptura do anel na forma de protococatecuato, foram realizados com homogenato de células crescidas em fenol e *paraclorofenol*. Os resultados podem ser observados na Tabela IV.9.

Tabela IV.9 - Valores de atividade enzimática para as dioxigenases que realizam a ruptura do protocatecuato.

Substrato	Atividade (nmol/mL*min)		
	proto-catecuato 2,3 dioxigenase	Proto-catecuato 3,4 dioxigenase	proto-catecuato 4,5 dioxigenase
Fenol	0,0	0,0	0,0
Paraclorofenol	82,6	0,0	0,0

T. beigelii é capaz de degradar paraclorofenol via protocatecuato e a enzima que mostrou atividade foi a protocatecuato 2,3 dioxigenase. Na Figura IV.14 pode-se observar um esboço da degradação de paraclorofenol por *T. Beigelii*.

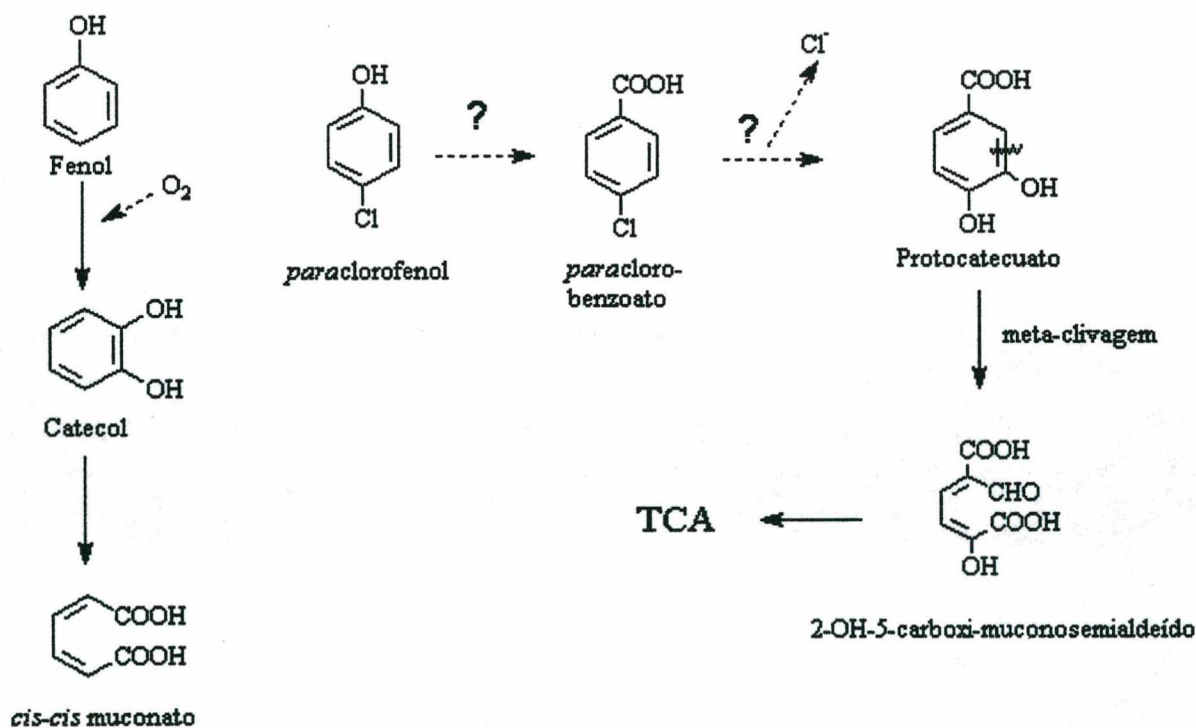


FIGURA IV.14 - ESBOÇO DA DEGRADAÇÃO DE FENOL E PARACLOROFENOL POR *T. BEIGELII*.

Para substratos semelhantes *T. beigelii* utiliza duas vias catabólicas distintas. Para o fenol a degradação passa por catecol e a ruptura do anel é na posição orto, catalisada pela enzima catecol 1,2 dioxigenase. No caso do *paraclorofenol* a degradação é via protocatecuato, e a enzima que atua na abertura do anel é a protocatecuato 2,3 dioxigenase.

V Conclusão

Neste trabalho foi estudada a degradação biológica de alguns compostos aromáticos com diferentes graus de halogenação, tendo como microrganismo degradador a levedura *Trichosporon beigelii*.

Baseado em resultados obtidos por GAAL e NEUJAHN (1979), que demonstraram que *T. beigelii* é capaz de degradar fenol até elevadas concentrações, (500mg/L), ensaios de biodegradação de fenol foram realizados demonstrando a elevada capacidade de degradar tal composto.

Os clorofenóis são compostos altamente tóxicos e são degradados somente por algumas espécies de microrganismos. Em geral este processo é realizado por consórcios. A técnica do co-metabolismo é descrita como eficiente para a degradação de compostos tóxicos (SHIMP e PFAENDER, 1987). Consequentemente, ensaios tendo fenol como substrato e o clorofenol como co-substrato foram realizados afim de avaliar o potencial de degradação do organoclorado por *T. beigelii*. oCP e pCP apresentaram diferenças no que diz respeito a degradação, sendo o pCP mais facilmente degradado, conforme resultados obtidos por KATAYAMA HIRAYAMA, TOBITA e KATAYAMA, (1994). Os policlorados (2,4 DCP, 2,4,6 TCP e PCP) não foram degradados. Nos ensaios com 2,4 DCP e 2,4,6 TCP houve inibição do crescimento e da degradação do fenol. A adição do PCP ao meio inibiu completamente a degradação do fenol e o crescimento da levedura, exibindo efeito letal na concentração testada (20 mg/L).

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de determinar as vias metabólicas que *T. beigelii* utiliza na degradação de fenol e pCP. Ensaios de biotransformação de fenol mostraram que a rota biológica utilizada na degradação de fenol passa por catecol, a etapa subsequente sendo a abertura do anel aromático na posição *orto* caracterizando a *orto-clivagem*. Esta etapa confirmada através de testes enzimáticos. A degradação de pCP por *T. beigelii* também foi investigada através de testes enzimáticos e ensaios de biotransformação. Análises em GC-MS de amostras da biotransformação mostraram a formação de protocatecuato e os testes enzimáticos revelaram a atividade da enzima protocatecuato 2,3 dioxigenase. Com base nestes resultados, estudos mais aprofundados da degradação de pCP por *T. beigelii* são necessários para esclarecer o mecanismo exato de metabolização deste composto.

VI Referências Bibliográficas

- ARBUCKLE, W.B. & KENNEDY, M.S. Activated sludge response to a parachlorophenol transient. **Journal of WPCF**. vol.61, n°4, p.476-480, 1989.
- ARSENAULT, R.D. Pentachlorophenol and contained chlorinated dibenzodioxins in the environment - a study of environmental fate, stability and significance when used in wood preservation. **Process American Wood Preservation Association**. vol.72, p. 122-148, 1976.
- DORN, E. & KNACKMUSS, H.J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds: Substituent effects of 1,2 dioxygenation of catechol. **Journal of Biochemistry**. vol.174, p.85-94, 1978.
- FETZNER, S. & LINGENS, F. Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics and biotechnological applications. **Microbiological Reviews**. vol. 58, n°4, p.641-685, 1994.
- FIELD, J.A.; STAMS, A.J.M.; KATO, M. & SCHRAA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antonie von Leeuwenhoek**. vol.67, p.47-77, 1995.
- GAAL, A. & NEUJAHN, H.Y. Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. **Journal of Bacteriology**. vol.137, n°1, p.13-21, 1979.

- GOTTSCHALK, G.: Catabolic Activities of Aerobic Heterotrophs. In: Bacterial Metabolism. 2^a Ed., Springer Verlag. Cap. 6, p. 157-162, 1985.
- IVANOVA, N. & YOTOVA, L. Biotransformation of furfural by yeast cells covalently bound to cellulose granules. **ACTA Biotechnology**. vol.13, n°1, p. 79-82, 1993.
- KATAYAMA-HIRAYAMA, K.; TOBITA, S. & HIRAYAMA, K. Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*. **Water Science Technology**. vol.30, n°9, p.59-66, 1994.
- KENNEDY, M.S.; GRAMMAS, J. & ARBUCKLE, W.B. Parachlorophenol degradation using bioaugmentation. **Research Journal of WPCF**. vol.62, n°3, p.227-233, 1990.
- KOROL, S.; NATALE, P.; MORETTON, J.; SANTINI, P. & D'AQUINO, M. Isolation and characterization of a new para-chlorophenol degrading strain of *Pseudomonas* from samples of natural waters. **Revista de Microbiologia**. vol.22, n°4, p.313-318, 1991.
- LaFOND, R.A. & FERGUNSON, J.F. Anaerobic and aerobic treatment processes for removal of chlorinated organics from kraft bleaching wastes. In Proceedings TAPPI Environmental Conference, San Antonio, Texas, April 7-10, 1991, Tappi Press. Atlanta, GA, p.797-805.
- LU, C.J. & TSAI, Y.H. The effects of a secondary carbon source on the biodegradation of recalcitrant compounds. **Water Science Technology**. vol.28, n°7, p.97-101, 1993.
- MacGILLIVRAY, A.R. & SHIARIS, M.P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. **Applied Environmental Microbiology**. vol.59, n°5, p. 1613-1618, 1993.

SAAR, J. RABINOVITCH, L. Physiology and Metabolism of Bacteria. Curso a nível de Pós-Graduação, Fundação Oswaldo Cruz - IOC - Bacteriologia. Apostila Experimental p. 15-21, 1993.

SAHASRABUDHE, S.R & MODI, V.V. Microbial degradation of chlorinated aromatic compounds. **Microbiological Sciences**. vol.4, n°10, p.300-303, 1987.

SCHAUER, F.; HENNING, K.; PSCHIEDL, H.; WITTICH, R.M.; FORTNAGEL, P.; WILKES, H.; SINNWELL, V. & FRANCKE, W. Biotransformation of diphenyl ether by the yeast *Trichosporon beigelii* SBUG 752. **Biodegradation**. vol.6, n°2, p.173-180, 1995

SCHOLLHORN, A.; STUCKI, G. & HANSELMANN, K. Biodegradation of all three isomers of monochlorophenols in a fixed bed reactor to very low concentrations. **Water Science Technology**. vol.30, n°7, p.41-44, 1994.

SHIMP, R.J. & PFAENDER, F.K. Effect of adaptation to phenol on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. vol.53, n°7, p.1496-1499, 1987.

SPAANING, A. & NEUJAHN, H.Y. Simultaneous utilization of phenol and other carbon sources during continuous culture of *Trichosporon beigelii*. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YEASTS, 7th. 1989.

STANLAKE, G.J. & FINN, R.K. Isolation and characterization of a pentachlorophenol-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 44, n°6, p.1421-1427, 1982.

XUN,L.; TOPP,E. & ORSER,C.S. Confirmation of oxidative dehalogenation of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* pentachlorophenol hidroxylase. **Journal of Bacteriology.** vol.174, p.5745-5747, 1992.

Anexos

Anexo A - Figuras

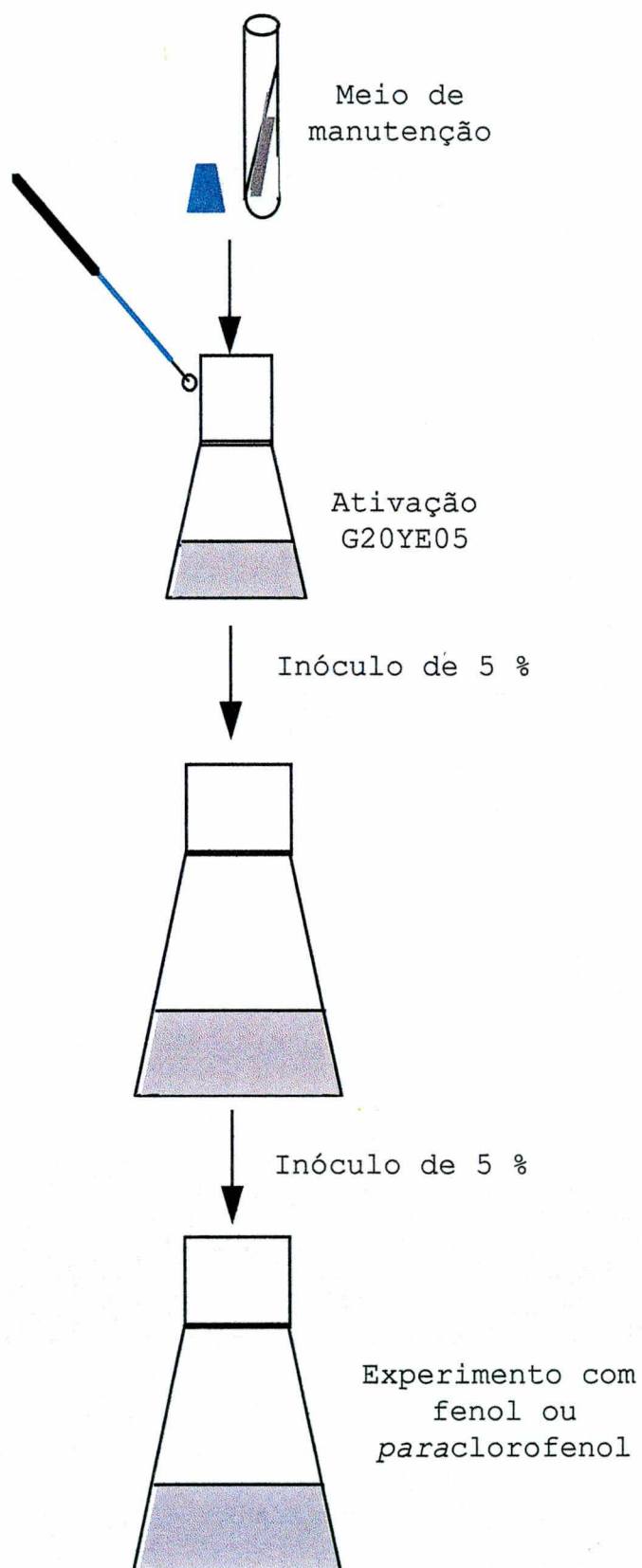


FIGURA A.1 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS TENDO UMA FONTE DE CARBONO APENAS.

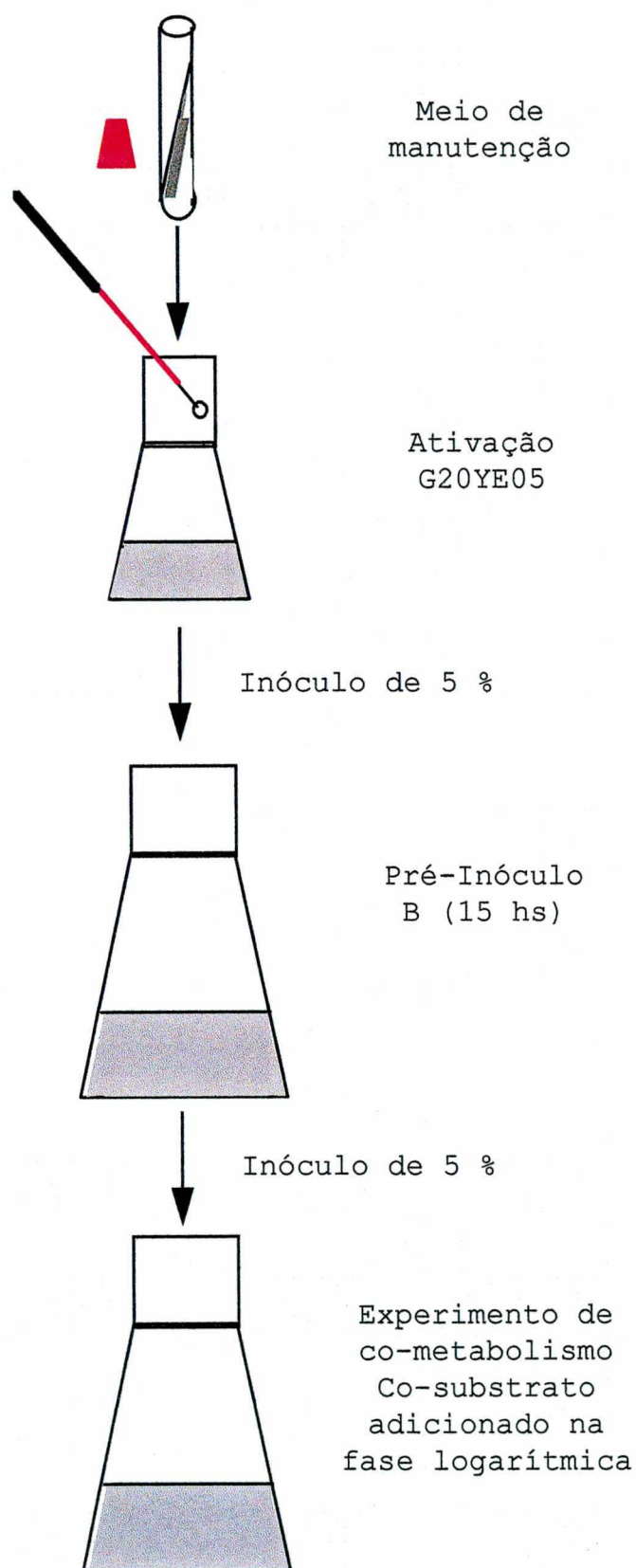


FIGURA A.2 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS EM CONDIÇÕES DE CO-METABOLISMO.

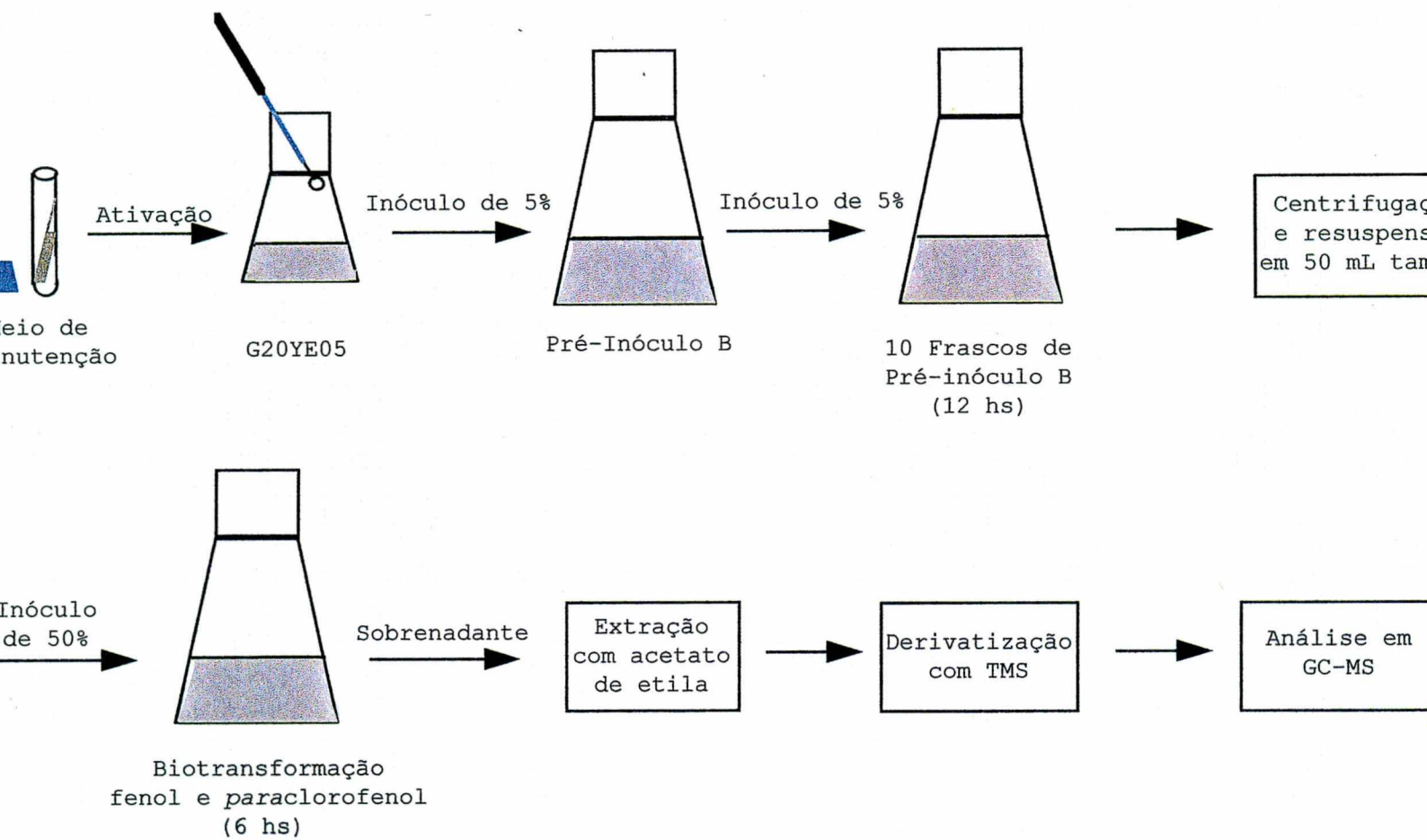


FIGURA A.3 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.

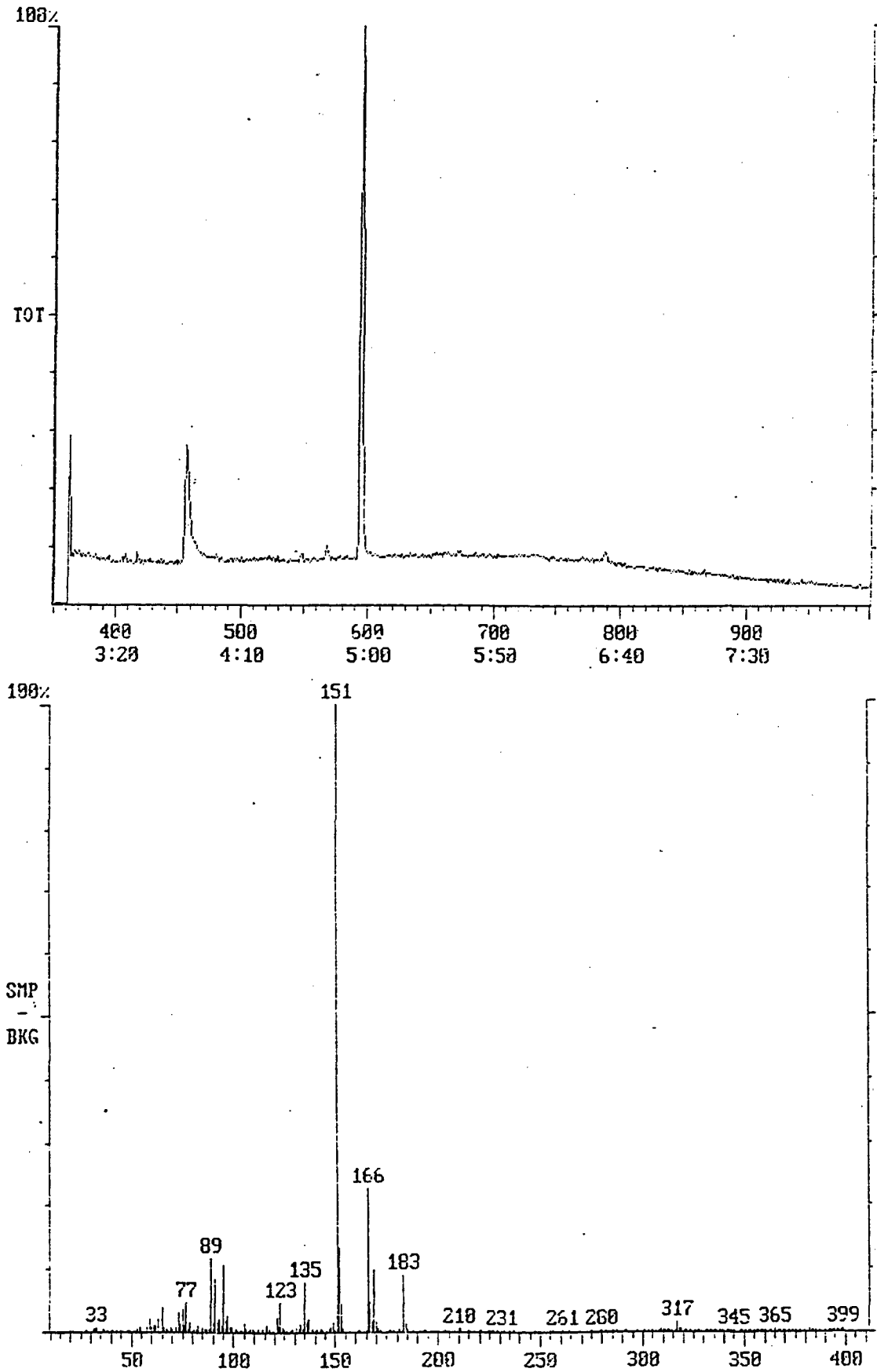


FIGURA A.4.A - ESPECTRO DE GC-MS DO FENOL DERIVATIZADO COM OS PRINCIPAIS PICOS INDICADOS E COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.

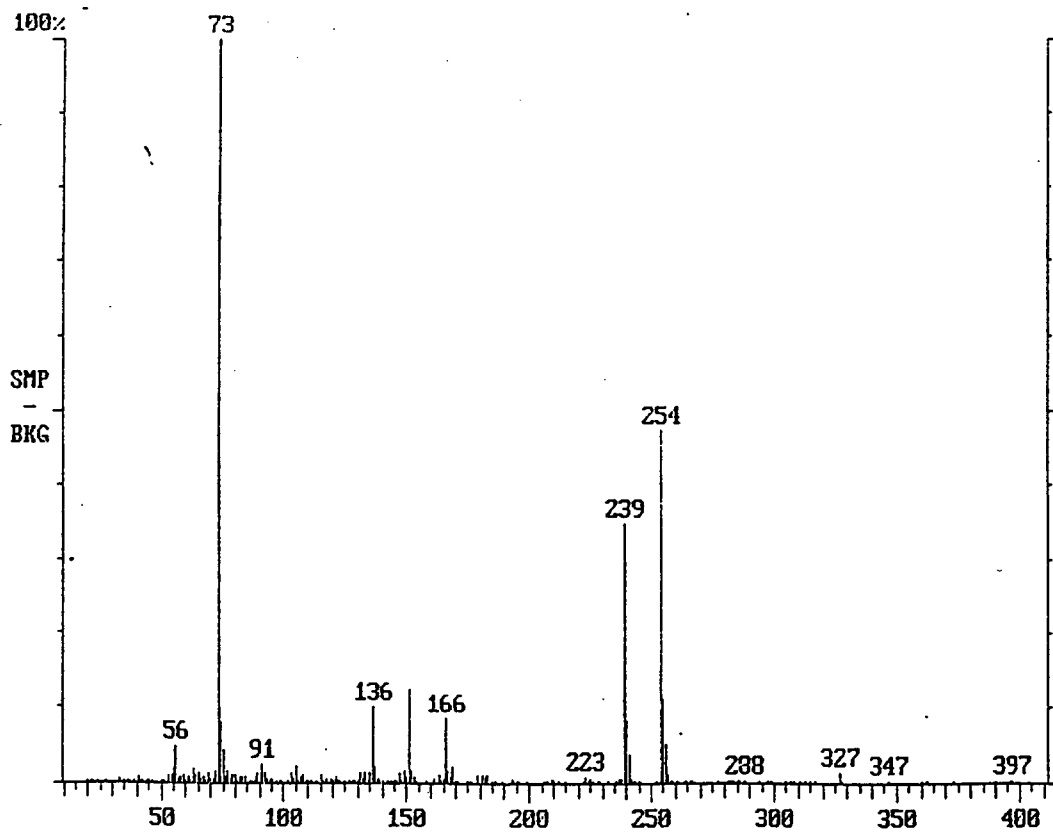
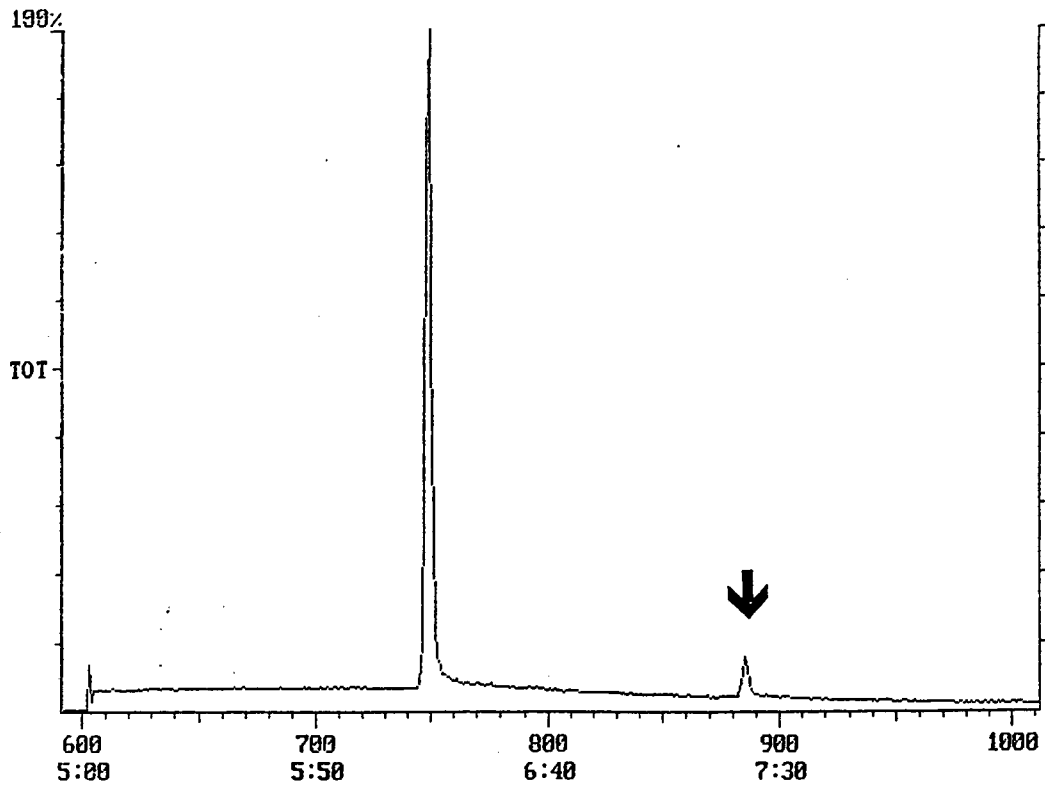


FIGURA A.4.B - ESPECTRO DE GC-MS DO CATECOL DERIVATIZADO COM OS PRINCIPAIS PICOS INDICADOS E COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.

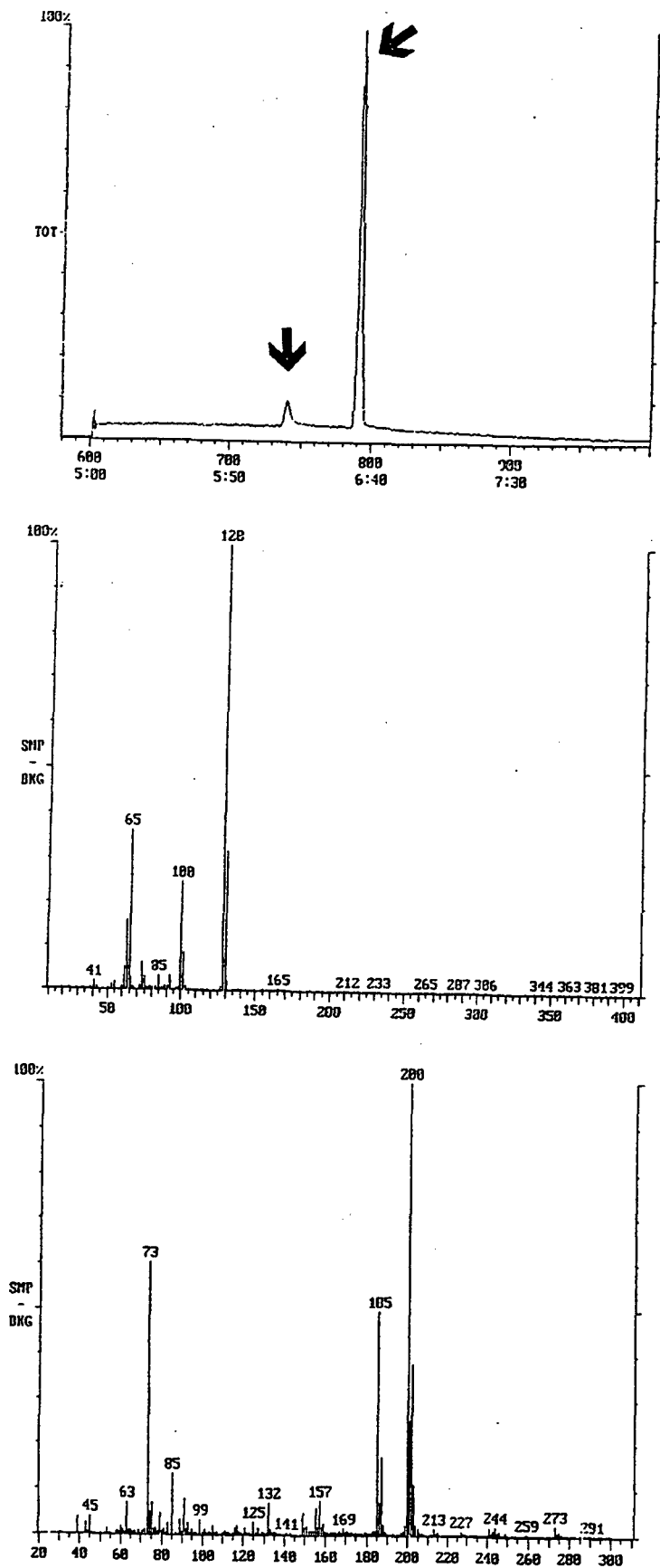


FIGURA A.4.C - ESPECTRO DE GC-MS DO PARA-CLOROFENOL DERIVATIZADO COM OS PRINCIPAIS PICOS INDICADOS E COM SEUS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.

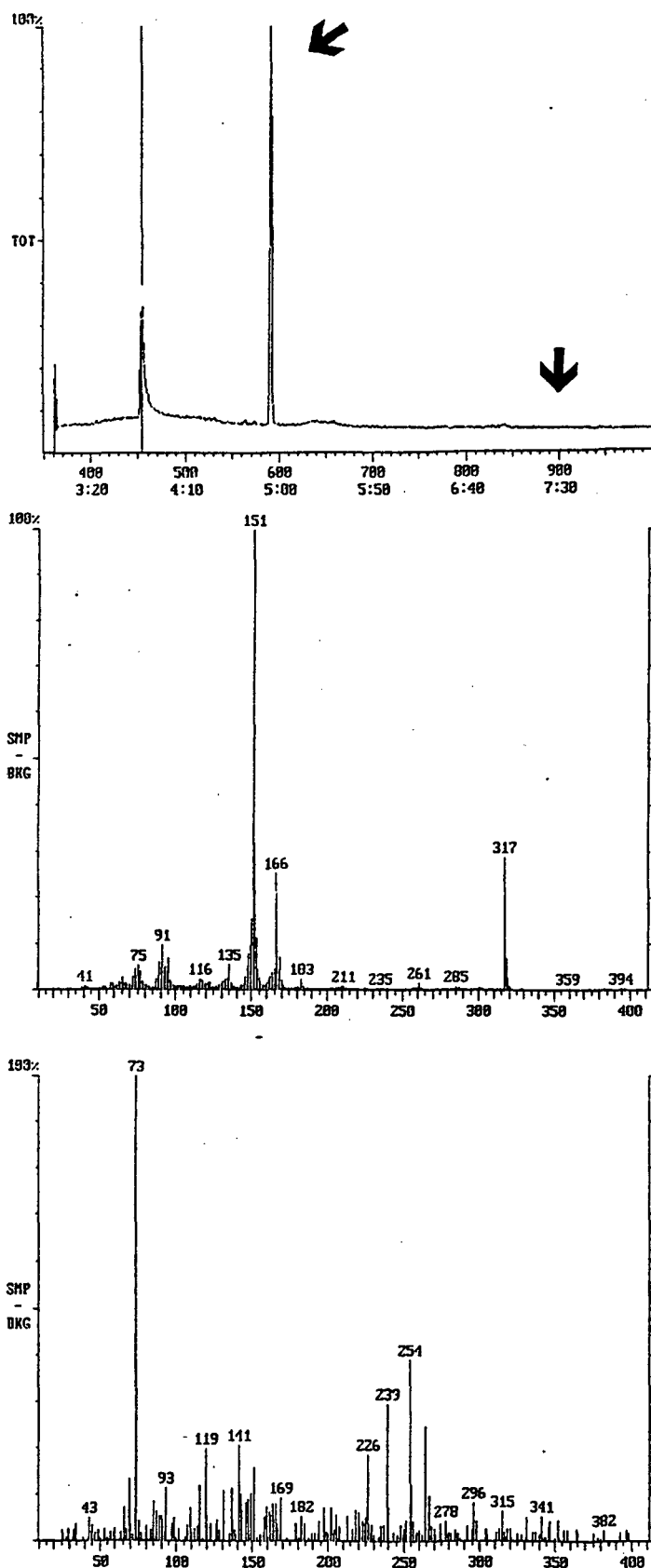


FIGURA A.4.D - ESPECTRO DE GC-MS CARACTERÍSTICO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO FENOL, TENDO O FENOL E O CATECOL DERIVATIZADOS INDICADOS E OS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.

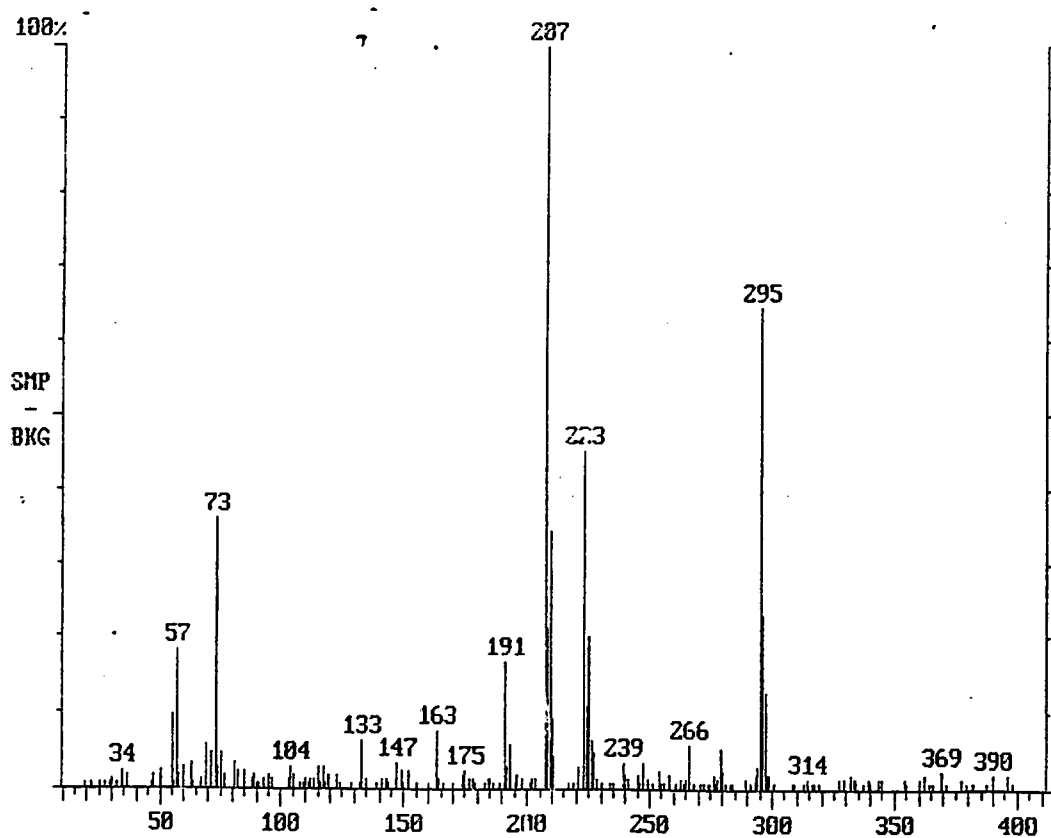
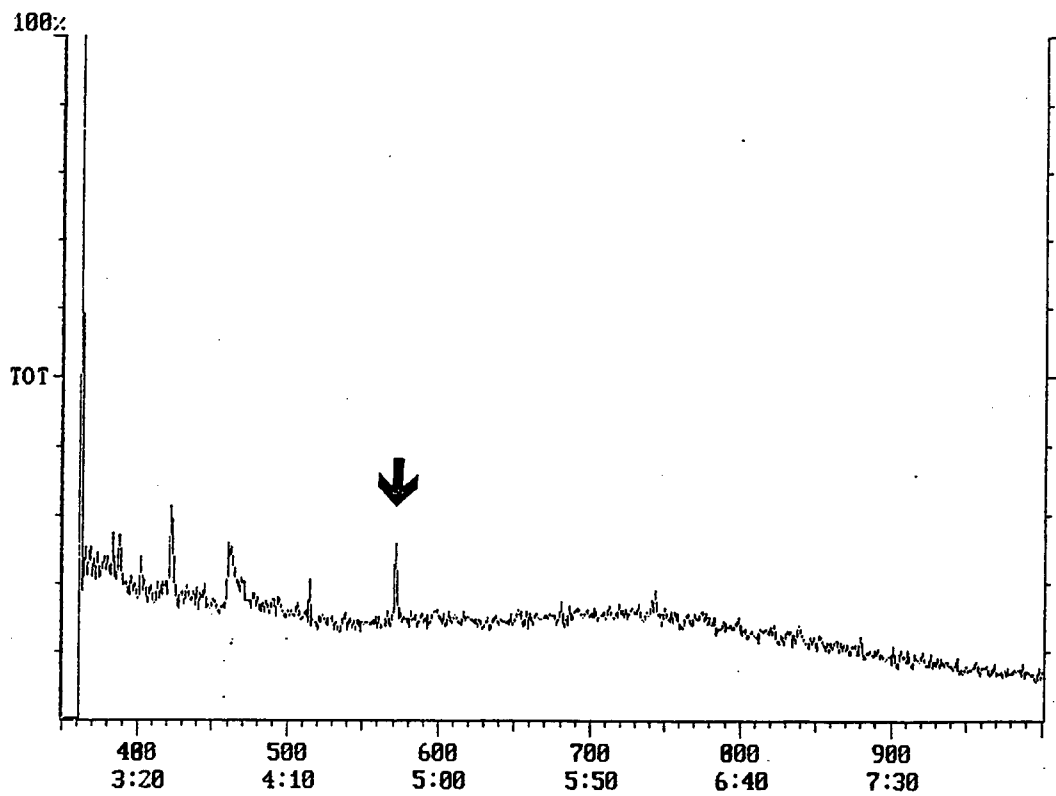


FIGURA A.4.E - ESPECTRO DE GC-MS CARACTERÍSTICO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO PARACLOROFENOL, TENDO O PARACLOROFENOL E O PROTOCATECUATO DERIVATIZADOS INDICADOS E OS RESPECTIVOS ESPECTROS DE MASSA.

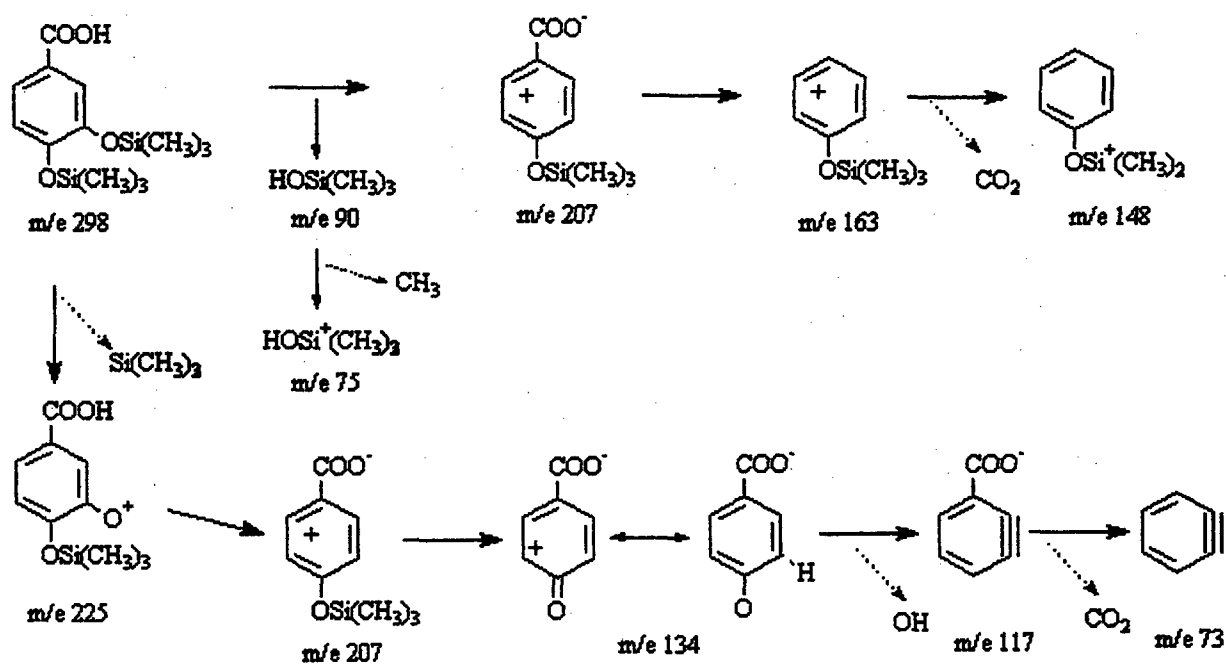


FIGURA A.4.F - SEQUÊNCIA DE FRAGMENTAÇÃO PROPOSTA PARA O PROTOCATECUATO.

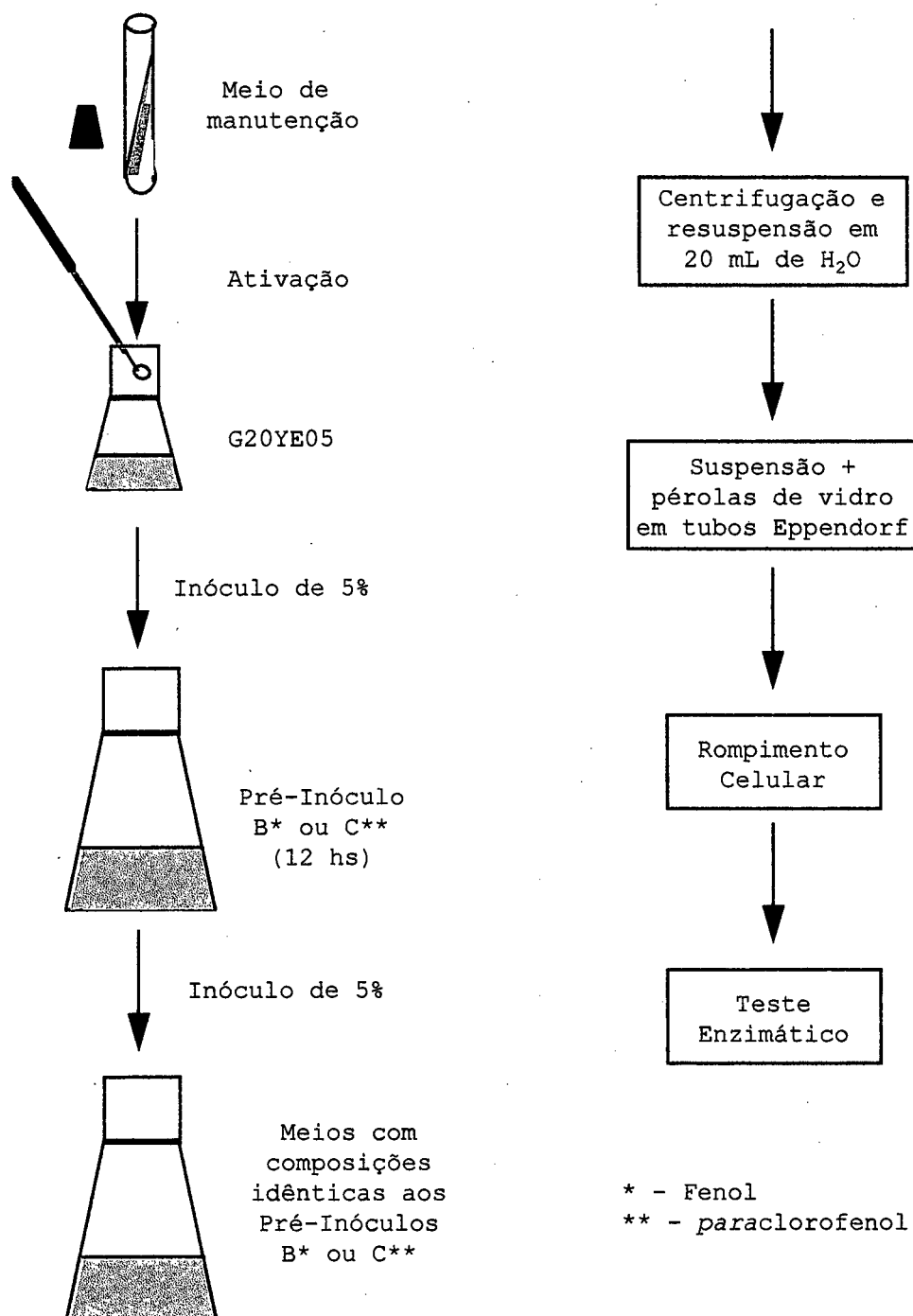


FIGURA A.5 - ESBOÇO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS PARA OS TESTES ENZIMÁTICOS.

Anexo B - Tabelas com os resultados experimentais

Tabela B.1.a - Resultados do crescimento de *T. beigelii* para o experimento com fenol como única fonte de carbono na ausência de extrato de levedura.

Tempo	Biomassa (mg/L)			
	100 mg/L	200 mg/L	500 mg/L	Controle
0	37,99	33,39	31,09	5,03
4	39,52	40,29	36,07	6,18
8,5	59,83	80,91	75,54	5,03
13	93,17	133,79	143,75	5,80
16	95,47	139,92	207,37	6,57
20	106,20	153,33	252,20	5,80
24	103,90	149,89	248,37	5,03

Tabela B.1.b - Resultados da degradação de fenol por *T. beigelii* para o experimento tendo fenol como única fonte de carbono sem extrato de leveduras.

Tempo	Concentração (mg/L)			
	100 mg/L	200 mg/L	500 mg/L	Controle
0	102,2	195	500	500
4	77,3	166,2	411,5	500
8,5	24,7	98,5	265,7	500
13	2,3	3	232,9	500
16	0	0	119,8	500
20	0	0	8	500
24	0	0	0	500

Tabela B.2.a - Resultados do crescimento de *T. beigelii* para o experimento com fenol como única fonte de carbono com fonte de vitaminas.

Tempo	Biomassa (mg/L)			
	100 mg/L	200 mg/L	500 mg/L	Controle
0	34,53	36,45	37,60	7,32
4	68,64	65,19	54,84	8,86
7	107,34	118,46	97,00	8,09
10	139,92	167,89	167,12	6,94
13	137,23	203,91	283,62	5,79
16	147,20	207,36	344,55	7,71
19	134,17	191,65	347,23	5,03
23	145,66	188,58	350,68	4,64
33	145,66	195,48	356,43	7,32

Tabela B.2.b - Resultados da degradação de fenol por *T. beigelii* para o experimento tendo fenol como única fonte de carbono com extrato de levedura.

Tempo	Concentração (mg/L)			
	100 mg/L	200 mg/L	500 mg/L	Controle
0	100,0	200,0	500,0	500
7	11,5	74,0	356,8	-
10	0	0	213,6	500
13	0	0	66,2	-
19	0	0	0	500
23	0	0	0	500

Tabela B.3.a - Resultados do crescimento de *T. beigelii* para o experimento com paraclorofenol como única fonte de carbono.

Tempo (hs)	Biomassa (mg/L)			
	20 mg/L pCP	50 mg/L pCP	100 mg/L pCP	Controle
0	69,41	53,70	57,15	5,03
2	70,18	64,81	60,21	5,80
4	74,39	69,80	75,93	6,18
6	70,94	75,16	73,24	6,56
9	71,71	73,24	77,08	5,03
13	70,18	72,09	74,78	5,03
19	70,56	69,79	71,33	5,80
31,5	65,20	67,50	69,03	5,41

Tabela B.3.b - Resultados da degradação de paraclorofenol por *T. beigelii* para o experimento com paraclorofenol como única fonte de carbono.

Tempo (hs)	Concentração (mg/L)			
	20 mg/L pCP	50 mg/L pCP	100 mg/L pCP	Controle
0	18,7	49,5	101,9	100
2	18,7	48,4	97,7	100
4	16,4	46,5	96,2	100
6	16,4	45,3	95,6	100
9	14,2	39,3	94,6	100
13	11,8	42,6	91,9	100
19	10,5	40,5	85,6	100
31,5	5,1	30,6	80,2	100

Tabela B.4.a -Crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e paraclorofenol como co-substrato.

Biomassa (mg/L)					
Tempo	Fenol	pCP 50	pCP 100	pCP 200	Controle
		mg/L	mg/L	mg/L	
0	56,38	55,61	56,38	55,23	30,32
3	62,90	62,51	63,28	62,13	34,92
6	85,89	83,59	84,36	85,12	34,92
9	141,84	121,91	143,37	128,43	34,16
12	192,04	185,91	188,21	169,81	29,94
15	274,43	261,78	216,56	181,31	31,09
18	356,05	335,74	247,60	189,74	34,54
22	415,83	366,73	266,38	190,12	32,24
25	414,30	361,80	264,85	188,59	32,24

Tabela B.4.b - Degradação de fenol e paraclorofenol por *T. beigelii* em condições de co-metabolismo.

Concentração (mg/L)									
Tempo (hs)	500	500	50	500	100	500	200	Controle	
	F	F	pCP	F	pCP	F	pCP	F	pCP
0	450,0	445,5	-	459,2	-	457,6	-	456,2	-
6	409,9	405,3	-	405,3	-	413,0	-	-	-
12,2	244,0	190,0	50,0	224,0	100,0	236,0	200,0	415,0	195,8
18	0	72,7	40,0	173,3	83,1	-	-	-	-
22	0	11,3	7,3	135,7	79,8	-	-	-	-
25	0	0	0	97,5	72,5	-	-	-	-
30	0	0	0	62,1	55,9	242,5	175,2	415,0	197,8

Tabela B.5.a - Crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e ortoclorofenol como co-substrato.

Biomassa (mg/L)					
Tempo (hs)	Fenol	oCP 50 mg/L	oCP 100 mg/L	oCP 200 mg/L	Controle
0	43,74	43,74	43,74	44,50	8,48
3	57,53	59,45	54,85	57,92	8,48
6	122,68	123,83	127,28	124,59	8,48
7	165,60	163,68	165,98	156,02	8,48
9	286,69	293,21	278,26	222,70	8,48
12	290,52	320,41	300,10	156,02	8,48
16	367,17	519,30	464,50	227,68	8,48
18	417,37	720,87	591,34	307,00	8,48
22	364,48	862,66	707,46	236,11	8,48
28	352,99	1069,59	889,48	230,36	8,48
48	379,81	1730,63	1648,24	239,94	8,48

Tabela B.5.b - Degradação de fenol e ortoclorofenol por *T. beigelii* em condições de co-metabolismo.

Concentração (mg/L)											
Tempo h	500		50	500		100	500		200	Controle	
	F	F	oCP	F	oCP	F	oCP	F	oCP	F	oCP
0	400,0	400,0	-	400,0	-	400	-	400	-	400	-
7	260,2	250,0	50,0	249,2	95,0	260,7	180,0	405	183,5		
12	0	0	43,2	0	82,7	170,0	168,0				
16	0	0	43,2	0	81,6	84,2	167,5				
22	0	0	42,1	0	81,5	13,2	167,2				
28	0	0	42,1	0	81,7	0	164,2	402	182,8		

Tabela B.6.a -Crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e 2,4 Diclorofenol como co-substrato.

Tempo (hs)	Biomassa (mg/L)		
	Fenol	2,4 DCP	Controle
0	19,98	19,98	8,48
3	24,19	25,34	8,10
6	37,22	33,39	7,71
9	56,38	63,66	8,48
13	111,18	106,97	8,10
15	146,05	132,64	8,10
18	201,25	153,33	8,48
21	285,60	182,50	7,71
24	330,25	200,12	8,10
27	345,65	210,05	9,25
29	349,52	211,00	10,01

Tabela B.6.b - Degradação de fenol e 2,4 Diclorofenol por *T. beigelii* em condições de co-metabolismo.

Tempo (hs)	Concentração (mg/L)	
	Fenol	2,4 DCP
0	540,0	
3	523,0	
6	481,2	
9	436,3	
13	315,7	20,5
18	217,4	19,1
24	144,7	19,2
29	47,0	20,2

Tabela B.7.a - Crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e 2,4,6 Triclorofenol como co-substrato.

Tempo (hs)	Biomassa (mg/L)		
	Fenol	2,4,6 TCP	Controle
0	19,98	19,98	8,48
3	24,19	21,89	8,10
6	37,22	34,92	7,72
9	56,38	56,38	8,48
13	111,18	115,01	8,10
15	146,05	130,72	8,10
18	201,25	165,23	8,48
21	285,60	186,25	7,71
24	330,25	209,69	8,10
27	345,65	216,85	9,24
29	349,52	216,25	10,01

Tabela B.7.b - Degradação de fenol e 2,4,6 Triclorofenol por *T. beigelii* em condições de co-metabolismo.

Tempo (hs)	Concentração (mg/L)	
	Fenol	2,4,6 TCP
0	506,69	
3	479,43	
6	456,46	
9	439,02	
13	337,46	18,5
18	259,55	18,6
24	143,37	18,5
29	24,83	18,7

Tabela B.8.a -Crescimento de *T. beigelii* em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e pentaclorofenol como co-substrato.

Tempo (hs)	Biomassa (mg/L)		
	Fenol	PCP	Controle
0	19,98	21,51	8,48
3	24,19	24,19	8,10
6	37,22	34,92	7,72
9	56,38	56,38	8,48
13	111,18	115,40	8,10
15	146,05	114,63	8,10
18	201,25	106,58	8,48
21	285,60	100,07	7,71
24	330,25	97,00	8,10
27	345,65	96,24	9,24
29	349,52	99,69	10,01

Tabela B.8.b - Degradação de fenol e pentaclorofenol por *T. beigelii* em condições de co-metabolismo.

Tempo (hs)	Concentração (mg/L)	
	Fenol	PCP
0	427,7	
3	420,3	
9	376,3	
13	301,6	17,0
18	307,6	16,9
24	310,5	17,1
29	310,2	17,0

Tabela B.9 - Resultado do experimento para determinação da atividade enzimática de catecol 1,2 dioxigenase obtida a partir de células crescidas em fenol.

Tempo (s)	Absorbância (260nm)
0	0,113
20	0,152
40	0,199
60	0,243

Tabela B.10 - Resultado do experimento para determinação da atividade enzimática de protocatecuato 2,3 dioxigenase obtida a partir de células crescidas em paraclorofenol.

Tempo (s)	Absorbância (260nm)
0	0,120
20	0,129
40	0,140
60	0,151

Anexo C - Memória de cálculo

C.1 Metodologia para cálculo da formação de biomassa (ΔX)

Nesta seção é mostrada a metodologia com que foram realizados os cálculos para obtenção do ΔX (formação de biomassa). Para ilustrar foi escolhido o experimento tendo fenol como única fonte de carbono sem extrato de levedura na concentração inicial de 500 mg/L.

$$\Delta X = X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}$$

$$\Delta X = 250,29^* - 31,09$$

$$\Delta X = 219,20 \text{ mg/L}$$

* - Valor obtido pela média dos pontos de 20 e 24 horas de experimento.

C.2 Método gráfico para a obtenção de τ

A obtenção do τ foi feita graficamente, através de uma ampliação de escalas. Como exemplo será utilizado o experimento tendo fenol como única fonte de carbono (concentração inicial de 500 mg/L) na ausência de extrato de leveduras (Figura IV.2).

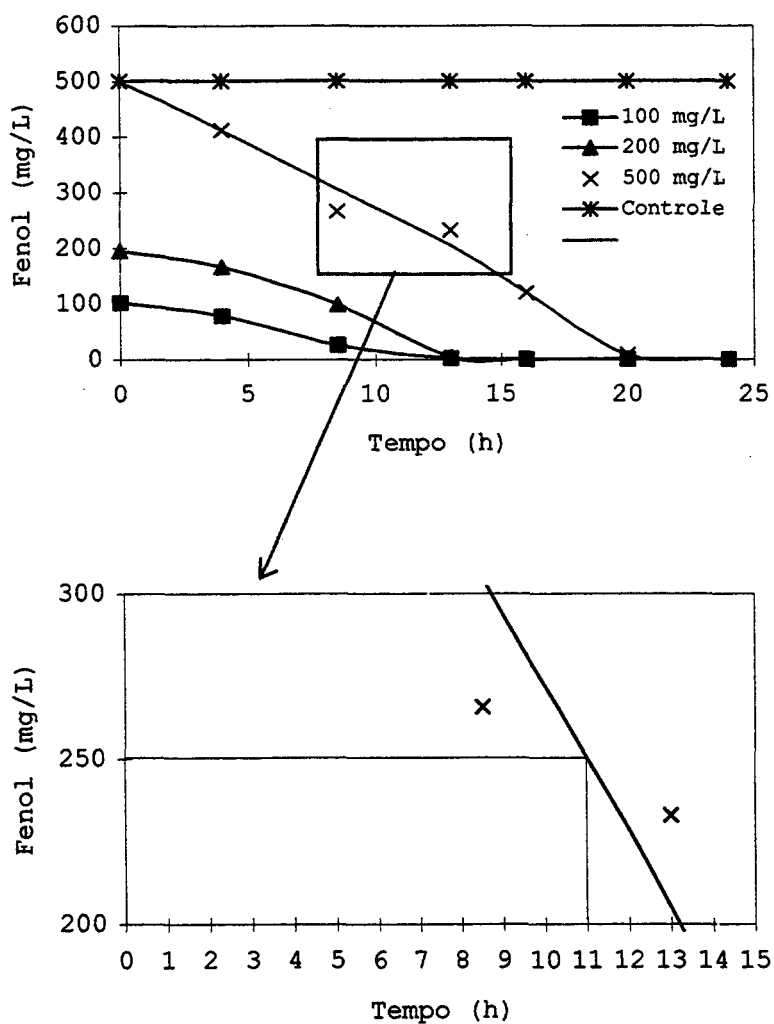


Figura IV.2 - Ampliada para a obtenção de τ .

O valor de τ para este caso foi 11,0 horas.

C.3 Metodologia para o cálculo do % de inibição

O percentual de inibição foi calculado a partir dos dados do Anexo B. Como exemplo foi escolhido o experimento em condições de co-metabolismo, tendo fenol como substrato e paraclorofenol como co-substrato na concentração de 50 mg/L. Matematicamente o % de inibição pode ser expresso da seguinte maneira:

$$\% \text{ de inibiç ao} = \left(1 - \frac{X_{f,coS} - X_{adiç ao,coS}}{X_{f,f} - X_{adiç ao,f}} \right) * 100 \quad (1)$$

Os valores para o experimento em condições de co-metabolismo com paraclorofenol (concentração inicial de 50 mg/L), são os seguintes:

$$X_{f,PCP} = 361,80 \text{ mg/L};$$

$$X_{adição,PCP} = 185,91 \text{ mg/L};$$

$$X_{f,f} = 414,30 \text{ mg/L};$$

$$X_{fadição,f} = 192,40 \text{ mg/L}.$$

O valor do % de inibição em termos de biomassa para este caso é de 20,8.

C.4 Metodologia para o cálculo da atividade enzimática

O experimento para determinação da atividade de catecol 1,2 dioxigenase, proveniente de células crescidas em fenol, foi escolhido para a mostrar a metodologia dos cálculos de atividade enzimática.

O valor da variação da absorbância por minuto, calculado a partir dos dados da Tabela B.9, foi 0,129. O valor do coeficiente de extinção molar para reação é 16900, e a enzima foi diluída 10,67 vezes. O cálculo da atividade enzimática e realizado diretamente a partir de uma regra de três, assim tem-se:

$$\begin{array}{lcl} 1 \text{ M} & \rightarrow & 16900 \\ X & \rightarrow & 0,1290 \end{array}$$

$$X = 7,63 \cdot 10^{-6} \text{ M/min}$$

Este valor multiplicado pelo valor da diluição resulta no valor da atividade enzimática, para este caso, 81,4 nmol/mL*min

