



COPPE/UFRJ

ESTUDO DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL EM MEIO BIFÁSICO
UTILIZANDO A BACTÉRIA *Sphingomonas sp.* GTIN11

Felipe Rodrigues Alves dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Tito Lívio Moitinho Alves

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2010

ESTUDO DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL EM MEIO BIFÁSICO
UTILIZANDO A BACTÉRIA *Sphingomonas sp.* GTIN11

Felipe Rodrigues Alves dos Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

Prof^a. Márcia Walquiria de Carvalho Dezotti, D. SC.

Prof^a. Vânia Margaret Flosi Paschoalin, D. SC.

Dr^a. Ariane Leites Larentis, D. SC.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

FEVEREIRO DE 2010

Santos, Felipe Rodrigues Alves dos

Estudo da Rota de Degradação do Carbazol em Meio Bifásico Utilizando a Bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 / Felipe Rodrigues Alves dos Santos – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

XVI, 132 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Tito Lívio Moitinho Alves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química, 2010.

Referências Bibliográficas: p. 109-119.

1. Desnitrogenação do Petróleo. 2. Biorrefino. 3. Bioprocesso. 4. Modelagem Enzimática. I. Alves, Tito Lívio Moitinho. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Dedico este trabalho a minha família,
meu exemplo, meu alicerce.
Meus pais Paulo e Greicy,
meu irmão Fabio, minha noiva Elisângela
e meus avos Nelson, Alice e Irene,
por todo carinho, amor, dedicação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Tito Lívio Moitinho Alves, pela atenção e recursos a mim disponibilizados durante os dois anos de desenvolvimento desta dissertação. Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, Herval, Candida, Monica e Carla, pelas ideias, conversas e prontidão para ajudar.

Ao Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, pela estrutura disponibilizada para a realização do estudo e, cujos colegas, professores e funcionários deram sempre o suporte necessário. À Prof^a. Márcia Dezotti, pela disponibilização do equipamento de cromatografia líquida do Laboratório de Controle de Poluição de Águas do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ. Ao Dr. Edélvio Gomes e ao Prof. Nei Pereira Jr. do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos da EQ/UFRJ, pela grande ajuda que deram a esta dissertação nas análises de espectroscopia de massas para a detecção e confirmação mais precisa dos metabólitos da rota estudada.

Ao centro de pesquisa e desenvolvimento Leopoldo Américo Miquez de Mello (Cenpes Petrobras) por possibilitar o uso da cepa manipulada nesta dissertação através de um projeto de biotratamento de petróleo em conjunto com o laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

Aos amigos André Alberton e João Severo, pelo auxílio tanto nas aulas de estimação de parâmetros, quanto no desenvolvimento computacional com o manuseio dos softwares Maple[®] e Fortran[®]. Aos amigos da turma de mestrado de 2008, principalmente Aldo, Guillermo, Karen, Gisele e Lívia, pelo companheirismo e cumplicidade em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora por participarem desta reta final do trabalho (particularmente a Dr^a. Ariane Larentis e a Prof^a. Márcia Dezotti que me acompanham há algum tempo).

Aos meus pais, Paulo e Greicy, irmão, Fabio, avós, tios, padrinhos, primos, que estiveram sempre por perto para dar carinho e apoio. Aos amigos da graduação, que embora não estavam por perto, muitas vezes ajudaram de alguma forma.

À minha Noiva Elisângela, companheira de todas as horas e que sempre tem me dado força e lutado ao meu lado (companheira para toda vida).

Enfim, a todos os amigos, que são pessoas maravilhosas e que não daria para escrever sobre todos porque senão a dissertação ficaria extensa demais...

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL EM MEIO BIFÁSICO
UTILIZANDO A BACTÉRIA *Sphingomonas sp.* GTIN11

Felipe Rodrigues Alves dos Santos

Fevereiro/2010

Orientador: Tito Lívio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

Pesquisas sobre biodegradação do carbazol, composto nitrogenado encontrado em frações pesadas do petróleo, vêm crescendo, visto a associação deste aos problemas de desativação de catalisadores em refinarias e emissões de NO_x no meio ambiente. Para isto, utilizou-se a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11, cepa silvestre isolada de ambiente contaminado por óleo, que metaboliza a molécula de carbazol como única fonte de carbono e nitrogênio. Utilizou-se no processo de desnitração em sistema bifásico o teste de degradação com as células íntegras não proliferantes (“*resting cells*”) na concentração de 3 g/L. Este teste confirmou a capacidade de metabolização do carbazol pela cepa, com o surgimento, durante o teste cinético, de intermediários que possibilitaram a elucidação da rota metabólica deste microrganismo. Dentre os intermediários identificados e quantificados estão o ácido antranílico, a amônia, o catecol e o ácido cis,cis-mucônico. Além destes, também estão envolvidos os compostos 2'-amino bifenil-2,3-diol e ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil) hexa-2,4-dienóico (HOADA), identificados indiretamente com a utilização de moléculas similares. Com estes dados, foram identificadas as enzimas expressas por esta cepa (enzimas de dioxigenação angular, dioxigenação de *meta*-clivagem, hidrólise e dioxigenação de *orto*-clivagem), e gerou-se um conjunto de equações matemáticas representativas do consumo do carbazol em sistema bifásico com o intuito de criar uma ferramenta confiável para a simulação do processo de remoção do nitrogênio em óleo.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for degree of Master of Science (M. Sc.)

DEGRADATION PATHWAY STUDY OF CARBAZOLE IN BIPHASIC MEDIUM
USING THE BACTERIA *Sphingomonas sp.* GTIN11

Felipe Rodrigues Alves dos Santos

February/2010

Advisor: Tito Lívio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

Researches in carbazole biodegradation, nitrogenous compound found in heavy fractions of petroleum, have been growing since its association with the problems of deactivation of catalysts in refineries and NO_x emissions in the environment. For this reason, it was used the bacterium *Sphingomonas sp.* GTIN11, wild strain isolated from the environment contaminated by oil, which metabolizes the molecule of carbazole as the sole source of carbon and nitrogen. It was used the degradation test in the biphasic system of denitrogenation process with the non-proliferating intact cells ("*resting cells*") at an concentration of 3 g·L⁻¹. With this test, it was confirmed the ability of carbazole metabolism during the kinetic test by strain, with the generation of intermediaries that help in the elucidation of the metabolic pathway of this microorganism. The intermediaries anthranilic acid, ammonia, catechol and cis,cis-muconic acid, were identified and quantified. Besides these, the compounds 2'-amino biphenyl-2,3-diol and 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-amino phenyl) hexa-2,4-dienoic (HOADA) were identified indirectly with the use of similar molecules, belonging to the pathway. With these data, the enzymes expressed by this strain (enzymes dioxygenation angular, dioxygenation *meta*-cleavage, dioxygenation *ortho*-cleavage and hydrolysis) was identified and it was generated a group of mathematical equations that represent the carbazole consumption in biphasic system for creating a reliable tool for simulating the process of removing nitrogen in oil.

Sumário

I – INTRODUÇÃO	1
<i>Objetivos</i>	9
II – REVISÃO DA LITERATURA	10
II.1 – Compostos Nitrogenados Presentes no Petróleo	10
II.2 – Degradação Microbiológica de Carbazol	13
II.3 – Rota de Degradação do Carbazol.....	24
II.4 – Enzimas da Rota de Degradação do Carbazol	26
II.4.1 – Carbazol dioxigenase	27
II.4.2 – Dioxigenase de <i>meta</i> -clivagem	33
II.4.3 – HOADA hidrolase	35
II.4.4 – Antranilato dioxigenase	37
II.4.5 – Catecol dioxigenase	39
II.5 – Modelagem Enzimática da Rota de Degradação do Carbazol.....	40
III – MATERIAIS E MÉTODOS	45
III.1 – Técnicas Analíticas Básicas	45
III.1.1 – Microrganismo	46
III.1.2 – Armazenagem.....	46
III.1.3 – Meio de Cultivo e Crescimento Bacteriano.....	46
III.1.4 – Técnica de Degradação do Carbazol por Células Íntegras não Proliferantes (<i>resting cells</i>).....	48
III.1.5 – Análises para Identificação e Quantificação dos Metabólitos.....	50
III.2 – Identificação dos Metabólitos e Geração de Dados para o Cálculo dos Parâmetros Cinéticos	51
III.2.1 – Análises para a Comparação dos metabólitos por HPLC-UV.....	51
III.2.2 – Análises para a Comparação dos metabólitos por GC/MS.....	54
III.2.3 – Análise de Detecção e Quantificação do Nitrogênio Removido	54
III.3 – Representação Matemática do Processo de Bionitrogenação do Carbazol.....	55
IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
IV.1 – Caracterização do Microrganismo.....	57
IV.1.1 – Características do Microrganismo.....	58
IV.1.2 – Curva de Crescimento Celular	59

IV.2 – Detecção e Quantificação dos Metabólitos	61
IV.2.1 – Espectro de Absorvância na Faixa do Ultravioleta	61
IV.2.2 – Análise dos Metabólitos por Cromatografia Líquida.....	62
IV.2.2.1 – Biodegradação do Carbazol.....	63
IV.2.2.2 – Biodegradação do 2,3-Dihidroxi Bifenil e 2-Amino Bifenil.....	79
IV.2.3 – Análise de Amônia/Amônio.....	87
IV.2.4 – Análise de Degradação do Óleo Sintético.....	88
IV.2.5 – Análise de Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas Acoplado (GC/MS)	90
IV.3 – Geração de Modelo do Sistema Reacional.....	94
V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	105
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
VII – ANEXOS	120
Anexo 1	120
Anexo 2	121
Anexo 3	125
Anexo 4	127
Anexo 5	132

Lista de Figuras

Figura I.1: Estruturas contendo heteroátomos nitrogenados comumente presentes no petróleo.	3
Figura I.2: Rota de degradação do carbazol para bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> (LARENTIS, 2005).	7
Figura II.1: Compostos orgânicos heterocíclicos nitrogenados presentes no petróleo.	12
Figura II.2: Rota genérica completa de degradação de carbazol baseada nas propostas de OUCHIYAMA <i>et al.</i> (1993), GIEG <i>et al.</i> (1996), SHOTBOLT-BROWN <i>et al.</i> (1996), SATO <i>et al.</i> (1997a e 1997b), OUCHIYAMA <i>et al.</i> (1998), KIRIMURA <i>et al.</i> (1999), SCHNEIDER <i>et al.</i> (2000), NOJIRI <i>et al.</i> (2001a), NAKAGAWA <i>et al.</i> (2002) e LARENTIS (2005), para os respectivos microrganismos utilizados (TCA indica o ciclo do ácido tricarboxílico).	24
Figura II.3: Mecanismo de conversão microbiológica de carbazol em 2'-amino bifenil-2,3-diol pela ação da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) passando por um composto intermediário instável (modificado de BENEDIK <i>et al.</i> , 1998). Rota proposta para a cepa CA10 de <i>Pseudomonas sp.</i> por SATO <i>et al.</i> , (1997b).	28
Figura II.4: Esquema modificado dos componentes e funções das subunidades da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase para a conversão do carbazol em 2'-amino bifenil-2,3-diol através do mecanismo de transferência de elétrons proposto por NAM <i>et al.</i> (2002b).	32
Figura II.5: Funções propostas por BUNDY <i>et al.</i> (1998) para as proteínas codificadas do gene <i>ant</i> . Os genes <i>antAB</i> que codificam a dioxigenase terminal e <i>antC</i> que codifica a redutase são evolutivamente relacionados a uma dioxigenase da classe IB de dihidroxilação multicomponentes.	38
Figura II.6: Esquema da rota de degradação do carbazol realizada pelos microrganismos <i>Pseudomonas sp.</i> CA10 e <i>Pseudomonas stutzeri</i>	43
Figura III.1: Fluxograma das etapas realizadas nesta dissertação para os processos de obtenção do biocatalisador, do experimento de degradação do carbazol com as células íntegras não proliferantes (<i>resting cells</i>), de análise de detecção dos compostos da rota metabólica da bactéria <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11 e de estimação dos parâmetros e modelagem matemática do sistema bifásico.	53

Figura IV.1: Aspecto das colônias de <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11 crescida em agar nutriente durante 48 horas a 30°C.	58
Figura IV.2: Fotografias em microscópio, utilizando aumento de 1000 vezes, da cultura da bactéria <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11. Em a) está a lâmina “a fresco” e em b) está a lâmina de coloração de gram.	58
Figura IV.3: Microscopia eletrônica da bactéria <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11.	59
Figura IV.4: Crescimento celular da bactéria <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11 em meio com carbazol como única fonte de nitrogênio.....	60
Figura IV.5: Espectro de intensidade de absorção molecular na faixa de comprimento de onda do ultravioleta para os padrões dos metabólitos da rota de degradação do carbazol.....	61
Figura IV.6: Cromatograma dos padrões na análise de HPLC. Pico a – ácido cis,cis-mucônico em 8,12 minutos; pico b – catecol em 8,77 minutos; pico c – ácido antranílico em 9,53 minutos; pico d – tolueno em 10,15 minutos; pico e – 2,3-dihidroxi bifenil em 13,80 minutos; pico f – 2-amino bifenil em 14,85 minutos; e pico g – carbazol em 19,29 minutos.	62
Figura IV.7: Cromatograma da fase orgânica do teste de degradação do carbazol com tratamento com cartuchos de extração em fase sólida.....	64
Figura IV.8: Cromatogramas da fase orgânica do teste de degradação do carbazol com tratamento com cartuchos de SPE. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes.	65
Figura IV.9: Cromatograma da fase orgânica do teste de degradação do carbazol sem tratamento com cartucho de extração em fase sólido.....	66
Figura IV.10: Cromatogramas da fase orgânica do teste de degradação do carbazol sem tratamento com cartuchos de SPE. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes.	67
Figura IV.11: Gráfico do perfil de concentração do carbazol em função do tempo de reação. Em preto estão os dados obtidos no experimento realizado com cartucho de SPE e em vermelho estão os dados obtidos no experimento realizado sem cartucho de SPE....	69
Figura IV.12 : Cromatograma da fase aquosa do teste de degradação do carbazol.....	70

Figura IV.13: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do carbazol. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. Os picos na região 1 são oriundos do meio (tween 20), os picos na região 2 são de ácido cis,cis-mucônico, os picos da região 3 são de catecol, os picos na região 4 são de ácido antranílico, os picos na região 5 são de tolueno e os picos na região 6 são de oriundos da célula (seção IV.2.4).....	71
Figura IV.14: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do carbazol. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. Os picos na região 1 são de carbazol e os picos na região 2 são oriundos do meio do teste.....	73
Figura IV.15: Gráficos do perfil de concentração do carbazol na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).....	75
Figura IV.16: Gráfico do perfil de concentração do ácido antranílico na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).....	76
Figura IV.17: Gráfico do perfil de concentração do catecol na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).....	77
Figura IV.18: Gráfico do perfil de concentração do ácido cis,cis-mucônico na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).	78
Figura IV. 19: Esquema do mecanismo de degradação do carbazol no interior da célula (adaptado de MONTICELLO, 2000).	79

Figura IV.20: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem 2,3-dihidroxi bifenil (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. O pico na região de tempo de retenção 13,80 minutos é de 2,3-dihidroxi bifenil. Os demais picos não são de interesse neste teste.....	81
Figura IV.21: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do 2-amino bifenil. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem 2'-amino bifenil (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do 2'-amino bifenil e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. Os picos na região de tempo de retenção 14,85 minutos são de 2-amino bifenil.....	83
Figura IV.22: Gráfico do perfil de concentração do 2,3-dihidroxi bifenil e do 2-amino bifenil na fase aquosa do teste de degradação em função do tempo de reação.	84
Figura IV.23: Cromatogramas da fase orgânica do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem 2,3-dihidroxi bifenil (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. O pico na região de tempo de retenção 13,80 minutos é de 2,3-dihidroxi bifenil.....	85
Figura IV.24: Gráfico do perfil de concentração do 2,3-dihidroxi bifenil na fase orgânica do teste de degradação em função do tempo de reação.	86
Figura IV.25: Gráfico do perfil de concentração da amônia/amônio na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação, com o erro experimental referente a cada ponto.	88
Figura IV.26: Cromatograma da fase aquosa do teste de degradação do tolueno. O pico na região do tempo de retenção de aproximadamente 10,15 minutos é referente ao tolueno.	89
Figura IV.27: Cromatograma da fase orgânica do teste de degradação do tolueno. O pico na região do tempo de retenção de aproximadamente 10,15 minutos é referente ao tolueno.	90

Figura IV.28: Cromatograma, obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas, da amostra gerada na biodesnitrogenação do carbazol pela cepa GTIN11 de <i>Sphingomonas sp.</i>	91
Figura IV.29: Espectro de massas para a comparação do pico de carbazol obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 97% de similaridade.	92
Figura IV.30: Espectro de massas para a comparação do pico de ácido antranílico obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 85% de similaridade.	92
Figura IV.31: Espectro de massas para a comparação do pico de catecol obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 79% de similaridade.	93
Figura IV.32: Espectro de massas para a comparação do pico de 1,7-dihidroxi naftaleno (padrão interno) obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 97% de similaridade.	93
Figura IV.33: Espectro de massas para a comparação do pico de carbazol obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 97% de similaridade.	94
Figura IV.34: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran [®] 11. Os gráficos de carbazol na fase óleo e carbazol na fase aquosa apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.	99
Figura IV.35: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran [®] 11. Os gráficos de 2'-amino bifenil-2,3-diol apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.	100
Figura IV.36 : Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran [®] 11. Os gráficos de HOADA e ácido antranílico apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.	101
Figura IV.37: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran [®] 11. Os gráficos de catecol e ácido cis,cis-mucônico apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.	102
Figura IV.38: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran [®] 11. O gráfico de amônia/amônio apresenta os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.	103

Figura IV.39: Esquema proposto para a rota de degradação do carbazol realizada pela bactéria <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11.....	104
Figura V.1: Esquema da rota de degradação do carbazol realizada pelas bactérias <i>Pseudomonas sp.</i> CA10 e <i>Pseudomonas stutzeri</i> (modificado de OUCHIYAMA <i>et al.</i> , 1993; NOJIRI <i>et al.</i> , 2002; e LARENTIS, 2005).....	106
Figura VII.1: Curva de calibração de Peso Seco x Absorbância para a cepa GTIN11 em meio mineral mínimo contendo somente carbazol como fonte de nitrogênio.....	120
Figura VII.2: Curva de calibração do carbazol para a análise de cromatografia líquida...	121
Figura VII.3: Curva de calibração do 2-amino bifenil para a análise de cromatografia líquida.....	122
Figura VII.4: Curva de calibração do 2,3-dihidroxi bifenil para a análise de cromatografia líquida.....	122
Figura VII.5: Curva de calibração do ácido antranílico para a análise de cromatografia líquida.....	123
Figura VII.6: Curva de calibração do catecol para a análise de cromatografia líquida.	123
Figura VII.7: Curva de calibração do ácido cis,cis-mucônico para a análise de cromatografia líquida.....	124
Figura VII.8: Curva de calibração para quantificação do nitrogênio removido.	125
Figura VII.9: Espectros de massa do padrão interno e dos padrões da rota de degradação do carbazol.	132

Lista de Tabelas

Tabela I.1: Características de alguns petróleos no mundo. Grau API é uma medida da densidade de petróleo e derivados definida pelo <i>American Petroleum Institute</i> (quanto menor a densidade do petróleo, maior seu grau API) (modificado de LARENTIS, 2005; e LEITE <i>et al.</i> , 2005).....	2
Tabela II.1: Resumo dos artigos comentados.	21
Tabela III.1: Composição mássica do meio de cultivo usado para o crescimento das células da bactéria.....	47
Tabela III.2: Composição percentual do meio teste usado para a biodegradação do carbazol a uma concentração celular de $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	49
Tabela IV.1: Características da cultura <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11.....	59
Tabela IV.2: Valores dos parâmetros estimados em Fortran [®] 11 utilizados na modelagem do processo considerando a transformação enzimática do carbazol em ácido cis,cis-mucônico (valores constantes: $k_{eq} = 240,7$ e $x = 3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).	98
Tabela IV.3: Matriz de correlação entre os parâmetros do modelo gerado para a transformação do carbazol em ácido cis,cis-mucônico utilizando a bactéria <i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11.	99
Tabela VII.1: Valores de absorvância a 625 nm	126

I – INTRODUÇÃO

O petróleo é uma mistura complexa de moléculas orgânicas que variam de 1 a 60 átomos de carbono que compreendem hidrocarbonetos, alcanos e aromáticos, além de moléculas heteroatômicas contendo enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais. Dessa maneira, o carbono se apresenta como principal constituinte da mistura, seguido pelo hidrogênio, enxofre e, em menores proporções, nitrogênio (com maior ocorrência no óleo sulamericano), oxigênio, metais e alguns sais como os cloretos de sódio, magnésio e cálcio (LARENTIS, 2005).

O óleo cru pode ser denominado de três formas diferentes, de acordo com a proporção de hidrocarbonetos presentes no mesmo: parafínico, quando possuir um maior percentual de cadeias do tipo C_nH_{2n+2} ; naftênico, quando possuir um maior percentual de compostos cíclicos saturados do tipo C_nH_{2n} ; e aromático, quando possuir um maior percentual de compostos cíclicos insaturados (BODUSZYNSKI, 1987).

Dentre os heteroátomos, o enxofre e o nitrogênio são os que necessitam de maior atenção. As moléculas que apresentam em sua composição enxofre, em geral, são um problema mundial por se apresentarem bastante reativas e corrosivas, tendo sua presença com maior significância em frações pesadas do petróleo nas formas, além da elementar, de sulfetos, dissulfetos, mercaptanas e tiofenos (LARENTIS, 2005).

Já as moléculas que apresentam em sua composição nitrogênio, um problema de maior intensidade em reservas da América do Sul, também são encontradas em grande parte em frações pesadas (RIBEIRO, 2004), variando sua composição entre 0 e 2% do petróleo. Ao observar a Tabela 1.1, onde está exibido o panorama geral das composições dos petróleos em diferentes locais ao redor do mundo, nota-se que os teores dos compostos nitrogenados presentes nos óleos brasileiros são significativamente superiores aos observados nos demais locais apresentados.

Estes compostos nitrogenados podem apresentar propriedades neutras ou não-básicas (como, por exemplo, as moléculas de indol, pirrol, carbazol e derivados destes)

e básicas (como, por exemplo, as moléculas de piridina e quinolina) (LARENTIS, 2005).

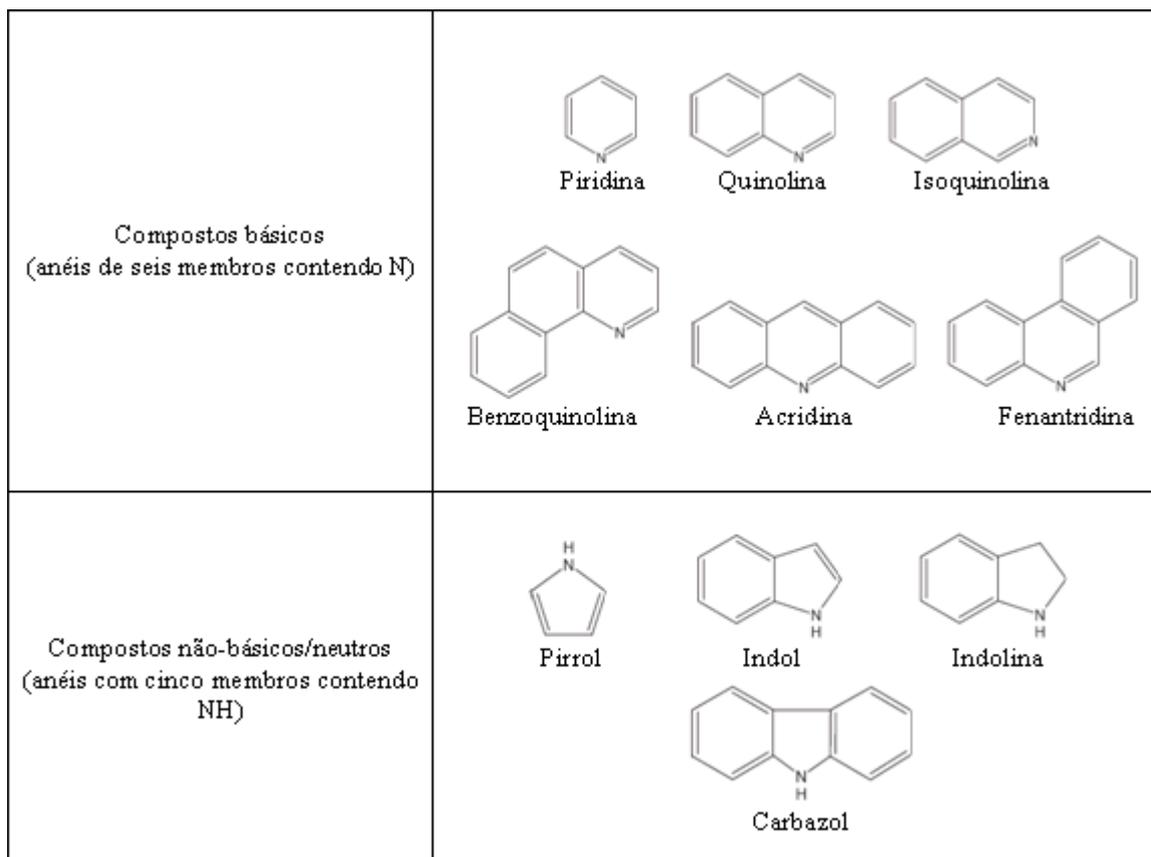
Tabela I.1: Características de alguns petróleos no mundo. Grau API é uma medida da densidade de petróleo e derivados definida pelo *American Petroleum Institute* (quanto menor a densidade do petróleo, maior seu grau API) (modificado de LARENTIS, 2005; e LEITE *et al.*, 2005).

Características	Brent (Mar do Norte)	Ásia Leve (Thevenard Island)	Marlim (RJ)	Cabiúnas (RJ)	Fazenda Alegre (ES)	Árabe Leve
°API	37	40,7	19,7	24,7	13,2	33,3
Enxofre (% peso)	0,4	0,03	0,75	0,47	0,75	1,63
Nitrogênio (% peso)	0,104	0,01	0,45	0,27	0,33	0,09
Vanádio (ppm)	7,1	<0,1	24	12	6	14
Níquel (ppm)	1,4	1	19	9	42	3,5
Metais (ppm)	-	-	-	-	-	-
Acidez (mg KOH/g)	0,05	0,04	1,01	0,83	0,8	0,08
Asfaltenos (% peso)	-	-	2,6	2,8	2,6	1,1

De acordo com o conceito de neutralidade e basicidade de Lewis, as propriedades são assinaladas segundo a presença, ou não, de um par eletrônico não ligado do nitrogênio ao compartilhamento e a configuração eletrônica apresentada pelos anéis aromáticos destas moléculas (quando o par eletrônico não ligado do nitrogênio não participa da nuvem eletrônica do anel aromático, caracterizará a molécula como uma base de Lewis) (LARENTIS, 2005).

De forma a ilustrar a estrutura destes compostos, na Figura I.1 estão representadas as estruturas dos principais compostos nitrogenados presentes no petróleo. O carbazol, composto heteroatômico encontrado em maior percentual (BENEDIK *et al.*, 1998), é caracterizado, segundo o conceito de basicidade de Lewis, como uma molécula heterocíclica aromática neutra (ou não-básica) composta por um sistema dibenzopirrol (SATO *et al.*, 1997).

Figura I.1: Estruturas contendo heteroátomos nitrogenados comumente presentes no petróleo.



Os compostos heteroatômicos, citados anteriormente, são constituintes de muitos combustíveis fósseis, o que pode provocar problemas quando utilizados como carga em unidades de refino, gerando envenenamento dos catalisadores de hidrotreatamento e instabilidade dos combustíveis. Além disto, estes compostos recalcitrantes também geram problemas na obtenção de energia, pois quando queimados emitem uma série de compostos óxidos (SO_x e NO_x) que, em contato com a umidade atmosférica, reagem formando chuvas ácidas, além de catalisarem a degradação da camada de ozônio e danificar o ecossistema devido ao seu alto poder carcinogênico e mutagênico (OUCHIYAMA *et al.*, 1993; SATO *et al.*, 1997). Por estes aspectos negativos, tem-se um crescente rigor da legislação ambiental, impondo à indústria petrolífera o aumento da busca por soluções para a remoção dos compostos sulfurados e nitrogenados gerados, de forma a reduzir drasticamente essas emissões na atmosfera.

Frente a este problema ambiental, algumas alternativas vêm sendo bastante discutidas, como a substituição da matriz energética de petróleo por combustíveis menos poluentes de fontes renováveis, como a utilização de biomassa, ou a remoção

destes componentes contaminantes, através do desenvolvimento dos processos de refino.

Devido à importância geo-político-econômica do petróleo na conjuntura mundial atual e a grande quantidade de reservas ainda disponíveis, a remoção de compostos com N, S, O e metais é a opção de maior relevância econômica. Estes processos apresentam melhores resultados em curto prazo, visto a necessidade de adequação do controle de emissão de poluentes às exigências na legislação ambiental cada vez maiores nas últimas décadas, de centenas para dezenas de ppm dos heteroátomos (LANGE E PACHECO, 1999; HOPKIN, 2005). Por este motivo, estudos de processos para remoção de compostos indesejáveis em petróleo vêm ganhando um grande impulso, principalmente após os acordos, para redução de emissões (os tratados ambientais como, por exemplo, o Protocolo de Kyoto), firmados entre a maioria dos países com maior industrialização (maiores responsáveis por estas emissões).

Atualmente, a redução das quantidades de compostos heteroatômicos presentes em petróleo a níveis aceitáveis pela legislação é realizada através de um processo de hidrogenação, na presença de um catalisador a base de Ni-Mo ou Co-Mo em condições de operação com altas temperaturas (300 a 400°C) e altas pressões (LARENTIS, 2005). Este tipo de processamento é denominado hidrotratamento (HDT), onde praticamente não se atinge concentrações de heteroátomos muito mais baixa que a atual.

Além dos efeitos ambientais, os compostos heteroatômicos afetam economicamente o processo de refino do petróleo, alterando assim a qualidade dos produtos dele derivados. Como exemplo, a remoção de 90% do nitrogênio presente no petróleo, resulta em um aumento acima de 20% do rendimento da gasolina, influenciando também no aumento da vida útil dos catalisadores de refino (BENEDIK *et al.*, 1998).

Os compostos como H₂S, enxofre elementar, mercaptanas, amônia e cianetos provenientes da decomposição de compostos sulfurados e nitrogenados, além de derivados de sais (HCl e NH₄Cl) promovem a corrosão de equipamentos de refino, de armazenagem e de tubulações, atuando também como inibidores de alguns tipos de processamentos (BENEDIK *et al.*, 1998). O carbazol, por exemplo, é um composto não-básico nitrogenado presente no petróleo que, durante o hidrotratamento, é convertido

em derivados básicos que são adsorvidos em sítios ativos ácidos dos catalisadores de refino, resultando na desativação e decréscimo de rendimento do processo (LI *et al.*, 2004).

Existe na natureza uma ampla gama de microrganismos silvestres que são capazes de metabolizar compostos orgânicos e aromáticos, que contém inserido em suas moléculas nitrogênio, enxofre, oxigênio e/ou metais, utilizando-os como fonte de nutrientes e energia (RIBEIRO, 2004). Por este motivo é de grande interesse biotecnológico a aplicação de rotas metabólicas na degradação (ou mineralização) destes compostos que estão presentes no óleo cru e seus derivados.

Neste sentido, o emprego de microrganismos com a finalidade de remover estes compostos através de biorrefino se mostraria, no ponto de vista operacional, como uma alternativa bastante econômica, pois emprega pressões e temperaturas de operação significativamente menores quando comparadas às aplicadas a tecnologia de hidrotreatamento, havendo uma redução considerável do gasto energético e emissões de CO₂, além da eliminação do uso de hidrogênio (LANGE e PACHECO, 1999; RIBEIRO, 2004). Além das condições brandas de operação, este processo também é atrativo por apresentar reações com alta especificidade devido à elevada seletividade característica das reações enzimáticas, uma vez que não ocorrem significantes degradações de outros componentes da matriz energética, como ocorre com o refino catalítico por hidrotreatamento (BENEDIK *et al.*, 1998; LANGE e PACHECO, 1999).

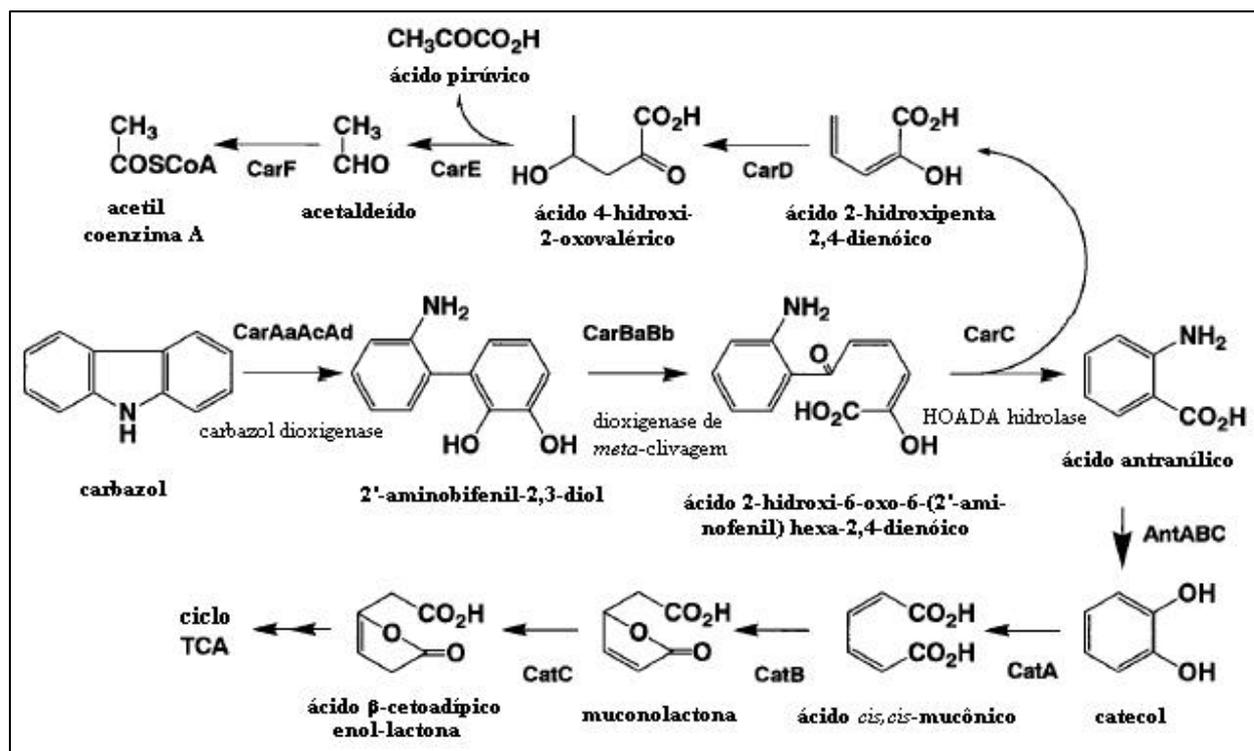
Por ainda estar em um estágio incipiente, devido à remoção do heteroátomo N ser um problema de maior intensidade do petróleo da região sulamericana, o processo de degradação de compostos nitrogenados utilizando biocatalisadores apresenta algumas dificuldades econômicas, entre estas está a baixa taxa de crescimento dos biocatalisadores (cepas silvestres). A fim de viabilizar o uso em larga escala deste tipo de processo, a proposta melhor aceita para o biorrefino atualmente é o seu acoplamento às unidades de hidrotreatamento de petróleo como já proposto para a dessulfuração (MONTICELLO, 1994; LANGE e PACHECO, 1999; KILBANE II, 2004) (e também proposto por KILBANE II (2006) para a desnitração), surgindo a possibilidade de ampliação do leque de compostos comercializados com a obtenção de coprodutos químicos com potencial utilização em outras indústrias (LANGE e PACHECO, 1999).

A biodegradação de carbazol por algumas espécies de bactérias, capazes de utilizá-lo como única fonte de carbono, nitrogênio e energia, tem sido bastante estudada na última década, onde foram descritas na literatura algumas rotas microbianas que apresentam alta especificidade (OUCHIYAMA *et al.*, 1993; GIEG *et al.*, 1996; SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996; OUCHIYAMA *et al.*, 1998; KIRIMURA *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 2000), assim como as enzimas atuantes e os genes envolvidos nessas rotas (Figura I.2).

Atualmente, as rotas metabólicas estudadas para a degradação do carbazol são similares a rota destrutiva de degradação proposta por Kodama para remoção de enxofre. Esta rota provoca perda no poder combustível do carbazol, devido ao consumo de carbono e nitrogênio para o crescimento bacteriano (BENEDIK *et al.*, 1998), reduzindo o poder energético do petróleo. Assim sendo, este processo se tornará viável à medida que a síntese de componentes de química fina derivados destes compostos nitrogenados, utilizados na produção de, por exemplo, plásticos e fármacos, apresentem-se cada vez mais robustos (OUCHIYAMA *et al.*, 1993).

Os derivados de carbazol e de seus produtos de degradação são de grande importância terapêutica. Por este motivo, e por estas moléculas estarem presentes em sua grande maioria em óleo, há a necessidade de compreensão das rotas metabólicas bacteriana destes compostos e também do sistema reacional, visto que as reações de biodegradação são processadas em sistemas bifásicos. Documentos na literatura reportam que compostos tetracíclicos derivados de piridocarbazóis, que possuem em sua base a molécula de carbazol, apresentam em animais, principalmente, propriedades anticancerígenas e que compostos heterocíclicos, que contém grupamentos pirróis, apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antitumorais (RICE *et al.*, 1964; DALTON *et al.*, 1969; BALAMURALI e RAJENDRA PRASAD, 2001). Um exemplo disto é a utilização da atividade clínica do ácido 6-cloro,1,2,3,4-tetrahidrocarbazol-2-carboxílico, composto derivado de tetrahydrocarbazol que apresenta propriedades biológicas antifúngicas e anti-inflamatórias, no tratamento da doença gota aguda (ASSELIN *et al.*, 1976).

Figura I.2: Rota de degradação do carbazol para bactéria *Pseudomonas stutzeri* (LARENTIS, 2005).



O princípio da degradação bacteriana atribuído nas rotas atualmente propostas para compostos como carbazol e dibenzotiofeno também pode ser aplicado no biorrefino de outros compostos nitrogenados e sulfurados presentes no petróleo. Isto se faz possível devido à abrangência relativamente ampla de substratos que estas enzimas são capazes de degradar, além de apresentarem grande potencial para a aplicação na biorremediação de ambientes quimicamente contaminados (LANGE e PACHECO, 1999, WACKETT, 2002).

Devido ao fato das rotas serem de caráter destrutivo reduzindo o poder combustível do carbazol (e do petróleo em geral) e às baixas taxas de conversão geralmente apresentadas pelas cepas silvestres, uma alternativa que vem sendo estudada em diversos trabalhos para a resolução desta problemática é a utilização de microrganismos geneticamente modificados capazes de remover o nitrogênio (ou qualquer outro heteroátomo) sem que haja perda do esqueleto molecular de carbono. Para isto, a tecnologia de DNA recombinante com clonagem das enzimas da rota de degradação, particularmente de carbazol, sendo aplicada a estes sistemas, permite ampliar a concentração de proteínas recombinantes no extrato protéico (obtendo

maiores quantidades de proteínas em relação aos sistemas silvestres) e o controle dos níveis de expressão, apresentando-se imprescindível na obtenção de maiores quantidades destes biocatalisadores para aplicações biotecnológicas na degradação de compostos nitrogenados. Estas características permitem ampliar as taxas de degradação, visto que o crescimento destas bactérias silvestres utilizadas atualmente é bastante lento, limitando o seu emprego em biorrefino (RIDDLE *et al.*, 2003a; KILBANE II, 2004; LARENTIS, 2005).

Outro aspecto importante na eficácia global do processo de biodegradação é a atuação de bactérias em sistemas bifásicos (meio composto por óleo-água). São raros os registros na literatura sobre o comportamento destes microrganismos capazes de atuar em sistemas bifásicos (principalmente na remoção do nitrogênio do petróleo), pois para a biodegradação neste tipo de meio se faz necessário o isolamento de bactérias, encontradas na natureza basicamente em locais contaminados por óleo, que possuam enzimas tolerantes a solventes orgânicos e que apresentem alta atividade para a assimilação dos compostos heteroatômicos de interesse encontrados na parte óleo do sistema bifásico (LI *et al.*, 2008).

Uma das bactérias isoladas de ambientes silvestres e capazes de degradar o carbazol nos sistemas citados anteriormente é a *Sphingomonas sp.* GTIN11. Esta bactéria foi isolada a partir de amostras de solo coletadas em plantas de gás manufacturado que apresentam contaminação crônica de hidrocarbonetos. Esta cepa foi obtida e purificada através de uma seleção periódica do sobrenadante do meio de cultura inoculado com as amostras de solo, a qual apresentou capacidade de crescimento em meio contendo carbazol como a única fonte de nitrogênio (KILBANE *et al.*, 2002). Por este motivo, pela cepa apresentar alta atividade enzimática em sistemas bifásicos (CARNEIRO *et al.*, 2007) e por ser bastante robusta frente a variações no processo de biodesnitrogenação, esta bactéria foi escolhida para ser utilizada como biocatalisador nos experimentos desta dissertação.

OBJETIVOS

Com vista ao que foi apresentado até o momento, este trabalho objetiva estudar a rota de desnitração enzimática do carbazol realizada pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11, identificando e quantificando compostos intermediários e finais, além de criar um modelo matemático para a degradação do carbazol, representando o sistema bifásico encontrado em processos de refino.

Este estudo poderá servir de subsídio a projetos de equipamentos que auxiliem aos processos de hidrotratamento utilizados em refinarias na remoção de compostos nitrogenados, como por exemplo, o carbazol. Isto possibilitaria a ampliação da capacidade de desnitração de óleos por microrganismos já isolados, através da utilização de ferramentas da engenharia genética (melhorando as taxas de conversão).

Objetivo Geral:

- Estudar a rota de desnitração enzimática do carbazol realizada pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

Objetivos específicos:

- Identificar e quantificar compostos intermediários e finais da rota de desnitração enzimática do carbazol realizada pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11;
- Gerar um modelo matemático que representativo do sistema bifásico de degradação do carbazol.

II – REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão apresentadas as informações encontradas na literatura sobre o composto nitrogenado (carbazol) alvo deste estudo, assim como os tipos de microrganismos utilizados como biocatalisadores das reações enzimáticas e o mecanismo enzimático da degradação do carbazol. Além disto, serão expostos também os princípios matemáticos utilizados para o desenvolvimento do modelo do processo de biodesnitrificação utilizando o biocatalisador escolhido para este estudo.

II.1 – COMPOSTOS NITROGENADOS PRESENTES NO PETRÓLEO

O petróleo é constituído por uma ampla gama de moléculas, dentre as quais se podem destacar duas classes principais, os compostos hidrocarbonetos (que apresentam em sua estrutura somente átomos de carbono e hidrogênio) e os compostos hidrocarbonetos com heteroátomos (com átomos de Enxofre, Nitrogênio e/ou Oxigênio em sua estrutura). De acordo com o aumento das estruturas moleculares, com ou sem heteroátomos (o que confere uma grande variedade de grupos funcionais e possibilidades estruturais), a complexidade do petróleo também é aumentada, necessitando assim de um maior gasto energético para o seu tratamento na etapa de refino devido à ampliação dos pontos de ebulição de corte do óleo (BODUSZYNSKY, 1987; BODUSZYNSKY, 1988).

Dentre os compostos heteroatômicos, as pesquisas de compostos nitrogenados estão ganhando espaço, principalmente com foco em petróleos pesados (complexos) como o brasileiro. Estes compostos nitrogenados estão subdivididos em não heterocíclicos, que apresentam o heteroátomo fora da cadeia carbônica circular, e heterocíclicos, que apresentam o heteroátomo inserido na cadeia carbônica circular. As aminas alifáticas e anilinas estão introduzidas no grupo dos não heretocíclicos, que são facilmente oxidados em tratamentos catalíticos, como por exemplo, no hidrotreamento, devido à polaridade conferida a molécula pelo grupamento nitrogenado (RIBEIRO, 2004).

Os compostos nitrogenados heterocíclicos, por sua vez, podem ser separados em moléculas com anel piridínico, e com anel pirrólico, diferindo em suas configurações eletrônicas. Os compostos com anel piridínico apresentam o par de elétrons do nitrogênio não compartilhado na estrutura, conferindo um caráter básico à molécula, segundo o conceito de Lewis. Já os compostos com anel pirrólico apresentam o par de elétrons do nitrogênio participando da nuvem eletrônica do anel, não havendo interação deste com os compostos eletrofilicos em sua proximidade e conferindo a esta um caráter neutro ou não básico, também baseado no conceito de Lewis (MOORE, *et al.*, 1951; KATRITZKY, 1985). De acordo com RICHTER *et al.* (1952) e LI *et al.* (1992), dentre os compostos heterocíclicos nitrogenados, há maior predominância das estruturas piridínicas básicas quando comparado as estruturas pirrólicas neutras, variando entre 25% e 33% de compostos básicos. LI *et al.* (1992) ainda reporta que o nitrogênio está diretamente associado ao alto ponto de ebulição das frações de petróleo.

Os problemas causados pelos compostos nitrogenados básicos são bem conhecidos, pois eles são capazes de interagir com os sítios ácidos dos catalisadores, ocasionando a deposição de coque na superfície do catalisador (envenenamento) durante os processos de craqueamento e hidrocraqueamento, mesmo com baixas concentrações destes compostos. O processo de neutralização dos sítios ativos dos catalisadores pelos compostos básicos é reversível, mas apresenta maior dificuldade na reversibilidade quanto maior o peso molecular do composto (em frações pesadas), tornando o craqueamento mais difícil, com aumento acentuado de gás e coque, em comparação aos compostos de baixo peso molecular (HUNT e O'NEAL, 1978; FURIMSKY, 1979).

Além dos compostos nitrogenados citados anteriormente, existem também no petróleo compostos com altos pesos moleculares que apresentam em suas estruturas partes aromáticas e alifáticas (apresentando ou não heteroátomos) (FEDORAK *et al.*, 1993 apud RIBEIRO, 2004). Estes compostos são denominados como porfirinas e são encontrados nas frações asfálticas do petróleo (asfaltenos), sendo capazes de complexarem metais, como por exemplo, o vanádio e o níquel. Por este motivo, estes compostos se tornam um imenso problema para o refino, causando inibição dos sítios ativos da superfície dos catalisadores pela deposição dos metais complexados (envenenamento de catalisadores) (RIBEIRO, 2004).

Na Figura II.1 estão expostas as estruturas das moléculas heterocíclicas nitrogenadas geralmente encontradas no petróleo (podem ser encontrados também compostos que tem em sua base estrutural as moléculas apresentadas na Figura II.1).

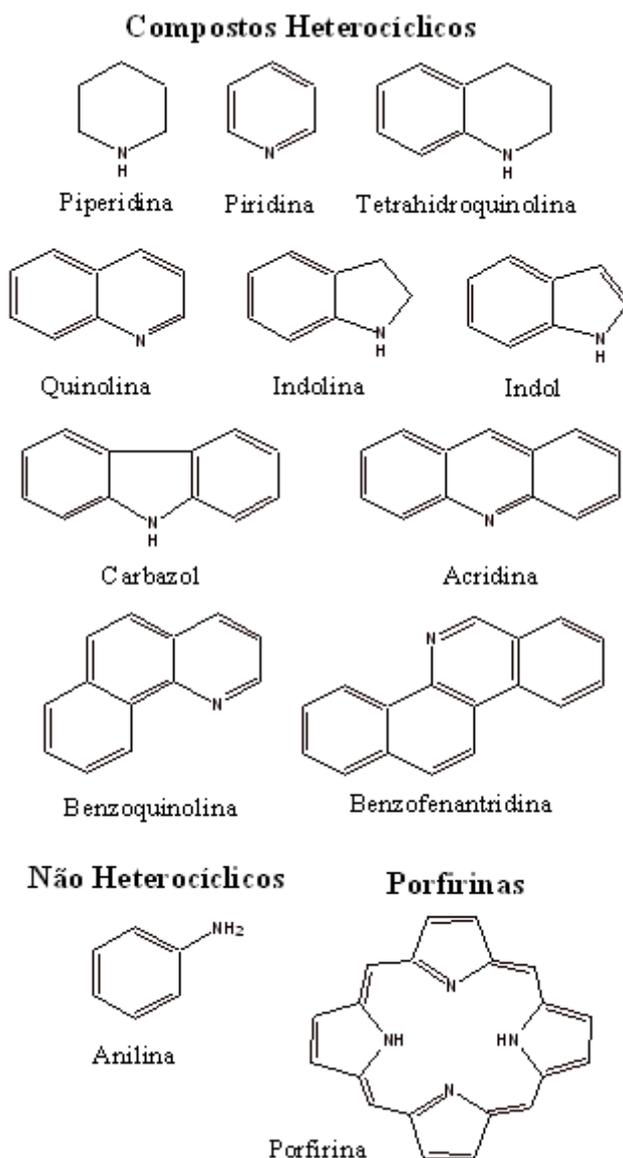


Figura II.1: Compostos orgânicos heterocíclicos nitrogenados presentes no petróleo.

Os compostos nitrogenados estão presentes na grande maioria dos petróleos ao redor do mundo, sendo encontrados em concentrações que variam de valores inferiores a 0,2%, como no poço de Brent no mar do norte, a valores em torno de 2,0% (LI *et al.*, 1992). Em petróleos brasileiros, como o de Cabiúnas, de Fazenda Alegre e de Marlim, esses valores são, respectivamente, de 0,27%, 0,33% e 0,45% (Tabela I.1). Estes compostos são encontrados com maior facilidade nas frações pesadas do petróleo, que

apresentam altos pesos moleculares e pontos de ebulição bastante altos (superiores a 300°C).

Dentre a gama de compostos nitrogenados encontrados nas diversas frações de petróleo, BALL (1962) e LOCHTE (1995) apud RIBEIRO (2004) reportaram que os compostos predominantemente encontrados são carbazóis, indóis, quinolinas, benzoquinolinas, piridinas e homólogos a estes alquilados. Além destes, também são encontrados em frações pesadas compostos contendo dois átomos de nitrogênio, como azocarbazóis e azoindóis; um átomo de oxigênio e um de nitrogênio, como hidroxipiridinas e hidroxiquinolinas; além de amidas, quinolonas e alquilpiridonas (JEWELL e HARTING, 1962; SNYDER, 1969; PETERS e BENDORAITIS, 1976; MCKAY *et al.*, 1976; LI *et al.*, 1992).

II.2 – DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CARBAZOL

O estudo de microrganismos capazes de degradar compostos heteroatômicos presentes em petróleo e outros combustíveis fósseis vem se desenvolvendo no decorrer dos últimos anos com o avanço das técnicas de biologia molecular e engenharia bioquímica, e com a ampliação da gama de moléculas heteroatômicas removidas biologicamente, visto as possíveis aplicações biotecnológicas em biorrefino e na minimização dos efeitos ambientais por biorremediação, além da utilização de muitos dos metabólitos destas rotas como intermediários na obtenção de fármacos e outros produtos de química fina (BENEDIK *et al.*, 1998).

Nas últimas duas décadas a biodegradação de carbazol, hidrocarboneto aromático nitrogenado utilizado por alguns microrganismos como única fonte de carbono, nitrogênio e energia, vem ganhando espaço nas linhas de pesquisa ao redor do mundo. Isto está ocorrendo devido o carbazol ser uma molécula altamente tóxica e carcinogênica, encontrada em alguns rios, solos, águas subterrâneas, além do petróleo (e seus derivados) e da atmosfera, apresentando difícil remoção e inutilização de equipamentos nos processos químicos de desnitração existentes atualmente (GROSSER *et al.*, 1991, KOBAYASHI *et al.*, 1995, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996; KIRIMURA *et al.*, 1999). Neste sentido, o carbazol é usado como molécula

heteroatômica modelo para estudos de desnitração com microrganismos isolados a partir de lodos ativados e ambientes contaminados por petróleo e derivados, como por exemplo, em águas e solos (principalmente nas proximidades de plantas industriais) (OUCHIYAMA *et al.*, 1993; GIEG *et al.*, 1996, SHOTBOLT-BROWN *et al.*, 1996; OUCHIYAMA *et al.*, 1998; KIRIMURA *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 2000; KILBANE *et al.*, 2002; INOUE *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008).

Dentre as bactérias já isoladas e descritas na literatura, capazes de degradar o carbazol presente em petróleo, carvão, óleos e outros combustíveis, assim como em águas e solos contaminados, encontram-se muitas espécies de *Pseudomonas* e algumas de *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Serratia* e *Bacillus*. O que se observa nestes estudos é que a maioria dos mecanismos de degradação dos compostos aromáticos necessita de uma etapa aeróbia inicial (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b), embora haja casos de degradação anaeróbia (ou com limitação de oxigênio) (KOBAYASHI *et al.*, 1995; BENEDIK *et al.*, 1998).

Duas cepas, CA06 e CA10, de *Pseudomonas* foram isoladas por OUCHIYAMA *et al.* (1993) de solo e lodo ativado, respectivamente, capazes de degradar o carbazol como única fonte de nutrientes e energia. Nesta degradação, os principais produtos metabólicos são formados através de uma oxidação inicial do substrato, com posterior *meta*-clivagem a ácido antranílico, havendo acúmulo deste no meio, e o surgimento de catecol com posterior reação de *orto*-clivagem e utilização do produto no metabolismo de crescimento celular. Foi ainda exposto neste trabalho que ambos os microrganismos foram capazes de consumir totalmente em 18 horas a concentração inicial de 5,7mM de carbazol. OUCHIYAMA *et al.* observaram também que as enzimas usadas no consumo do carbazol são induzidas pela falta de outros nutrientes e presença da molécula de carbazol no meio. Com os resultados obtidos, foi proposta uma rota de degradação para estes microrganismos e que é usada como base para estudos com outras cepas.

No estudo publicado por HISATSUKA e SATO (1994) foi isolada de solo uma cepa identificada como *Pseudomonas stutzeri* ATCC31258 também capaz de utilizar o carbazol como fonte de nutrientes e energia em condições não propícias para seu crescimento celular. Foi observado o acúmulo de uma grande quantidade do metabólito ácido antranílico, intermediário na biossíntese de L-triptofano, no meio reacional,

havendo consumo total de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbazol em 4 dias. Neste estudo também foram verificados os efeitos de alguns surfactantes não-iônicos no metabolismo celular.

Em 1995, KOBAYASHI *et al.* publicaram a identificação, em amostras de solo, de 8 cepas capazes de degradar o carbazol de óleo e águas poluídas em condições de limitação de oxigênio (microaerófilas) ou anaeróbias, simulando as condições de transporte e armazenagem de petróleo (em atmosfera de nitrogênio). Dos microrganismos isolados, quatro eram *Pseudomonas sp.*, dois eram *Bacillus sp.*, um era *Serratia sp.* e uma *Escherichia coli*, apresentando capacidade de consumir 30% do carbazol, em concentração inicial de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, em 28 dias.

GIEG *et al.* (1996) isolaram de solos contaminados por creosoto e identificaram como sendo a bactéria *Pseudomonas sp.* LD2. Esta *Pseudomonas* apresentou capacidade de degradação de 87% do carbazol em 24 horas (esgotamento do carbazol em 96 horas), com surgimento no meio reacional de ácido antranílico, catecol e ácido indol-3-acético. GIEG *et al.* propuseram que a formação do composto indólico ocorreu via adição intramolecular do tipo Michael devido a instabilidade do 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)hexa-2,4-dienóico (HOADA) e ao pH baixo ($\text{pH}<4$). Além disto, foi testado, mas sem sucesso, o crescimento desta cepa usando como substrato outros compostos aromáticos heterocíclicos como benzeno, naftaleno, fenantreno, antraceno, dibenzotiofeno, dibenzofurano e fluoreno.

SHOTBOLT-BROWN *et al.* (1996) identificaram a presença das espécies *Burkholderia cepacia* (CB1), *Xanthomonas sp.* (CB2) e *Pseudomonas sp.* (CB3), em amostras compostas por solo e sedimentos contaminados por esgoto de uma planta de carvão, capazes de degradar carbazol em meio contendo dimetil sulfoxido (DMSO). Neste processo de degradação, foi verificada a remoção de 80% do carbazol nas primeiras 20 horas de incubação e que as cepas não foram capazes de metabolizar compostos análogos de carbazol, fluoreno e dibenzotiofeno. Já nos testes usando ácido antranílico, catecol e bifênil como substrato, as cepas CB2 e CB3, CB1 e CB2, e CB2, respectivamente, foram capazes de utilizá-los em seu crescimento celular. No crescimento das cepas CB1 e CB2 houve a necessidade da adição de vitaminas juntamente com o carbazol, o que não ocorreu com a cepa CB3, apresentando resultados que indicam a existência da atividade de *meta*-clivagem no anel aromático do catecol. O

comportamento das cepas foi descrito como similar ao da cepa *Pseudomonas sp.* CA10 descrito por OUCHIYAMA *et al.* (1993). Já a cepa CB3, SHEPHERD E LLOYD-JONES (1998) a identificou como sendo a espécie *Sphingomonas*.

SATO *et al.* (1997b), utilizando a cepa *Pseudomonas sp.* CA10 apresentada por OUCHIYAMA *et al.* (1993), detectaram e clonaram o fragmento de DNA que codifica as enzimas de *meta*-clivagem e de hidrólise do composto *meta*-clivado (ORF1, ORF2 e ORF3 – ORF: Open Reading Frames). Neste estudo, SATO *et al.* verificaram que a enzima CarB (ORF2) possui afinidade significativa e 20 vezes mais atividade de *meta*-clivagem para o 2,3-dihidroxi bifênil do que para os derivados de catecol. Esta cepa ainda apresentou a ORF3 homóloga a de uma bactéria capaz de expressar a enzima hidrolase, designada como CarC, exibindo atividade 40 vezes maior para o ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-hexa fenil-2,4-dienóico do que para ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-hepta-2,4-dienóico (composto de *meta*-clivagem do 3-metil-catecol).

Em 1998, OUCHIYAMA *et al.* publicaram o isolamento da cepa OM1 de *Pseudomonas stutzeri*, a partir do lodo ativado de uma planta de tratamento de efluentes, que apresentou a rota de degradação de carbazol quase idêntica a das cepas CA06 e CA10 (produção dos metabólitos 2'-amino bifênil-2,3-diol, 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)hexa-2,4-dienóico (HOADA) e ácido antranílico). A cepa OM1 diferiu das cepas CA06 e CA10 somente na via de degradação de catecol, pois no meio reacional houve aparecimento do composto ácido semialdeído-2-hidroxi-mucônico (composto oriundo da *meta*-clivagem do catecol). Os testes para a confirmação do comportamento da via de degradação do catecol foram realizados através da técnica de DNA recombinante utilizando a clonagem do fragmento de DNA atuante nesta etapa da rota em *Escherichia coli*.

A cepa CDH-7 de *Sphingomonas sp.* isolada por KIRIMURA *et al.* (1999) de amostras de solo, foi capaz de metabolizar o carbazol em amônia via ácido antranílico como produto intermediário. Este microrganismo degradou completamente em 50 horas, 500 mg*L⁻¹ de carbazol em meio de crescimento, e quando aplicada técnica de *resting cells* (técnica que utiliza as células para degradar o carbazol sem que haja crescimento), o mesmo degradou em 4 horas. KIRIMURA *et al.* realizaram também um teste de batelada alimentada com a técnica de *resting cells* adicionando 100 mg*L⁻¹ por

10 vezes, obtendo uma conversão de 75,1% do carbazol em amônia em 48 horas. Os autores testaram ainda diferentes solventes para a fase orgânica do teste de *resting cells*, observando que, para esta cepa, a degradação do carbazol diminui quando usados os solventes *p*-xileno, tolueno e heptanol na quantidade de 20% em volume. Os pesquisadores comentam que a degradação empregando a técnica de *resting cells* é seletiva, por isso mais eficiente, não verificando consumo de outros compostos aromáticos (dibenzotiofeno, fluoreno e bifenil) presentes no meio de cultura. Os pesquisadores descrevem que a cepa CDH-7 parece seguir a mesma rota proposta para a cepa CA10.

A capacidade de biodegradação de carbazol foi também verificada na bactéria *Ralstonia* sp. RJGII.123, isolada em uma planta de beneficiamento de carvão por SCHNEIDER *et al.* (2000). A cepa foi testada com concentrações iniciais de 2 mg·L⁻¹ e 500 mg·L⁻¹ de carbazol, verificando que a mesma converte em CO₂ 80% da primeira concentração inicial (menos de 1% permanece como carbazol) e 24% da segunda concentração inicial (aproximadamente 70% permanece como carbazol) em 15 dias de incubação. A identificação de metabólitos intermediários indicou que a cepa também segue rota das cepas de *Pseudomonas* sp. descritas por OUCHIYAMA *et al.* (1993). Os pesquisadores comentam também sobre a importância da elucidação dos metabólitos desta rota para o biorrefino e para a biorremediação.

A cepa GTIN11 de *Sphingomonas* sp. foi isolada por KILBANE II *et al.* (2002), em uma planta de gás manufacturado, que clonaram fragmentos de DNA, confirmando a existência de genes responsáveis pela degradação do carbazol. Diferentemente das outras cepas descritas na literatura, a cepa GTIN11 expressa as enzimas da rota de degradação de carbazol de forma constitutiva, ou seja, a cepa não tem que crescer em contato com este substrato. Na técnica de *resting cells* a cepa se mostrou capaz de degradar 95% do carbazol em 16 horas (concentração inicial de 2 mM), apresentando uma atividade específica a 37°C de 8,0 μmoles de carbazol por minuto por grama de célula seca. Os autores identificaram por homologia a presença de 5 ORF's (open reading frames) compostas por sequências de aminoácidos responsáveis pela expressão das enzimas carbazol dioxigenase (ORF1), subunidades da 2,3-dihidroxi bifenil (ORF2 e ORF3), hidrolase do composto de *meta*-clivagem (ORF4) e componente ferridoxina

(ORF5). Com isto, e a presença do metabólito ácido antranílico, eles imaginam que a cepa siga a mesma (ou muito similar) rota que as outras cepas descritas na literatura.

A enzima 2'-amino bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase envolvida na rota de degradação de carbazol da *Pseudomonas sp.* LD2 foi purificada por GIBBS *et al.* (2003). Neste estudo foram determinados a temperatura (40°C) e o pH (8,0) ótimos para a produção enzimática de 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico (HOPDA) a partir de 2,3-dihidroxi bifenil. Os pesquisadores determinaram ainda nesta cepa a atividade específica máxima de 48,1 mmol de HOPDA*min⁻¹*mg⁻¹ para o 2,3-dihidroxi bifenil, obtendo também os valores de 5 µM, 37 µM, e 44mmol*min⁻¹*mg⁻¹, para os parâmetros do modelo de inibição pelo substrato (constante de Michaelis-Menten (K_m), constante de inibição (K_s) e velocidade que a reação ocorre em altas concentrações de substrato (V_{max}), respectivamente). GIBBS *et al.* mostraram que a 2'-amino bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenase é uma enzima de *meta*-cleavagem relacionada com a família das 4,5-protocatechuate dioxigenase, e que apresenta desafios na purificação devido a instabilidade enzimática intrínseca.

A cepa CP19 da espécie *Sphingomonas sp.* foi isolada e identificada por BRESSLER *et al.* (2003) como uma bactéria que segue uma rota de degradação do carbazol diferente (também havendo perda do poder calorífico) das demais cepas encontradas na literatura devido ao acúmulo de um metabólito amarelo durante seu crescimento em carbazol (com ou sem a presença de outra fonte de carbono). Este composto foi identificado como 2-amino-fenoxazina-3-ona, um composto derivado de 2-amino fenol.

Diferentemente da maioria dos artigos publicados na literatura que focam no processo microbiológico em meio aquoso, LI *et al.* (2004) focaram seus estudos em sistemas bifásicos devido ao carbazol ser encontrado na fase líquida não-aquosa. Para isto, LI *et al.* (2004) isolaram a cepa *Pseudomonas sp.* XLDN4-9 de solos contaminados e estudaram o efeito físico-químico de algumas fases líquidas não-aquosa na degradação do carbazol. Foi aplicada uma razão fase orgânica/fase aquosa de 1:1 no sistema de *resting cells*, verificando uma remoção de 47% de 1g de carbazol, adicionado inicialmente, em 1h. O uso de solventes pode ocasionar problemas de toxicidade, mas a

adição do solvente tolueno, xileno, ciclohexano, hexano, heptano ou tetradecano, e de óleo diesel ao sistema reacional, aumentou consideravelmente a degradação de carbazol.

INOUE *et al.* (2005) isolaram diversas cepas de solo e lodo ativado similares às bactérias *Pseudomonas resinovorans* CA10 e *Sphingomonas* sp. KA1, sendo também isolada a cepa IC177 identificada como *Nocardioides* sp. (a primeira bactéria Gram-positiva que foi isolada). Esta cepa apresentou capacidade de degradar 18% do carbazol em 4 dias e 80% após 30 dias a 30°C. Além disto, esta se mostrou capaz de acumular ácido antranílico no meio de crescimento, dando indícios de se valer da mesma rota da *Pseudomonas resinovorans* CA10, e de metabolizar dibenzotiofeno-sulfona e antraceno (CA10 não metabolizou).

Os genes de *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258 usados na expressão de enzimas para a degradação de carbazol foram clonados separadamente por LARENTIS (2005) utilizando o sistema de recombinação sito-específica, sendo expressos posteriormente em *Escherichia coli*. O carbazol a uma concentração de 20 ppm foi degradado após 15 horas de reação pela enzima CarA em Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), Fe(II), NADH e FAD. Além disto, LARENTIS obteve uma taxa de degradação de 0,53 mmoles*mg de proteína⁻¹*min⁻¹ para a enzima CarB e de 1,09 mmoles*mg de proteína⁻¹*min⁻¹ para a enzima CarC, a 35°C. As atividades foram medidas pela produção (CarB) e pelo consumo (CarC) do composto ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico (HOPDA) partindo da concentração inicial de substrato de 100 mM na reação de *resting cells* (células íntegras sem a necessidade de uso de cofatores). A pesquisadora descreve que a cepa ATCC 31258 segue a mesma rota proposta para a cepa CA10.

A bactéria *Arthrobacter* sp. P1-1 foi isolada por SEO *et al.* (2006) de ambientes contaminados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Esta cepa se mostrou capaz de degradar aproximadamente 82% de dibenzotiofeno (concentração inicial de 40 mg*L⁻¹) e 57% de carbazol (concentração inicial de 40 mg*L⁻¹) em 14 dias de incubação. Os cinco metabolitos de carbazol detectados foram o ácido 4-(3-hidroxi-1*H*-indol-2-il)-2-oxobut-3-enóico, o ácido 2-(2-carboxi-vinil)-1*H*-indol-3-carboxílico, o pirido-[1,2-*a*]-indol-6,10-diona, o ácido indol-2,3-dicarboxílico e o ácido 2-amino benzóico. Avaliando os resultados, os pesquisadores sugeriram que na degradação a molécula de

carbazol foi submetida a uma 3,4-dioxigenação seguida de *orto*- e *meta*-clivagem do anel, chegando a ácido antranílico.

LI *et al.* (2008) isolaram a cepa *Klebsiella sp.* LSSE-H2 (CGMCC No. 1624) a partir de amostras de solo contaminado. Esta estirpe degrada eficientemente o carbazol a partir de qualquer meio aquoso e bifásico (aquoso-orgânico), exibindo alta atividade de desnitrificação e alto nível de tolerância ao solvente. Neste estudo, a bactéria LSSE-H2 degradou completamente $12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de carbazol em 56 horas de cultivo e quando realizado uma co-cultura com *Pseudomonas delafieldii* R-8 partindo de concentrações conhecidas de carbazol ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e dibenzotiofeno ($3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), houve degradação de aproximadamente 92% do carbazol e 94% do dibenzotiofeno em 12 horas.

Em suma, os cultivos das cepas apresentadas na literatura e nesta seção para a degradação do carbazol foram realizados em meios com diferentes concentrações de carbazol e nutrientes, mas todos com pH inicial de 7,0 e temperatura variando entre 28 e 30°C (o resumo destes trabalhos está apresentado na Tabela II.1). Alguns trabalhos comentam o aumento significativo da eficiência da degradação do carbazol com a adição de surfactantes, como por exemplo, polioxietileno, monolaureato glicol e dimetilsulfóxido (DMSO), auxiliando na dispersão do composto aromático (aumento da solubilização), disponibilizando uma maior superfície do composto para a biodegradação (OUCHIYAMA *et al.*, 1993, HISATSUKA E SATO, 1994, KIRIMURA *et al.*, 1999, GIBBS *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008).

Tabela II.1: Resumo dos artigos comentados.

Autores (ano)	Microrganismo	Isolado de	Degradação de Carbazol	Observações
OUCHIYAMA <i>et al.</i> (1993)	<i>Pseudomonas sp.</i> CA06 e CA10	Solo e Lodo ativado.	Consumo total de 5,7 mM em 18 horas.	Formação de ácido antranílico por <i>meta</i> -clivagem e consumo de catecol por <i>orto</i> -clivagem.
HISATSUKA e SATO (1994)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC31258	Solo	Consumo total de 10 g*L ⁻¹ em 4 dias.	Acúmulo de ácido antranílico e verificação do efeito de surfactantes não-iônicos.
KOBAYASHI <i>et al.</i> (1995)	4 <i>Pseudomonas sp.</i> , 2 <i>Bacillus sp.</i> , 1 <i>Serratia sp.</i> e 1 <i>Escherichia coli.</i>	Solo	Consumo de 30% de 1 g*L ⁻¹ em 28 dias.	Microrganismos atuantes em limitação de O ₂ ou em ambiente anaeróbio.
GIEG <i>et al.</i> (1996)	<i>Pseudomonas sp.</i> LD2	Solo contaminado por creosoto	Consumo de 87% em 24 horas e esgotando em 96 horas.	Formação de ácido antranílico, catecol e ácido indol-3-acético (via adição intramolecular do tipo Michael).
SHOTBOLT-BROWN <i>et al.</i> (1996)	<i>Burkholderia cepacia</i> (CB1), <i>Xanthomonas sp.</i> (CB2) e <i>Sphingomonas sp.</i> (CB3).	Solo e Sedimentos contaminados por esgoto.	Consumo de 80% em 20 horas.	Uso de DMSO e rota similar ao da cepa <i>Pseudomonas sp.</i> CA10.
SATO <i>et al.</i> (1997b)	<i>Pseudomonas sp.</i> CA10	Não isolado	Não avaliado	Clonagem do fragmento de DNA que codifica as enzimas de <i>meta</i> -clivagem e de hidrólise do composto <i>meta</i> -clivado.
OUCHIYAMA <i>et al.</i> (1998)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> OM1	Lodo ativado	Não avaliado	Rota de degradação de carbazol similar a das cepas CA06 e CA10, com formação de ácido semialdeído-2-hidroxi-mucônico (composto <i>meta</i> -clivado de catecol).

Tabela II.1: Resumo dos artigos comentados (continuação).

Autores (ano)	Microrganismo	Isolado de	Degradação de Carbazol	Observações
KIRIMURA <i>et al.</i> (1999)	<i>Sphingomonas sp.</i> CDH-7	Solo	Consumo total de 500 mg·L ⁻¹ em 50 horas no crescimento e em 4 horas no <i>resting cells</i> .	Acúmulo de amônia via ácido antranílico e redução de 20% na degradação usando os solventes <i>p</i> -xileno, tolueno e heptanol.
SCHNEIDER <i>et al.</i> (2000)	<i>Ralstonia sp.</i> RJGII.123	Planta de beneficiamento de carvão	Converte 80% de 2 mg·L ⁻¹ e 24 % de 500 mg·L ⁻¹ em CO ₂ .	Identificação dos mesmos metabólitos da rota de OUCHIYAMA <i>et al.</i> (1993).
KILBANE II <i>et al.</i> (2002)	<i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11	Planta de gás manufacturado	Consumo de 95% em 16 horas.	A presença de ácido antranílico e a identificação de 5 ORF's indica que a rota é similar a da cepa <i>Pseudomonas stutzeri</i> OM1.
GIBBS <i>et al.</i> (2003)	<i>Pseudomonas sp.</i> LD2	Não isolado	Não avaliado	A enzima estudada é de <i>meta</i> -cleavagem relacionada a família das 4,5-protocatechuate dioxigenase.
BRESSLER <i>et al.</i> (2003)	<i>Sphingomonas sp.</i> CP19	Solo	Não avaliado	Segue uma rota de degradação do carbazol diferente das cepas obtidas na literatura.
LI <i>et al.</i> (2004)	<i>Pseudomonas sp.</i> XLDN4-9	Solos contaminados	Consumo de 47% em 1 hora.	Estudo do efeito físico-químico de algumas fases líquidas não-aquosa na degradação do carbazol.
INOUE <i>et al.</i> (2005)	<i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10, <i>Sphingomonas sp.</i> KA1 e <i>Nocardioides sp.</i> IC177	Solo e Lodo ativado	Consumo de 18% em 4 dias e 80% após 30 dias.	Única bactéria Gram-positiva que é capaz de metabolizar também dibenzotiofeno-sulfona e antraceno.

Tabela II.1: Resumo dos artigos comentados (continuação).

Autores (ano)	Microrganismo	Isolado de	Degradação de Carbazol	Observações
LARENTIS (2005)	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 31258	Não isolado	Consumo de 20 ppm em 15 horas.	Estudo de clonagem e expressão de DNA com confirmação de que a bactéria codifica as mesmas enzimas CarA, CarB e CarC da rota proposta para a cepa CA10.
SEO <i>et al.</i> (2006)	<i>Arthrobacter sp.</i> P1-1	Ambientes contaminados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Consome 82% de dibenzotiofeno e 57% de carbazol em 14 dias.	Degradação de carbazol submetida a uma 3,4-dioxigenação seguida de <i>orto-</i> e <i>meta-</i> clivagem do anel, e chegando a ácido antranílico.
LI <i>et al.</i> (2008)	<i>Klebsiella sp.</i> LSSE-H2	Solo contaminado	Consumo total de 12 mmol*L ⁻¹ em 56 horas.	Degradação de 92% do carbazol e 94% do dibenzotiofeno em 12 horas com co-cultura.

II.3 – ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL

OUCHIYAMA *et al.* em 1993 foram os primeiros a propor uma rota de biodegradação para o composto carbazol, o qual é usado como única fonte de carbono e nitrogênio no crescimento de alguns microrganismos, como por exemplo, as bactérias *Pseudomonas sp.* CA06 e CA10. OUCHIYAMA *et al.* (1993), através da identificação dos metabólitos intermediários encontrados no crescimento das bactérias citadas anteriormente e da comparação com rotas de degradação de outros compostos aromáticos, propôs uma rota para este processo biológico e que está apresentada na Figura II.2. A rota proposta por OUCHIYAMA *et al.* (1993) serviu como base para diversos estudos descritos na literatura sobre este assunto, como por exemplo, nos trabalhos de GIEG *et al.* (1996), SHOTBOLT-BROWN *et al.* (1996), SATO *et al.* (1997a e 1997b), OUCHIYAMA *et al.* (1998), KIRIMURA *et al.* (1999), SCHNEIDER *et al.* (2000), NOJIRI *et al.* (2001a), NAKAGAWA *et al.* (2002) e LARENTIS (2005), que comentam a provável utilização desta mesma via de degradação de carbazol demonstrada na Figura II.2 por seus respectivos microrganismos.

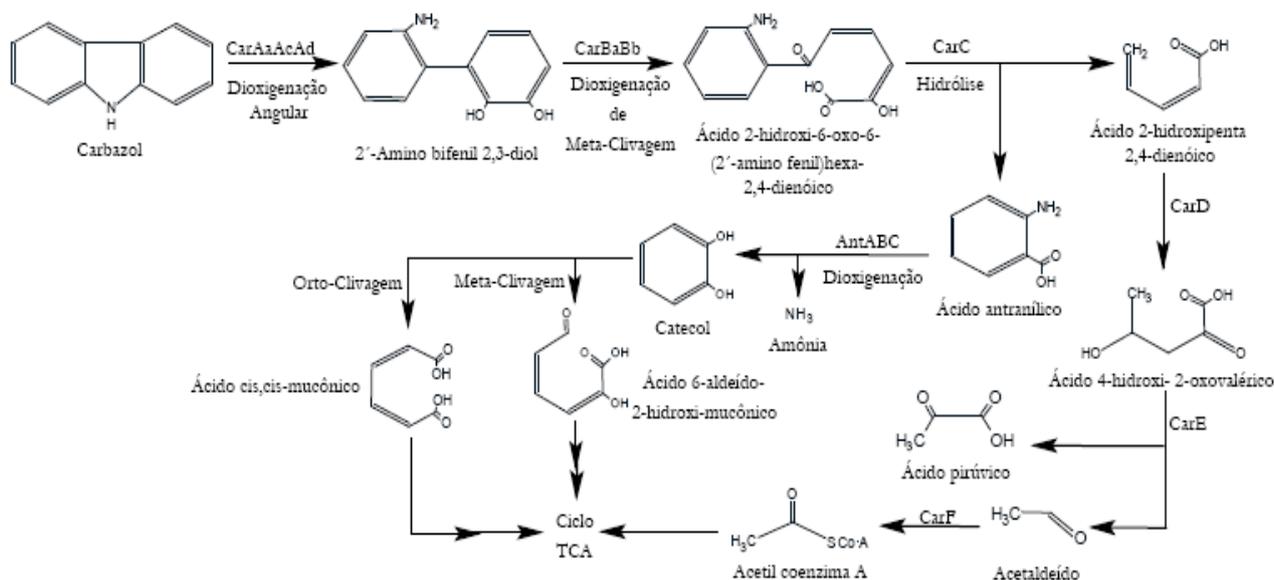


Figura II.2: Rota genérica completa de degradação de carbazol baseada nas propostas de OUCHIYAMA *et al.* (1993), GIEG *et al.* (1996), SHOTBOLT-BROWN *et al.* (1996), SATO *et al.* (1997a e 1997b), OUCHIYAMA *et al.* (1998), KIRIMURA *et al.* (1999), SCHNEIDER *et al.* (2000), NOJIRI *et al.* (2001a), NAKAGAWA *et al.* (2002) e LARENTIS (2005), para os respectivos microrganismos utilizados (TCA indica o ciclo do ácido tricarboxílico).

Para bactérias, isoladas e descritas na literatura, capazes de metabolizar o carbazol, a rota proposta de degradação tem como parte principal a etapa inicial da reação onde ocorre a dioxigenação do composto complexo na posição angular adjacente ao átomo de nitrogênio presente na molécula, convertendo assim o carbazol em 2'-amino bifenil-2,3-diol (BENEDIK *et al.*, 1998; NOJIRI *et al.*, 1999; NOJIRI e OMORI, 2002). Segundo SATO *et al.* (1997a e 1997b), muitas bactérias se mostram capazes de expressar dioxigenases, mas nem todas essas enzimas possui a habilidade de atacar a ligação adjacente ao átomo de nitrogênio.

Já o composto 2'-amino bifenil-2,3-diol é transformado em ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino bifenil)-hexa-2,4,dienóico através de um ataque na posição *meta* do anel que contém as hidroxilas e, logo em seguida, hidrolisado a ácido antranílico e ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino bifenil)-hexa-2,4,dienóico (SATO *et al.*, 1997b). O ácido antranílico formado é convertido em catecol por uma enzima de dioxigenação, removendo o nitrogênio heteroatômico, e o ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino bifenil)-hexa-2,4,dienóico é convertido por três reações de *meta*-clivagem em acetil coenzima A que é utilizado no ciclo do ácido tricarbóxico (NOJIRI *et al.*, 2001b).

O catecol formado na dioxigenação do ácido antranílico pode ser metabolizado tanto via *meta*-clivagem (OUCHIYAMA *et al.*, 1998), quanto via *orto*-clivagem, através da rota β -cetoacil-CoA, com a formação de compostos catalisados por enzimas expressas pelos genes *catBCA* e *catR* (NOJIRI *et al.*, 2002). A ocorrência da *orto*-clivagem do catecol pelas bactérias *Pseudomonas spp.* CA06 e CA10, o que resulta na formação do ácido *cis,cis*-mucônico (OUCHIYAMA *et al.*, 1993), e a ocorrência da *meta*-clivagem do catecol pela bactéria *Pseudomonas stutzeri sp.* OM1, o que resulta na formação do ácido semialdeído-2-hidroxi-mucônico (OUCHIYAMA *et al.*, 1998), permitem a obtenção de energia para o crescimento celular através da inserção dos metabólitos formados no ciclo do TCA.

Além da distinção destas duas vias, algumas cepas podem apresentar também outra diferença na rota de degradação do carbazol. Bactérias como a *Pseudomonas sp.* LD2 são capazes de expressar enzimas dioxigenase que atuam diferentemente da dioxigenase angular, possibilitando a formação de outro composto intermediário que é o ácido indol-3-acético (GIEG *et al.*, 1996).

II.4 – ENZIMAS DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL

A degradação biológica de compostos nitrogenados encontrados em petróleo e derivados, mais especificamente o carbazol que é usado como molécula modelo, está sendo amplamente estudada, possibilitando o entendimento da sequência genética localizada no genoma das bactérias capazes de expressar as enzimas responsáveis pela rota de degradação do carbazol e do funcionamento destas enzimas.

Em sua maioria, as cepas com capacidade de degradação de carbazol expressam três enzimas, CarA, CarB e CarC (expressas pela “leitura” dos genes do *operon car*), que são capazes de transformar o carbazol em ácido antranílico via 2'-amino bifeníl-2,3-diol através de dioxigenação angular, dioxigenação de *meta*-clivagem e hidrólise do produto da *meta*-clivagem, respectivamente (SATO *et al.*, 1997a; SATO *et al.*, 1997b; NOJIRI *et al.*, 2001a; LARENTIS, 2005). A outra parte das bactérias com esta capacidade converte o carbazol em ácido antranílico via compostos indólicos, como registraram SEO *et al.* (2006). Estes propuseram que esta rota segue uma 3,4-dioxigenação do carbazol, seguido de *orto*- e *meta*-clivagem do carbazol 3,4-diol, ambas formando indol-2,3-diol que passa a ácido 2-carboxil-amino benzóico e posteriormente ácido antranílico (não foram identificados os genes e as enzimas atuantes).

A transformação do ácido antranílico em catecol com liberação de amônia é realizada pela enzima multicomponente expressa pelo cluster de genes *antABC* localizado no locus *ant* do genoma bacteriano. Estes genes *ant* codificam a antranilato dioxigenase. BUNDY *et al.* (1998) estabelecem que os genes *antABC* da antranilato dioxigenase são evolutivamente relacionados com a classe IB de sistemas enzimáticos dihidroxilados.

Já o catecol formado na dioxigenação do ácido antranílico pode ser metabolizado via *orto*- ou *meta*-clivagem, através da rota β -cetoadipato, por enzimas codificadas pelos *operons catR* e *catBCA* (OUCHIYAMA *et al.*, 1998; NOJIRI *et al.*, 2002). Em *Pseudomonas resinovorans* CA10 foram deduzidas as sequências de aminoácidos

responsáveis pelos 4 ORF's existentes no genoma desta bactéria que apresentaram alta identidade com cis,cis-muconato cicloisomerase (CatB), muconolactona δ -isomerase (CatC), regulador positivo do *operon cat* (CatR) e catecol 1,2-dioxigense (CatA), responsáveis pela utilização do catecol como substrato celular. As Proteínas Cat da cepa CA10 foram muito semelhantes as encontrada na *P. putida*, embora o parentesco em regiões não codificantes tenha sido elevado. Foi verificado ainda que os genes *catBCA* foram induzidos em carbazol para a produção de células como uma única unidade de transcrição (NOJIRI *et al.*, 2002).

O estudo dos genes responsáveis pela degradação do carbazol pelas bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 (SATO *et al.*, 1997a; SATO *et al.*, 1997b) e *Pseudomonas stutzeri* OM1 (OUCHIYAMA *et al.*, 1998) foi realizado através de digestões parciais e totais para a criação de uma biblioteca de DNA's, além de empregar diferentes enzimas de restrição. No caso do estudo do *operon* da bactéria *Sphingomonas sp.* CB3 (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998) foi empregada a técnica de PCR para a obtenção dos genes envolvidos na degradação de carbazol.

II.4.1 – Carbazol dioxigenase

A etapa inicial da degradação de carbazol, proposta para a cepa CA10 de *Pseudomonas sp.*, ocorre através da ação catalítica da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) na posição angular adjacente ao átomo de nitrogênio. Nesta oxigenação acontece a formação de um composto intermediário dihidroxilado que é convertido espontaneamente em 2'-amino bifenil-2,3-diol (Figura II.3) (SATO *et al.*, 1997b, BENEDIK *et al.*, 1998). A rota proposta para a cepa CB3 de *Sphingomonas sp.* apresenta de maneira diferente o mesmo processo da cepa CA10, com a codificação de uma enzima dihidrodiol desidrogenase do *operon car* que atua em conjunto com a carbazol dioxigenase (CarA) na conversão do carbazol em 2'-amino bifenil-2,3- diol (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998).

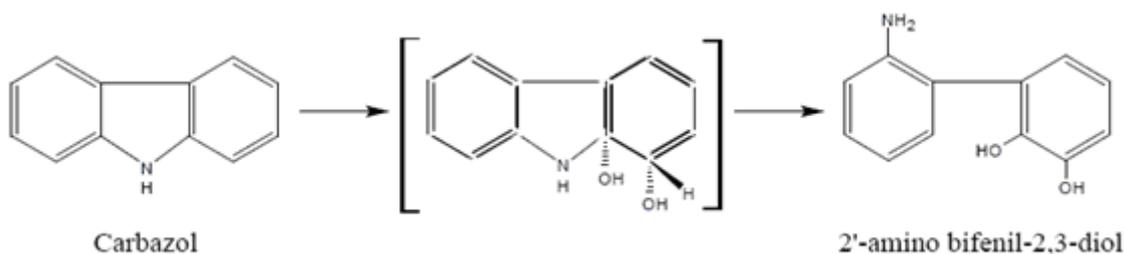


Figura II.3: Mecanismo de conversão microbiológica de carbazol em 2'-amino biphenil-2,3-diol pela ação da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) passando por um composto intermediário instável (modificado de BENEDIK *et al.*, 1998). Rota proposta para a cepa CA10 de *Pseudomonas* sp. por SATO *et al.*, (1997b).

As enzimas oxigenases são capazes de incorporar diretamente um ou dois átomos de oxigênio (mono- ou dioxigenases, respectivamente) da atmosfera, utilizando-o como cossustrato (WACKETT, 2002). Isto ocorre comumente em bactérias com sistemas multicomponentes, *in vivo*, como etapa inicial da degradação de substratos aromáticos e hidrocarbonetos (NOJIRI *et al.*, 1999, WACKETT, 2002). Um dos modos de degradação de compostos aromáticos é a dioxigenação angular (dioxigenação na posição lateral) microbiológica. A comparação da especificidade de substratos, juntamente com a análise filogenética, sugere que este modo de dioxigenação, com ataque da posição angular, seja originado do relaxamento da especificidade de substratos da família das oxigenases de Rieske com ferro localizado na posição de grupamento não-heme (NOJIRI *et al.*, 2001b).

As dioxigenases que possuem agregados ferro-enxofre ([2Fe-2S]) do tipo Rieske, coordenados por duas histidinas e duas cisteínas, apresentam estrutura e mecanismo de atuação distintos das demais enzimas com agregados ferro-enxofre, como por exemplo as do tipo planta, que apresentam quatro cisteínas ligantes aos átomos de ferro. As que possuem centros de Rieske têm maior potencial redox, o que melhora o controle do fluxo de elétrons durante o ciclo catalítico da oxigenase.

Estas dioxigenases multicomponentes que possuem domínio de Rieske empregam piridina nucleotídeo reduzida como fonte inicial de elétrons para a ativação do oxigênio molecular. Estes elétrons migram para um centro do tipo [2Fe-2S] em um componente protéico que contém um cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que é usado como interruptor redox da passagem de elétrons, ou em uma componente ferredoxina

separada. Em uma última instância, os elétrons são transferidos ao componente da dioxigenase que contém o domínio com agregado [2Fe-2S] de Rieske e o centro de ferro mononuclear (WACKETT, 2002).

As oxigenases terminais são constituídas por proteínas ferro-enxofre ([2Fe-2S]) com agregado de Rieske [2Fe-2S] e ferro mononuclear, apresentando como cadeia de transporte de elétrons uma ou duas subunidades separadas, sendo a caracterização destas subunidades a diferenciação entre os três grupos de dioxigenases multicomponente envolvidas na hidroxilação de anéis substratos aromáticos (NAM *et al.*, 2001; WACKETT, 2002). O grupo IA contém a subunidade redutase com domínios flavina mononucleotídeo (FMN) e ferro-enxofre de planta, e o grupo IB também contém este agregado ferro-enxofre, mas apresentando o domínio FAD. O grupo II de dioxigenases é formado por uma subunidade redutase com domínio FAD e uma subunidade ferredoxina, apresentando o subgrupo IIA com agregado [2Fe-2S] de planta e o subgrupo IIB com o de Rieske. Já o grupo III apresenta o componente redutase com domínios FAD e quatro cisteínas ligantes aos átomos de ferro ([2Fe-2S]), e o componente ferredoxina com duas cisteínas e duas histidinas ligantes ao átomo de ferro ([2Fe-2S]). As enzimas carbazol 1,9a-dioxigenase e naftaleno dioxigenase de *Pseudomonas sp.* estão classificadas no grupo III.

Devido as discrepâncias apresentadas nesta classificação das dioxigenases multicomponente, NAM *et al.* (2001) propuseram uma nova classificação baseada na homologia das sequências dos aminoácidos das subunidades. Tanto a subunidade α quanto a β influenciam na interação enzima-substrato. Na subunidade α da componente oxigenase terminal destas enzimas, localiza-se o sítio ativo metálico e é o componente que determina a especificidade do substrato, tendo um papel crítico no reconhecimento do substrato. Já a subunidade β das oxigenases não tem um papel significativo na determinação da especificidade das enzimas, aparentando ter somente um papel estrutural na holoenzima, mas ainda sendo essencial para atividade enzimática. Além disto, estudos encontrados na literatura sugerem que um único componente redutase e ferredoxina pode atuar em combinação com um grande número de diferentes componentes dioxigenases de Rieske (WACKETT, 2002). Assim sendo, as subunidades idênticas (homomultímeros) estão classificadas no grupo I, enquanto as subunidades

não-idênticas α (maior) e β (menor), heterodímeros, estão classificadas nos grupos II, III e IV.

Como a carbazol 1,9a-dioxigenase não apresenta a subunidade β , esta está classificada no grupo I de dioxigenases multicomponente envolvidas na hidroxilação de anéis substratos aromáticos (NAM *et al.*, 2001). Segundo NAM *et al.* (2001), ambas as classificações podem ser utilizadas para expressar tanto a afiliação filogenética quanto os aspectos bioquímicos da enzima, especialmente a cadeia de transporte de elétrons, servindo como formas complementares.

A enzima com capacidade de degradação do carbazol identificada na cepa CA10 de *Pseudomonas sp.* é uma dioxigenase de três componentes codificada por três diferentes ORF's localizados no *operon car* do genoma bacteriano (SATO *et al.*, 1997b). As sequências de nucleotídeos relacionadas com a ação da carbazol 1,9a-dioxigenase localizadas no *operon car* foram denominadas *carAa*, *carAc* e *carAd* por SATO *et al.* (1997b) e apresentam, respectivamente, aproximadamente 30% de homologia com as maiores subunidades dos componentes terminais de outras oxigenases; 60% de homologia com os componentes ferredoxina das dioxigenases envolvidas na degradação de clorobenzeno e tolueno por diferentes gêneros de *Pseudomonas* e da bifenil dioxigenase de *Rhodococcus sp.*; e 50% de homologia com componentes ferredoxina redutases de diferentes *Pseudomonas* que compõem sistemas monoxigenases que degradam tolueno e alquenos, assim como da naftaleno dioxigenase (SATO *et al.*, 1997b; NOJIRI E OMORI, 2002).

O gene *carAa*, que possui a sequência consenso de proteínas ferro-enxofre do tipo Rieske e que está relacionado com dois ORF's do *operon car* que apresentam sequências idênticas de nucleotídeos (diferindo somente em uma base localizada na região não codificante), é indispensável para a metabolização do carbazol. A reação de degradação não necessita de ambos os ORF's para ocorrer, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas na atividade da enzima pela presença do gene duplicado. A expressão deste gene em *Escherichia coli* resultou na expressão de uma proteína com 43kDa, sendo proposto um modelo por homologia desta estrutura trimérica que apresentou energias de resíduos aceitáveis e 95% dos resíduos situados em

ângulos espacialmente possíveis, de acordo com os gráficos de Ramachandran (SATO *et al.*, 1997b; NOJIRI E OMORI, 2002; LARENTIS *et al.*, 2006b).

O gene *carAc* também apresenta a sequência de proteínas ferro-enxofre de Rieske. Isto indica que este ORF da cepa CA10 de *Pseudomonas sp.* codifica a subunidade ferredoxina da dioxigenase CarA (SATO *et al.*, 1997b). A estrutura cristalográfica, determinada por NAM *et al.* (2005), composta por três folhas- β , desta subunidade comprova que seu enovelamento é altamente semelhante ao componente ferredoxina da bifenil dioxigenase da bactéria *Burkholderia cepacia*, apresentando diferenças na distribuição de cargas superficiais. Já o gene *carAd* apresenta a sequência de proteínas ferro-enxofre de planta e está localizado perto da posição N-terminal. Além disto, também são encontradas neste gene as sequências envolvidas na ligação de FAD e NAD na posição C-terminal, e na codificação do componente ferredoxina redutase da provável sequência de aminoácidos da carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA). A expressão dos genes *carAc* e *carAd* em *Escherichia coli* resultou, respectivamente, em proteínas com 11 e 36kDa (SATO *et al.*, 1997b; LARENTIS, 2005).

A purificação do sistema e a caracterização dos componentes CarAa, CarAc e CarAd da carbazol 1,9a-dioxigenase de *Pseudomonas resinovorans* CA10 (NAM *et al.*, 2002a; NAM *et al.*, 2002b) foram utilizadas para propor, baseado no mecanismo apresentado por WACKET (2002), a função de cada um dos componentes de forma similar ao que acontece com as demais enzimas expostas na literatura (Figura 2.4). De acordo com estes trabalhos, os monômeros *carAc* e *carAd* funcionam, respectivamente, como componentes ferredoxina e ferredoxina-redutase no transporte de elétrons de NADH para o componente oxigenase terminal (*carAa* purificado na forma de homotrímero) (NAM *et al.*, 2002a, NAM *et al.*, 2002b). Para que ocorra a conversão do carbazol em 2'-amino bifenil-2,3-diol pela enzima carbazol dioxigenase é necessário que haja a coexistência de todas as subunidades (SATO *et al.*, 1997a; SATO *et al.*, 1997b).

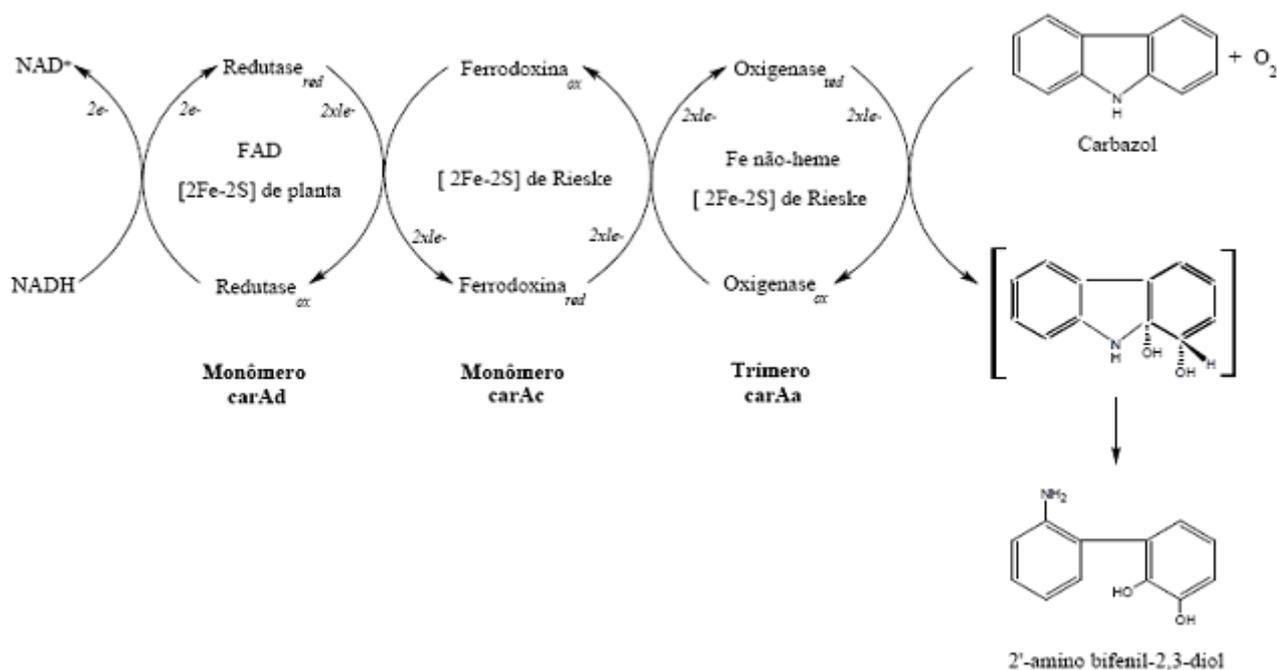


Figura II.4: Esquema modificado dos componentes e funções das subunidades da enzima carbazol 1,9a-dioxigenase para a conversão do carbazol em 2'-amino bifenil-2,3-diol através do mecanismo de transferência de elétrons proposto por NAM *et al.* (2002b).

Comparando as dioxigenases identificadas nas cepas CB3 de *Sphingomonas sp.* e CA10 de *Pseudomonas sp.* (SATO *et al.*, 1997a, SATO *et al.*, 1997b; SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998), é possível notar que apesar de ambas serem composta por três componentes, elas apresentam baixa homologia. A carbazol oxigenase da cepa CB3 é codificada por quatro genes (*carAaAbAcAd*), sendo que o componente oxigenase terminal é composto por duas subunidades codificadas pelos genes *carAaAb*, diferentemente da carbazol 1,9a-dioxigenase da cepa CA10 que é formada e codificada por apenas uma subunidade e pelo gene *carAa*. O gene *carAa* da cepa CB3 codifica a subunidade maior (α) do componente ferro-enxofre e agregado de Rieske [2Fe-2S], com os resíduos conservados de cisteína e histidina, enquanto *carAb* codifica a subunidade menor (β) do componente ferro-enxofre. O gene *carAc* apresenta homologia com as subunidades ferrodoxinas de dioxigenases da cepa CA10 e conserva a ligação de Rieske [2Fe-2S]. O gene *carAd* codifica a subunidade redutase e a sequência de aminoácidos referente a proteínas associadas a membranas (LARENTIS, 2005). Apesar da dioxigenase da cepa CB3 ser capaz de degradar carbazol, não houve evidências de que esta enzima CarA catalise um ataque por uma dioxigenação angular (NOJIRI *et al.*, 2001b).

Os resultados de oxidação de diferentes substratos pela enzima carbazol 1,9a-dioxigenase (CarA) apresentados por SATO *et al.* (1997b), mostram sua capacidade de oxidação de uma grande variedade de compostos poliaromáticos, como por exemplo, o dibenzo-*p*-dioxina, fenoxazina, fenotiazina, bifenil, fenantreno e antraceno, além do carbazol, apresentando com conversões superiores a 90% do substrato. Esta enzima também é capaz de degradar dibenzofurano, fenoxantina, xanteno e naftaleno, com médias conversões, mas não catalisa a reação de fenazina. Além disto, a enzima CarA catalisa diversos tipos de oxigenações atípicas dentre enzimas descritas na literatura, como a dioxigenação angular, *cis*-dihidroxição e mono-oxigenação, sendo que dioxigenação angular somente ocorre na posição adjacente a átomo de oxigênio e nitrogênio (NOJIRI *et al.*, 1999).

II.4.2 – Dioxigenase de *meta*-clivagem

Na segunda etapa da rota de degradação de carbazol, a abertura do anel hidroxilado do composto 2'-amino bifenil-2,3-diol é catalisada por uma enzima de dioxigenase que é codificada de diferentes maneiras nos microrganismos usados para esta degradação e que atua na posição *meta* do anel hidroxilado, transformando esta molécula bifenílica em outra denominada ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)-hexa-2,4-dienóico (HOADA) (SATO *et al.* 1997a; SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998).

As dioxigenases envolvidas na quebra das ligações entre carbonos de anéis aromáticos são enzimas metalo-dependentes e estão divididas em intradiol e extradiol dioxigenases, diferindo na forma de atuação no anel (forma diferentes produtos a partir da mesma molécula) e no estado de oxidação do ferro presente no sítio ativo. As intradiol dioxigenases apresentam o íon férrico não-heme em seu sítio ativo e catalisam a clivagem do anel aromático entre os grupamentos hidroxila vicinal do anel catecol (clivagem na posição *orto*), enquanto as extradiol dioxigenases apresentam o íon ferroso também na posição não-heme no sítio ativo e catalisam a clivagem do anel aromático na posição adjacente aos grupos vicinais hidroxila (clivagem na posição *meta*) (SUGIMOTO *et al.*, 1999; IWATA *et al.*, 2003).

Foram identificadas e descritas na literatura três classes de extradiol dioxigenases. As classes I e II apresentam estruturas primárias similares, aparentando possivelmente que as enzimas da classe II evoluíram por duplicação genética a partir das enzimas da classe I, figurando dois domínios com praticamente o mesmo padrão. As classes II e III não compartilham nenhuma similaridade a nível sequencial ou estrutural, entretanto, os sítios ativos destas classes mostram características comuns que sugerem o mesmo mecanismo reacional (SUGIMOTO *et al.*, 1999; IWATA *et al.*, 2003; IWATA *et al.*, 2004). Neste mecanismo, ambos os grupamentos hidroxila do anel se coordenam com o Fe(II) do sítio ativo em uma geometria trigonal bipiramidal, com uma posterior ligação do oxigênio molecular ao íon ferroso e a transferência de elétrons do anel para o oxigênio molecular. Esta transferência resulta na quebra da ligação O=O ataque da ligação entre carbonos do anel aromático do substrato (SUGIMOTO *et al.*, 1999).

A enzima 2'-amino bifênil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarB) é codificada pelos genes *carBa* e *carBb*, estão localizados um após o outro no *operon car* de *Pseudomonas sp.* CA10, e são indispensáveis para a atividade da enzima (SATO *et al.*, 1997a). Na sequência de aminoácidos nomeada como *carBb* foi identificada a conservação de resíduos de histidina considerados essenciais para os sítios ativos, podendo haver a constituição um sítio de coordenação para um cofator de ferro sem configuração heme na estrutura. As duas subunidades da enzima foram expressas em *Escherichia coli* obtendo tamanhos moleculares de 10kDa para CarBa e 29kDa para CarBb (com maior quantidade da segunda subunidade). Além disto, com a modelagem comparativa (modelagem por homologia) foram produzidos modelos consistentes de ambas as subunidades, sendo construída uma estrutura heterotetramérica do tipo $\alpha_2\beta_2$ para a CarB (IWATA *et al.*, 2003; LARENTIS *et al.*, 2005; LARENTIS *et al.*, 2006a).

A atividade de *meta*-clivagem sobre o substrato 2'-amino bifênil-2,3-diol da enzima CarB da cepa CA10 de *Pseudomonas sp.* foi testada e comprovada utilizando o análogo do composto 2,3-dihidroxi bifênil, mostrando alta especificidade após o teste com outros substratos, como por exemplo, o catecol, o 3-metilcatecol e o 4-metilcatecol (SATO *et al.*, 1997a; IWATA *et al.*, 2003). A atividade de *meta*-clivagem de CarB mostrou consumo rápido do oxigênio molecular com produção simultânea do composto *meta*-clivado resultante da reação (coloração amarela). Alguns pesquisadores consideram ainda indeterminada a localização do sítio de ligação do oxigênio e de

reconhecimento do substrato, mas sugerem que o sítio ativo da enzima está localizado na subunidade CarBb, conforme a indicações da estrutura obtida pela modelagem por homologia (LARENTS, 2005; LARENTIS *et al.*, 2006a).

A enzima de *Pseudomonas sp.* LD2 apresentou duas subunidades de tamanhos 8kDa e 25kDa (CarBa e CarBb, respectivamente), em uma estrutura $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramérica de 70kDa, com caráter hidrofóbico e com estabilidade muito limitada (GIBBS *et al.*, 2003). Na cepa CB3 de *Sphingomonas sp.*, o gene *carC* foi caracterizado como sendo o responsável pela codificação da enzima de *meta*-clivagem que catalisa o composto 2'-amino bifênil-2,3-diol. Esta enzima foi descrita como sendo uma extradiol dioxigenase (SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998).

Entre as cepas *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri* OM1 foi verificada alta homologia de suas enzimas de *meta*-clivagem, indicando que ambas são codificadas pelos mesmos genes (OUCHIYAMA *et al.*, 1998). Estes resultados revelam que estas enzimas apresentam especificidade muito mais alta para a degradação de substratos com a estrutura do tipo bifênil dihidroxilados (como por exemplo, 2'-amino bifênil-2,3-diol e 2,3-dihidroxi bifênil) do que para compostos derivados de catecol (presença de somente um anel aromático) (SATO *et al.*, 1997a; SHEPHERD E LLOYD-JONES, 1998; IWATA *et al.*, 2003; GIBBS *et al.*, 2003), e que ambas pertencem à classe III das extradiol dioxigenases (IWATA *et al.*, 2003; GIBBS *et al.*, 2003).

II.4.3 – HOADA hidrolase

A terceira etapa da rota de degradação de carbazol é correspondente a conversão do ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico (HOADA) em ácido antranílico e ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienóico realizada pela enzima CarC. Nesta parte da degradação do carbazol ocorre uma hidrólise da molécula de HOADA por uma enzima hidrolase (HOADA hidrolase) que cliva hidroliticamente, através de um tipo raro de reação, uma ligação entre átomos de carbono. Este grupo de hidrolases atua sobre ligações entre carbonos de substratos cetônicos, sendo classificadas como grupo E.C. 3.7.1. A especificidade de substratos e as taxas de degradação das hidrolases, em muitos casos, determinam a capacidade de suas respectivas rotas catabólicas,

conferindo-lhes um papel decisivo como o proposto para a CarC na rota de degradação de carbazol (FUSHINOBU *et al.*, 2002, RIDDLE *et al.*, 2003b; NOJIRI *et al.*, 2003).

As hidrolases são caracterizadas pela conservação de uma estrutura tridimensional com um enovelamento do tipo α/β , embora apresentem baixa similaridade sequencial (NANDHAGOPAL *et al.*, 2001, RIDDLE *et al.*, 2003b). Esta estrutura α/β encontrada neste tipo de hidrolases as confere um diferente mecanismo enzimático devido à presença de uma tríade catalítica com a configuração de resíduos nucleofílico-ácido-histidina. A etapa inicial desta reação de hidrólise consiste em um ataque nucleofílico, com uma subsequente clivagem por água do intermediário formado. A função do resíduo ácido e da histidina é ativar a molécula de água (LARENTIS, 2005).

De acordo com o substrato preferencial das hidrolases, estas podem ser divididas, segundo suas características, em grupos I, II, III e IV. No grupo I estão as hidrolases envolvidas na degradação de compostos aromáticos bicíclicos, como o carbazol e o bifenil, enquanto o grupo II é representado por uma única hidrolase envolvida na degradação do ácido 3-hidroxifenilpropiónico. Além destas, no grupo III, onde está a maior parte das hidrolases, estão as enzimas envolvidas na biodegradação de compostos monocíclicos com cadeias alquil laterais curtas, como tolueno, xileno e isopropilbenzeno. Já o grupo IV, o mais heterogêneo, é composto por hidrolases, como as carboxilesterases e as enol-lactona hidrolases envolvidas em rotas catabólicas com *orto*-clivagens, e epóxido hidrolases, que degradam ligações carbono-heteroátomo, conservando a tríade catalítica serina-aspartato-histidina (NOJIRI *et al.*, 2003; HABE *et al.*, 2003).

Apesar da CarC encontrada em diversas cepas apresentar maior similaridade sequencial com as hidrolases do grupo III, como indicado pela árvore filogenética descrita por NOJIRI *et al.* (2003), elas se mostram também similares às enzimas do grupo I. As enzimas CarC apresentam características intermediárias entre ambos os grupos e devido às diferenças nas especificidades por substratos, poderiam ser classificadas como um novo grupo de hidrolases (NOJIRI *et al.*, 2003).

O gene *carC* apresentou uma tradução desta sequência com cerca de 30% de identidade com hidrolases de compostos *meta*-clivados presentes em algumas bactérias.

Isto sugere que as enzimas subsequentes devam ser mais relacionadas com enzimas correspondentes a outras rotas de degradação de aromáticos do que com a enzima CarA (NORIJI et al., 2003). SATO et al. (1997b) confirmaram a presença de uma sequência de aminoácidos altamente conservada nas hidrolases que apresenta uma estrutura do tipo α/β , aproximando-se mais da enzima homodimérica da hidrolase de *Pseudomonas fluorescens* IP01 (FUSHINOBU et al., 2002) pertencente ao grupo III do que da estrutura octamérica da hidrolase de *Rhodococcus sp.* RHA1 (NANDHAGOPAL et al., 2001) pertencente ao grupo I.

Os genes *carC* de *Pseudomonas sp.* CA10 (SATO et al., 1997b) e LD2 (RIDDLE et al., 2003b) apresentaram homologia de 98% e identidade completa para a proteína CarC de ambos os microrganismos. A estrutura cristalográfica de CarC da cepa J3 de *Janthinobacterium sp.* foi determinada por HABE et al. (2003), corroborando que a enzima dimérica é formada por dois monômeros assimétricos com uma forte interação entre si, o que se dá pela presença de folhas- β antiparalelas nas duas subunidades.

A enzima HOADA hidrolase da cepa CA10 foi expressa em *Escherichia coli* por SATO et al. (1997b), apresentando uma massa molecular de 32kDa. Na cepa LD2 de *Pseudomonas sp.*, RIDDLE et al. (2003b) purificou e indicou a existência desta mesma enzima através da degradação do ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico (HOPDA) (produto da dioxigenação de *meta*-clivagem de 2,3-dihidroxi bifenil, um composto análogo ao 2'-amino bifenil-2,3-diol, que faz parte da rota de degradação de carbazol), verificando a forma de um homodímero com atuação em uma faixa de pH entre 7,0 e 9,0 (atividade ótima para HOPDA em pH 7,0 e em temperatura de 58°C), sem o requerimento de cofatores. Além destes compostos, NOJIRI et al., 2003 verificaram que a CarC também consegue degradar os produtos de *meta*-clivagem de dibenzofurano e bifenil.

II.4.4 – Antranilato dioxigenase

A quarta etapa da rota de degradação do carbazol é a conversão de ácido antranílico em catecol, que é realizada pela enzima AntABC, identificada como antranilato 1,2-dioxigenase. Esta enzima é codificada em *Pseudomonas sp.* CA10 por três ORF's com organização bastante similar aos da cepa *Acinetobacter sp.* ADP1,

diferindo somente na localização destes genes (na CA10 estão entre dois genes de transposases) (NOJIRI *et al.*, 2001a). Estes genes *antABC* da antranilato dioxigenase são evolutivamente relacionados com a classe IB de sistemas enzimáticos dihidroxilados (BUNDY *et al.*, 1998).

Nas enzimas da classe IB, o cofator codificado pelo gene *antC* é um dinucleotídeo flavina-adenina e a redutase contém um cluster ferro-enxofre ([2Fe-2S]) do tipo planta e um centro de ferro mononuclear. Na parte da enzima codificada pelos genes *antA* e *antB* (dioxigenase terminal), há duas subunidades (α e β), as quais a maior delas, a subunidade α , contém um cluster ferro-enxofre do tipo Rieske e os centros de ferro mononuclear (BUNDY *et al.*, 1998). O modo de atuação destes componentes da enzima está representado na Figura II.5.

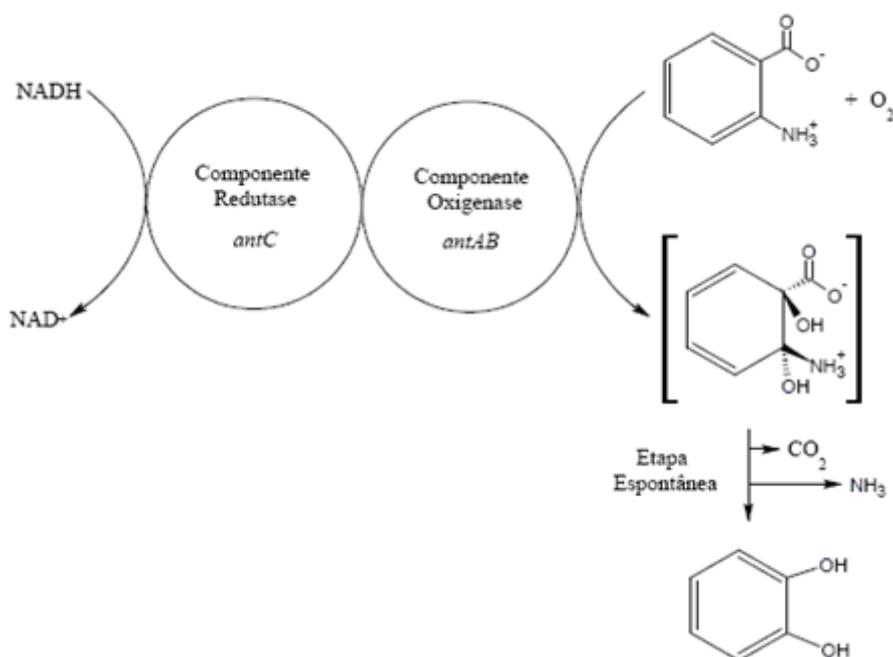


Figura II.5: Funções propostas por BUNDY *et al.* (1998) para as proteínas codificadas do gene *ant*. Os genes *antAB* que codificam a dioxigenase terminal e *antC* que codifica a redutase são evolutivamente relacionados a uma dioxigenase da classe IB de dihidroxilação multicomponentes.

Segundo BUNDY *et al.* (1998), os genes *antABC* da cepa ADP1 clonados em *Escherichia coli* (bactéria que não é capaz de degradar o ácido antranílico), permitiram que o ácido antranílico (1mM) fosse totalmente convertido a catecol em 4 horas de reação, havendo o surgimento de 30 μ M de catecol na primeira 1,5 hora (sendo

consumido rapidamente logo após devido ao catecol contribuir para a inibição do crescimento bacteriano).

BUNDY *et al.* (1998) e NOJIRI *et al.* (2001a) verificaram também que os genes *ant* são fortemente induzidos nas cepas ADP1 e CA10, respectivamente, quando cultivadas em carbazol. Na bactéria *Pseudomonas sp.* CA10, NOJIRI *et al.* (2001a) confirmaram a presença de uma cópia intacta dos genes *antABC* no genoma da bactéria localizados no megaplasmídeo pCAR1, em um possível transposon.

II.4.5 – Catecol dioxigenase

A quinta etapa da rota de degradação do carbazol é a conversão do catecol em produtos metabólicos intermediários do ciclo do TCA e é catalisada por genes contidos em 4 ORF's do *operon cat* localizados no locus *cat* do cromossomo da bactéria *Pseudomonas resinovorans* CA10. Estes genes designados como *catB*, *catC*, *catR* e *catA*, apresentaram alta identidade com *cis,cis*-muconato cicloisomerase, muconolactona isomerase, regulador positivo do *operon cat* e catecol 1,2-dioxigenase, respectivamente, na cepa CA10, responsáveis pela rota da β -cetoadipate. Os genes *catBCA* foram induzidos em carbazol para a produção de células como uma única unidade de transcrição (NOJIRI *et al.*, 2002).

As enzimas catecol dioxigenases catalisam a abertura do anel aromático, incorporando à molécula de catecol dois átomos de oxigênio. Para que isto proceda, é necessário que haja uma desprotonação inicial de pelo menos uma das hidroxilas do anel, facilitando a oxidação e, conseqüentemente, perdendo a estabilidade da estrutura aromática do anel, além da ativação do oxigênio molecular para que a reação transcorra (MILLER, 2008). Elas são separadas da mesma forma descrita no item II.4.2, como intradiol e extradiol.

As catecol dioxigenases, com uma ou duas possíveis exceções, são dímeros de quaisquer subunidades idênticas ou não, com massa molecular de 30,5-34 kDa. A enzima catecol 1,2-dioxigenase é alta específica, pois este tipo de enzima catalisa somente a oxigenação de catecol e alguns dos seus derivados (STRACHAN *et al.*, 1998).

As duas possíveis vias de degradação enzimática do catecol encontradas na literatura são a *orto*-clivagem (intradiol) e a *meta*-clivagem (extradiol). A reação de *orto*-clivagem do anel ocorre entre os grupos hidroxila vicinal, enquanto que na *meta*-clivagem, a reação é adjacente a um dos grupos hidroxila. Ambos os tipos de enzimas utilizam o ferro não-heme como único cofator: na *orto*-clivagem o cofator está no estado férrico, enquanto que na *meta*-clivagem está no estado ferroso (STRACHAN *et al.*, 1998; SUGIMOTO *et al.*, 1999; IWATA *et al.*, 2003). A ocorrência da *orto*-clivagem do catecol nas bactérias *Pseudomonas spp.* CA06 e CA10 resulta na formação do ácido cis,cis-mucônico (OUCHIYAMA *et al.*, 1993), e a ocorrência da *meta*-clivagem do catecol na bactéria *Pseudomonas stutzeri* OM1 resulta na formação do ácido semialdeído-2-hidroxi-mucônico (OUCHIYAMA *et al.*, 1998), permitindo a estas obterem produtos intermediários para a inserção no ciclo do TCA e, conseqüentemente, energia para o crescimento celular.

II.5 – MODELAGEM ENZIMÁTICA DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL

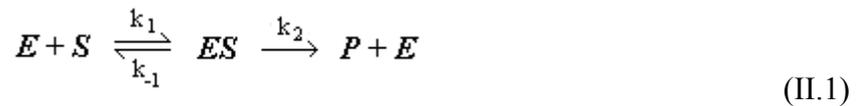
O desenvolvimento e a aplicação de modelos matemáticos para representar e interpretar diversos tipos de processos, principalmente os processos químicos, é uma atividade bastante útil e, atualmente, muito difundida na engenharia química. De maneira geral, os modelos matemáticos consistem em sistemas de equações algébricas e/ou diferenciais baseadas em fenômenos de balanços de massa, de energia e de quantidade de movimento, que fornecem relações qualitativas e quantitativas entre as variáveis envolvidas no processo em estudo. Sendo assim, podemos prever o comportamento dos processos a partir de um modelo, utilizando-os para os mais diversos fins, como por exemplo, em projetos, otimizações, controle e automação de processos industriais ou também, em escala laboratorial, na análise de dados experimentais, facilitando a compreensão dos fenômenos estudados e no desenvolvimento de novas teorias.

Em uma representação matemática de um processo ou fenômeno qualquer, algumas variáveis não podem ser medidas, como por exemplo, constantes de transferência de massa ou constantes cinéticas de uma reação. Por isto, o valor destas variáveis deve ser inferido a partir de um conjunto de dados através do procedimento de estimação de parâmetros que irá gerar equações que, quando comparadas a resultados reais do processo (industrial ou laboratorial), permitirão a avaliação e o aperfeiçoamento do modelo obtido.

Na representação de processos de reações biológicas, e também catalisadas por sólidos, é facilmente encontrada na literatura a utilização dos modelos matemáticos do tipo Michaelis-Menten e Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson (SCHWAAB, 2007). A degradação de carbazol pela atividade enzimática de biocatalisadores exposta neste trabalho é mais bem representada pelo modelo enzimático descrito por Michaelis-Menten, pois neste é possível avaliar satisfatoriamente as etapas lentas da reação e, com isso, determinar a quantidade de enzima necessária em cada etapa para uma otimização do processo.

O processo enzimático descrito pelo modelo de Michaelis-Menten (Bailey e Ollis, 1986) apresenta um mecanismo que envolve enzima (E), substrato (S), complexo enzima-substrato (ES), produto (P), além das constantes de velocidade (k_1 , k_{-1} e k_2) de reação (equação II.1). O valor máximo da velocidade de reação é atingido com o aumento da concentração do S no meio. Isto ocorre à medida que a concentração de substrato se torna muito maior que a concentração enzimática, convertendo assim toda a enzima presente no meio em complexo ES , caracterizando a formação de produto como etapa limitante da reação e deixando a taxa global de velocidade independente do aumento da concentração de S .

Algumas enzimas podem ser inibidas na reação pelo excesso de substrato (Bailey e Ollis, 1986). Quando isso acontece é verificada a queda na velocidade da reação acima de uma determinada concentração do substrato (concentração de substrato referente a V_{\max}), devido à ligação de uma molécula de S em excesso no meio ao complexo ES (equações II.1 e II.2).



Considerando um sistema em estado *quasi*-estacionário (onde taxa de formação é igual a taxa de consumo), a velocidade de reação pode ser determinada pelas expressões (II.3) e (II.4) de taxa de formação de produto. O V_{\max} das expressões é a velocidade da reação quando a enzima está saturada com altas concentrações de substrato no meio (considerando que a concentração de enzimas é diretamente proporcional à concentração de células ($E \propto x$) devido à complicação na obtenção destes dados experimentalmente e que $V_{\max} = e_0 \cdot k_2 = k \cdot k_2 \cdot x = k_0 \cdot x$, sendo e_0 a concentração inicial de enzimas), o K_m das expressões é a constante de Michaelis-Menten que informa qual a afinidade entre as enzimas e o substrato (quanto maior a afinidade, menor o valor) e o K_s é a constante de inibição pelo substrato (quanto maior a inibição, menor o valor). O utilização da expressão II.3 ou II.4 no modelo dependerá do mecanismo apresentado pela enzima, isto é, se há algum tipo de inibição da sua atividade ou não.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (\text{II.3})$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_s}\right)} \quad (\text{II.4})$$

Aplicando os conhecimentos comentados até o momento nesta seção do trabalho para descrever o mecanismo enzimático de degradação do carbazol, pode-se assumir que o comportamento das enzimas envolvidas nesta rota seguem o mecanismo de Michaelis-Menten, simplificando assim a abordagem do problema por exigir dados de fácil obtenção. Mesmo sendo bastante simples, esta abordagem responde muito bem ao comportamento deste tipo de processo, ao contrário de quando se aborda a existência de dois ou mais substratos, o que deixa o sistema muito mais complexo, exigindo dados

experimentais mais detalhados e de difícil obtenção, visto que nesta reação de biodegradação está envolvido também o efeito de cofatores para o funcionamento de algumas subunidades (como FAD e NAD(P)H) e o oxigênio como substrato das dioxigenases.

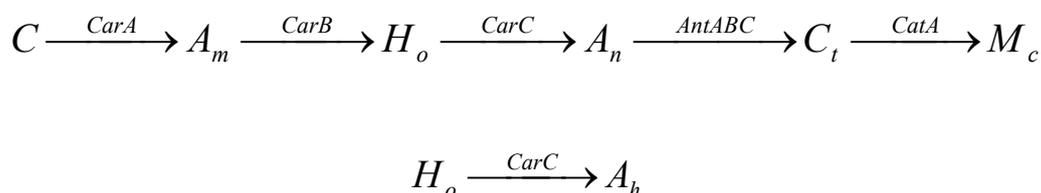


Figura II.6: Esquema da rota de degradação do carbazol realizada pelos microrganismos *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri*.

Tomando-se por base o mecanismo descrito na literatura (e esquematizado na Figura II.6), SATO *et al.* (1997a) estudaram a atividade da enzima CarB expressa pela bactéria *Pseudomonas sp.* CA10 em extrato celular de *Escherichia coli* recombinante utilizando o composto 2,3-dihidroxi bifênil, molécula análoga a 2'-amino bifênil-2,3-diol, e indicaram que os parâmetros do modelo de Michaelis-Menten para este sistema são $K_m = 1,2 \mu\text{M}$ e $V_{\max} = 7435 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Para a atividade da enzima CarC, expressa pela bactéria *Pseudomonas sp.* LD2, utilizando a molécula do ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenil hexa-2,4-dienóico (HOPDA), produto da *meta*-clivagem do 2,3-dihidroxi bifênil, e produzida em *Escherichia coli*, determinou-se, através do ajuste dos dados experimentais a um modelo de inibição não-competitiva pelo substrato, que os parâmetros cinéticos (a 25°C e pH 7,5) são $K_m = 4,6 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 3,3 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e $K_s = 70,0 \mu\text{M}$ (RIDDLE *et al.*, 2003b). Já o estudo desenvolvido por GIBBS *et al.* (2003) para a mesma bactéria *Pseudomonas sp.* LD2, determinou também a atividade da enzima CarC, diferindo somente nas condições de análise utilizadas (40°C e pH 8,0). Os dados experimentais obtidos por GIBBS *et al.* (2003) também foram ajustados a um modelo de inibição não-competitiva pelo substrato, encontrando valores paramétricos de 5 μM , 37 μM , e 44 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, para a constante de Michaelis-Menten (K_m), para a constante de inibição (K_s) e para a velocidade que a reação ocorre em altas concentrações de substrato (V_{\max}), respectivamente.

Para a enzima AntABC (ou antranilato dioxigenase), NOJIRI *et al.* (2003) não obtiveram êxito na expressão desta enzima produzida pela bactéria *Pseudomonas sp.* CA10. Entretanto, a enzima catecol dioxigenase expressa pela bactéria *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 apresentou comportamento de *orto*-clivagem do anel aromático do catecol, ajustando-se bem ao modelo de Michaelis-Menten sem inibição. Os dados experimentais obtidos possibilitaram a determinação dos valores de 2 μM para a constante K_m e de 19 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para a velocidade V_{max} (STRACHAN *et al.*, 1998).

III – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e os métodos utilizados neste trabalho. Para facilitar, o mesmo foi dividido em três fases.

A primeira fase deste capítulo diz respeito às técnicas de manuseio do microrganismo capaz de remover seletivamente o nitrogênio das ligações C-N e a ambientação com as mesmas, bem como a escolha das técnicas utilizadas para a detecção e quantificação dos produtos metabólicos da rota de desnitração do carbazol e a geração de suas correspondentes metodologias de análise.

Já a segunda fase foi focada no trabalho de identificação, com as técnicas escolhidas na fase inicial, de alguns metabólitos envolvidos na quebra seletiva das ligações C-N presentes na molécula de carbazol e realizada pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11. Esta identificação foi realizada por meio de comparação com alguns padrões previamente adquiridos seguindo uma rota base, referente à bactéria *Pseudomonas stutzeri*.

Ainda na segunda fase, houve a realização de experimentos que objetivaram a obtenção de dados que permitissem o cálculo dos parâmetros cinéticos do processo de degradação do carbazol pelo microrganismo escolhido para a realização do trabalho e a quantificação dos compostos detectados.

A terceira e última fase teve como objetivo representar matematicamente o consumo do composto orgânico nitrogenado de modo a desenvolver ferramentas para a simulação do processo de biodesnitração do carbazol e seus derivados pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

III.1 – TÉCNICAS ANALÍTICAS BÁSICAS

Nesta fase do trabalho, buscou-se conhecer o microrganismo através do manuseio das técnicas analíticas básicas estabelecidas no laboratório de Bioprocessos do

Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, como por exemplo, as técnicas de assepsia, de armazenagem, de cultivo para crescimento celular e de microscopia, e a criar uma metodologia de análise para a utilização da técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para usá-la como técnica de detecção da degradação do carbazol.

III.1.1 – Microrganismo

A cepa utilizada neste trabalho para a degradação do carbazol em sistema bifásico foi a da bactéria silvestre do gênero *Sphingomonas*, que foi isolada a partir de ambientes contaminados por óleo e sendo nomeada pelo código GTIN11 (KAYSER e KILBANE, 2005).

III.1.2 – Armazenagem

Para a armazenagem da cepa foram utilizados criotubos de 2 mL, sendo envazados com 1 mL de meio de cultivo onde foram crescidas as células da bactéria e 1 mL de solução de glicerol 40% em volume, obtendo o meio final a uma concentração de 20% em volume de glicerol. Os criotubos envazados foram mantidos em ambiente refrigerado entre -12°C e -18°C.

III.1.3 – Meio de Cultivo e Crescimento Bacteriano

Os meios de cultivos utilizados neste trabalho para o crescimento bacteriano foram preparados a partir do seguinte meio mineral basal com carbazol (CARNEIRO *et al.*, 2007):

Tabela III.1: Composição mássica do meio de cultivo usado para o crescimento das células da bactéria.

Componentes	Concentração ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25
CaCl_2	0,000756
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001
KH_2PO_4	4
Na_2HPO_4	4
Glicose	4
Carbazol/DMSO	0,5
Tween 20	0,55
Óleo Sintético*	5

*Composto por 70% em volume de n-hexadecano e 30% em volume de tolueno. O valor de concentração apresentado é volumétrica (mL de óleo por 1000 mL de solução).

Os reagentes carbazol (97%), n-hexadecano, tolueno (99,9%) e dimetil sulfóxido-DMSO (99,5%) foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich Inc. (Steinheim, Alemanha), tween 20 na empresa Acros Organics (Nova Jersey, USA) e os demais reagentes na empresa Vetec Química Fina Ltda. (Brasil).

O crescimento bacteriano se iniciou com a adição do conteúdo de um criotudo (seção III.1.2) em um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo base e 0,5 mL de carbazol em DMSO (0,5% em volume). O frasco foi incubado em Incubador Shaker I26 da New Brunswick Scientific a temperatura de 30°C e sob agitação de 200 rpm, por um período de 96 horas.

Após as células estarem crescidas, 5% em volume do valor do próximo meio foi então transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultivo base e 0,5% em volume de óleo sintético. Esta então foi incubada nas mesmas condições do erlenmeyer anterior por mais 96 horas. Este procedimento se repetiu por mais uma vez, mantendo-se as mesmas condições.

Passado o tempo de incubação para o crescimento celular, a concentração do meio de cultivo foi determinada através da densidade óptica (DO) e de uma curva padrão de peso de células secas. A DO foi determinada por espectrofotometria de absorção

molecular, utilizando o equipamento espectrofotômetro UV/VIS modelo UV Mini 1240 da marca Shimadzu em um comprimento de onda (λ) de 600 nm.

O procedimento de obtenção do peso de células secas teve por objetivo obter uma relação direta entre a absorvância de uma cultura microbiana líquida, em uma determinada condição de crescimento, e a massa de células em gramas por litro.

Para a obtenção da curva de calibração de peso seco, secaram-se três recipientes em estufa a 90°C até que fossem observados pelo menos três valores constantes em seus pesos (recipientes mantidos em dessecador até atingirem a temperatura ambiente). Em seguida, centrifugou-se 30 mL de meio com biomassa crescida a 11077 x g por 10 minutos e 20°C, lavando-se as células separadas com 3 alíquotas de 10 mL de água destilada. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 10 mL de água destilada para cada recipiente, levando-os novamente à estufa a 90°C até que também fossem observados pelo menos três valores constantes em seus pesos.

Paralelamente a isto, realizou-se 5 diluições do meio com biomassa crescida, medindo-se a absorvância das mesmas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm. A partir dos valores de peso e absorvância obtidos, plotou-se a curva calibração de peso seco (concentração celular em $g \cdot L^{-1}$ X absorvância), calculando-se a equação da reta obtida e o seu coeficiente de correlação (Anexo 1).

III.1.4 – Técnica de Degradação do Carbazol por Células Íntegras não Proliferantes (*resting cells*)

A técnica de *resting cells* – técnica que consiste em fornecer às células íntegras somente o composto estudado, sem o fornecimento de nutrientes adicionais para o crescimento celular – foi realizada em tubo de centrífuga de 15 mL de volume, com 1,5 cm de diâmetro e 11,7 cm de altura (tubo falcon convencional), a 200 rotações por minuto e com meio na seguinte composição:

Tabela III.2: Composição percentual do meio teste usado para a biodegradação do carbazol a uma concentração celular de $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Componentes	Concentração (%)
Tampão Fosfato 0,1M (pH=7,0)	80
Tween 20*	0,75
Ácido Clorídrico (1:1)	5
Óleo Sintético ** com carbazol ($400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	20

*Tween 20 a uma concentração de 0,05% em volume.

**Composto por 70% em volume de n-hexadecano e 30% em volume de tolueno (simulando o óleo real).

Os reagentes carbazol (97%), n-hexadecano e tolueno (99,9%) foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich Inc. (Steinheim, Alemanha), tween 20 na empresa Acros Organics (Nova Jersey, USA), ácido clorídrico PA na empresa Tedia Company Inc. (Brasil) e os demais reagentes na empresa Vetec Química Fina Ltda. (Brasil).

O teste foi realizado em um volume reacional de 2 mL, respeitando-se as proporções descritas na Tabela III.2, e com o valor de $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, descrito na Tabela III.2, que foi determinado por CARNEIRO *et al.* (2007) a fim de obter uma concentração celular que possibilitasse a visualização da cinética de degradação do carbazol em aproximadamente 30 minutos de reação.

Primeiramente, tomou-se o volume de meio de cultivo com biomassa crescida necessário para obter 6 mg de células (curva de peso de células secas – absorvância versus concentração celular). O volume foi então centrifugado a 11077 x g por 10 minutos a 30°C , e lavado com 3 alíquotas de 10 mL de tampão fosfato 0,1M com pH 7,0.

Em seguida, as células lavadas foram ressuspensas em tampão fosfato 0,1M com pH 7,0, adicionando-se posteriormente tween 20 e óleo sintético com carbazol. Passado o tempo pré-estabelecido, adicionou-se ácido clorídrico 1:1 para inibir a reação de degradação.

Os experimentos de degradação finalizados foram novamente centrifugados (11077 x g por 10 minutos e 10°C) formando duas fases. As duas fases separadas foram

tratadas, a aquosa filtrada em membrana de PVDF (Millex-HV) com 33 mm de diâmetro externo e 0,45 µm de diâmetro de poro da Millipore e a orgânica avolumada a 4 mL com acetonitrila para HPLC (99,9%) adquirida da empresa Tedia Company Inc., para posterior análise.

III.1.5 – Análises para Identificação e Quantificação dos Metabólitos

A análise escolhida para a detecção dos metabólitos da rota de degradação do carbazol foi a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detector operando na faixa do ultravioleta (UV).

Para esta parte do trabalho, tomou-se por base a rota de degradação do carbazol pelas bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri* estudadas por OUCHIYAMA *et al.* (1993) e LARENTIS (2005), respectivamente. Com base na literatura, adquiriu-se os padrões de carbazol (97%), 2-amino bifenil (97%), ácido antranílico, catecol e tolueno para HPLC (99,9%) na empresa Sigma-Aldrich Inc. (Steinheim, Alemanha), além de 2,3-dihidroxi bifenil (98%) na empresa Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japão) e ácido cis,cis-mucônico para HPLC (≥97%) na empresa Fluka Analytical (Steinheim, Alemanha).

Utilizando-se o equipamento de HPLC-UV foi possível testar, identificar e criar uma metodologia de análise para os padrões adquiridos.

Sendo assim, operando o equipamento de HPLC da Shimadzu com detector de UV a uma temperatura de 40°C, com um comprimento de onda (λ) de 230 nm, a vazão de 1 mL por minuto da fase móvel composta por (A) água Milli-Q com pH 2,2 – acidificada com ácido fosfórico 3M – e (B) acetonitrila, e com coluna C18 de fase reversa VP-ODS shim-pack com dimensões de 250 X 4,6 mm e com pré-coluna de C18 também da Shimadzu com 10 X 4,6 mm, foi possível detectar os compostos padrão fazendo um gradiente de concentração na fase móvel no tempo de análise.

Injetando-se 20 µL da amostra padrão, iniciou-se o gradiente de concentração com 60% de A e 40% de B até 4,00 minutos do tempo de análise. Em seguida, aos 4,01 minutos, a concentração da fase móvel passou a ser 45% de A e 55% de B

permanecendo até 12,49 minutos. De 12,50 minutos até o final da análise, aos 20 minutos, a concentração passou a 80% de A e 20% de B.

Foi realizado um tratamento de extração em fase sólida (Solid Phase Extration – SPE) da amostra orgânica (fase óleo) com cartuchos de SPE da empresa Varian, com 500 mg de recheio C18 e capacidade para 6 mL de amostra líquida, para remoção da fração linear do óleo sintético e assim evitar problemas no equipamento de cromatografia.

Para a quantificação dos metabólitos detectados, foram injetadas diferentes concentrações conhecidas dos padrões nas mesmas condições de análise a ser realizada para a amostra propriamente dita. Com isto, é possível correlacionar graficamente a concentração dos compostos com as respectivas áreas dos picos para cada padrão através de uma curva de área do pico versus concentração do padrão (Anexo 2).

III.2 – IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS E GERAÇÃO DE DADOS PARA O CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Nesta fase, buscou-se detectar e quantificar, nos equipamentos de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e de espectroscopia de massas acoplado ao de cromatografia gasosa, os metabólitos gerados no teste de *resting cells* de biodegradação de carbazol pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11. Além disso, foram realizados outros testes de *resting cells* para a geração de dados para a estimação dos parâmetros da cinética enzimática, determinação do comportamento dos compostos e da cinética de degradação do carbazol.

III.2.1 – Análises para a Comparação dos metabólitos por HPLC-UV

Os testes foram realizados da forma descrita na seção III.1.4 para a biodegradação de carbazol e da forma descrita na seção III.1.5 para a separação, identificação e comparação com padrões.

Para a biodegradação, foram estabelecidos diferentes tempos de reação para que fosse possível determinar o comportamento cinético de cada composto envolvido no sistema no meio bifásico. Para isto, os experimentos transcorreram em 9 sistemas reacionais (porque os experimentos são de caráter destrutivos), sendo 7 deles correspondentes à observação do comportamento cinético e 2 deles correspondentes aos controle e branco do teste, respectivamente.

Para os testes de comportamento cinético foram escolhidos os tempos para paralisar a reação de 0, 5, 10, 15, 20, 40 e 60 minutos de reação. Os testes controles foram realizados adicionando todos os componentes, com suas respectivas proporções, descritos na Tabela III.2, sendo para o teste branco adicionados todos os componentes menos o carbazol e para o teste controle adicionados todos os componentes menos as células.

Após terminar o experimento, centrifugaram-se os frascos onde ocorreram as reações e as duas fases formadas em cada frasco foram separadas para serem injetadas no sistema de cromatografia líquida, sendo a fase inferior (aquosa) filtrada em disco de membrana de PVDF e a fase superior (oleosa) misturada com o eluente B da fase móvel do equipamento, como descrito anteriormente, devido ao seu baixo volume reacional.

Já na análise de detecção e quantificação por HPLC, programou-se o equipamento com a corrida descrita na seção III.1.5 e injetou-se ambas as fases filtradas de cada sistema reacional. A determinação dos metabólitos foi realizada por comparação entre os dados de tempos de retenção apresentados nos cromatogramas das amostras e dos padrões. Os picos em tempos de retenção que não há padrão foram identificados através da análise de espectroscopia de massas (seção III.2.2). O processo para a obtenção das metodologias, análises (HPLC e GC/MS) e modelo matemático está esquematizado na Figura III.1.

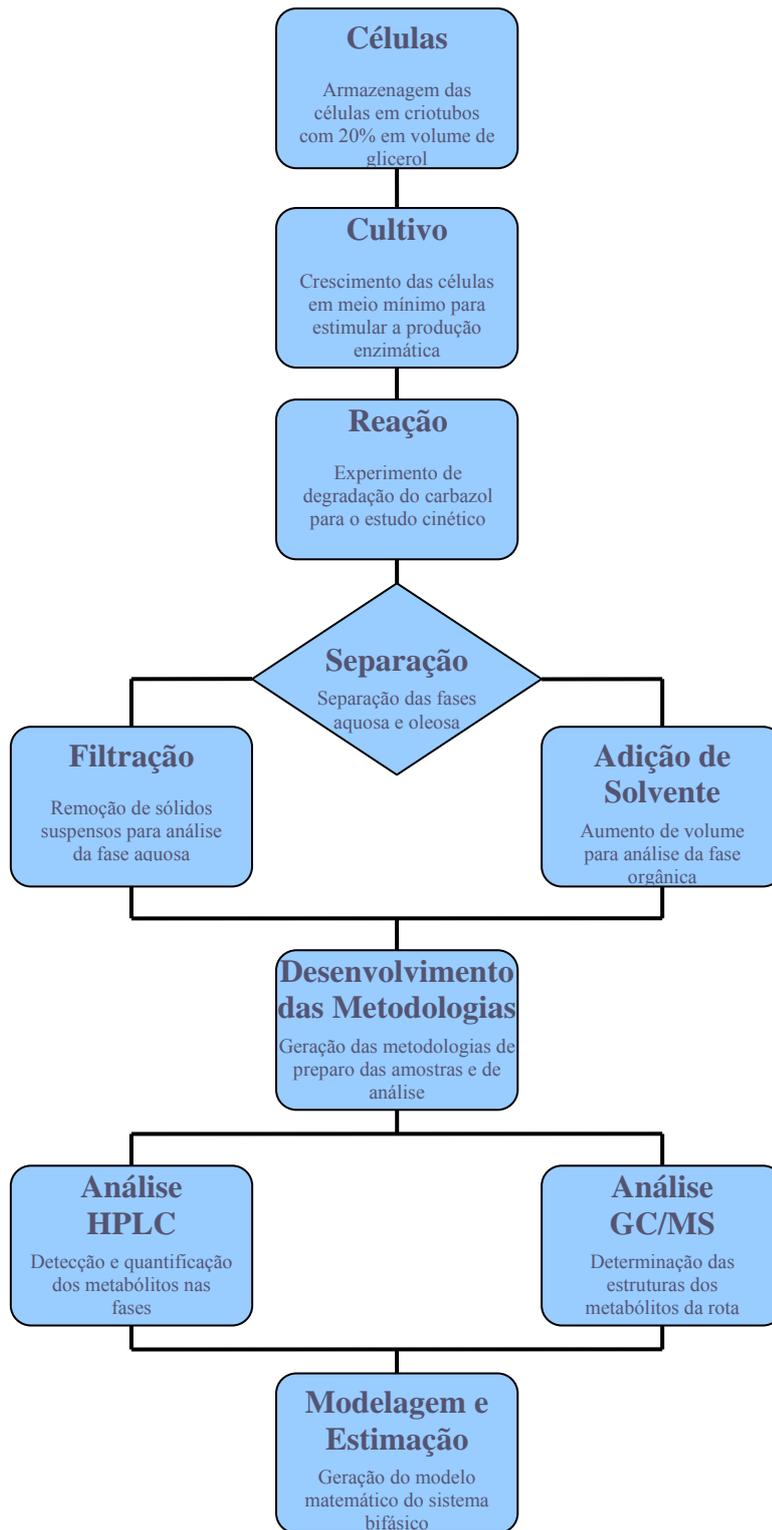


Figura III.1: Fluxograma das etapas realizadas nesta dissertação para os processos de obtenção do biocatalisador, do experimento de degradação do carbazol com as células íntegras não proliferantes (*resting cells*), de análise de detecção dos compostos da rota metabólica da bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 e de estimação dos parâmetros e modelagem matemática do sistema bifásico.

III.2.2 – Análises para a Comparação dos metabólitos por GC/MS

A análise de espectroscopia de massas acoplada à cromatografia gasosa foi utilizada para a detecção e confirmação dos metabólitos gerados na rota de degradação do carbazol usando a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11. Para isto, utilizaram-se os equipamentos CP3800 de cromatografia gasosa e Saturn 2200 de espectroscopia de massas da empresa Varian. Utilizou-se no equipamento de cromatografia gasosa a coluna CP8944a (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com o fluxo de gases (hélio e nitrogênio) de 29 mL por minuto na entrada do equipamento e de 1 mL por minuto do gás de arraste no interior da coluna.

Os compostos foram extraídos com acetato de etila da amostra gerada no teste de degradação e injetados no equipamento, onde as temperaturas do injetor e do detector foram estabilizadas em 250°C e 200°C, respectivamente, para o início da análise. Na programação da rampa de temperatura para a separação dos compostos da amostra por cromatografia gasosa, iniciou-se a temperatura de análise com 40°C constantemente durante 5 minutos, com posterior aumento para 220°C a uma razão de 12°C por minuto e, em seguida, ampliada para 320°C a uma razão de 15°C por minuto, mantendo-se constante por 25 minutos ao atingir esta última temperatura.

Para corrigir variações de leitura causadas por problemas analíticos diversos, adicionou-se às amostras, como padrão interno, 800 mg*L⁻¹ do composto 1,7-dihidroxi naftaleno para dar confiabilidade as áreas obtidas dos compostos da rota de degradação do carbazol detectados na cromatografia. Os resultados de concentração foram calculados diretamente pelo equipamento através da obtenção de curvas de calibração dos padrões preparada anteriormente à análise para cada composto padrão da rota.

III.2.3 – Análise de Detecção e Quantificação do Nitrogênio Removido

Para a detecção e quantificação do nitrogênio removido da molécula de carbazol na forma de amônia/amônio, escolheu-se o método colorimétrico com alta sensibilidade descrito por FAWCET e SCOTT (1960) e por WEATHERBURN (1967) que consiste na reação, catalisada pelo nitroprussiato, do fenol com o nitrogênio amoniacal presente na amostra em meio alcalino.

Este método consiste na adição de 5 mL do reagente A (5 g de fenol e 25 mg de nitroprussiato de sódio em 500 mL de solução) em 20 μ L de amostra com homogeneização rigorosa e posterior adição de 5 mL do reagente B (2,5 g de hidróxido de sódio e 4,2 mL de hipoclorito de sódio em 500 mL de solução), também homogeneizando rigorosamente. O meio reacional preparado foi então mantido a 37°C por aproximadamente 20 minutos e lido em equipamento espectrofotômetro UV/VIS – o modelo usado é o UV Mini 1240 da marca Shimadzu – no comprimento de onda (λ) de 625 nm.

Juntamente com o procedimento anterior para detecção e quantificação da amônia/amônio, repetiu-se o mesmo procedimento de análise para obter a curva de calibração (Anexo 3), sendo essa obtida substituindo a amostra por concentrações conhecidas de sulfato de amônio.

III.3 – REPRESENTAÇÃO MATEMÁTICA DO PROCESSO DE BIODESNITROGENAÇÃO DO CARBAZOL

Nesta última fase do trabalho, buscou-se gerar um modelo matemático que representasse a degradação enzimática do carbazol de modo a auxiliar no desenvolvimento de ferramentas de simulação para o processo de biodesnitração do carbazol e seus derivados.

Para isto, utilizaram-se os resultados obtidos nos experimentos e técnicas matemáticas para a obtenção e resolução de equações diferenciais ordinárias (EDO's) que representassem o sistema em questão. Após a revisão das equações geradas e correção das unidades das variáveis usadas no modelo, as mesmas tiveram suas resoluções numéricas efetuadas pelo método de Runge-Kutta no programa de simulação matemática Maple[®] 12 com o auxílio dos dados obtidos nos experimentos. A listagem desta programação está exposta no Anexo 4 da referida dissertação.

As EDO's resolvidas numericamente no programa Maple[®] 12 também foram resolvidas empregando o programa Fortran[®] 11, utilizando o integrador DASSL (PETZOLD, 1982) para confirmação dos resultados e assim dar início a estimação dos parâmetros usados na simulação do comportamento do modelo gerado para a degradação do carbazol no experimento de *resting cells* empregando a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11. A estimação de parâmetros foi realizada pelo método numérico híbrido, empregando o método heurístico do Enxame de Partículas (KENNEDY e EBERHART, 1995; SCHWAAB, 2007) associado ao método de Gauss-Newton (NORONHA *et al.*, 1993).

IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no referido trabalho. Para isto, tomou-se como base para o estudo as rotas de degradação do carbazol apresentadas por OUCHIYAMA *et al.* (1993) e LARENTIS (2005) para as bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri*, respectivamente. Avaliou-se os produtos metabólicos da degradação de carbazol, com remoção do nitrogênio heteroatômico, por testes de *resting cells* com a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 através da utilização das técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

Os dados analisados e discutidos foram utilizados na modelagem do sistema dinâmico e na estimação dos parâmetros cinéticos do processo de degradação do carbazol. Realizou-se também a obtenção de dados relativos à formação de amônia, degradação dos componentes do óleo sintético e dos compostos 2,3-dihidroxi bifenil e 2-amino bifenil, visto que estes dois últimos compostos são análogos ao primeiro intermediário na rota de degradação do carbazol. O estudo do comportamento cinético do processo de degradação dos compostos 2,3-dihidroxi bifenil e 2-amino bifenil foi realizado visando auxiliar na compreensão do processo de degradação da molécula de carbazol.

IV.1 – CARACTERIZAÇÃO DO MICRORGANISMO

Nesta seção serão descritos os resultados dos testes realizados para a caracterização do microrganismo empregado nesta pesquisa devido a pouca informação sobre esta cepa na literatura. O microrganismo empregado foi a bactéria *Sphingomonas sp.* cedida pelo centro de pesquisas e desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello – Cenpes Petrobras.

IV.1.1 – Características do Microrganismo

A bactéria utilizada nesta dissertação foi caracterizada tanto em relação a sua morfologia colonial como em relação as suas características microscópicas (Tabela IV.1). O teste de morfologia da colônia foi realizado de duas formas: em placas de Petri contendo agar nutriente e com coloração de gram para a visualização em microscópio após o crescimento do microrganismo em meio líquido (Tabela III.1). As Figuras IV.1 e IV.2 ilustram, respectivamente, a morfologia colonial e a visualização microscópica desta estirpe.



Figura IV.1: Aspecto das colônias de *Sphingomonas sp.* GTIN11 crescida em agar nutriente durante 48 horas a 30°C.

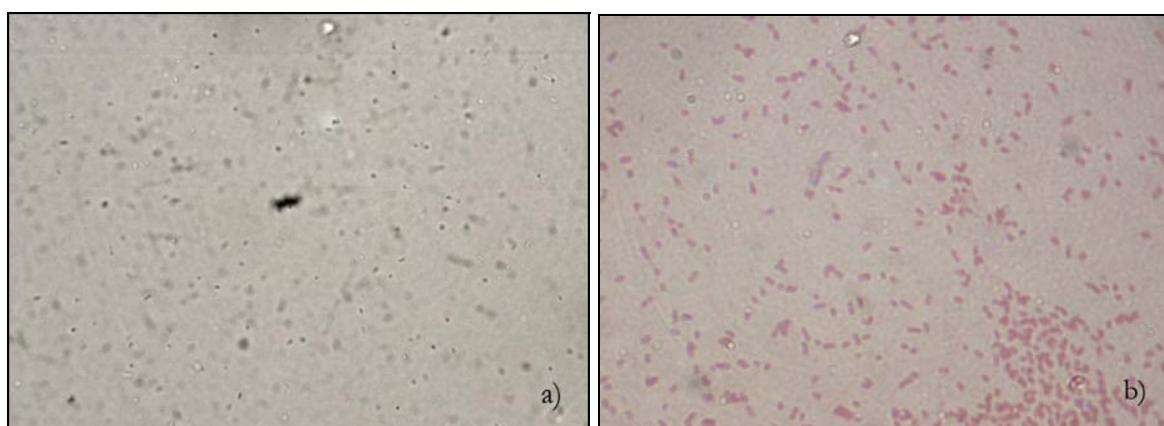


Figura IV.2: Fotografias em microscópio, utilizando aumento de 1000 vezes, da cultura da bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11. Em a) está a lâmina “a fresco” e em b) está a lâmina de coloração de gram.

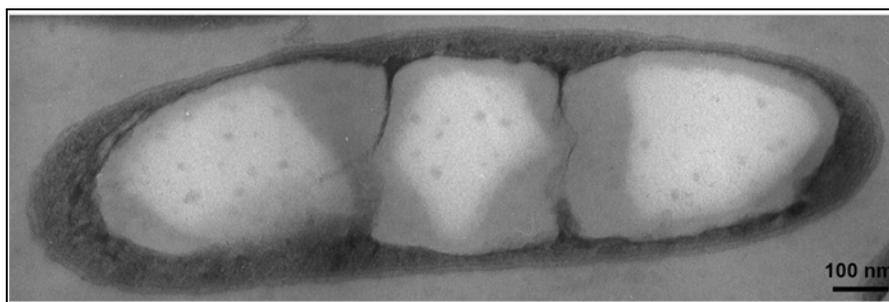


Figura IV.3: Microscopia eletrônica da bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

Na microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 (Figura IV.3) é possível visualizar a presença de grânulos no interior da célula. Isto pode ter ocorrido devido à presença em excesso de algum nutriente no meio de crescimento. Desta forma, o microrganismo, através de algum mecanismo ainda não identificado (e que não é o foco desta dissertação), acumula energia em seu interior na forma de um tipo de polímero. Isto poderia ser confirmado com o teste de ressonância magnética nuclear (RMN) que possibilitaria talvez afirmar que estes grânulos são oriundos da formação de um tipo de polihidroxibutirato (PHB), tornando possível a utilização desta bactéria para outras finalidades que não só a biodesnitrogenação em sistemas bifásicos.

Tabela IV.1: Características da cultura *Sphingomonas sp.* GTIN11.

Microrganismo	Temperatura de Cultivo	Composto Orgânico Nitrogenado	Morfologia Colonial	Características Microscópicas
<i>Sphingomonas sp.</i> GTIN11	30°C	Carbazol	Colônia média, circular, convexa, densa, lisa, coloração creme	Bastonetes, gram (-), sem flagelos ou cílios

IV.1.2 – Curva de Crescimento Celular

A Figura IV.4 apresenta a curva de crescimento desta cultura em meio cuja única fonte de nitrogênio é o carbazol, como descrito na seção III.1.3 deste trabalho.

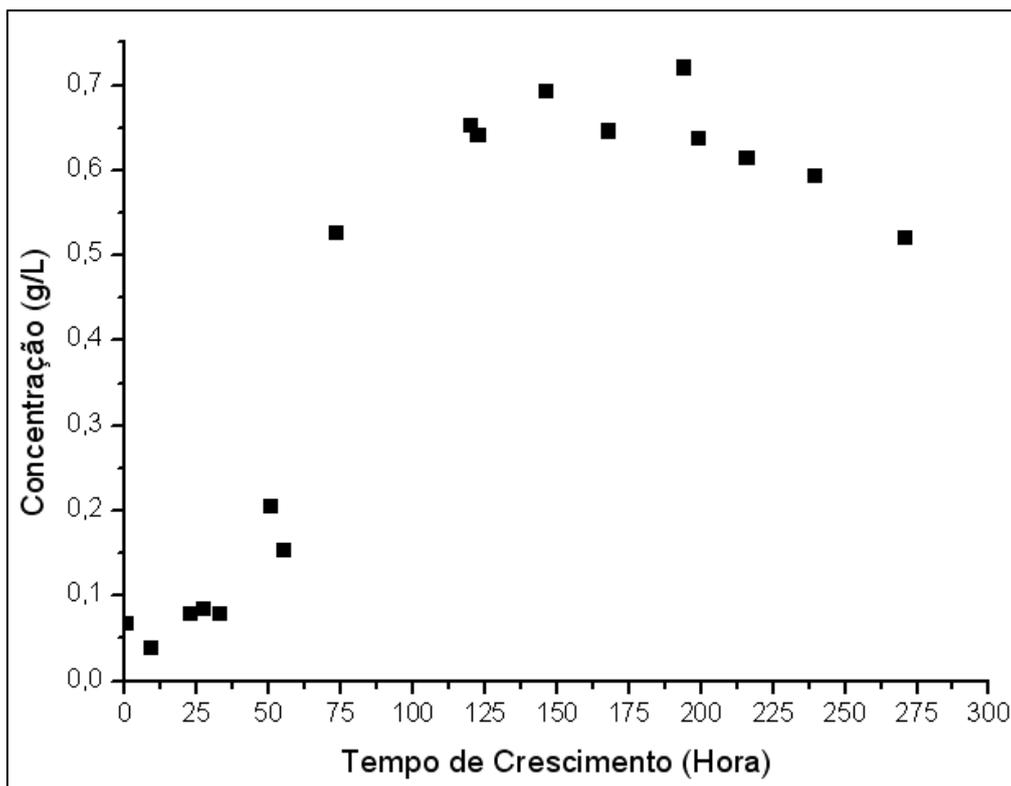


Figura IV.4: Crescimento celular da bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 em meio com carbazol como única fonte de nitrogênio.

Nota-se que, neste crescimento, a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 permaneceu na fase lag por aproximadamente 33 horas de incubação. Este longo tempo provavelmente ocorreu devido à única fonte de nitrogênio do meio não ser de fácil assimilação. No entanto, pode-se também observar que uma vez iniciado o consumo do composto orgânico nitrogenado, a cepa GTIN11 de *Sphingomonas sp.* cresceu acentuadamente até alcançar o final de sua fase exponencial de crescimento em torno de 96 horas de incubação, atingindo uma concentração celular máxima de aproximadamente $0,659 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no final do crescimento.

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada entre os pontos 33 e 73 horas de incubação, obtendo um valor igual a $0,018 \text{ h}^{-1}$ com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,937 para a cepa crescida no meio onde somente havia carbazol como fonte de nitrogênio. A baixa taxa de crescimento obtida no meio com carbazol como única fonte de nitrogênio (meio mínimo), equiparou-se à taxa obtida em meio rico em nutrientes apresentada por CARNEIRO *et al.* (2007).

IV.2 – DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Esta fase do trabalho teve como objetivo, através das condições de análise definidas e descritas nas seções III.1.5, III.2.2 e III.2.3, determinar e quantificar por técnicas cromatográficas e de espectroscopia de massas os metabólitos da rota de biodesnitração do carbazol. Além disto, procurou-se também gerar dados que possibilitassem a estimação de parâmetros do modelo de degradação do carbazol pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

IV.2.1 – Espectro de Absorvância na Faixa do Ultravioleta

O objetivo deste teste foi determinar o comprimento de onda a ser utilizado na análise de HPLC. Para isto, fez-se uma leitura de intensidade de absorção molecular de cada composto na faixa de comprimento de onda (λ) do ultravioleta para determinar qual λ atenderia concomitantemente a todos os compostos para sua utilização no teste de cromatografia líquida.

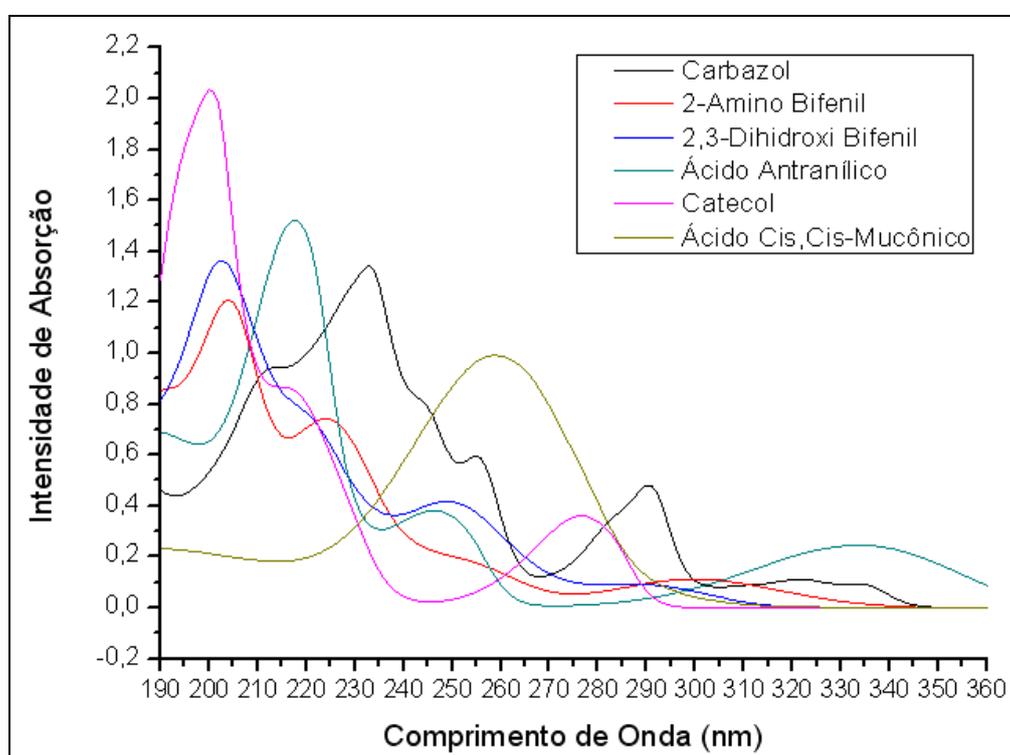


Figura IV.5: Espectro de intensidade de absorção molecular na faixa de comprimento de onda do ultravioleta para os padrões dos metabólitos da rota de degradação do carbazol.

O gráfico de resposta dos compostos analisados obtido no equipamento espectrofotômetro demonstrou que cada um dos padrões apresenta um ou mais pontos máximos de absorção molecular no intervalo de λ analisado (Figura IV.5). Com isso, optou-se por utilizar um λ de 230 nm, dado corroborado de artigos discutidos em literatura e que descrevem a utilização deste λ para a análise de carbazol (HISATSUKA, 1994; KIRIMURA, 1999; LI, 2008), e por neste comprimento de onda ser possível detectar razoavelmente todos os padrões.

IV.2.2 – Análise dos Metabólitos por Cromatografia Líquida

Baseado na rota metabólica de desnitração do carbazol proposta por OUCHIYAMA *et al.* (1993) e LARENTIS (2005) para as bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri*, respectivamente, realizaram-se ensaios de separação cromatográfica em fase líquida (Figura IV.6) para os compostos (a) ácido cis,cis-mucônico, (b) catecol, (c) ácido antranílico, (d) tolueno, (e) 2,3-dihidroxi bifenil, (f) 2-amino bifenil e (g) carbazol.

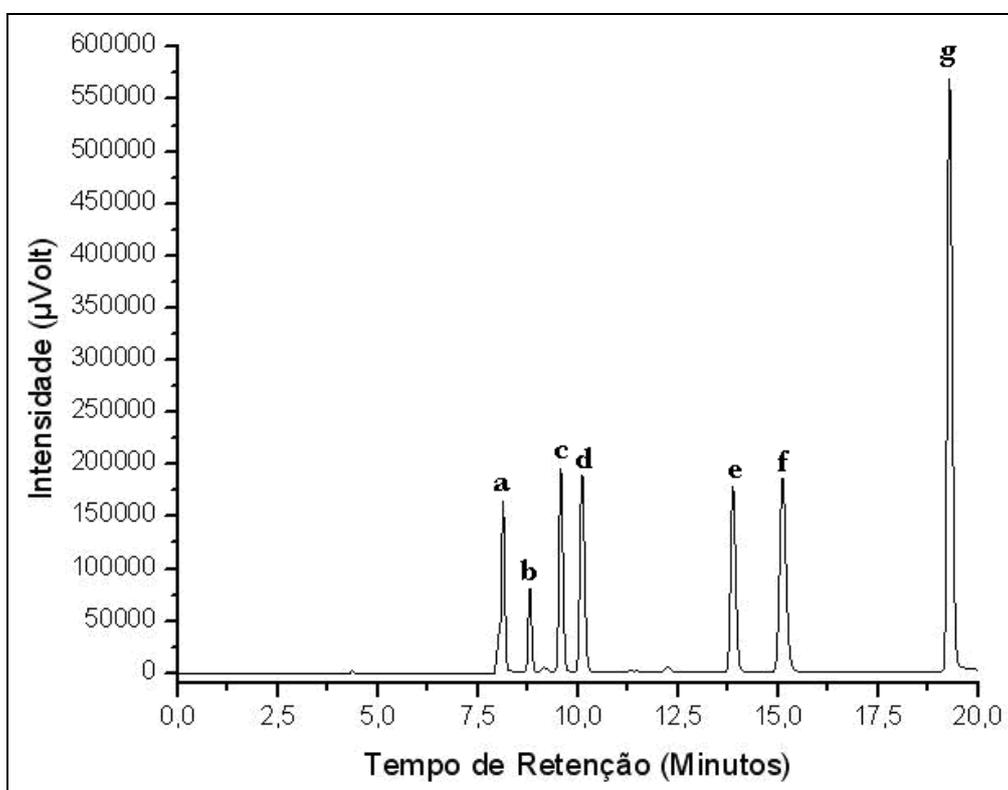


Figura IV.6: Cromatograma dos padrões na análise de HPLC. Pico a – ácido cis,cis-mucônico em 8,12 minutos; pico b – catecol em 8,77 minutos; pico c – ácido antranílico em 9,53 minutos; pico d – tolueno em 10,15 minutos; pico e – 2,3-dihidroxi bifenil em 13,80 minutos; pico f – 2-amino bifenil em 14,85 minutos; e pico g – carbazol em 19,29 minutos.

Pode-se observar na Figura IV.6 que o método de separação empregado nesta dissertação (seção III.1.5) resultou em boa separação dos compostos padrão da rota de desnitração em questão, facilitando a quantificação, além da identificação de um pico na região do tempo de retenção de 10,15 minutos. Este pico foi determinado comparativamente (através da injeção de tolueno grau HPLC) como sendo do composto tolueno presente na reação de degradação do carbazol em meio bifásico e que aparece quando as células da bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 são adicionadas ao meio reacional.

IV.2.2.1 – Biodegradação do Carbazol

A realização dos ensaios de biodegradação do carbazol em sistemas bifásicos teve o intuito de se aproximar do que ocorreria em um ambiente de processamento de petróleo de uma refinaria com tratamento biológico acoplado. Para isto, o teste de desnitração foi conduzido como descrito na seção III.1.4, sendo separadas as duas fases do sistema reacional, analisando-as por técnicas cromatográficas e obtendo os cromatogramas ilustrados nas Figuras IV.7 e IV.9 (fase orgânica), e IV.12 (fase aquosa).

Análise da Fase Orgânica da Biodegradação do Carbazol

Na análise da fase orgânica foram realizados experimentos por meio de dois procedimentos: primeiro tratando a amostra gerada na biodegradação do carbazol através da técnica de extração em fase sólida (solid phase extraction - SPE) para a remoção do n-hexadecano que representa 70% desta fase (podendo causar danos em alguns componentes do equipamento) e segundo sem o tratamento de SPE (Figuras IV.7 e IV.8, e IV.9 e IV.10, respectivamente). Procedeu-se da primeira maneira por receio de rápida saturação da coluna, aumento da pressão do sistema de análise e redução da vida útil da coluna cromatográfica com o acúmulo dos compostos presentes na reação, o que não se observou realizando o segundo procedimento. Em ambos os procedimentos foi possível detectar (em HPLC) somente o composto carbazol, como ilustrado nas Figuras IV.7 e IV.9, que foi adicionado inicialmente a esta fase a uma concentração conhecida, permitindo visualizar o seu comportamento em função do tempo. Notou-se que o

comportamento do processo de desnitração do carbazol variava minimamente entre os procedimentos (com e sem tratamento com cartucho de SPE), sendo que a amostra que foi tratada com a técnica de SPE, nas condições testadas, apresentou recuperação inferior (ilustrado na Figura IV.11) em relação à amostra que não sofreu tratamento (concentração aproximadamente 3 vezes menor).

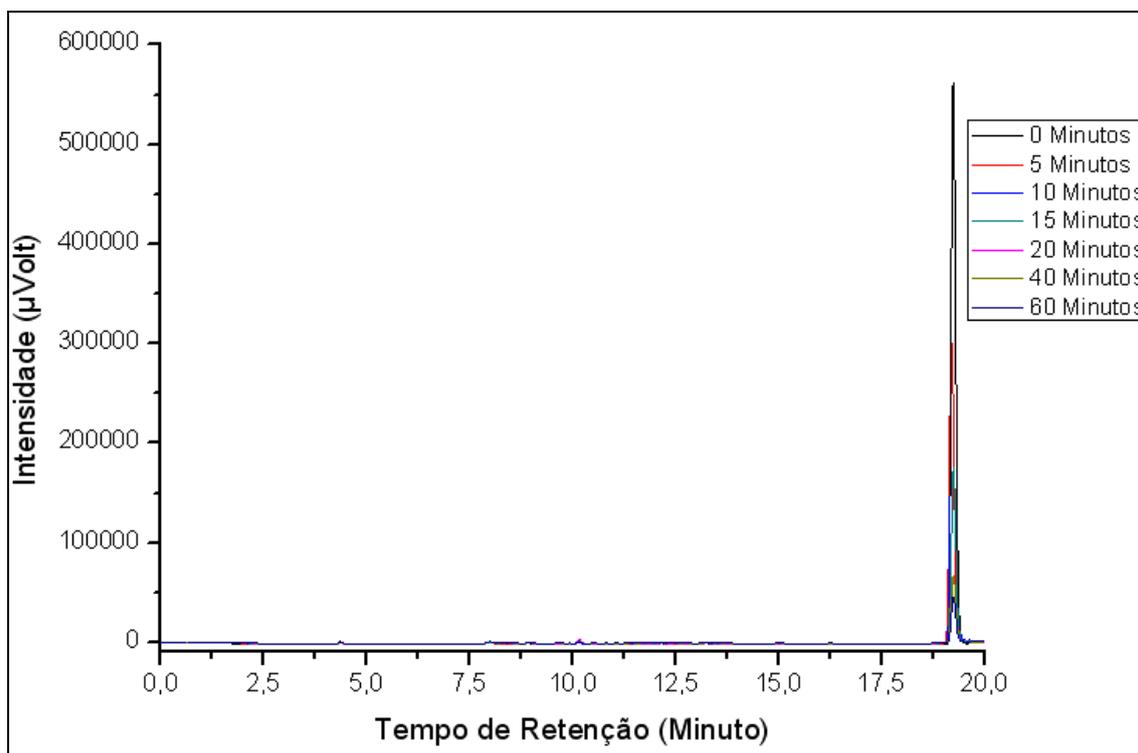


Figura IV.7: Cromatograma da fase orgânica do teste de degradação do carbazol com tratamento com cartuchos de extração em fase sólida.

Na Figura IV.8.a, a amostra controle (sem carbazol) apresentou um valor de concentração de carbazol próximo ao da amostra branco (sem células), o que ocorreu devido, provavelmente, ao carbazol estar aderido à membrana celular da bactéria, sendo esta concentração de carbazol oriunda do crescimento celular. A pequena variação no tempo de retenção de alguns picos apresentada nos cromatogramas das Figuras IV.8.a, IV.8.b e IV.10.a é decorrente de instabilidades no equipamento, como por exemplo, a alteração da vazão da fase móvel no ato da análise e/ou no gradiente de concentração dos componentes da fase móvel. O consumo do carbazol pela bactéria ficou evidenciado na Figura IV.8.b com o decréscimo da intensidade dos picos com o decorrer da reação de degradação (com o aumento do tempo de reação, menor é a concentração de carbazol encontrada nesta fase (Figura IV.11)). Com estes resultados, é possível afirmar que a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 é capaz de expressar a enzima carbazol 1,9a-

dioxigenase (CarA), uma dioxigenase angular, usada na primeira etapa da degradação do carbazol.

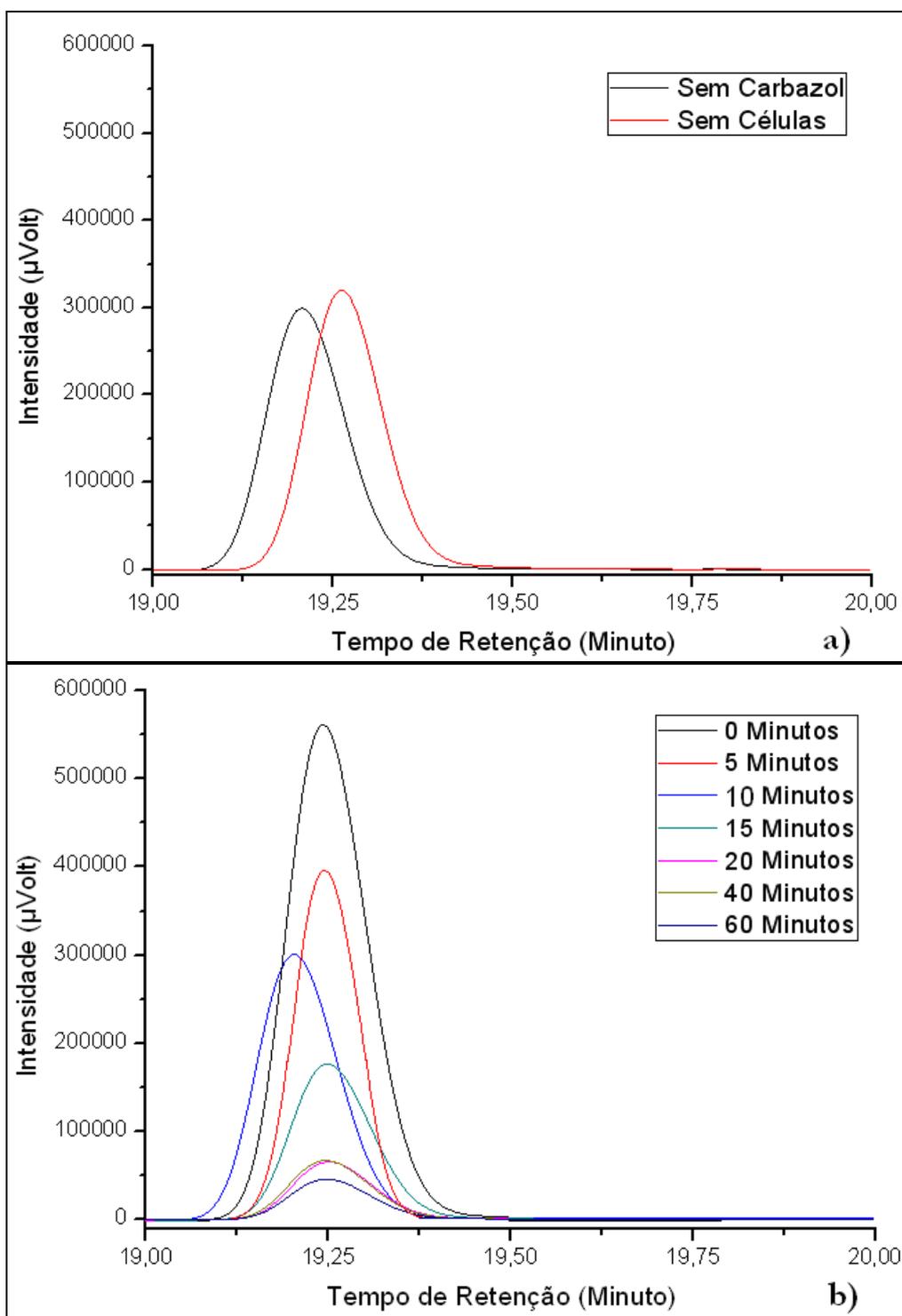


Figura IV.8: Cromatogramas da fase orgânica do teste de degradação do carbazol com tratamento com cartuchos de SPE. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes.

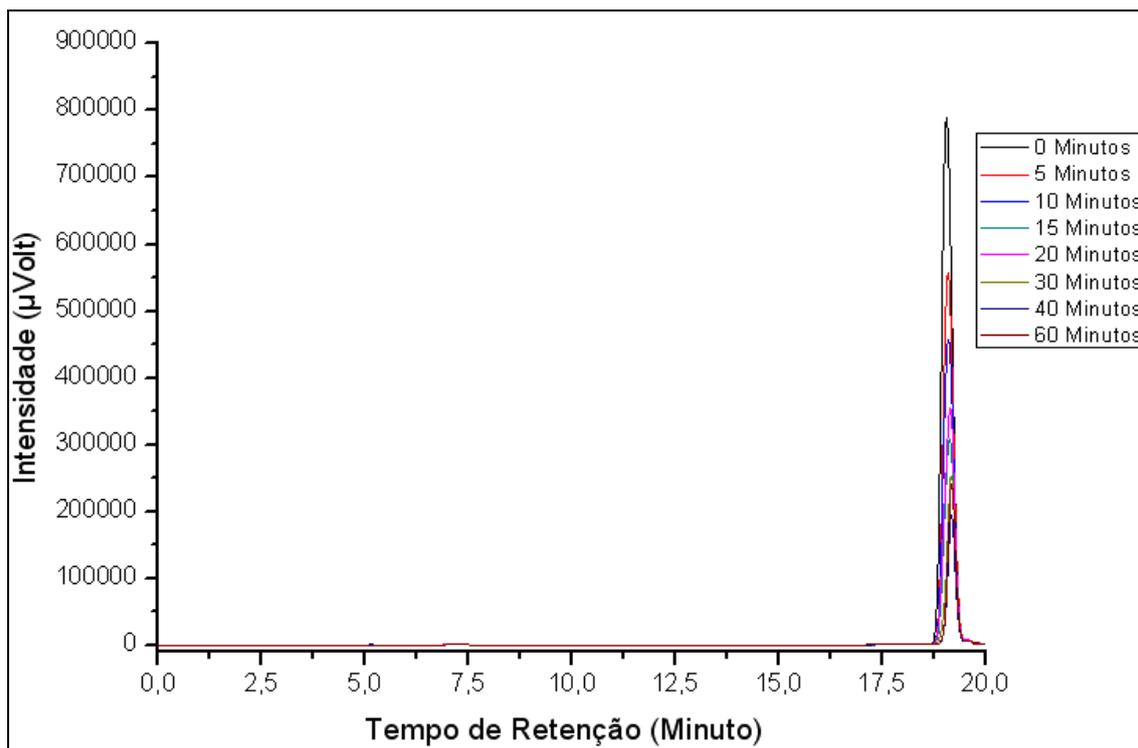


Figura IV.9: Cromatograma da fase orgânica do teste de degradação do carbazol sem tratamento com cartucho de extração em fase sólida.

A variação da intensidade dos picos expostos na Figura IV.10.b apresentou a mesma variação comportamental de intensidade dos picos expostos na Figura IV.8.b, diferindo somente na apresentação de valores mais altos de concentração – valor máximo de intensidade de 800000 μ Volts e de 600000 μ Volts, respectivamente. Na Figura IV.10.a, a amostra controle (sem carbazol) também apresentou um pico no tempo de retenção do carbazol, mas com menor intensidade. Este comportamento se repetiu em todos os testes realizados no período da dissertação, dando indícios de que este composto está aderido na membrana celular e/ou que a degradação é intracelular, pois aparentemente as células estão carregando carbazol do meio de crescimento.

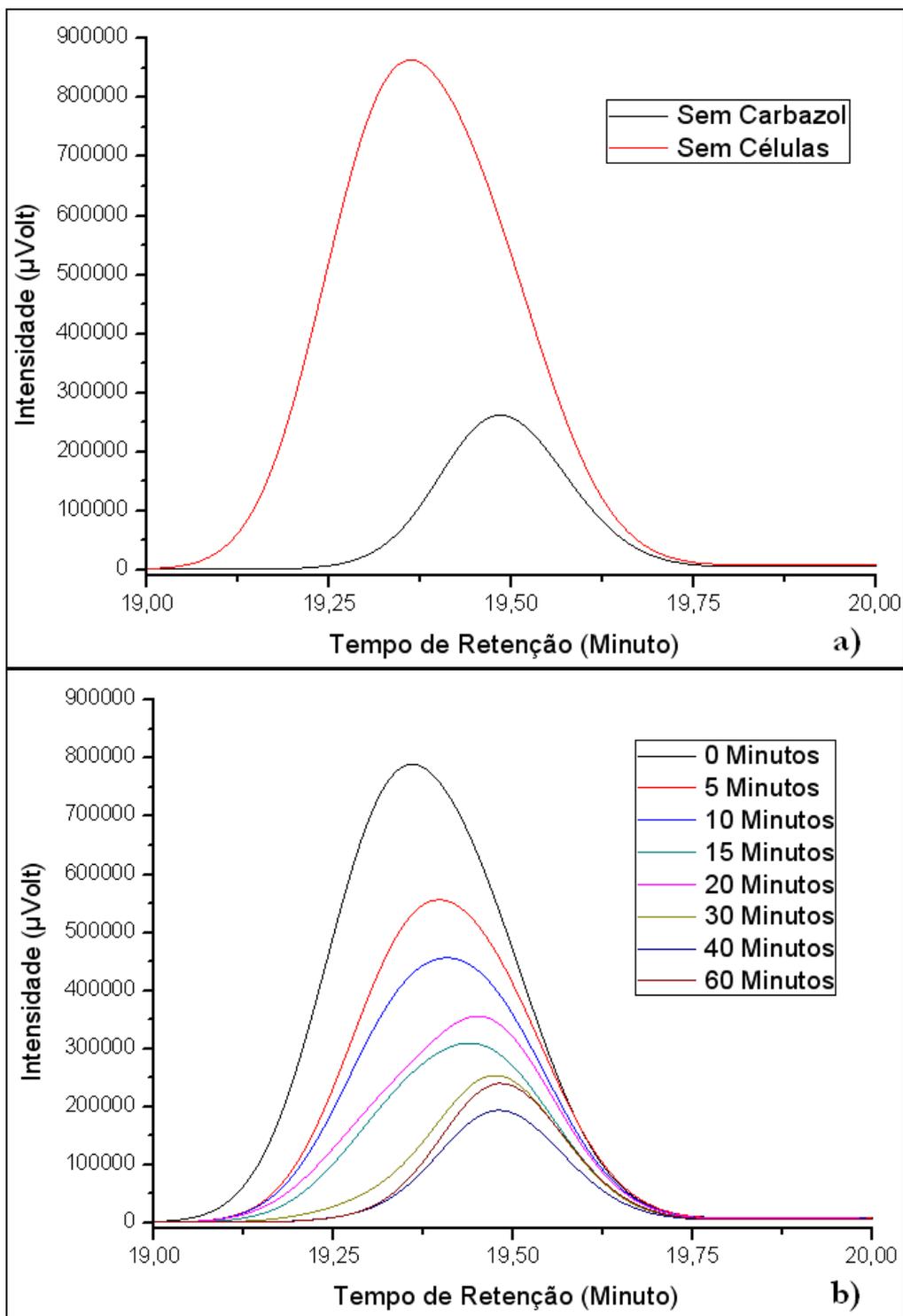


Figura IV.10: Cromatogramas da fase orgânica do teste de degradação do carbazol sem tratamento com cartuchos de SPE. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes.

Em ambos os procedimentos houve decréscimo exponencial da concentração, como ilustrado na Figura IV.11, sendo que no primeiro experimento, com cartucho de SPE, a concentração se estabilizou mais rapidamente (a partir de aproximadamente 20 minutos de reação) em relação ao segundo experimento (a partir de aproximadamente

40 minutos de reação), sem o cartucho de SPE. Uma hipótese que pode ser levantada para esta diferença na estabilização é a perda de material no processo de SPE devido à quantidade de moléculas dos compostos da rota de degradação ser superior à quantidade de sítios ativos específicos na superfície sólida do suporte para a adsorção (ou que a quantidade de sítios é baixa), impossibilitando a retenção de todos os compostos presentes na amostra gerada no teste (gerando a necessidade de se trabalhar com a amostra diluída). Aliado a isto, outro possível motivo desta diferença é a variação na atividade enzimática da bactéria no crescimento microbiano (por exemplo, variação na temperatura de crescimento e/ou na agitação do meio), visto que os testes foram realizados com crescimentos bacterianos distintos (realizados em dias diferentes), podendo haver alteração na taxa de crescimento celular e produção enzimática. É possível afirmar isto, pois segundo CARNEIRO *et al.* (2007), a degradação do carbazol realizado pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11, partindo de $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentração do substrato no óleo, ocorre em aproximadamente 20 minutos devido a elevada taxa específica de consumo deste composto apresentada por esta cepa em sistema bifásico contendo 70% alifáticos e 30 % aromáticos.

Sabendo-se que a bactéria está presente na fase aquosa e que o carbazol apresenta insolubilidade em meio aquoso (composto insolúvel em água a 20°C), adicionou-se um surfactante (tween 20) ao meio para estabilizar este composto insolúvel nesta fase, auxiliando o acesso da célula ao substrato. Com isto, torna-se possível a ocorrência de um fenômeno de transporte do carbazol entre ambas as fases, embora seja mínimo. Outra hipótese para o acesso das células ao substrato em uma fase distinta é a existência de um mecanismo de transporte facilitado promovido pela bactéria (o que não foi possível ser verificado).

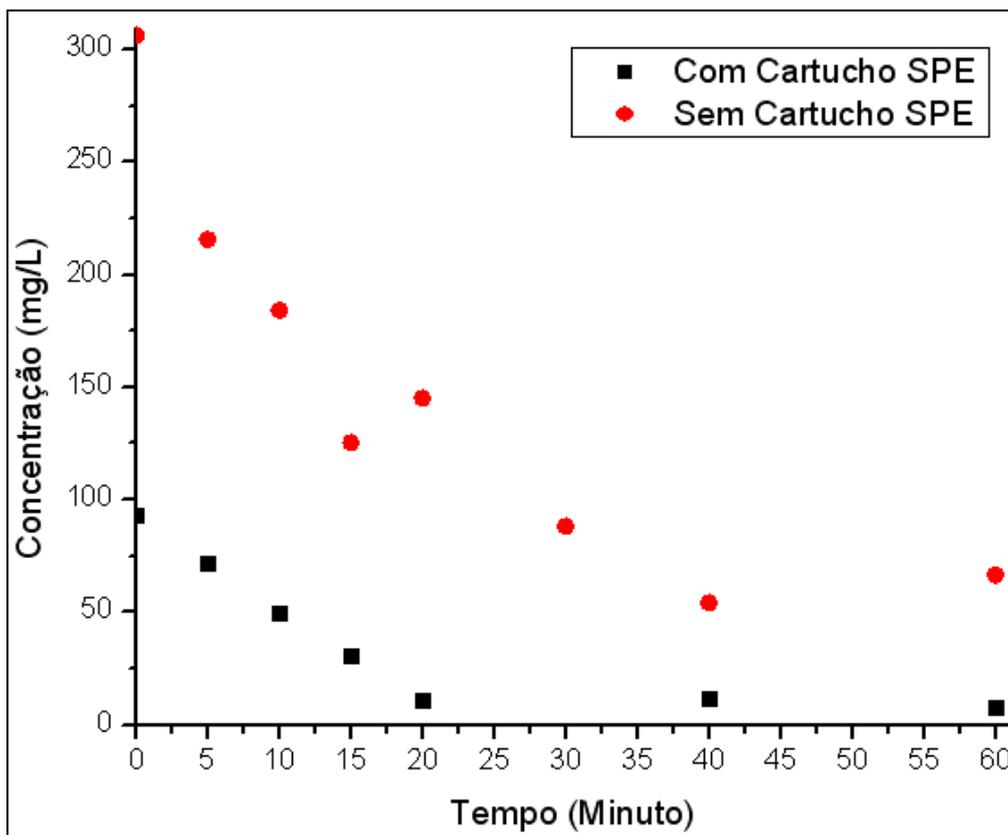


Figura IV.11: Gráfico do perfil de concentração do carbazol em função do tempo de reação. Em preto estão os dados obtidos no experimento realizado com cartucho de SPE e em vermelho estão os dados obtidos no experimento realizado sem cartucho de SPE.

Análise da Fase Aquosa da Biodegradação do Carbazol

Na análise da fase aquosa foi possível identificar a presença dos compostos ácido antranílico, catecol e ácido cis,cis-mucônico (Figuras IV.12 e IV.13), que se fazem também presentes na rota de degradação do carbazol pela bactéria escolhida como base para este estudo (*Pseudomonas stutzeri*). Isto é um forte indício de que a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 utilizada neste trabalho possui os genes para expressar, se não todas, a maioria das enzimas que a *Pseudomonas stutzeri* produz para remover o nitrogênio existente na molécula heteroatômica de carbazol. A presença destes compostos na fase aquosa é explicada pela conversão do carbazol ser realizada no interior das células bacterianas, uma vez que estas reações são dependentes de cofatores, sendo encontrados no meio aquoso devido ao rompimento da membrana celular com o término da reação de degradação. Na Figura IV.12 estão expostos todos os picos encontrados na fase aquosa do teste de degradação do carbazol durante o tempo de realização da análise cromatográfica.

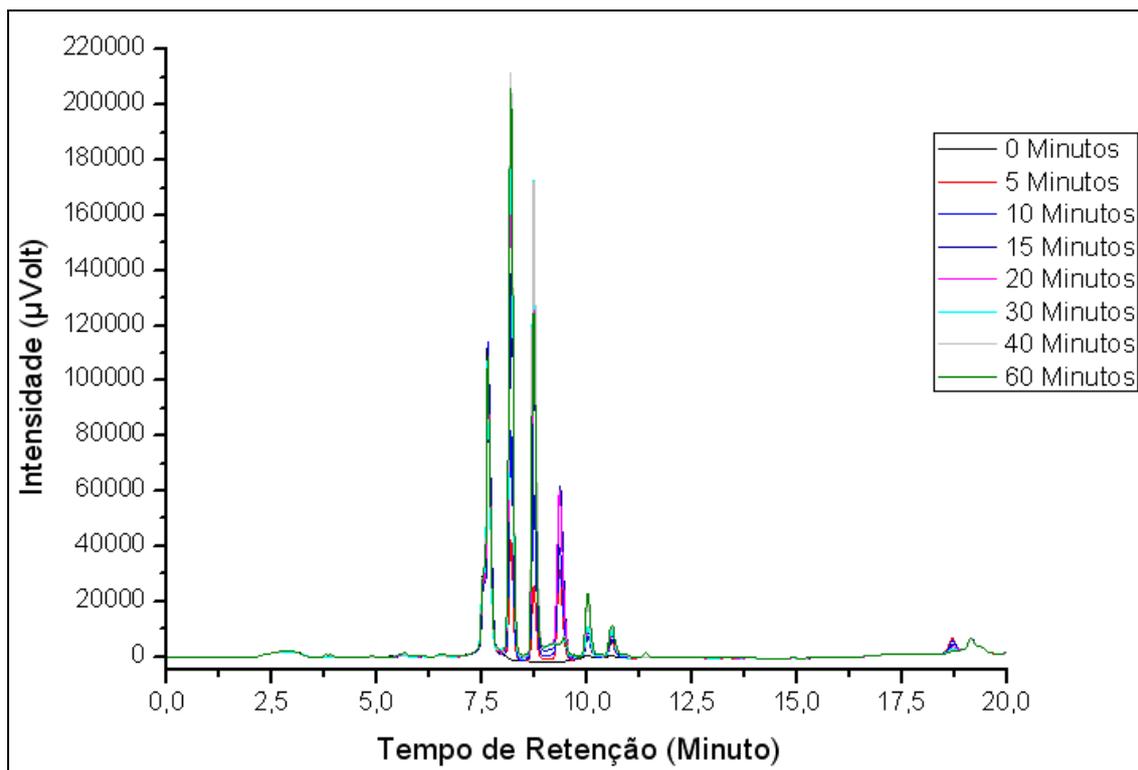


Figura IV.12 : Cromatograma da fase aquosa do teste de degradação do carbazol.

É possível observar na Figura IV.13 a presença de um pico (pico 5) no tempo de retenção de aproximadamente 10,15 minutos. Este pico foi determinado como sendo a presença de tolueno nesta fase (solubilidade de $0,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em água a 20°C). Isto foi agravado devido à presença do surfactante tween 20 no meio, estabilizando uma maior fração deste composto nesta fase. Além disto, observa-se também a presença de um pico relativo a um composto não determinado (pico número 6) na Figura IV.13.b, apresentando um comportamento variável (aumento e estabilização da intensidade) no tempo de retenção de aproximadamente 10,55 minutos. Não é possível somente com esta análise cromatográfica afirmar qual o composto referente a este último pico (número 6) devido à impossibilidade de detecção do mesmo pela falta de um padrão para a comparação, sendo necessária a realização de outros testes (vide seção IV.2.4).

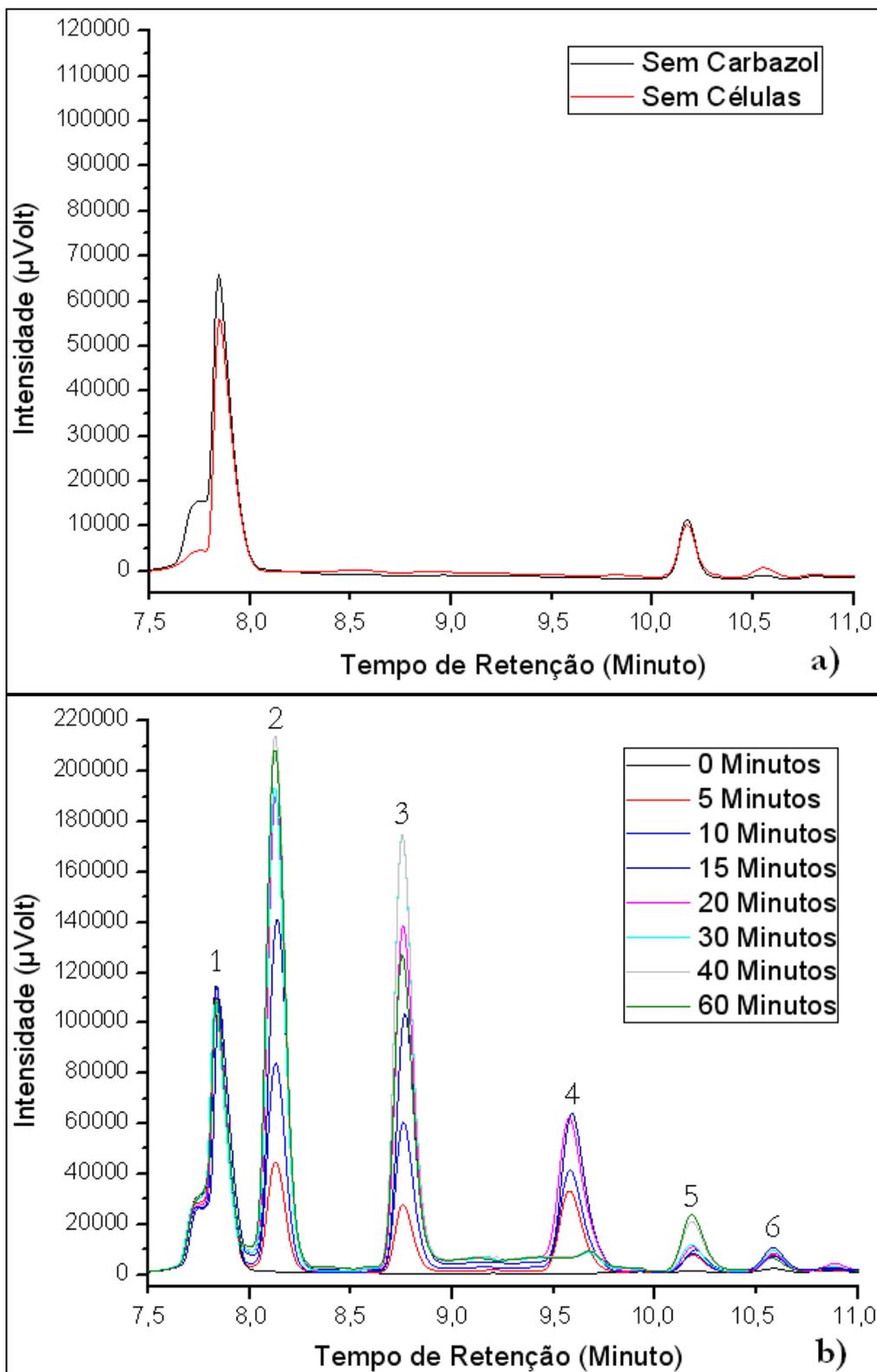


Figura IV.13: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do carbazol. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. Os picos na região 1 são oriundos do meio (tween 20), os picos na região 2 são de ácido cis,cis-mucônico, os picos da região 3 são de catecol, os picos na região 4 são de ácido antranílico, os picos na região 5 são de tolueno e os picos na região 6 são oriundos da célula (seção IV.2.4).

O pico presente na Figura IV.13 (a e b) no tempo de retenção de aproximadamente 7,9 minutos (pico número 1) foi encontrado em todos os experimentos apresentando baixa (ou nenhuma) variação, sendo encontrado também nos testes branco (sem células) e controle (sem carbazol). Este pico é referente ao surfactante tween 20 adicionado ao teste de degradação para facilitar o contato entre o substrato (carbazol) presente no óleo e a célula presente na fase aquosa, através do aumento da superfície de contato entre o carbazol e o biocatalisador. Esta hipótese foi confirmada através da injeção direta do surfactante em meio aquoso no equipamento de cromatografia líquida, sendo possível visualizar a presença de um pico na região do tempo de retenção de 7,9 minutos.

A Figura IV.14 ilustra a redução da intensidade do pico da fração de carbazol que se encontrou estabilizada no meio aquoso pelo surfactante, repetindo o comportamento encontrado na fase orgânica. Isto demonstra que o microrganismo realmente possui os genes que expressam as enzimas utilizadas na degradação do carbazol, sendo capaz de remover o nitrogênio desta molécula. É ainda possível afirmar, observando as Figuras IV.13.b e IV.14, que a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 transforma o carbazol em ácido antranílico e que esta utiliza este último composto em seu catabolismo, removendo o nitrogênio e convertendo-o em catecol (picos 4 e 3, respectivamente), isto tudo catalisado pela enzima antranilato 1,2-dioxigenase (AntABC). Em seguida, o catecol gerado sofre uma reação de *orto*-clivagem (intradiol dioxigenase) formando ácido *cis,cis*-mucônico (picos 3 e 2, respectivamente).

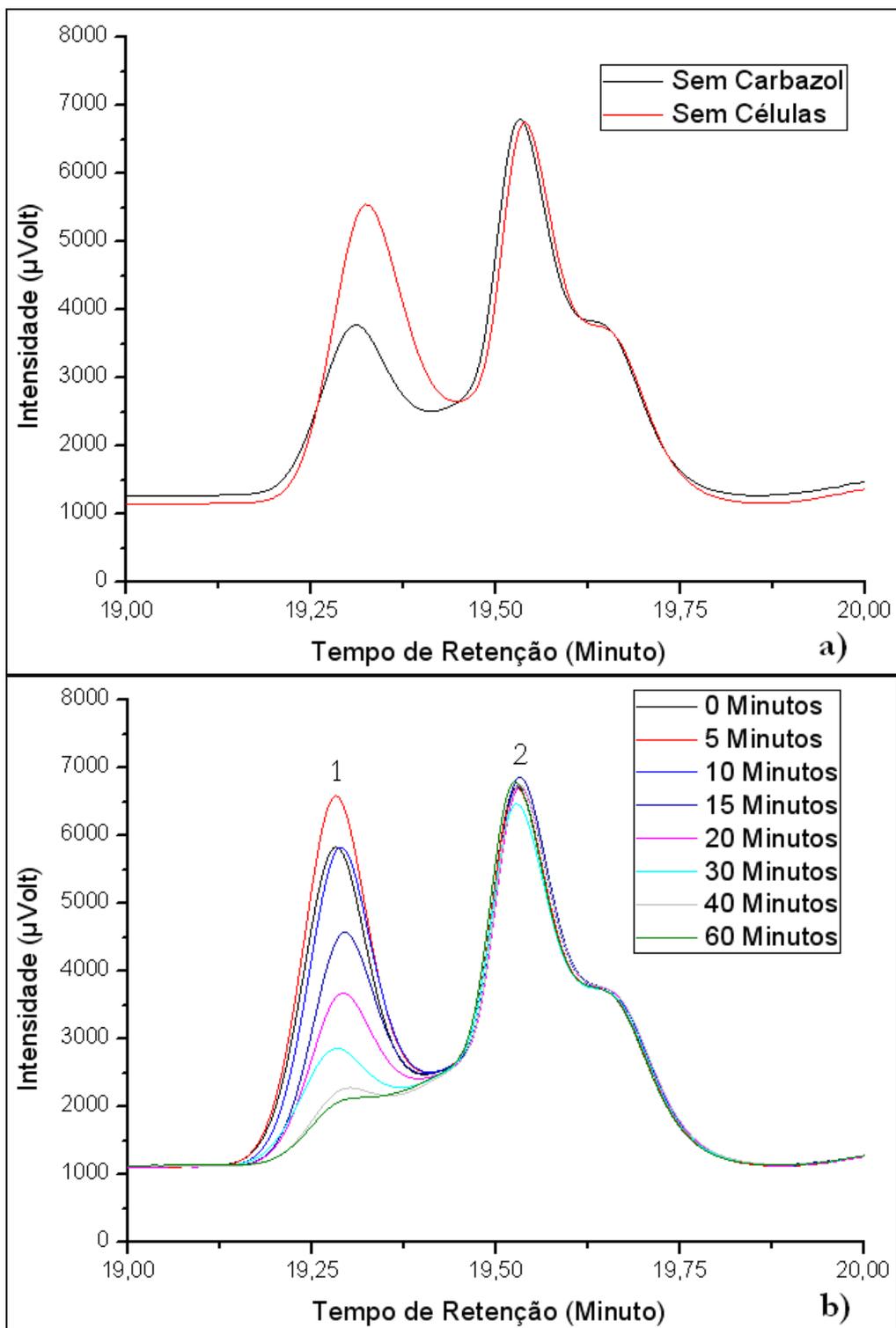


Figura IV.14: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do carbazol. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem carbazol (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do carbazol e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. Os picos na região 1 são de carbazol e os picos na região 2 são oriundos do meio do teste.

Com a análise cromatográfica, pôde-se determinar também o comportamento, em função do tempo de reação do experimento, de cada composto da rota metabólica detectado no teste de degradação do carbazol (Figuras IV.12, IV.13, IV.14 e IV.15),

verificando que composto é gerado e/ou consumido no intervalo de tempo da reação. Estes resultados auxiliaram no entendimento do mecanismo de degradação do carbazol no sistema bifásico para a cepa GTIN11, identificado que a etapa lenta deste processo é o transporte do substrato carbazol do óleo para a água, vista a baixa concentração de carbazol encontrada na fase aquosa, limitando a conversão deste em ácido cis,cis-mucônico.

Em relação ao comportamento do carbazol (Figura IV.15) adicionado inicialmente na fase orgânica do teste de biodegradação, nota-se que, mesmo sendo somente acrescido no óleo, é possível encontrá-lo também na fase aquosa (ponto 0 minuto), mas em pequenas concentrações. Isto significa que esta substância, com auxílio de um surfactante, consegue se manter em água (pequena solubilidade), facilitando o acesso da bactéria para o consumo do carbazol através do aumento da superfície de contato entre a célula e a molécula (CARNEIRO *et al.*, 2007).

Embora os gráficos da Figura IV.15 ilustrem valores diferentes de estabilização da concentração nos minutos finais do teste, é possível observar que ambos (primeiro e segundo teste de degradação do carbazol) apresentaram baixos intervalos de concentrações no decorrer do teste (entre 0 e $2,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), aumento da concentração do meio nos 5 minutos iniciais do teste de degradação e posterior decréscimo. Isto comprova que há um mecanismo de transporte do carbazol, auxiliado pelo surfactante, em direção a água (transferência de massa entre as fases do sistema) e depois para o interior da célula, facilitando o contato do mesmo com a bactéria.

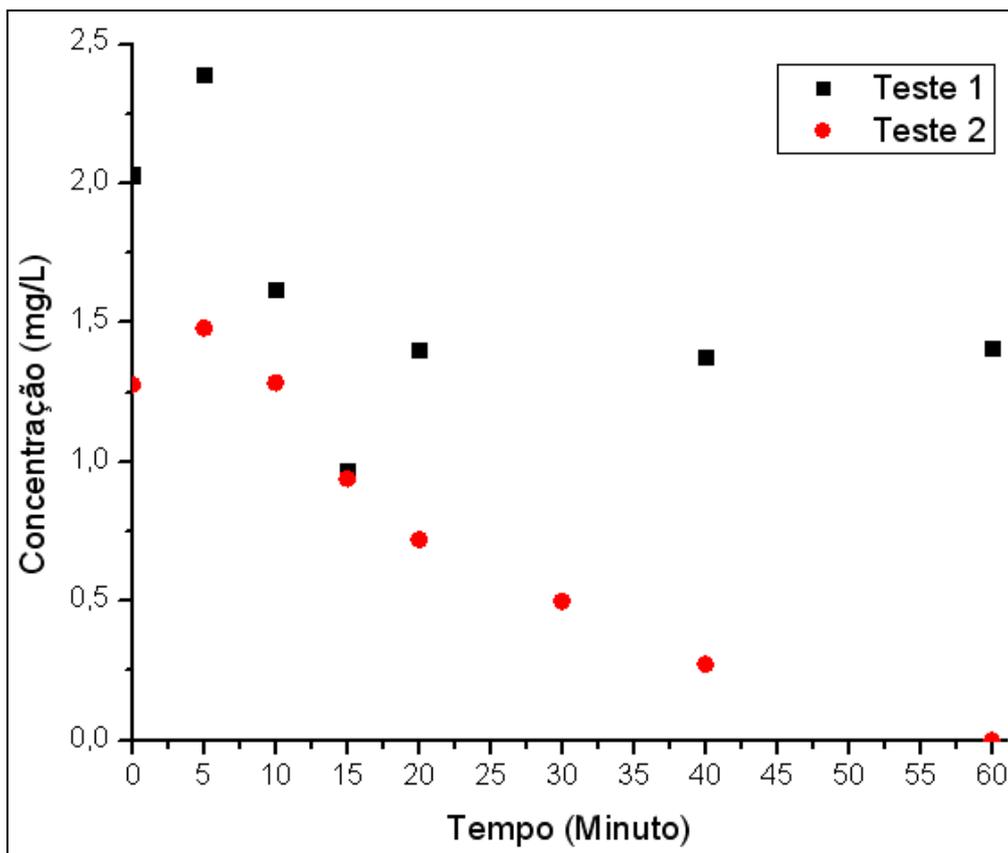


Figura IV.15: Gráficos do perfil de concentração do carbazol na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).

De acordo com o que está ilustrado nos gráficos da Figura IV.16, o ácido antranílico produzido apresentou comportamento bastante similar entre os testes realizados, havendo acúmulo deste composto com geração deste composto nos primeiros 10-20 minutos de reação até atingir aproximadamente $45-55 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e seu posterior consumo, com igual velocidade de acúmulo, estabilizando logo após atingir uma faixa de concentração entre 5 e $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os gráficos da Figura IV.17 ilustram que o catecol produzido se comportou da mesma maneira nos experimentos realizados nesta dissertação, apresentando um aumento linear da concentração até aproximadamente 20 minutos de reação, com subsequente desaceleração e posterior decréscimo nos últimos 20 minutos do teste.

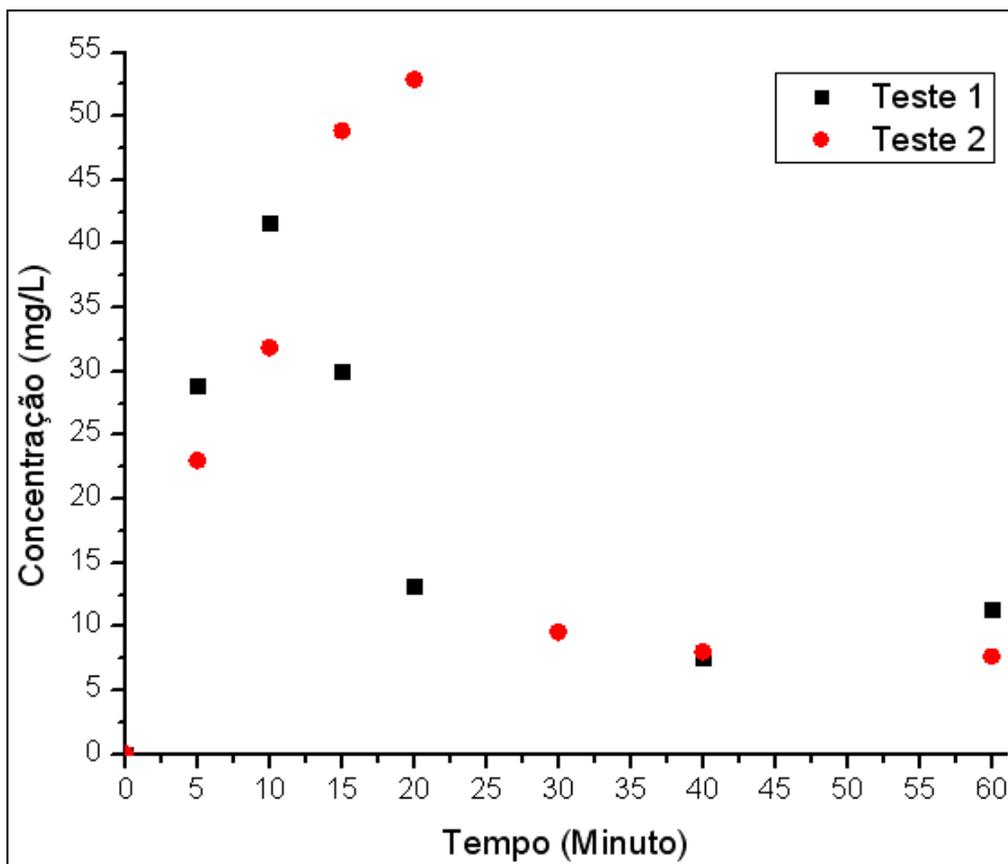


Figura IV.16: Gráfico do perfil de concentração do ácido antranílico na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).

O ácido *cis,cis*-mucônico produzido no experimento de degradação do carbazol e explanado na Figura IV.18 tem sua concentração aumentada no meio aquoso durante todo o tempo de realização do teste, demonstrando um crescimento linear mais acentuado nos primeiros 10-20 minutos de reação, desacelerando a sua formação após 10-20 minutos de reação, mantendo-se em um ligeiro aumento (tendendo a um valor constante) até o final do experimento. Isto pode significar que no teste de *resting cells* a cepa GTIN11 só é capaz de degradar a molécula de carbazol até a formação de ácido *cis,cis*-mucônico, visto que não foi possível detectar o surgimento ou a variação de nenhum pico nesta análise.

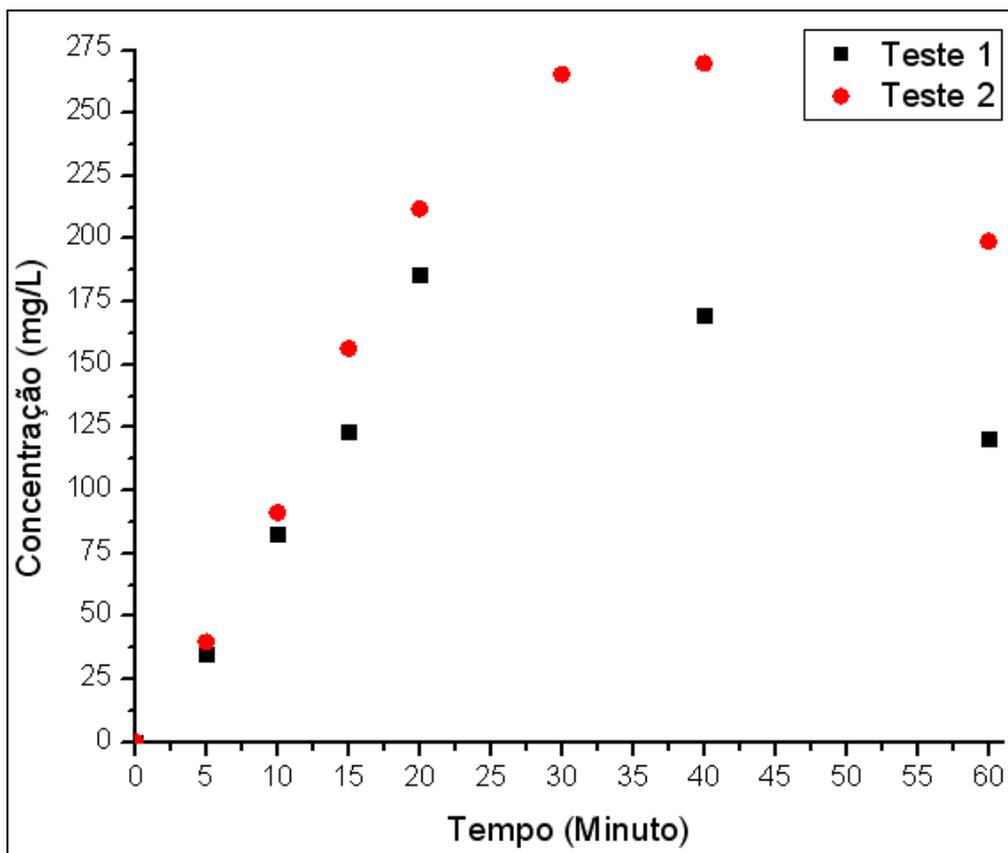


Figura IV.17: Gráfico do perfil de concentração do catecol na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).

A leve diferença na concentração e no comportamento de alguns dos metabólitos gerados na rota de degradação apresentada nas Figuras IV.15, IV.16, IV.17 e IV.18 pode ser explicada devido a variações da atividade enzimática no interior das células da bactéria entre os testes, visto que os mesmos são realizados com inóculos bacterianos distintos pois são realizados em diferentes dias.

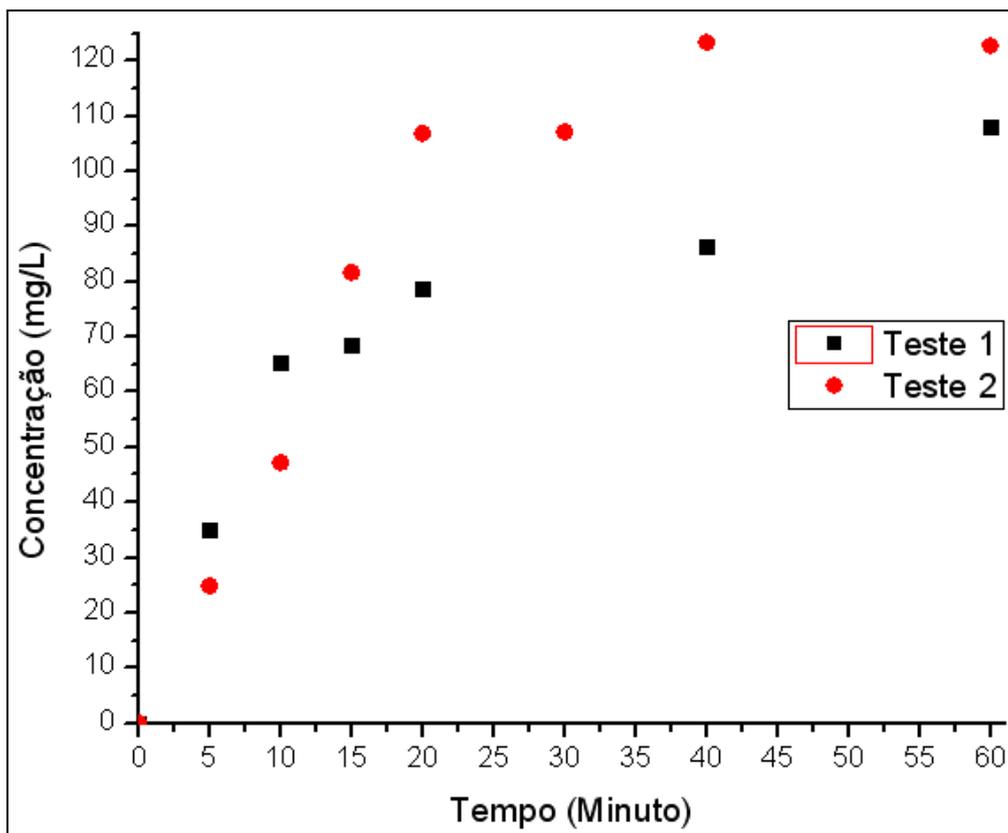


Figura IV.18: Gráfico do perfil de concentração do ácido cis,cis-mucônico na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação. Os pontos em preto correspondem aos resultados obtidos no teste 1 e os pontos em vermelho correspondem aos resultados obtidos no teste 2 (réplica).

Com os resultados do experimento de biodegradação obtidos em HPLC até o momento, notou-se que na degradação do carbazol utilizando a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 ocorre a transferência da molécula nitrogenada para a fase aquosa (por difusão e/ou transporte facilitado realizado pela célula) e que os compostos produzidos pela bactéria, ácido antranílico, catecol e ácido cis,cis,mucônico (esquema da rota apresentado na Figura IV.19), e detectados na cromatografia estão diretamente ligados entre si, possuindo quase que concomitantemente os mesmos comportamentos, diferindo somente no ponto máximo de concentração atingido. Já os compostos 2'-amino bifenil-2,3-diol e HOADA, descritos na literatura como metabólitos intermediários na conversão do carbazol em ácido antranílico (LARENTIS, 2005), não foram detectados nesta análise (taxa de reação muito alta), sendo necessária a realização de experimentos de degradação partindo destas moléculas ou redução do tempo de análise para a confirmação de que a rota de degradação do carbazol exercida pela cepa GTIN11 percorre caminho igual ao da *Pseudomonas stutzeri*. Foi possível ainda observar que a taxa de degradação do carbazol apresentada pela cepa GTIN11 foi 4,87 vezes maior no meio bifásico (38,92 μ moles de carbazol por minuto por grama de célula

seca) que no meio monofásico (somente com a fase aquosa) exposto por KILBANE II *et al.* (2002) (seção II.2).

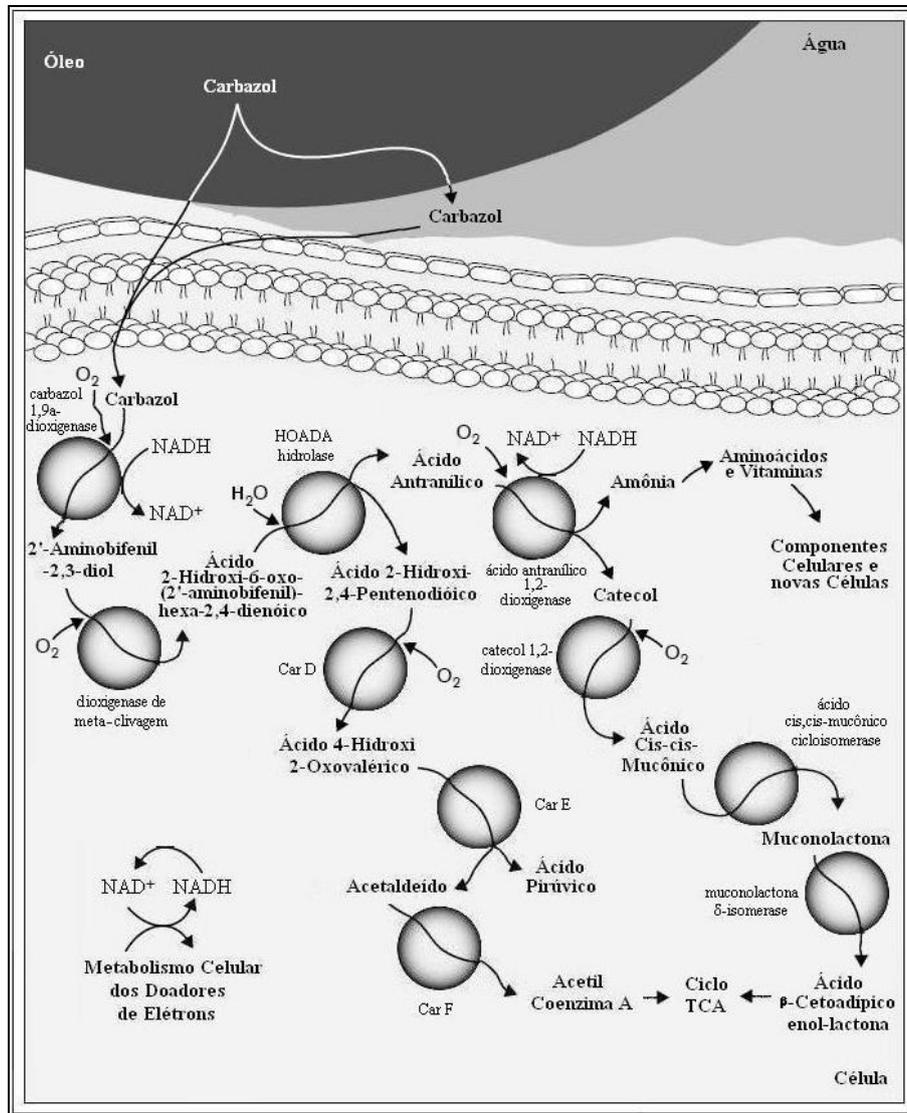


Figura IV. 19: Esquema do mecanismo de degradação do carbazol no interior da célula (adaptado de MONTICELLO, 2000).

IV.2.2.2 – Biodegradação do 2,3-Dihidroxi Bifenil e 2-Amino Bifenil

Para saber se a rota de desnitração do carbazol empregando bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 passa pelo metabólito intermediário 2'-amino bifenil-2,3-diol que é encontrado na rota do microrganismo base, optou-se por executar o teste de *resting cells* partindo das moléculas similares 2,3-dihidroxi bifenil e 2-amino bifenil, observando o comportamento da bactéria escolhida para este trabalho no tempo de

reação (em relação a estes compostos), se a mesma é capaz de expressar as enzimas dioxigenase de *meta*-clivagem e HOADA hidrolase (biocatalisadores de duas etapas na rota da *Pseudomonas stutzeri*) e qual o local de atuação da enzima expressa pela cepa na(s) molécula(s) análoga ao 2'-amino bifenil-2,3-diol.

Análise da Fase Aquosa da Biodegradação do 2-Amino bifenil e 2,3-Dihidroxi bifenil

Analisando-se a fase aquosa deste teste, foi possível observar que a reação de degradação ocorreu somente no experimento referente à Figura IV.20, mostrando que a bactéria em questão é capaz de consumir a molécula de 2,3-dihidroxi bifenil, levando a níveis não detectáveis da mesma no meio em, aproximadamente, 5 minutos de reação (Figura IV.22.a). Estes dados confirmam o que já era esperado após a análise dos dados de degradação partindo da molécula de carbazol, explicando a impossibilidade na detecção do metabólito 2'-amino bifenil-2,3-diol devido a alta velocidade de reação apresentada por esta enzima na rota metabólica da *Sphingomonas sp.* GTIN11 (estado *quasi*-estacionário).

Em relação à molécula Ácido do 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)-hexa-2,4-dienóico (HOADA), metabólito subsequente ao 2'-amino bifenil-2,3-diol na rota de degradação do carbazol de acordo com dados obtidos na literatura para a bactéria *Pseudomonas stutzeri* (OUCHIYAMA, 1998; LARENTIS,2005), é possível afirmar que a rota realizada pelo microrganismo utilizado neste trabalho passa por esta molécula, visto os resultados obtidos no teste descrito nesta seção e que há formação de ácido antranílico no meio reacional (metabólito seguinte a esta molécula), mostrando que a *Sphingomonas sp.* GTIN11 é também capaz de expressar a enzima HOADA hidrolase e que a mesma também apresenta alta velocidade de reação.

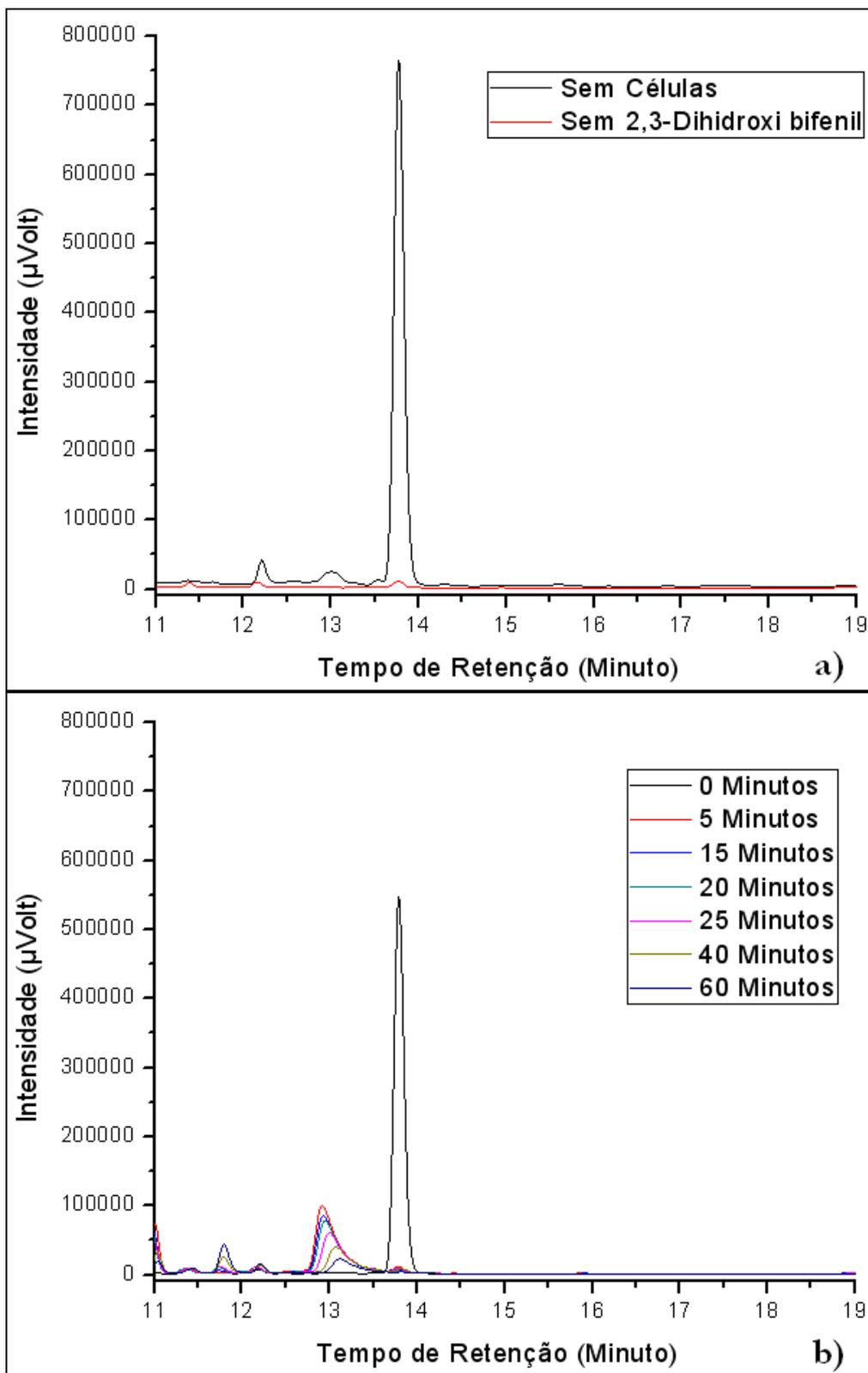


Figura IV.20: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem 2,3-dihidroxi bifenil (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. O pico na região de tempo de retenção 13,80 minutos é de 2,3-dihidroxi bifenil. Os demais picos não são de interesse neste teste.

Já em relação ao teste reacional partindo da molécula de 2-amino bifenil, é possível observar nos dados apresentados nas Figuras IV.21 e IV.22.b que não houve consumo da mesma, demonstrando assim que a reação enzimática nesta etapa somente ocorre no anel aromático da molécula de 2'-amino bifenil-2,3-diol onde estão ligados os grupamentos hidroxilas. Isto é mais um indício de que a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 possui em seu DNA genômico os genes *carBaBb* e *car C*, e que é capaz de expressar as enzimas dioxigenase de *meta*-clivagem e HOADA hidrolase que são responsáveis pela sequência da rota de degradação do carbazol (uma forma de confirmação são as técnicas de biologia molecular).

A Figura IV.22, que mostra o comportamento da concentração dos compostos utilizados nesta seção em relação ao tempo de reação, auxiliou na compreensão das referentes etapas na rota de degradação para a geração do modelo matemático representativo do fenômeno analisado nesta dissertação de mestrado e estimação dos parâmetros cinéticos. A alta concentração dos compostos 2,3-dihidroxi bifenil e 2-amino bifenil encontrada na fase aquosa é, provavelmente, por causa da presença do surfactante no meio, demonstrando que há uma melhor estabilização destas moléculas frente ao carbazol (mesmo apresentando dois anéis benzênicos em suas estruturas).

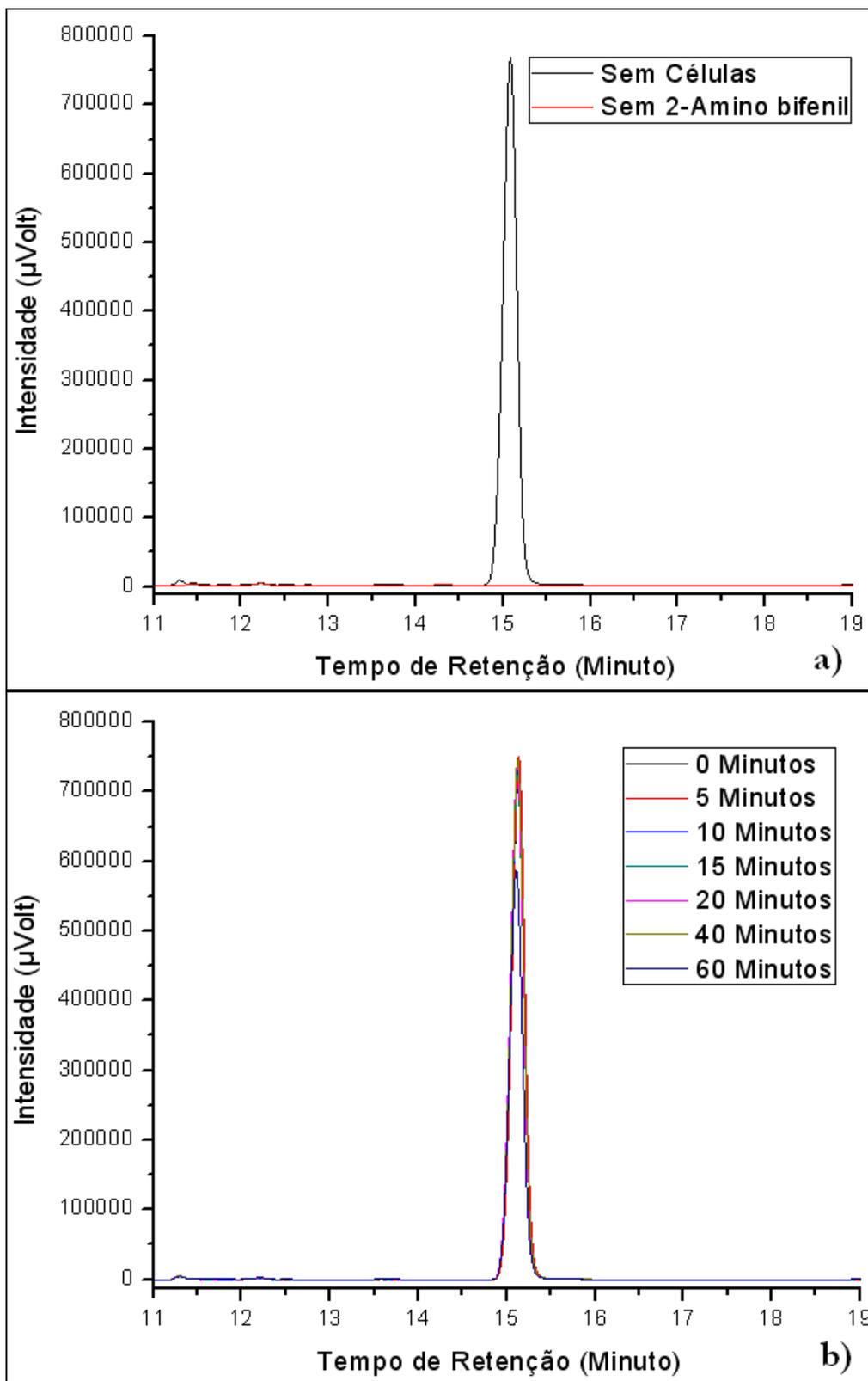


Figura IV.21: Cromatogramas da fase aquosa do teste de degradação do 2-amino bipenil. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem 2'-amino bipenil (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do 2'-amino bipenil e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. Os picos na região de tempo de retenção 14,85 minutos são de 2-amino bipenil.

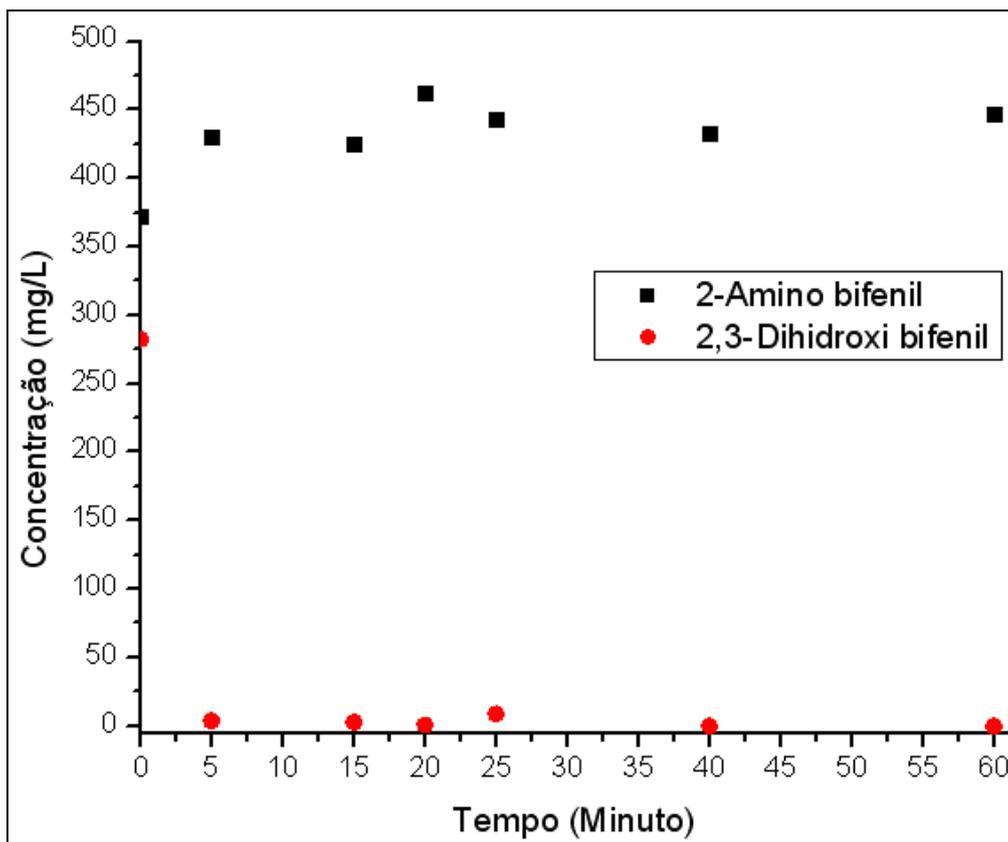


Figura IV.22: Gráfico do perfil de concentração do 2,3-dihidroxi bifenil e do 2-amino bifenil na fase aquosa do teste de degradação em função do tempo de reação.

Análise da Fase Orgânica da Biodegradação do 2-Amino bifenil e 2,3-Dihidroxi bifenil

A análise da fase orgânica (Figura IV.23) possibilitou somente a detecção do pico correspondente ao composto 2,3-dihidroxi bifenil, que apresentou concentração mais baixa em relação a este mesmo composto presente na fase aquosa. Sabe-se que esta molécula apresenta alta insolubilidade em meio aquoso, contrariando o resultado obtido neste teste. Este fenômeno também pode ser explicado (já comentado no parágrafo anterior) devido à presença do surfactante tween 20 no meio aquoso, que estabilizaria este composto no meio onde a cepa está presente e sendo auxiliado pela presença de dois grupamentos hidroxila nesta molécula, conferindo-a alguma polaridade.

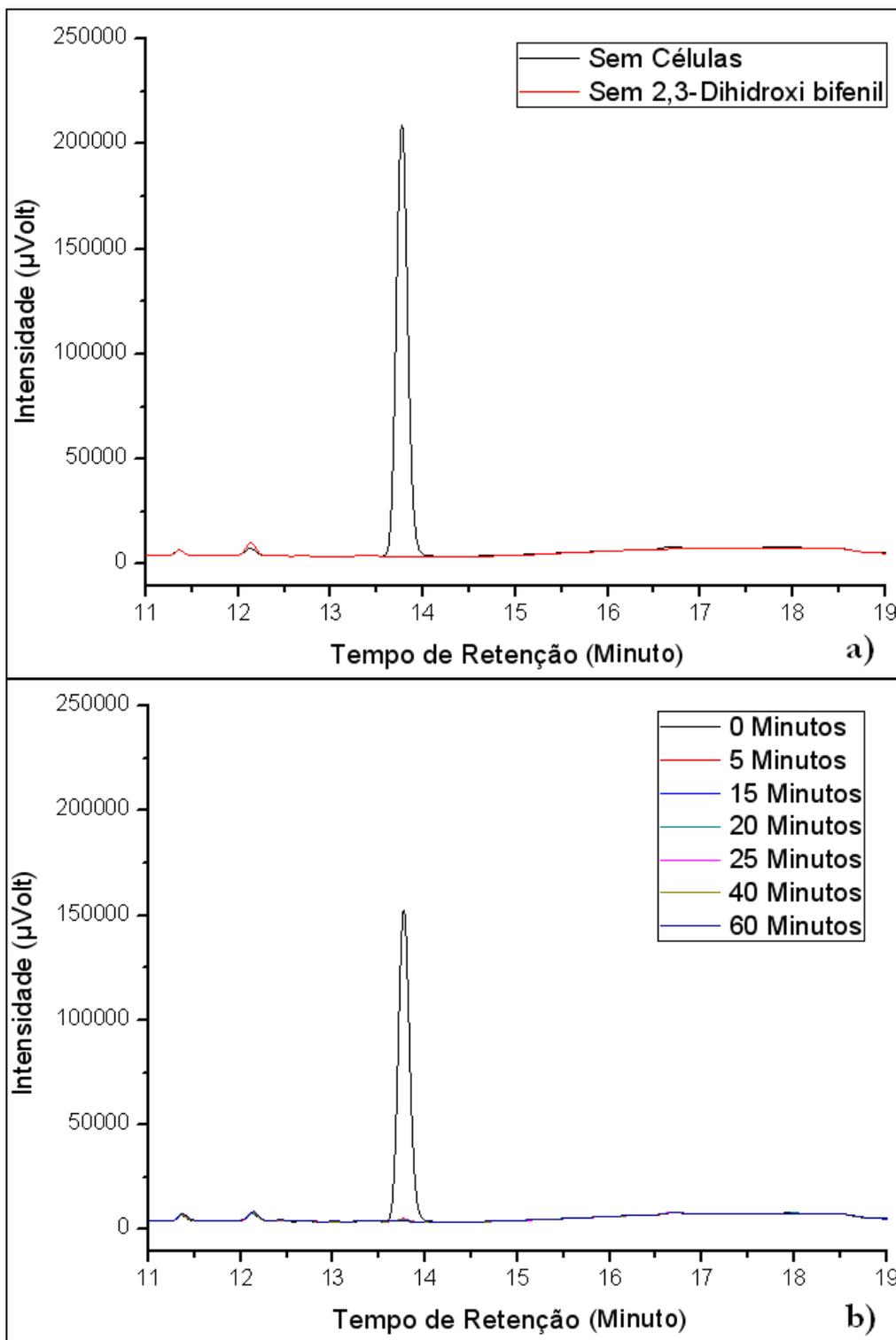


Figura IV.23: Cromatogramas da fase orgânica do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil. Em a) estão, respectivamente, os dados obtidos para as amostras sem 2,3-dihidroxi bifenil (controle) e sem células (branco) do teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil e em b) estão os dados obtidos para as amostras da cinética de degradação finalizadas em tempos de reação diferentes. O pico na região de tempo de retenção 13,80 minutos é de 2,3-dihidroxi bifenil.

Em ambas as fases do teste o 2,3-dihidroxi bifenil apresentou o mesmo comportamento, exibindo uma redução da concentração extremamente rápida, quando

comparado com os demais compostos da rota (reduzindo de 155 a quase 0 mg*L⁻¹ em aproximadamente 5 minutos na fase orgânica) (Figura IV.24). O baixo valor de concentração encontrado na fase orgânica do teste (155 mg*L⁻¹) frente ao adicionado inicialmente (400 mg*L⁻¹), devido à transferência de massa do composto para a fase aquosa, aos efeitos de estabilização oriundos do surfactante presente na água e a alta velocidade reacional da enzima dioxigenase de *meta*-clivagem no interior da célula.

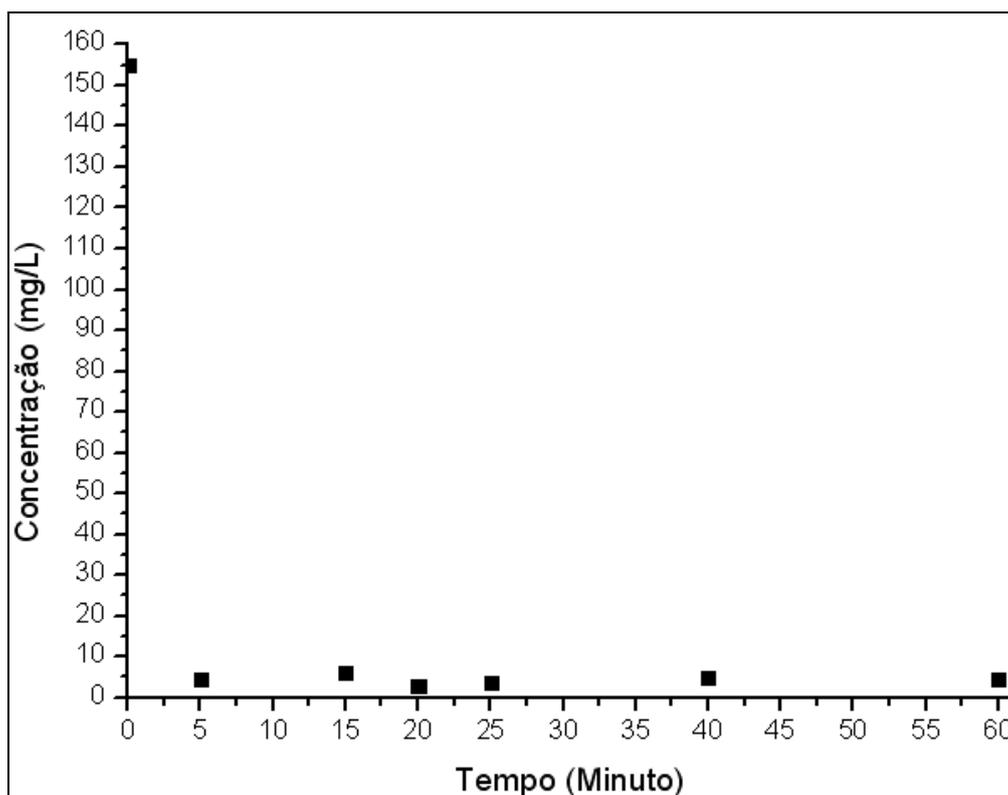


Figura IV.24: Gráfico do perfil de concentração do 2,3-dihidroxi bifenil na fase orgânica do teste de degradação em função do tempo de reação.

Os resultados dos testes de degradação dos compostos 2-amino bifenil e 2,3-dihidroxi bifenil possibilitaram a afirmação da capacidade de degradação de pelo menos um dos substratos pelo biocatalisador, da existência de uma enzima na bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11, a CarB (dioxigenase de *meta*-clivagem), participante da rota de degradação do carbazol e de que esta enzima atua degradando o anel hidroxilado na molécula de 2'-amino bifenil-2,3-diol, possivelmente na posição *meta* (extradiol). Além disto, por analogia, pode-se afirmar também que a cepa GTIN11 expressa a enzima CarC (hidrolase) para a degradação do ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino bifenil)-hexa-2,4,dienóico (HOADA), visto que a bactéria é capaz de degradar o carbazol em ácido antranílico passando pelo composto 2'-amino bifenil-2,3-diol. Outra

afirmação que pode ser feita através dos resultados obtidos até o momento nesta seção é a existência da enzima de dioxigenação angular (carbazol 1,9a-dioxigenase) na cepa GTIN11.

IV.2.3 – Análise de Amônia/Amônio

De acordo com dados da literatura (KIRIMURA *et al.*, 1999; CARNEIRO *et al.*, 2007), o nitrogênio removido por microrganismos da molécula de carbazol é transformado em amônia/amônio e em seguida utilizado na produção de proteínas e aminoácidos. Por este motivo, este experimento teve por objetivo descobrir se no teste de degradação do carbazol (*resting cells*) há realmente a liberação do nitrogênio na forma $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ para confirmar a remoção do heteroátomo no meio reacional e quantificá-lo (curva de calibração da amônia/amônio é encontrada no Anexo 3 desta dissertação de mestrado).

O método fenol-hipoclorito (FAWCET e SCOTT, 1960; WEATHERBURN, 1967) foi utilizado para a confirmação da hipótese de formação de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, visto que houve um indício desta formação devido a elevação do pH do meio reacional com o decorrer do tempo de reação (o pH do meio tamponado em 7,0 com tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ se elevou a aproximadamente 9,0 no intervalo de 60 minutos de reação). Na Figura IV.25 estão expostos os resultados obtidos pelo método fenol-hipoclorito, sendo possível observar o perfil de concentração do nitrogênio no decorrer do teste.

Observa-se na Figura IV.25 que na reação em questão há a liberação do nitrogênio na forma de amônia/amônio e que esta liberação ocorre de maneira crescente no tempo, atingindo a concentração máxima de $93,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. O erro médio apresentado pelo método foi de 4,82%, demonstrando a confiabilidade do mesmo para a análise realizada nesta seção.

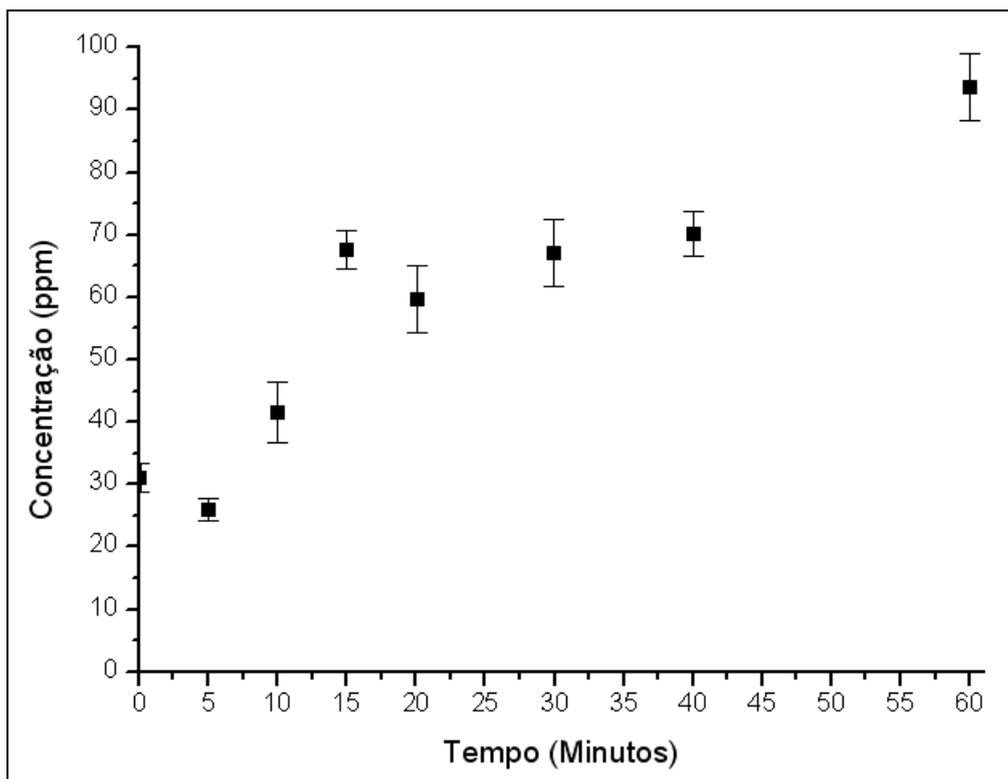


Figura IV.25: Gráfico do perfil de concentração da amônia/amônio na fase aquosa do teste de degradação do carbazol em função do tempo de reação, com o erro experimental referente a cada ponto.

IV.2.4 – Análise de Degradação do Óleo Sintético

Para eliminar dúvidas que surgiram no decorrer deste trabalho, foram realizados testes de *resting cells* sem a presença de carbazol, 2,3-dihidroxi bifenil e 2-amino bifenil (somente tampão fosfato com surfactante, óleo sintético e células) para verificar se a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 também seria capaz de metabolizar o tolueno constituinte do óleo sintético (que simula o óleo tratado em refinarias). Levantou-se esta hipótese devido ao aparecimento desta molécula na fase aquosa, com a presença de um pico, em aproximadamente 10,15 minutos de reação, e a baixa variação deste pico no meio aquoso.

As Figuras IV.26 e IV.27 expõem o aparecimento do pico de tolueno no tempo de retenção de aproximadamente 10,15 minutos em ambas as fases analisadas. Isto também é explicado pela presença do surfactante tween 20 no meio aquoso, facilitando e estabilizando a molécula de tolueno na água (mesmo motivo já descrito nas seções IV.2.2.1 e IV.2.2.2). Além disto, pode-se notar que não há variação da concentração de tolueno em ambos os meios, podendo afirmar que esta molécula não foi degradada pelo

microrganismo. Outra observação a ser feita é que o pico em meio aquoso (Figura IV.26) no tempo de retenção de 10,6 minutos não tem relação com o tolueno e possivelmente também não tem com a rota de degradação do carbazol, mesmo que este pico esteja apresentando variação em função do tempo, pois aparentemente este pico advém do metabolismo celular por estar presente somente na fase aquosa e por estar também presente no teste de degradação do carbazol. Não foi possível identificar através desta análise a qual composto este pico pertence, havendo a necessidade de utilização de outras técnicas (seção IV.2.5).

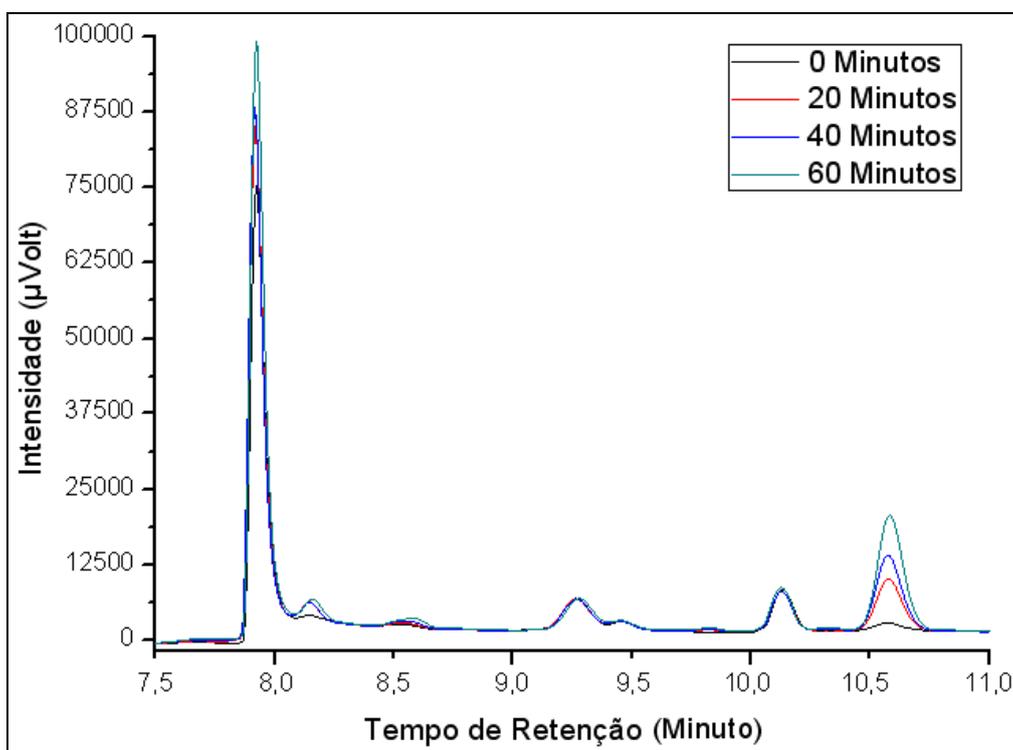


Figura IV.26: Cromatograma da fase aquosa do teste de degradação do tolueno. O pico na região do tempo de retenção de aproximadamente 10,15 minutos é referente ao tolueno.

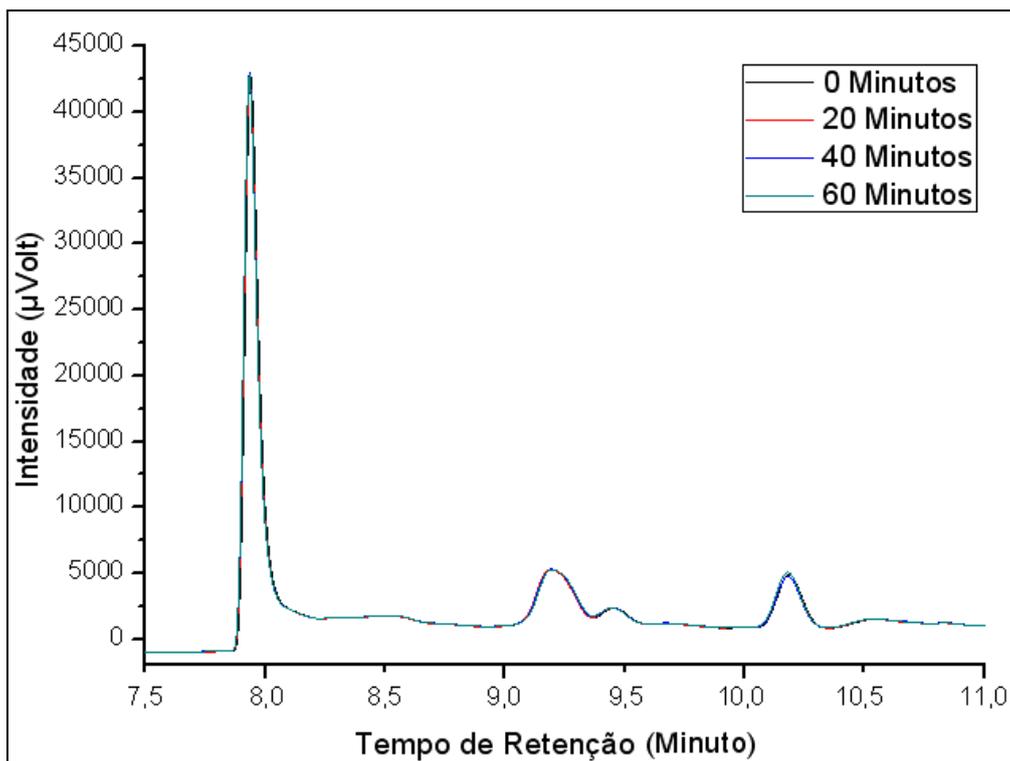


Figura IV.27: Cromatograma da fase orgânica do teste de degradação do tolueno. O pico na região do tempo de retenção de aproximadamente 10,15 minutos é referente ao tolueno.

IV.2.5 – Análise de Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massas Acoplado (GC/MS)

Para a confirmação dos compostos referentes aos picos dos experimentos de biodesnitração obtidos na cromatografia líquida e eventual determinação dos compostos referentes aos picos que não havia padrão para comparação, optou-se por utilizar o aparelho de espectroscopia de massas como mais uma ferramenta de identificação das moléculas da rota de degradação do carbazol. Para isto, fez-se esta análise em cromatógrafo gasoso acoplado com um espectrômetro de massas seguindo a programação descrita na seção III.2.2 e obtendo o cromatograma ilustrado na Figura IV.28.

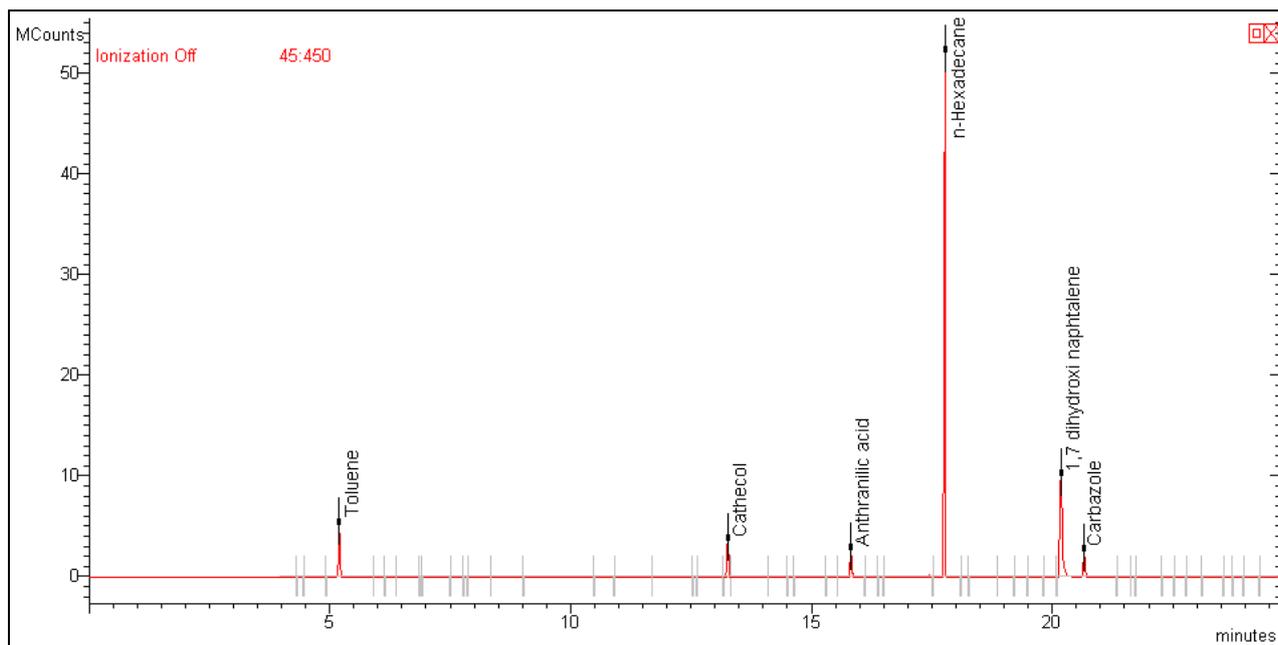


Figura IV.28: Cromatograma, obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas, da amostra gerada na biodesnitrogenação do carbazol pela cepa GTIN11 de *Sphingomonas sp.*

Analisando a Figura IV.28 é possível perceber a presença dos compostos carbazol, ácido antranílico e catecol, referentes ao teste de biodegradação, além do 1,7-dihidroxi naftaleno (padrão interno), n-hexadecano e tolueno, referentes ao óleo. O ácido cis,cis-mucônico, encontrado na análise de cromatografia líquida, não foi detectado devido a limitações do equipamento (possivelmente acontecendo o mesmo com os demais picos encontrados na cromatografia líquida, como por exemplo o pico no tempo de retenção de 10,6 minutos da Figura IV.26).

As Figuras IV.29, IV.30, IV.31, IV.32 e IV.33, ilustram a comparação dos espectros dos compostos encontrados na análise de GC/MS. As comparações dos compostos carbazol, ácido antranílico, catecol, 1,7-dihidroxi naftaleno e tolueno, com os padrões existentes na biblioteca de espectros do equipamento apresentaram, respectivamente, 97%, 85%, 79%, 97% e 97% de similaridade, confirmando a formação de ácido antranílico e catecol na rota de biodesnitrogenação do carbazol. O espectro do n-hexadecano não foi acrescido como resultado desta análise, pois esta molécula não constava na biblioteca de espectros do equipamento. Dentre as possibilidades de estruturas fornecidas pelo espectrômetro de massas para o pico de n-hexadecano, somente constavam moléculas de compostos alcanos com longas cadeias, possibilitando a dedução que o pico é realmente referente a esta molécula (único composto alcano acrescido no teste).

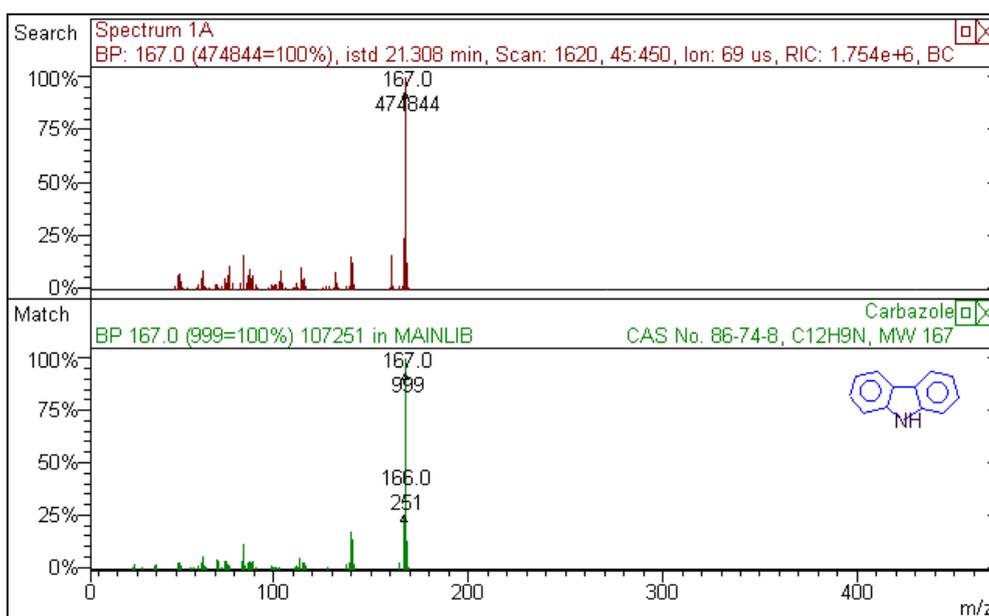


Figura IV.29: Espectro de massas para a comparação do pico de carbazol obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 97% de similaridade.

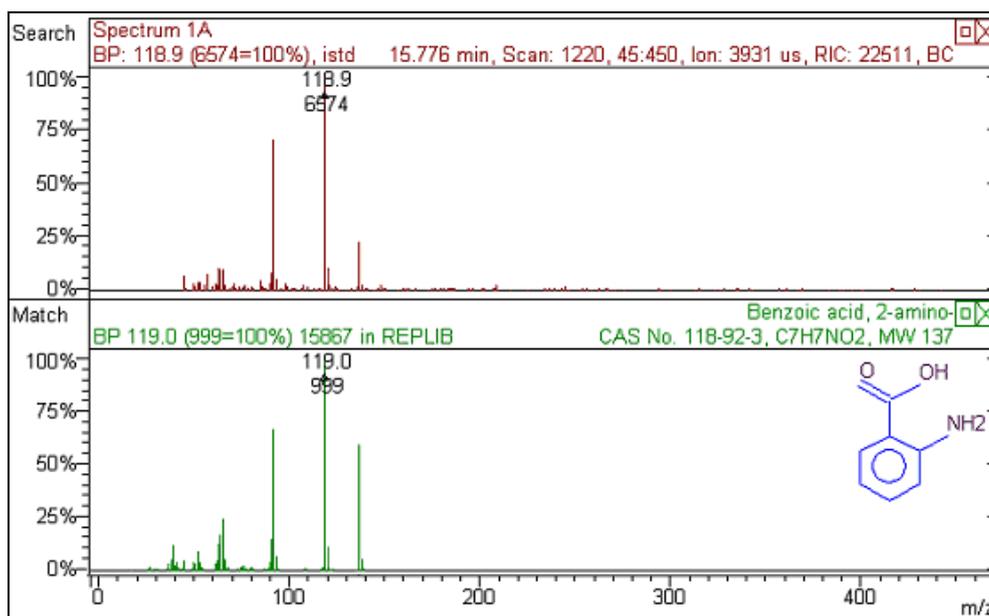


Figura IV.30: Espectro de massas para a comparação do pico de ácido antranílico obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 85% de similaridade.

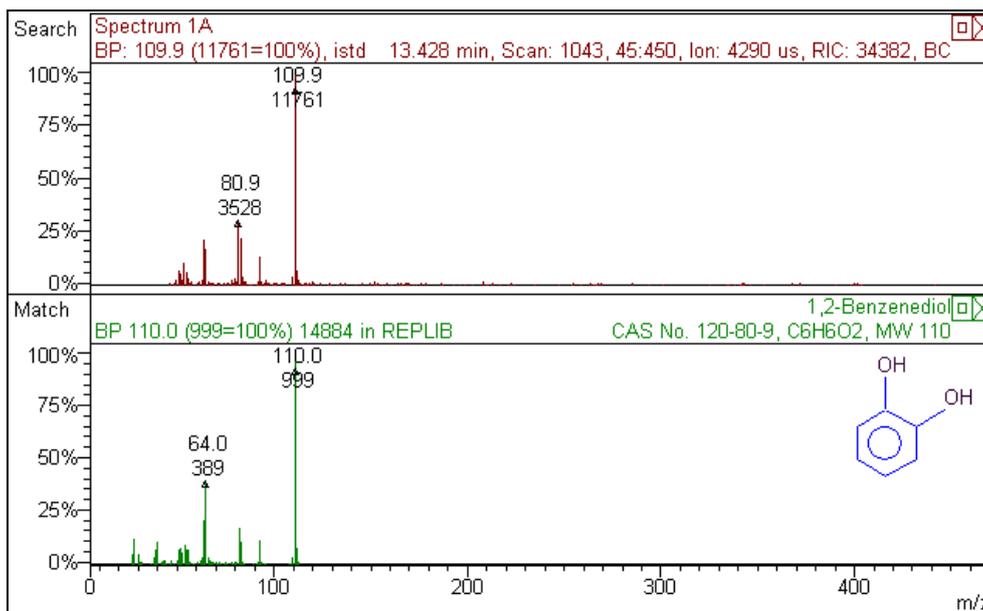


Figura IV.31: Espectro de massas para a comparação do pico de catecol obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 79% de similaridade.

Com os resultados obtidos nesta análise, pôde-se confirmar que a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 realmente é capaz de converter o carbazol em ácido antranílico e posteriormente em catecol. Com isto, pode-se afirmar que a cepa utilizada no teste de degradação do carbazol é capaz de expressar a enzima antranilato 1,2-dioxigenase (AntABC).

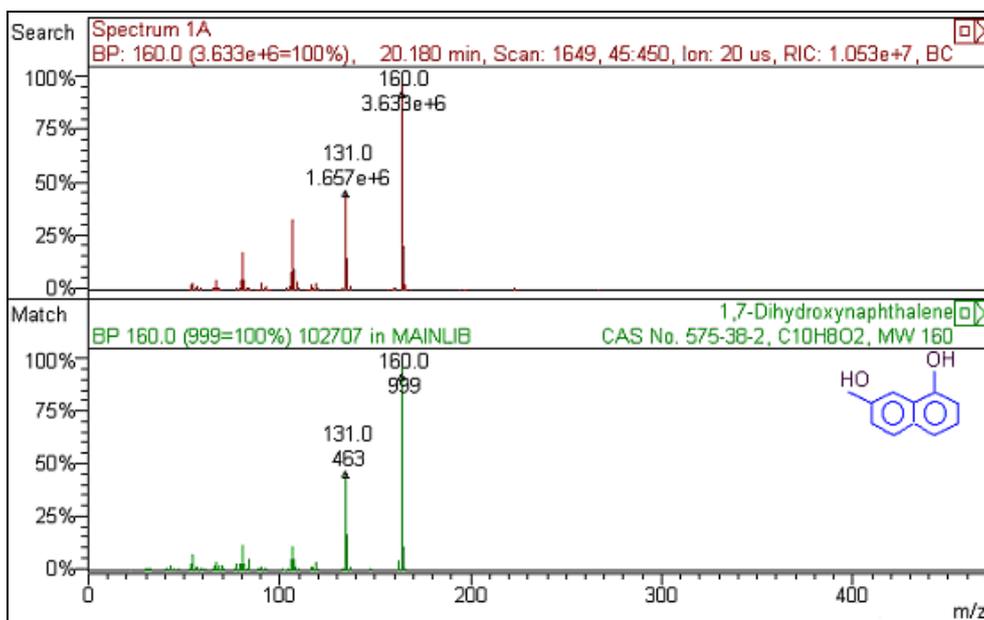


Figura IV.32: Espectro de massas para a comparação do pico de 1,7-dihidroxi naftaleno (padrão interno) obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 97% de similaridade.

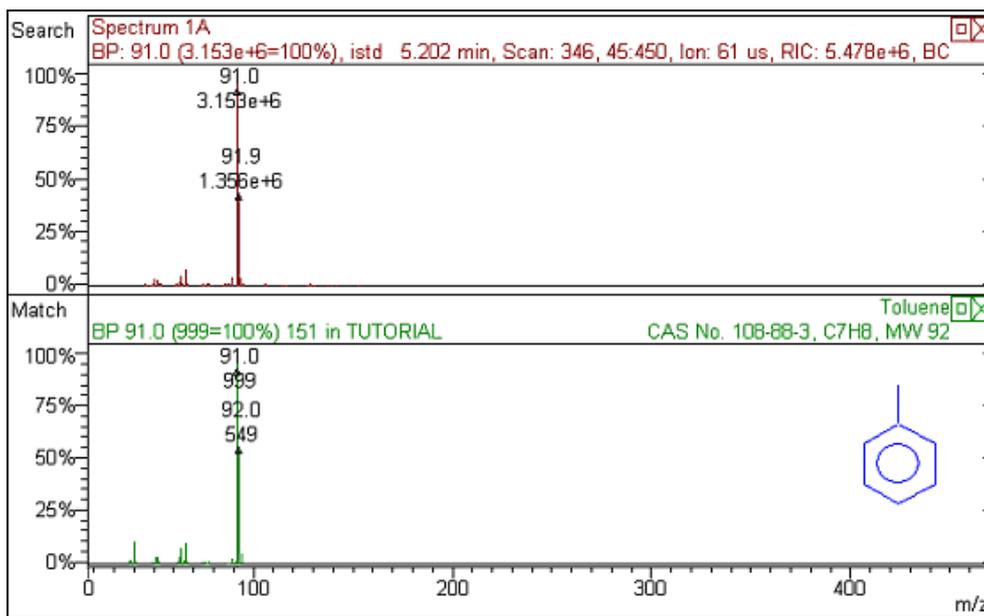


Figura IV.33: Espectro de massas para a comparação do pico de tolueno obtido na amostra com o padrão. Esta comparação apresentou 97% de similaridade.

IV.3 – GERAÇÃO DE MODELO DO SISTEMA REACIONAL

Os dados apresentados nesta seção tiveram como objetivo representar, através de um modelo matemático, o consumo do composto orgânico nitrogenado de modo a obter parâmetros bioquímicos do processo utilizando a cepa *Sphingomonas sp.* GTIN11. Nesta fase, as equações diferenciais ordinárias (EDO's) representativas do sistema foram resolvidas pelo método de Runge-Kutta, fazendo-se uso do programa Maple[®] 12. Além disto, estimou-se os parâmetros dos modelos cinéticos gerados utilizando o programa Fortran[®] 11 (usando o método heurístico do Enxame de partículas associado ao método de Gauss-Newton) devido à complexidade do conjunto de EDO's geradas, valendo-se dos dados experimentais obtidos.

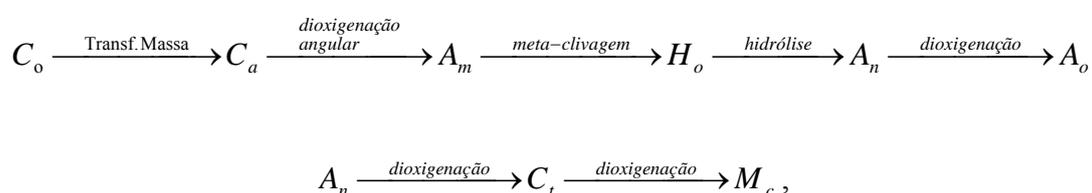
Neste processo a modelagem foi realizada considerando a transformação enzimática do carbazol em ácido cis,cis-mucônico. Considerou-se estado *quasi*-estacionário (reações muito rápidas) para a formação e consumo do ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienóico e demais compostos subsequentes desta parte da rota devido a eles não terem sido detectados nas análises cromatográficas. O mesmo pode ser considerado para os compostos 2'-amino bifenil-2,3-diol e ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)hexa-2,4-dienóico (estes foram modelados usando o 2,3-dihidroxi bifenil,

composto similar ao 2'-amino bifenil-2,3-diol, para a obtenção de valores experimentais).

Considerou-se também que o carbazol presente no óleo é transferido para a água respeitando o fenômeno de transferência de massa, auxiliado pela aeração do processo através da agitação. Outra consideração também feita foi que a transformação enzimática do carbazol em ácido cis,cis-mucônico ocorre a nível intracelular ou de membrana, assim, o carbazol extracelular é transportado para o interior da célula através da membrana celular e transformado enzimaticamente em ácido cis,cis-mucônico.

No crescimento celular o carbazol assimilado é transformado em ácido antranílico pela atuação das enzimas carbazol 1,9a-dioxigenase, dioxigenase de *meta*-clivagem e HOADA hidrolase, e que em seguida sofrerá atuação da enzima antranilato 1,2-dioxigenase que removerá o nitrogênio da molécula, utilizando-o na produção de proteínas e aminoácidos. Foi considerado também que a atuação desta última enzima gera uma molécula de catecol que irá ser atacada via *orto*-clivagem (intradiol) pela enzima catecol 1,2-dioxigenase (formação de ácido cis,cis-mucônico), seguindo na rota de degradação para servir de fonte de carbono para a célula (para a modelagem da degradação do carbazol em sistema bifásico com o teste de *resting cells* não será considerado o consumo do ácido cis,cis-mucônico, somente havendo acúmulo do mesmo).

A transformação enzimática do carbazol em ácido cis,cis-mucônico no teste de *resting cells* pode ser esquematizada da seguinte maneira (similar a Figura II.6):



sendo o carbazol representado por C_o no óleo e C_a na água, o 2'-amino bifenil-2,3-diol por A_m , o ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)hexa-2,4-dienóico por H_o , ácido antranílico por A_n , a amônia/amônio por A_o , o catecol por C_t e o ácido cis,cis-mucônico por M_c .

A primeira etapa deste esquema representa o transporte do carbazol do óleo para o interior da célula e as etapas subsequentes representam as reações enzimáticas de assimilação do carbazol sob a ação catalítica das enzimas de dioxigenação angular, dioxigenação de *meta*-clivagem, hidrólise, dioxigenação e de dioxigenação de *orto*-clivagem. Reputou-se na modelagem que esta reação é intracelular devido à necessidade da utilização de cofatores na dioxigenação angular do carbazol a 2'-amino bifenil-2,3-diol (primeira etapa da degradação do carbazol) e na dioxigenação do ácido antranílico a catecol, para que haja atividade enzimática nestas transformações (BUNDY *et al.*, 1998; NOJIRI *et al.*, 1999; NOJIRI *et al.*, 2001b; NOJIRI e OMORI, 2002b). Além disto, adotou-se que a concentração celular (x) no teste de degradação é constante, pois não há adição de nutrientes para o crescimento no decorrer do experimento (a vantagem de empregar a técnica de *resting cells*, em comparação com uso de enzimas *in vitro*, é que não há necessidade da adição de cofatores necessários à reação).

A seguir estão apresentadas as equações de balanço de massa geradas para o sistema de degradação do carbazol utilizando a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

Balanço de massa para a difusão do carbazol do óleo para o interior da célula.

$$\frac{dC_o(t)}{dt} = -k_{la} \cdot (C_o(t) - k_{eq} \cdot C_a(t)) \quad (IV.1)$$

Balanço de massa para o carbazol (no interior de célula)

$$\frac{dC_a(t)}{dt} = k_{la} \cdot (C_o(t) - k_{eq} \cdot C_a(t)) - \frac{k_1 \cdot C_a(t)}{k_{m1} + C_a(t)} \cdot x \quad (IV.2)$$

Balanço de massa para o 2'-amino bifenil-2,3-diol (no interior de célula)

$$\frac{dA_m(t)}{dt} = \frac{k_1 \cdot C_a(t)}{k_{m1} + C_a(t)} \cdot x - \frac{k_2 \cdot A_m(t)}{k_{m2} + A_m(t)} \cdot x \quad (IV.3)$$

Balanço de massa para o HOADA (no interior de célula)

$$\frac{dH_o(t)}{dt} = \frac{k_2 \cdot A_m(t)}{k_{m2} + A_m(t)} \cdot x - \frac{k_3 \cdot H_o(t)}{k_{m3} + H_o(t)} \cdot x \quad (\text{IV.4})$$

Balanço de massa para o ácido antranílico (no interior de célula)

$$\frac{dA_n(t)}{dt} = \frac{k_3 \cdot H_o(t)}{k_{m3} + H_o(t)} \cdot x - \frac{k_4 \cdot A_n(t)}{k_{m4} + A_n(t)} \cdot x \quad (\text{IV.5})$$

Balanço de massa para a amônia/amônio (no interior de célula)

$$\frac{dA_o(t)}{dt} = \frac{k_4 \cdot A_n(t)}{k_{m4} + A_n(t)} \cdot x \quad (\text{IV.6})$$

Balanço de massa para o catecol (no interior de célula)

$$\frac{dC_t(t)}{dt} = \frac{k_4 \cdot A_n(t)}{k_{m4} + A_n(t)} \cdot x - \frac{k_5 \cdot C_t(t)}{k_{m5} + C_t(t)} \cdot x \quad (\text{IV.7})$$

Balanço de massa para o ácido cis,cis-mucônico (no interior de célula).

$$\frac{dM_c(t)}{dt} = \frac{k_5 \cdot C_t(t)}{k_{m5} + C_t(t)} \cdot x - \frac{k_6 \cdot M_c(t)}{k_{m6} + M_c(t)} \cdot x \quad (\text{IV.8})$$

Como no teste de *resting cells* aparentemente só há formação do ácido cis,cis-mucônico durante o tempo de duração da reação (é extremamente baixa ou nula a atividade da enzima cis,cis-muconato cicloisomerase na degradação deste composto). Por isso, o 2º termo da equação pode ser aproximado para zero (2º termo da equação \ll 1º termo da equação ou é nulo).

$$\frac{dM_c(t)}{dt} = \frac{k_5 \cdot C_t(t)}{k_{m5} + C_t(t)} \cdot x \quad (\text{IV.9})$$

Nos modelos descritos pelas equações de IV.1 a IV.9, o parâmetro k_{la} representa a constante de transferência de massa do carbazol do óleo para o interior da célula (tempo^{-1}), k_{eq} a constante de equilíbrio do carbazol entre as fases óleo e água, x representa o valor constante da concentração enzimática no teste (diretamente proporcional a concentração celular em $\text{massa} \cdot \text{volume}^{-1}$) e k_i e k_{mi} ($i = 1, 2, \dots, 6$) os respectivos parâmetros do modelo de Michaelis-Menten ($\text{mol} \cdot \text{massa}^{-1} \cdot \text{tempo}^{-1}$ e $\text{mol} \cdot \text{volume}^{-1}$, respectivamente). Os termos positivos das equações representam o ganho do modelo e os termos negativos das equações representam a assimilação dos compostos pelas células (termo de consumo do modelo). Nas Tabelas IV.2 e IV.3 estão expostos, respectivamente, os valores dos parâmetros de transferência de massa k_{la} e do modelo de Michaelis-Menten k_i e k_{mi} ($i = 1, 2, \dots, 5$) determinados através do programa Fortran[®] 11, e a matriz de correlação entre os mesmos.

Tabela IV.2: Valores dos parâmetros estimados em Fortran[®] 11 utilizados na modelagem do processo considerando a transformação enzimática do carbazol em ácido cis,cis-mucônico (valores constantes: $k_{eq} = 240,7$ e $x = 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Parâmetros	Valores
$k_{la} [\text{min.}^{-1}]$	9,8673
$k_1 [\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min.})^{-1}]$	1,06264
$k_{m1} [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	0,315243
$k_2 [\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min.})^{-1}]$	0,502996
$k_{m2} [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	0,313198
$k_3 [\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min.})^{-1}]$	0,502996
$k_{m3} [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	0,313198
$k_4 [\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min.})^{-1}]$	0,171605
$k_{m4} [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	0,995191
$k_5 [\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min.})^{-1}]$	0,000132171
$k_{m5} [\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	0,0138187

Na Tabela IV.3, quanto mais próximo de 1 for o valor, mais correlacionados estão os parâmetros, sendo que os valores positivos de correlação significam que conforme o valor de um parâmetro aumenta o outro também irá aumentar (e vice-versa), e valores negativos de correlação significam de conforme o valor de um parâmetro aumenta o outro diminuirá (e vice-versa). Quando os valores estão altamente correlacionados, os

erros paramétricos dos modelos ficam maiores. No caso deste trabalho, esses erros apresentaram valores superiores a 25% (somente o k_{la} teve erro abaixo de 25% (1,08%).

Tabela IV.3: Matriz de correlação entre os parâmetros do modelo gerado para a transformação do carbazol em ácido cis,cis-mucônico utilizando a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

	k_{la}	k_1	k_{m1}	k_2	k_{m2}	k_3	k_{m3}	k_4	k_{m4}	k_5	k_{m5}
k_{la}	1,0000	0,1863	0,1863	0,0399	0,0399	0,0870	0,0874	-0,0015	-0,0015	0,0078	0,0079
k_1	0,1863	1,0000	1,0000	0,1537	0,1537	0,0712	0,0725	0,1434	0,1435	0,0267	0,0273
k_{m1}	0,1863	1,0000	1,0000	0,1537	0,1537	0,0712	0,0725	0,1434	0,1435	0,0267	0,0273
k_2	0,0399	0,1537	0,1537	1,0000	1,0000	-0,3023	-0,2993	-0,7643	-0,7643	0,2409	0,2400
k_{m2}	0,0399	0,1537	0,1537	1,0000	1,0000	-0,3023	-0,2993	-0,7643	-0,7642	0,2409	0,2400
k_3	0,0870	0,0712	0,0712	-0,3023	-0,3023	1,0000	1,0000	0,1197	0,1197	0,1025	0,0993
k_{m3}	0,0874	0,0725	0,0725	-0,2993	-0,2993	1,0000	1,0000	0,1171	0,1171	0,1036	0,1004
k_4	-0,0015	0,1434	0,1434	-0,7643	-0,7643	0,1197	0,1171	1,0000	1,0000	-0,2588	-0,2562
k_{m4}	-0,0015	0,1435	0,1435	-0,7643	-0,7642	0,1197	0,1171	1,0000	1,0000	-0,2588	-0,2562
k_5	0,0078	0,0267	0,0267	0,2409	0,2409	0,1025	0,1036	-0,2588	-0,2588	1,0000	0,9999
k_{m5}	0,0079	0,0273	0,0273	0,2400	0,2400	0,0993	0,1004	-0,2562	-0,2562	0,9999	1,0000

No Anexo 4 se encontra a listagem do programa utilizado na modelagem do processo, considerando a transferência de massa entre as fases do sistema e a transformação enzimática do carbazol em ácido cis,cis-mucônico no interior da célula.

As Figuras IV.34, IV.35, IV.36, IV.37 e IV.38, ilustram o perfil obtido na simulação das funções geradas para representação matemática do comportamento da cinética enzimática.

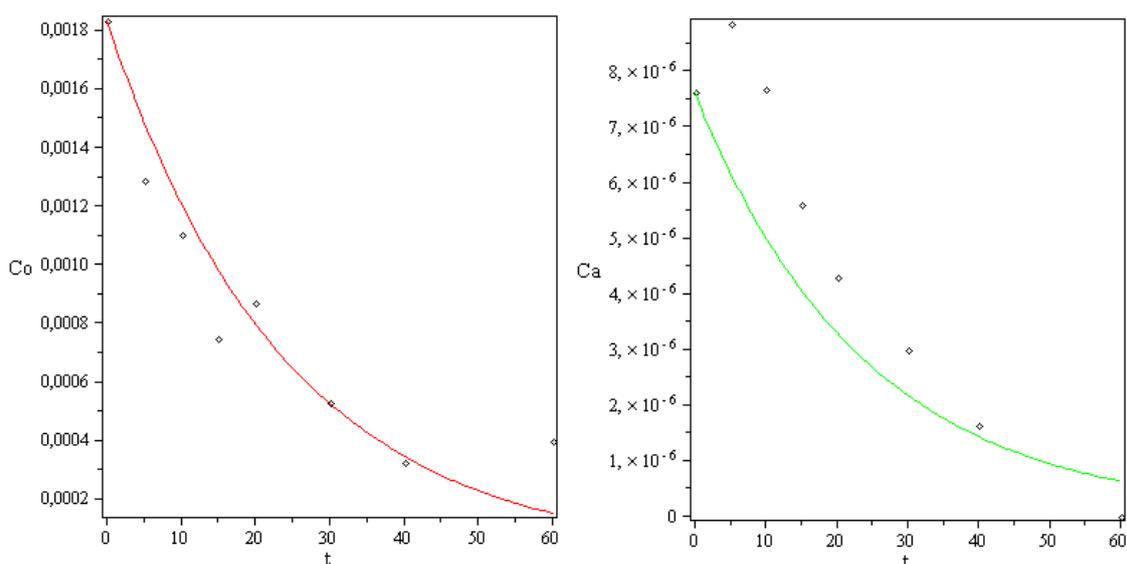


Figura IV.34: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran[®] 11. Os gráficos de carbazol na fase óleo e carbazol na fase aquosa apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.

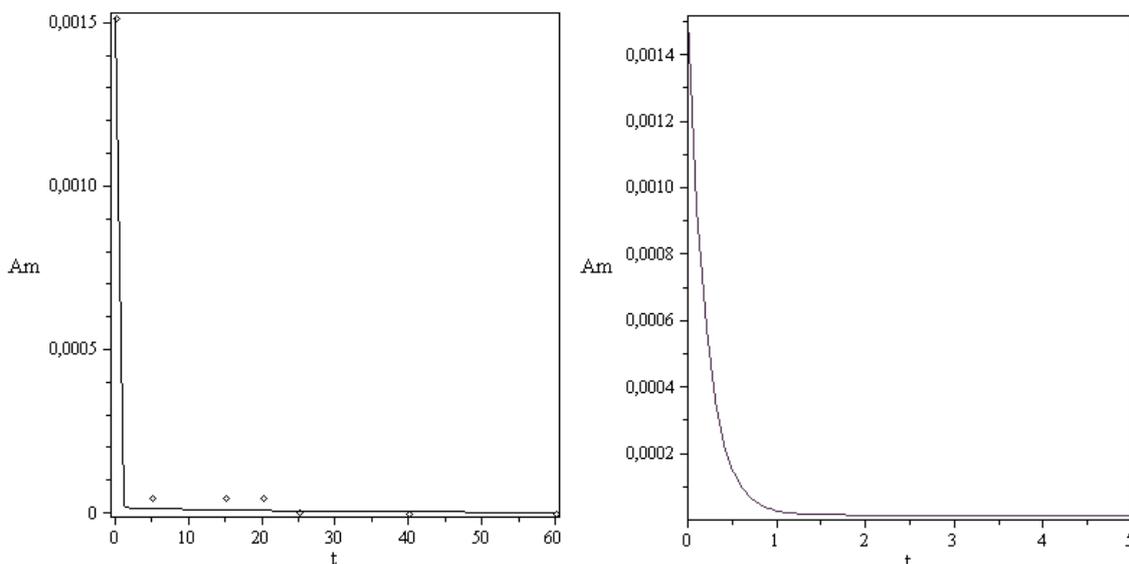


Figura IV.35: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran[®] 11. Os gráficos de 2'-amino bifenil-2,3-diol apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.

Os resultados expostos nas Figuras IV.34, IV.35, IV.36, IV.37 e IV.38, indicam que o modelo proposto representa de maneira satisfatória o consumo do carbazol e dos metabólitos de sua rota de degradação para as condições descritas na seção III.1.4, reproduzindo o comportamento apresentado nos experimentos para todos os compostos detectados. Na Figura IV.34 estão expostos os comportamentos do carbazol tanto na fase orgânica (C_o) quanto na fase aquosa (C_a). Pode-se observar nesta Figura que a concentração do carbazol decai exponencialmente no transcorrer do teste de degradação, igualmente ao mostrado com os pontos experimentais, sendo que somente na fase aquosa há um aumento da concentração presente no meio nos primeiros 5 minutos de reação e logo após ocorre à redução, não atingindo o valor zero de concentração nos 60 minutos do teste (o que não ocorre na fase orgânica). Este comportamento inicial dos pontos experimentais na fase aquosa pode ser explicado devido ao termo de transferência de massa ter maior predominância que o termo de consumo do substrato pela enzima nos minutos iniciais. O modelo predisse bem a transferência de massa do carbazol para a água, provavelmente porque o parâmetro k_{1a} não mostrou uma alta correlação com os demais. Já o comportamento do carbazol na fase aquosa na simulação foi bem delineado, mas demonstrou uma pequena falta de

ajuste inicialmente, que possivelmente será corrigido com uma melhor estimativa de parâmetros.

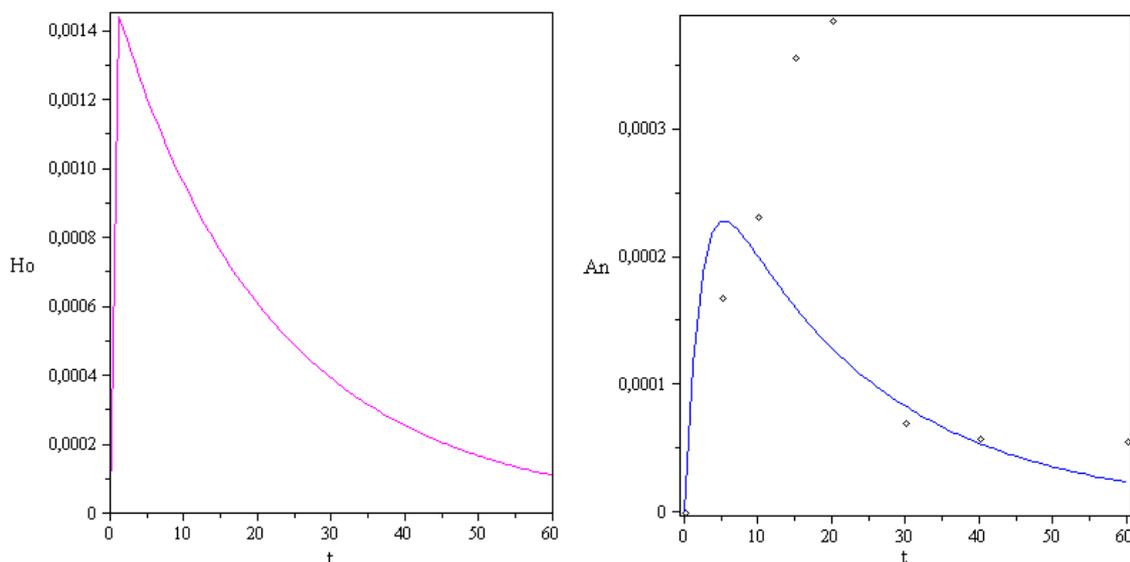


Figura IV.36 : Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran[®] 11. Os gráficos de HOADA e ácido antranílico apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.

A Figura IV.35 ilustra o comportamento extremamente rápido da enzima de dioxigenação de *meta*-clivagem para o teste de degradação do 2,3-dihidroxi bifenil, composto análogo ao 2'-amino bifenil-2,3-diol (A_m). Com esta simulação, verificou-se porque este composto não foi detectado na análise cromatográfica. Esta rapidez da atividade enzimática pode ser justificada pelo excesso da enzima de *meta*-clivagem no meio frente a concentração do substrato A_m ($E \gg A_m$). A simulação dos compostos HOADA (H_0) e ácido antranílico (A_n) estão ilustrados na Figura IV.36. Com o resultado obtido para o HOADA, pode-se dizer que a enzima de hidrólise referente a degradação deste composto, e expressa pela cepa GTIN11, não apresenta atividade tão alta quanto a dioxigenase de *meta*-clivagem, mas sim uma atividade próxima a da enzima de dioxigenação angular usada na conversão do carbazol em 2'-amino bifenil-2,3-diol. Além deste, o resultado obtido para o ácido antranílico proporcionou a visualização de uma menor atividade da enzima de dioxigenação (AntABC) quando comparada com a HOADA hidrolase devido ao suave decaimento da concentração do A_n no meio. Pôde-se observar também que o A_n não atinge concentrações altas na célula, sendo pouco acumulado (os compostos que atingem concentrações mais altas, ou são degradados por

enzimas com baixa atividade ou não são degradados pela célula, sendo somente acumulados).

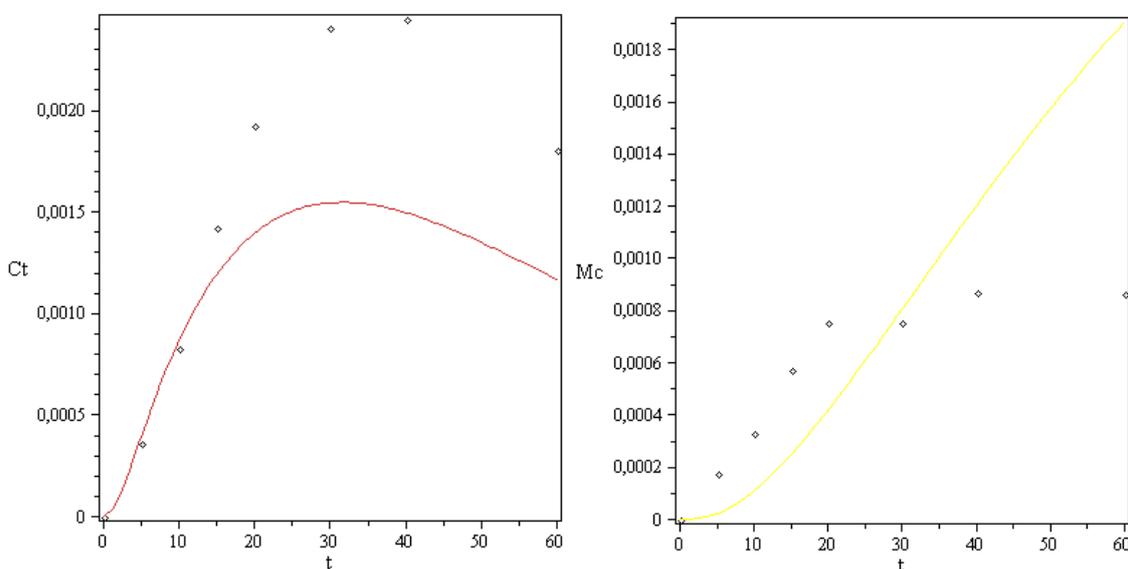


Figura IV.37: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran[®] 11. Os gráficos de catecol e ácido cis,cis-mucônico apresentam os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.

Na Figura IV.37 estão demonstradas a simulação dos comportamentos de acúmulo do catecol (C_t), com um suave decaimento da concentração após transcorridos 30-40 minutos de reação, e do ácido cis,cis-mucônico (M_c). Isto significa que no teste de degradação do carbazol por células não proliferantes (*resting cells*), a enzima atuante da degradação do M_c não possui atividade, só havendo acúmulo deste composto no meio, e que a dioxigenase de *orto*-clivagem, enzima que converte C_t em M_c , possui baixa atividade devido a suave queda da concentração do C_t e crescimento do M_c . Este comportamento do ácido cis,cis-mucônico e do catecol facilitaria a viabilização deste processo de degradação devido, respectivamente, as suas possíveis utilizações como produto de química fina e intermediário na síntese de outros compostos com importância terapêutica (para investigação oncológica, como por exemplo, no combate a células de glioblastomas) e agronômica (para utilização na prevenção da infecção de plantas e frutos por microrganismos), visto que estes compostos acumulam no meio reacional durante o processo.

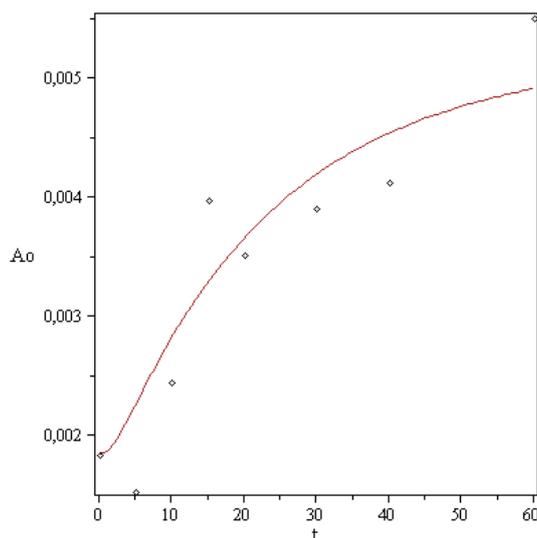


Figura IV.38: Resultados da simulação do modelo de degradação do carbazol gerado, usando os parâmetros estimados em Fortran[®] 11. O gráfico de amônia/amônio apresenta os resultados de concentração versus tempo ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ versus minutos) da simulação.

A Figura IV.38 ilustra a formação de amônia/amônio no meio teste com um satisfatório ajuste da curva simulada aos pontos experimentais devido a baixa correlação com a maioria dos parâmetros apresentada por K_4 e K_{m4} . Porém, a falta de ajuste da simulação apresentada por alguns resultados da seção IV.3, ocasionando em altos erros paramétricos (acima de 25%), mostrou-se como um ponto ruim neste experimento, vista alta correlação dos parâmetros e indicando a necessidade de estudos mais profundos neste processo para a minimização deste problema.

Os resultados expostos neste capítulo, de uma maneira geral, foram capazes de esclarecer o funcionamento em meio bifásico do mecanismo exercido pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 para a degradação do composto nitrogenado carbazol. Com estes, pôde-se verificar que esta bactéria é capaz de expressar enzimas de dioxigenação angular, de dioxigenação de *meta*-clivagem e de hidrólise, para a conversão do carbazol em ácido antranílico, passando por 2'-amino bifenil-2,3-diol e ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)hexa-2,4-dienóico (LARENTIS, 2005), além das enzimas AntABC (dioxigenação) e dioxigenase de *orto*-clivagem para a conversão do ácido antranílico em ácido *cis,cis*-mucônico via catecol, liberando o nitrogênio heteroatômico na forma de amônia/amônio. Estes resultados possibilitaram também verificar a alta especificidade desta reação enzimática (não degradou o composto aromático presente no óleo), apresentando uma taxa de degradação do carbazol 4,87 vezes maior no meio bifásico que no meio monofásico (somente fase aquosa), e gerar uma representação

matemática do processo. O modelo matemático gerado apresentou um comportamento satisfatório dos perfis de concentrações dos compostos da rota de degradação do carbazol a ácido cis,cis-mucônico obtidos experimentalmente, somente apresentando altas correlações entre a maioria dos parâmetros e indicando a necessidade do aprofundamento deste estudo para minimizar este problema. Com tudo isto, é possível assumir que a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 segue a mesma rota de degradação do carbazol realizada pelas bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 e *stutzeri*, e propor o esquema ilustrado na Figura IV.39.

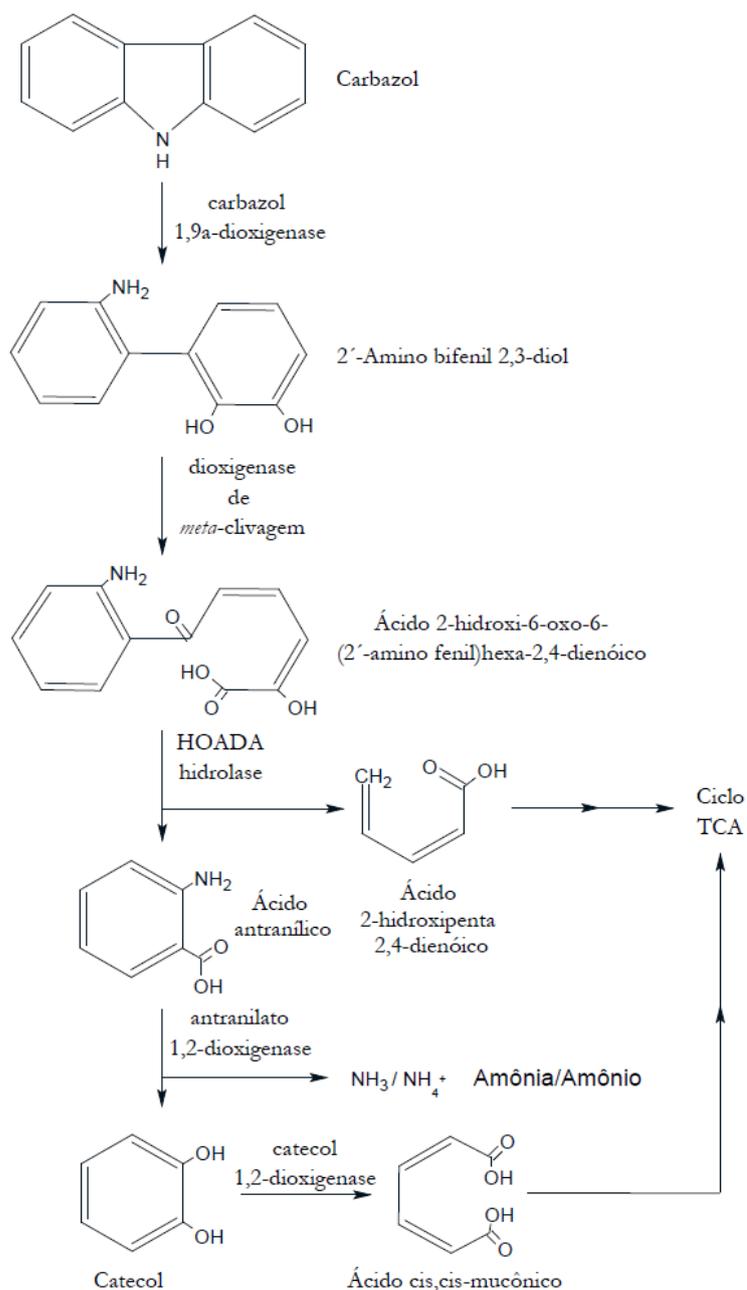


Figura IV.39: Esquema proposto para a rota de degradação do carbazol realizada pela bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11.

V – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com o intuito de elucidar o processo de biodesnitrogenação de petróleo e derivados utilizando o carbazol como composto padrão, este trabalho estudou o mecanismo de assimilação do nitrogênio presente nesta molécula padrão pelo microrganismo *Sphingomonas sp.* GTIN11 em sistema bifásico a fim de entender o funcionamento deste processo biotecnológico e utilizá-la como catalisador de biorrefino.

Para isto, os resultados descritos no capítulo IV indicaram que a cepa GTIN11 segue a mesma rota de degradação do carbazol sugerida para as bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri* (figura V.1) (OUCHIYAMA *et al.*, 1993; LARENTIS, 2005). As análises de cromatografia líquida de alto desempenho foram primordiais para o entendimento do acesso e consumo do carbazol, além da formação e consumo dos metabólitos intermediários desta rota de assimilação do nitrogênio pelas células da bactéria *Sphingomonas*.

A metodologia de cromatografia líquida juntamente com a análise colorimétrica para a detecção de amônia/amônio e a espectroscopia de massas acoplada a cromatografia gasosa proporcionaram a estruturação de uma rota de degradação do carbazol para a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 (figura IV.39) e modelagem matemática deste processo. Com estes dados, foi possível afirmar que esta cepa é capaz de expressar as enzimas de dioxigenação angular (CarA ou carbazol 1,9a-dioxigenase), de dioxigenação de *meta*-clivagem (CarB) e de hidrólise (CarC ou HOADA hidrolase), além das enzimas de dioxigenação do ácido antranílico (AntABC ou antranilato dioxigenase) e de dioxigenação de *orto*-clivagem (catecol dioxigenase) (SATO *et al.*, 1997a; SATO *et al.*, 1997b; NOJIRI *et al.*, 2001a; NOJIRI *et al.*, 2001b; NOJIRI *et al.*, 2002). Estas enzimas atuam, respectivamente, nos compostos carbazol, 2'-amino bifenil-2,3-diol, ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-amino fenil)hexa-2,4-dienóico (HOADA), ácido antranílico e catecol, gerados pela cepa utilizada neste trabalho. Além destes compostos, foram formados e detectados também amônia/amônio e ácido cis,cis-mucônico, mas estes não foram consumidos durante o teste de degradação do carbazol empregando as células íntegras como catalisador (*resting cells*). O acúmulo da

amônia/amônio é facilmente explicado pelo não crescimento das células no decorrer do teste de *resting cells*, mas acúmulo do ácido cis,cis-mucônico no mesmo teste é um ponto interessante de ser avaliado em futuros trabalhos, pois possivelmente as enzimas atuantes nesta etapa da degradação necessitam de algum nutriente presente no meio de crescimento para metabolizar esta molécula.

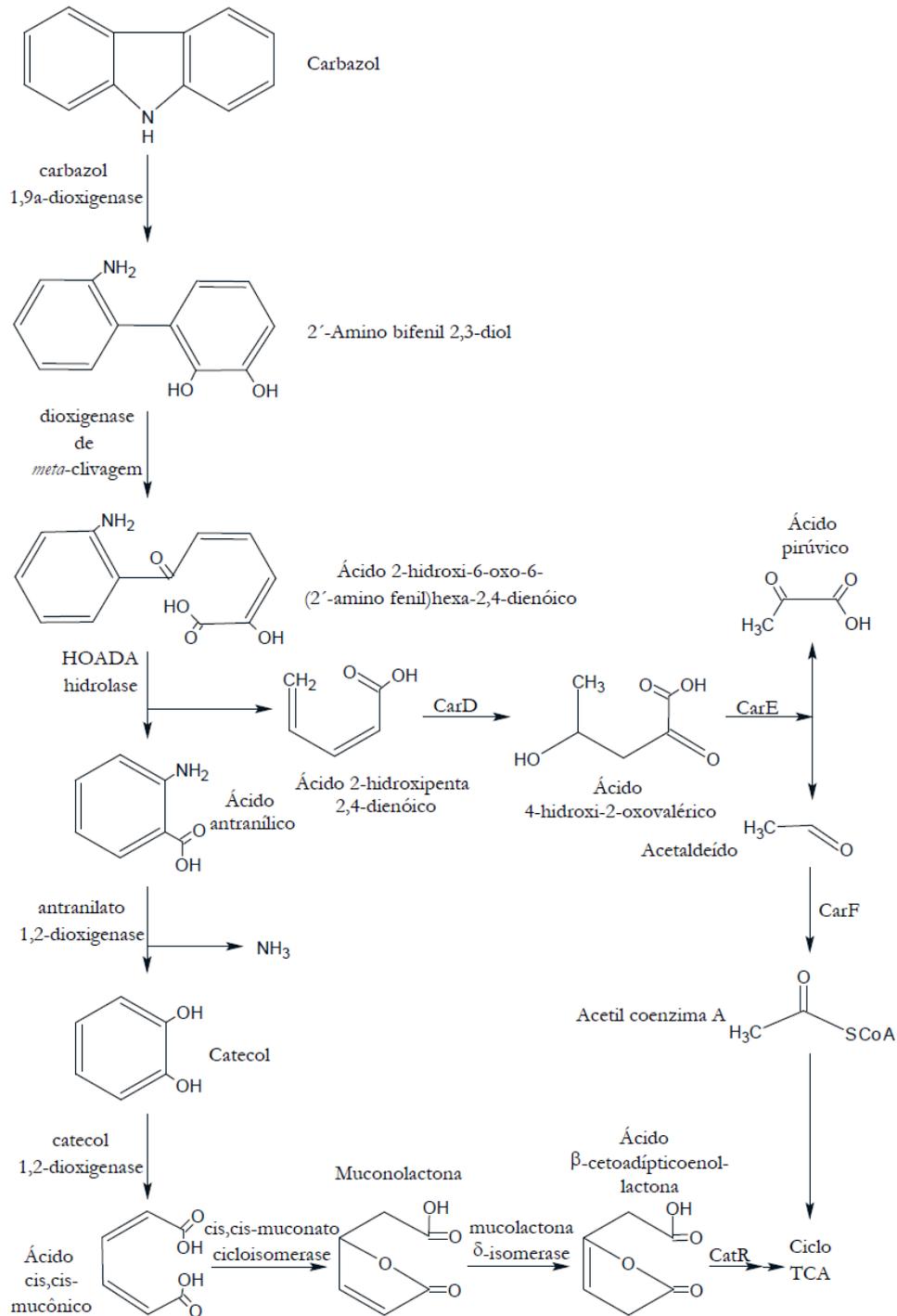


Figura V.1: Esquema da rota de degradação do carbazol realizada pelas bactérias *Pseudomonas sp.* CA10 e *Pseudomonas stutzeri* (modificado de OUCHIYAMA *et al.*, 1993; NOJIRI *et al.*, 2002; e LARENTIS, 2005).

Outro dado possível de ser observado na análise de cromatografia líquida foi que a taxa de degradação do carbazol apresentada pela cepa GTIN11 foi 4,87 vezes maior no meio bifásico ($38,92 \mu\text{moles}\cdot\text{minuto}^{-1}\cdot\text{grama}^{-1}$) que no meio monofásico (somente com a fase aquosa) exposto por KILBANE II *et al.* (2002) (seção II.2). Com tudo apresentado até o momento, é possível afirmar que o principal gargalo neste processo é a transferência de massa do carbazol do óleo para a água, sugerindo assim maior atenção e um estudo aprofundado deste fenômeno para otimizar o processo de biodesnitrificação.

Uma vez obtidos conhecimentos suficientes sobre o mecanismo de degradação do composto nitrogenado pelo microrganismo *Sphingomonas sp.* GTIN11, desenvolveu-se um modelo matemático para descrever o processo de forma a permitir um melhor entendimento do mesmo e gerar uma ferramenta confiável para sua simulação.

A modelagem dinâmica do processo de desnitrificação descreveu satisfatoriamente bem o transporte do óleo para o interior da célula com o consumo do carbazol, além da geração e consumo dos metabólitos intermediários desta rota no meio bifásico especificado, repetindo os perfis de concentração apresentados pelos experimentos.

Infelizmente o modelo mostrou pequenos problemas, através da simulação, na estimação dos parâmetros devido à grande complexidade das EDO's geradas e de suas interdependências. Os parâmetros estimados se mostraram altamente correlacionados (tabela IV.3), gerando falta de ajuste na simulação frente aos pontos experimentais e altos valores de erros paramétricos.

Este problema na estimação de parâmetros pode ser sanado com a utilização de um planejamento experimental fatorial (por exemplo, a dois níveis) que se mostra como uma valiosa ferramenta para a minimização deste efeito de correlação entre os parâmetros do modelo de degradação do carbazol utilizando a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11, obtendo um modelo final mais bem representativo do sistema bifásico.

Outro ponto que poderá melhorar os estudos de desnitração com a bactéria *Sphingomonas sp.* GTIN11 é a verificação do efeito dos metabólitos sobre as enzimas da rota de degradação do carbazol, apontando possíveis pontos que atrapalhem o sistema, determinando condições ótimas de operação e aperfeiçoando a modelagem do processo em meio bifásico.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSELIN, A. A., HUMBER, L. G., DOBSON, T. A., KOMLOSSY, J., MARTEL, R. R., 1976, " Cycloalkanoindoles. Syntheses and Antiinflammatory Actions of Some Acidic Tetrahydrocarbazoles, Cyclopentindoles, and Cycloheptindoles", *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 19, pp. 787-792.
- BAILEY & OLLIS, *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2^a ed., Mc.Graw-Hill, 1986.
- BALAMURALI, R., RAJENDRA PRASAD, K.J., 2001, "Synthesis, characterization and pharmacological activities of 5,6,11,12-tetrahydroindolo[2,3-*a*]carbazole derivatives", *Il Farmaco*, v. 56, pp. 229–232.
- BALL, J. S., 1962, "Nitrogen Compounds in Petroleum".In: *Proceedings of the American Petroleum Industry*, v.42, (Seção VIII), pp. 27-30.
- BENEDIK, M. J., GIBBS, P. R., RIDDLE, R. R., WILLSON, R. C., 1998, "Microbial denitrogenation of fossil fuels", *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, pp. 390-395.
- BODUSZYNSKI, M. M., 1987, "Composition of Heavy Petroleums. 1. Molecular Weight, Hydrogen Deficiency and Heteroatom Concentration as a Function of Atmospheric Equivalent Boiling Point up to 1400°F". *Energy & Fuels*, v.1, pp. 2-11.
- BODUSZYNSKY, M. M., 1988, "Composition of Heavy Petroleums. 2. Molecular Characterization". *Energy & Fuels*, v. 2, pp. 597-613.
- BUNDY, B. M., CAMPBELL, A. L., NEIDLE, E. L., 1998, "Similarities between the *antABC*-encoded anthranilate dioxygenase and the *benABC*-encoded benzoate dioxygenase of *Acinetobacter sp.* Strain ADP1", *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 17, PP 4466-4474.

- CARNEIRO, C. C., OLIVEIRA, H. B., SASSAKI, M. Y. M., RIBEIRO, C. M. S., BEVILAQUA, J. V., ALVES, T. L. M., 2007, "Estudo da degradação do carbazol por *Sphingomonas* sp. (GTIN11) ", XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, PR, Brasil;
- DALTON, L. K., DEMARAC, S., TEITEI, T., 1969, "Synthesis of pyridocarbazoles for anti-tumour studies", *Australian Journal of Chemistry*, v. 22, pp.185-191.
- DRUSHEL, H. V., SOMMERS, A. L., 1966, "Isolation and Identification of Nitrogen Compounds in Petroleum". *Analytical Chemistry*, v. 38, pp. 19-28.
- FAWCET, J. K., SCOTT, J. E., 1960, "A rapid and precise method for the determination of urea", *Journal of Clinical Pathology*, v. 13, n. 2, pp. 156-159.
- FEDORAK, P.M., SEMPLE, K.M., VAZQUEZ-DUHALT, R., WESTLAKE, D.W.S., 1993, "Chloroperoxidase - Mediated Modifications of Petroporphyrins and Asphaltenes". *Enzyme Microb. Technol*, v. 15, pp. 429 - 437.
- FRAKMAN, Z., IGNASIAK, T. M., MONTGOMERY D.S., STRASZ, O.P., 1988, "Nitrogen Compounds in Athabasca Asphaltene: The Vanadyl Porphyrins". *AOSTRA Journal of Research*, v. 4, pp. 171-179.
- FURIMSKY, E., 1979, "Deactivation and Regeneration of Refinery Catalysis". *Erdol Kohle*, v. 32, pp. 383-390.
- FUSHINOBU, S., SAKU, T., HIDAKA, M., JUN, S.-Y., NOJIRI, H., YAMANE, H., SHOUN, H., OMORI, T., WAKAGI, T., 2002, "Crystal structures of a metacleavage product hydrolase from *Pseudomonas fluorescens* IP01 (CumD) complexed with cleavage products", *Protein Science*, v. 11, pp. 2184–2195.
- GIEG, L. M., OTTER, A., FEDORAK, P. M., 1996, "Carbazole Degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: Metabolic Characteristics and the Identification of Some Metabolites", *Environmental Science & Technology*, v. 30, n. 2, pp. 575–585.

- HABE, H., MORII, K., FUSHINOBU, S., NAM, J-W., AYABE, Y., YOSHIDA, T., WAKAGI, T., YAMANE, H., NOJIRI, H., OMORI, T., 2003, "Crystal structure of a histidine-tagged serine hydrolase involved in the carbazole degradation (CarC enzyme)", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 303, n. 2, pp. 631-639.
- HISATSUKA, K., SATO, M., 1994, "Microbial transformation of carbazole to anthranilic acid by *Pseudomonas stutzeri*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 58, n. 1, pp. 213-214.
- HOPKIN, M., 2005, "Kyoto Protocol comes into force", *Nature*, 16 February 2005, news@nature.com.
- HUNT, R. H., O'NEAL, M. J., 1978, "Petroleum Composition". In: Etc, 2nd ed., v.14, pp. 845-855.
- IWATA, K., NOJIRI, H., SHIMIZU, K., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2003, "Expression, Purification, and Characterization of 2'-Aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase from Carbazole-degrader *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, pp. 300-307.
- IWATA, K., NOGUCHI, H. USAMI, Y., NAM, J-W, FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., NOJIRI, H., 2004, "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the 2'-aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase from the carbazole-degrader *Pseudomonas resinovorans* strain CA10", *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D60, pp. 2340-2342.
- JEWELL, D. M., HARTING, G. K., 1962, In: *Proceedings of the American Petroleum Industry*, v. 42, (seção VIII), pp. 92.
- KATRITZKY, A. R., 1985, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press.

- KAYSER, K. J., KILBANE II, J. J., 2005, "*Method for Metabolizing Carbazole in Petroleum*", In: United States Patent, US6,943,006, Alps Eletrics Co. Ltda., Tokyo, September 13.
- KENNEDY, J. C., EBERHART, R. C., 1995, "Particle swaarm optimization", In: *Proc. IEEE International Conference on Neural Networks*, Perth, Australia, pp. 1942-1948.
- KILBANE II, J. J., JACKOWSKI, K., 1992, "Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, pp. 1107-1114.
- KILBANE, J.J, RIBEIRO, C.M.S., LINHARES, M.M., 2001a, "*Microorganisms useful for cleavage of organic C-N bonds*", In: United States Patent, US6,204,048, Petróleo Brasileiro S. A., Rio de Janeiro, March 20.
- KILBANE, J.J, RIBEIRO, C.M.S., LINHARES, M.M., 2001b, "*Pseudomonas ayucida useful for cleavage of organic C-N bonds*", In: United States Patent, US6,221,651, Petróleo Brasileiro S. A., Rio de Janeiro, April 24.
- KILBANE II, J. J., DARAM, A., ABBASIAN, J., KAYSER, K. J., 2002, "Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 297, pp. 242-248.
- KILBANE, J.J, RIBEIRO, C.M.S., LINHARES, M.M., 2003, "*Bacterial cleavage of only organic C-N bonds of carbonaceous materials to reduce nitrogen content*", In: United States Patent, USSN 6,541,240, April 1.
- KILBANE II, J. J., 2004, "Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals", In: Vazquez-Duhalt, R., Quintero-Ramirez, R. (eds), *Petroleum Biotechnology, 151, Development and perspectives*, Studies in Surface Science and Catalysis, chapter 2, Cidade do México, México, Elsevier.

- KILBANE II, J. J., 2006, "Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels", *Energy Biotechnology, Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, pp. 305-314.
- KIRIMURA, K., NAKAGAWA, H., TSUJI, K., MATSUDA, K., KURANE, R., USAMI, S., 1999, "Selective and Continuous Degradation of Carbazole Contained in Petroleum Oil by Resting Cells of *Sphingomonas* sp. CDH-7", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 63, n. 9, pp. 1563 -1568.
- LANGE, E. A., PACHECO, M. A., 1999, "Advances in biocatalytic desulphurisation", *PTQ*, Autumn, pp. 37-43.
- LARENTIS, A. L., 2005, "*Clonagem e Expressão em Escherichia coli dos Genes da Degradação de Carbazol de Pseudomonas stutzeri*", Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LARENTIS, A.L., ALVES, T.L.M., MARTINS, O.B., 2005, "Cloning and Expression of *meta*-Cleavage Enzyme (CarB) of Carbazole Degradation Pathway from *Pseudomonas stutzeri*", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, 127-134.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., RÖSSLE, S. C., CARDOSO, A. M., ALMEIDA, W. I., BISCH, P. M., ALVES, T. L. M., MARTINS, O. B., 2006a, "Expression and Homology Modeling of 2'-Aminobiphenyl-2,3-diol 1,2-Dioxygenase (CarB) from *Pseudomonas stutzeri* Carbazole Degradation Pathway", *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 44, 530-538.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., CARDOZO, A. M., ALMEIDA, W. I., RÖSSLE, S. C., BISCH, P. M., MARTINS, O. B., ALVES, T. L. M., 2006b, "Homology Modeling of the Oxygenase Component of Carbazole 1,9a-Dioxygenase (CarAa) involved in Petroleum Denitrogenation Pathway of *Pseudomonas* sp.", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, pp. 53-61.

- LEITE, L. F., NETO, J. N. N., BEVILAQUA, J. V., 2005, "Biorefineries and biofuels: Current activities and future vision of Petrobras". ACS Division of Fuel Chemistry, Preprints 50 (2) 726-727.
- LI, M., LARTER, S. R., STODDART, D., BJOROY, M., 1992, "Liquid Chromatographic Separation Schemes for Pyrrole and Pyridine Nitrogen Aromatic Heterocycle Fractions from Crude Oils Suitable for Rapid Characterization of Geochemical Samples". *Analytical Chemistry*, v. 64, pp. 1337-1344.
- LI, L., XU, P., BLANKESPOOR, H. D., 2004, "Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp.", *Biotechnology Letters*, v. 26, pp. 581-584.
- LI, Y., LI, W., HUANG, J., XIONG, X., GAO, H., XING, J., LIU, H., 2008, "Biodegradation of carbazole in oil/water biphasic system by a newly isolated bacterium *Klebsiella* sp. LSSE-H2", *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, pp. 166-170.
- LOCHTE, H. L., LITMANN, E. R., 1995, *Petroleum Acids and Bases*, Chemical Publishing, New York.
- MCKAY, J. F., WEBER, J. H., LATHAM, D. R., 1976, "Characterization of Nitrogen Bases in High-Boiling Petroleum Distillates". *Analytical Chemistry*. v. 48, pp. 891-898.
- MILLER, A. F., 2008, "The shortest wire", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 21, pp 7341-7342.
- MONTICELLO, D. J., 1998, "Biocatalytic desulfurization of fossil fuels". In: *Proceedings of the 15th World Petroleum Congress*, Jonh Wiley & Sons, pp. 901-906.
- MONTICELLO, D. J., 2000, " Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates". *Chemical Biotechnology*, v. 11, pp. 540-546.

- MOORE, R. T., MCCUTCHAN, P., YOUNG, D. A., 1951, *Analytical Chemistry*, 23, 1639.
- NAKAGAWA, H., KIRIMURA, K., NITTA, T., KINO, K., KURANE, R., USAMI, S., 2002, "Recycle use of *Sphingomonas* sp. CDH-7 cells for continuous degradation of carbazole in presence of $MgCl_2$ ", *Current Microbiology*, v. 44, pp. 251-256.
- NAM, J-W., NOJIRI, H., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., 2001, "New Classification System for Oxygenase Components Involved in Ring-Hydroxylating Oxygenations", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65, n. 2, pp. 254-263.
- NAM, J-W., FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H., YAMANE, H., YOSHIDA, T., HABE, H., NOJIRI, H., OMORI, T., 2002a, "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the terminal oxygenase component of carbazole 1,9a-dioxygenase of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10", *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D58, Pt 8, pp. 1350-1352.
- NAM, J-W., NOJIRI, H., NOGUCHI, H., UCHIMURA, H., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., 2002b, "Purification and Characterization of Carbazole 1,9a-Dioxygenase, a Three-Component Dioxygenase System of *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 12, pp. 5882-5890.
- NAM, J-W., NOGUCHI, H., FUJIMOTO, Z., MIZUNO, H., ASHIKAWA, Y., ABO, M., FUSHINOBU, S., KOBASHI, N., WAKAGI, T., IWATA, K., YOSHIDA, T., HABE, H., YAMANE, H., OMORI, T., NOJIRI, H., 2005, "Crystal Structure of the Ferredoxin Component of Carbazole 1,9a-Dioxygenase of *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10, a Novel Rieske Non-Heme Iron Oxygenase System", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 58, pp. 779-789.
- NANDHAGOPAL, N., YAMADA, A., HATTA, T., MASAI, E., FUKUDA, M., MITSUI, Y., SENDA, T., 2001, "Crystal Structure of 2-Hydroxyl-6-oxo-6-

phenylhexa-2,4-dienoic Acid (HPDA) Hydrolase (BphD enzyme) from the *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 of the PCB Degradation Pathway", *Journal of Molecular Biology*, v. 309, pp. 1139-1151.

NOJIRI, H., NAM, J-W., KOSAKA, M., MORII, K-I., TAKEMURA, T., FURIHATA, K., YAMANE, H., OMORI, T., 1999, "Diverse Oxygenations Catalyzed by Carbazole 1,9a-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 10, pp. 3105–3113.

NOJIRI, H., SEKIGUCHI, H., MAEDA, K., URATA, M., NAKAI, S.I., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2001a, "Genetic Characterization and Evolutionary Implications of a *car* Gene Cluster in the Carbazole Degradation *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 12, pp. 3663-3679.

NOJIRI, H., HABE, H., OMORI, T., 2001b, "Bacterial degradation of aromatic compounds via angular dioxygenation", *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 47, n. 6, pp. 279-305.

NOJIRI, H., MAEDA, K., SEKIGUCHI, H., URATA, M., SHINTANI, M., YOSHIDA, T., HABE, H., OMORI, T., 2002, "Organization and transcriptional characterization of catechol degradation genes involved in carbazole degradation by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.66, n. 4, pp. 897-901.

NOJIRI, H., OMORI, T., 2002, "Molecular bases of aerobic bacterial degradation of dioxins: involvement of angular dioxygenation", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 10, pp. 2001–2016.

NOJIRI, H., TAIRA, H., IWATA, K., MORII, K., NAM, J.-W. , YOSHIDA, T., HABE, H., NAKAMURA, S., SHIMIZU, K., YAMANE H., OMORI, T., 2003, "Purification and Characterization of *meta*-Cleavage Compound Hydrolase from a Carbazole Degradation *Pseudomonas resinovorans* Strain CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, pp. 36-45.

- NORONHA, F. B., PINTO, J. C., MONTEIRO, J. L., LOBÃO, M. W., SANTOS, T. J., 1993, "ESTIMA: Um pacote computacional para estimação de parâmetros de projeto de experimentos", Relatório Técnico, Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- OUCHIYAMA, N., ZHANG, Y., OMORI, T., KODAMA, T., 1993, "Biodegradation of Carbazole by *Pseudomonas* spp. CA06 and CA10", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 57, n. 3, pp. 455-460.
- OUCHIYAMA, N., MIYACHI, S., OMORI, T., 1998, "Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge", *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 44, pp. 57-63.
- PETERS, A. W., BENDORAITIS, J. B., 1976, "High Resolution Mass Spectrographic Method for the Analysis of Nitrogen- and Oxygen-Containing Material Derived from Petroleum". *Analytical Chemistry*, v. 48, pp. 968-973.
- PETZOLD, L., 1982, "A description of DASSL: a differential/algebraic system solver", Proceedings 10th IMACS World Congress, Montreal, Canadá.
- RIBEIRO, C. M. S., 2004, *Estudo do Processo de Desnitrogenação de Quinolina Utilizando Microorganismo Isolado de Ambientes Contaminados por Petróleo*. Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- RICE, L. M., HERTZ, E., FREED, M. E., 1964, "Antidepressant Agents. Derivatives of 2,3-Polymethyleneindoles", *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 7, pp. 313-319.
- RICHTER, P. P., CEASSER, P. D., MEISEL, S. L., OFFENHAUSER, R. D., 1952, "Distribution of Nitrogen in Petroleum According to Basicity". *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 44, pp. 2601-2605.

- RIDDLE, R. R., GIBBS, P. R., WILLSON, R. C., BENEDIK, M. J., 2003a, "Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, pp. 6–12.
- RIDDLE, R. R., GIBBS, P. R., WILLSON, R. C., BENEDIK, M. J., 2003b, "Purification and properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoic acid hydrolase involved in microbial degradation of carbazole", *Protein Expression and Purification*, v. 28, pp. 182-189.
- SATO, S-I., NAM, J-W., KASUGA, K., NOJIRI, H., YAMANE, H., OMORI, T., 1997a, "Identification and Characterization of Genes Encoding Carbazole 1,9a-Dioxygenase in *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 15, pp. 4850-4858.
- SATO, S-I., OUCHIYAMA, N., KIMURA, T., NOJIRI, H., YAMANE, H., OMORI, T., 1997b, "Cloning of Genes Involved in Carbazole Degradation of *Pseudomonas* sp. Strain CA10: Nucleotide Sequences of Genes and Characterization of *meta*-Cleavage Enzymes and Hydrolase", *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 15, pp. 4841-4849.
- SHEPHERD, J. M., LLOYD-JONES, G., 1998, "Novel Carbazole Degradation Genes of *Sphingomonas* CB3: Sequence Analysis, Transcription, and Molecular Ecology", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 247, n. 1, pp. 129-135.
- SCHNEIDER, J., GROSSER, R. J., JAYASIMHULU, K., XUE, W., KINKLE, B., WARSHAWSKY, D., 2000, "Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII.123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil", *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 3, pp. 269-277.
- SCHWAAB, M., 2007, "Desenvolvimento e implementação de novas técnicas de estimação de parâmetros e planejamento seqüencial de experimentos", Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- SHOTBOLT-BROWN, J., HUNTER, D. W. F., AISLABIE, J., 1996, "Isolation and description of carbazole-degrading bacteria", *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, pp. 79-82.
- SNYDER, L. R., 1969, "Nitrogen and Oxygen Compound Types in Petroleum: Total Analysis of 400-700 of distillate from a California Crude Oil". *Analytical Chemistry*, v. 41, pp. 314-323.
- STRACHAN, P. D., FREER, A. A., FEWSON, C. A., 1998, "Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning sequencing of its *catA* gene", *Biochemistry Journal*, v. 333, pp 741-747.
- SUGIMOTO, K., SENDA, T., AOSHIMA, H., MASAI, E., FUKUDA, M., MITSUI, Y., 1999, "Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4,5-dioxygenase, under aerobic conditions", *Structure with Folding & Design*, v. 7, pp. 953-965.
- WACKETT, L. P., 2002, "Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, pp. 577-587.
- WEATHERBURN, M. W., 1967, "Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of ammonia", *Analytical Chemistry*, v. 39, n 8, pp. 971-974.

VII – Anexos

ANEXO 1

CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PESO SECO EM FUNÇÃO DA ABSORBÂNCIA PARA A CEPA *Sphingomonas sp.* GTIN11 UTILIZANDO CARBAZOL COMO ÚNICA FONTE DE NITROGÊNIO.

Para a obtenção desta curva, cultivou-se o microrganismo em meio mineral mínimo contendo somente carbazol como fonte de nitrogênio, na proporção descrita na tabela III.1 deste trabalho, utilizando carbazol como única fonte de nitrogênio em uma concentração igual a $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A metodologia de crescimento bacteriano utilizada está descrita na seção III.1.2. Na etapa de lavagem do material celular centrifugado e diluição para obtenção das absorbâncias a 600nm, utilizou-se água Milli-Q.

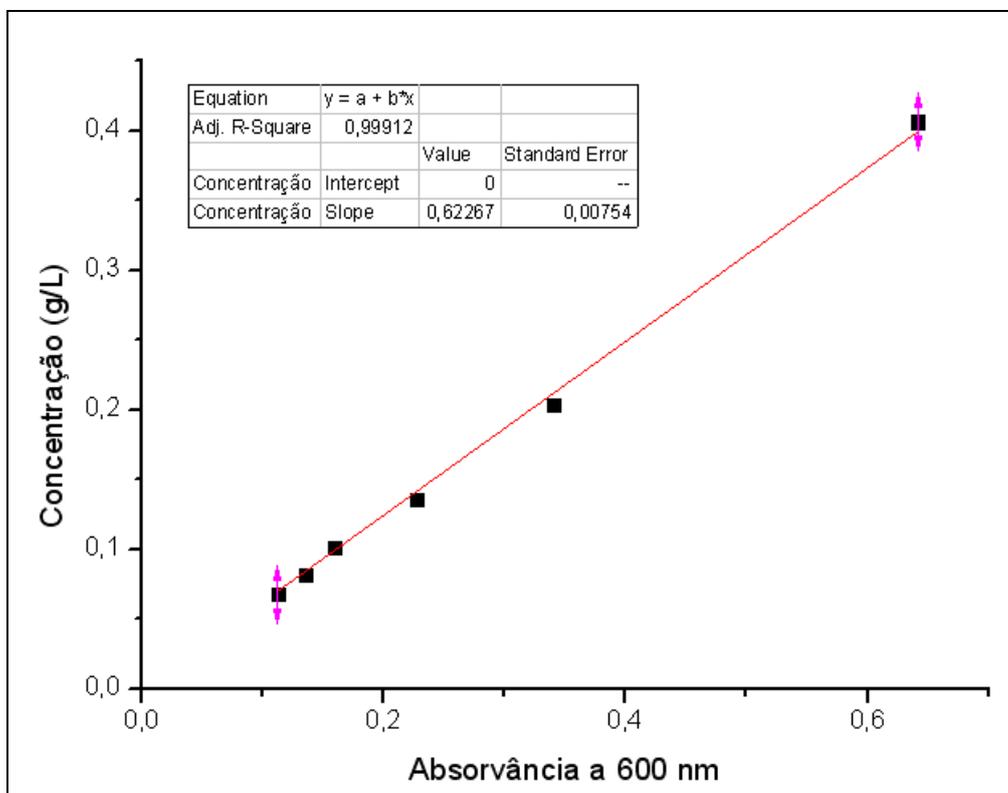


Figura VII.1: Curva de calibração de Peso Seco x Absorbância para a cepa GTIN11 em meio mineral mínimo contendo somente carbazol como fonte de nitrogênio.

ANEXO 2

CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS PADRÕES DA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL UTILIZANDO A BACTÉRIA *Sphingomonas sp.* GTIN11.

Para a obtenção destas curvas, prepararam-se seis soluções com concentrações conhecidas de todos os padrões e diferentes entre si, injetando-as em seguida no equipamento de HPLC valendo do procedimento descrito na seção III.1.4. As concentrações variaram entre 10 e 400 mg*L⁻¹ e através das respectivas áreas determinadas para cada composto, plotaram-se os gráficos apresentados a seguir (foram calculados as equações da reta e os coeficientes de correlação para cada composto).

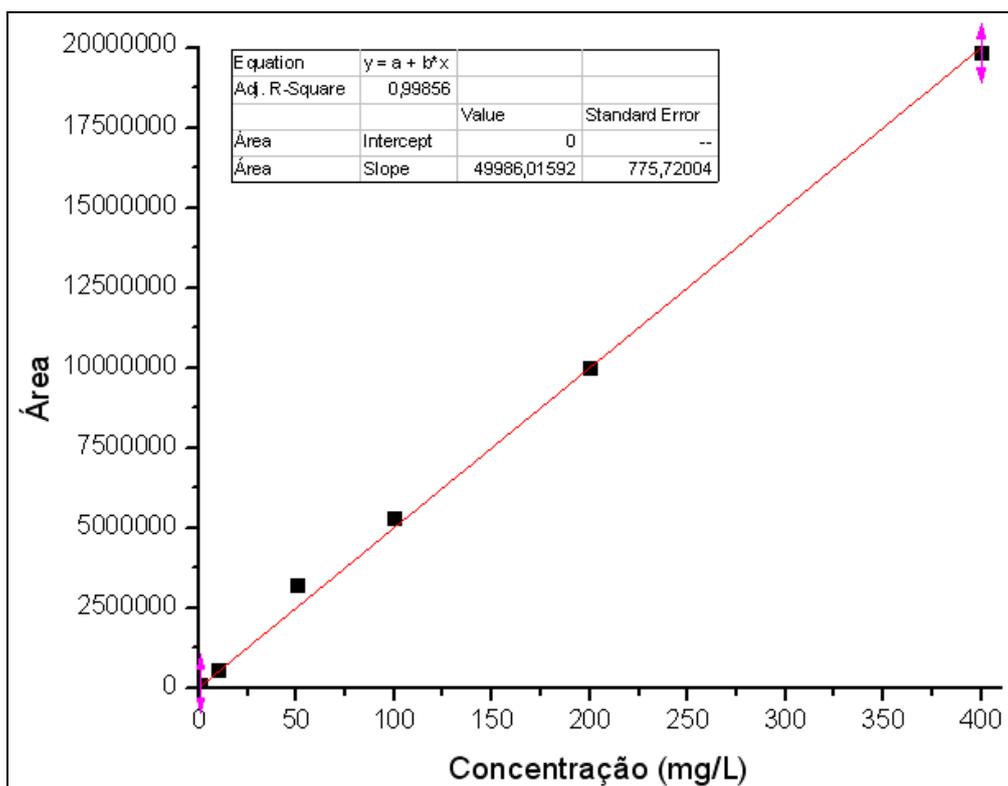


Figura VII.2: Curva de calibração do carbazol para a análise de cromatografia líquida.

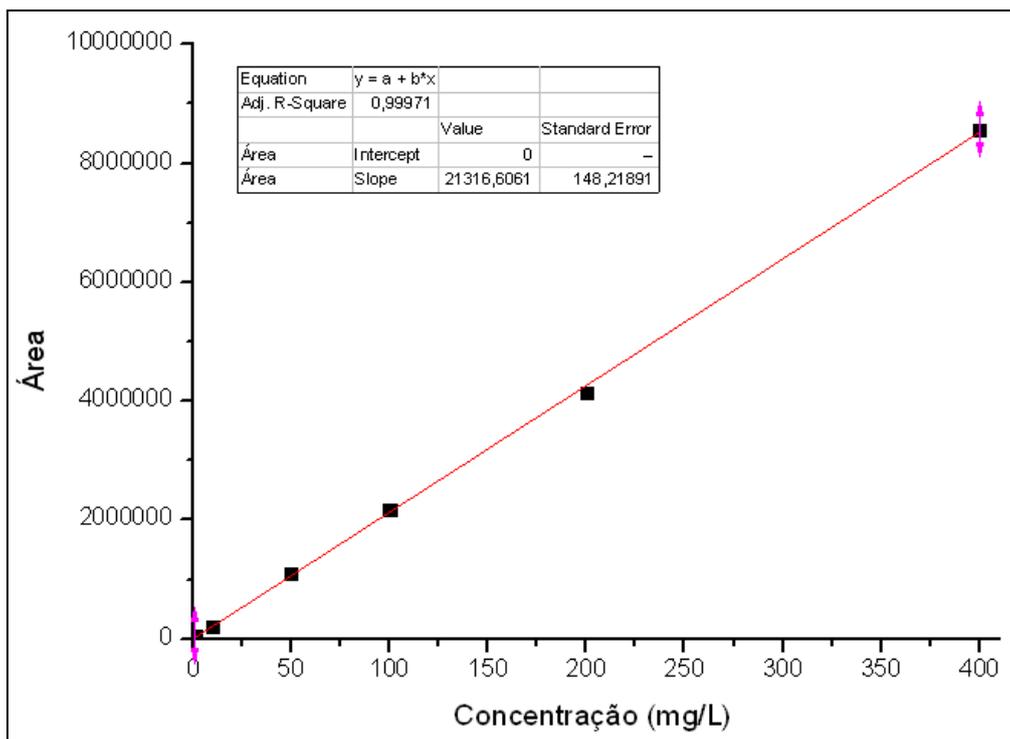


Figura VII.3: Curva de calibração do 2-amino bipenil para a análise de cromatografia líquida.

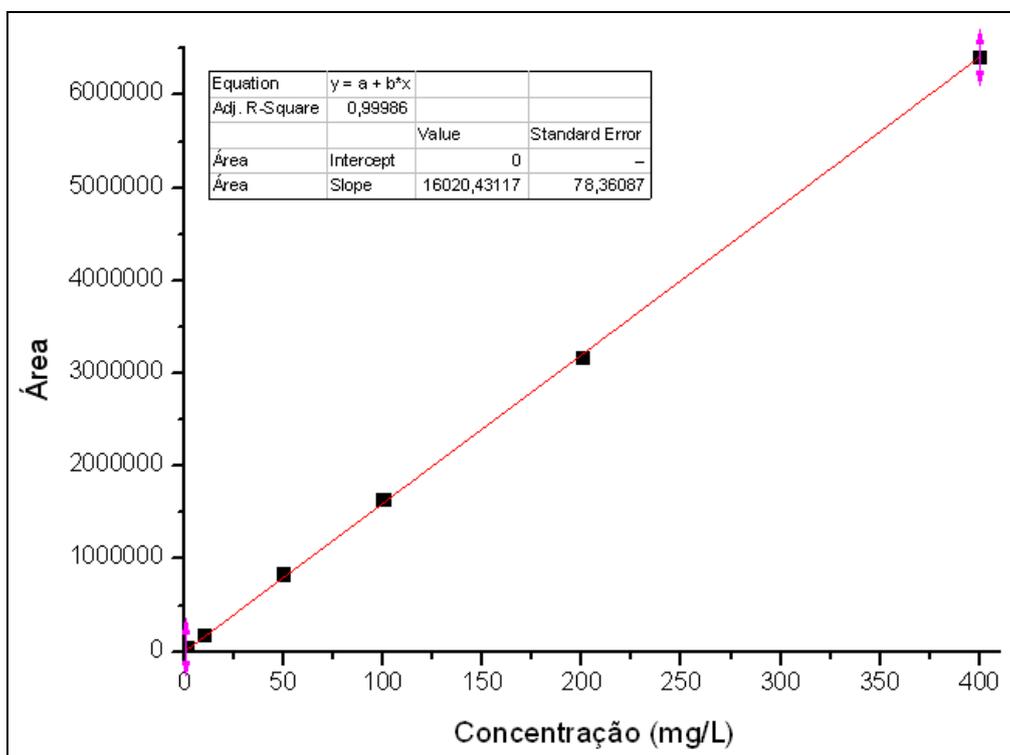


Figura VII.4: Curva de calibração do 2,3-dihidroxi bipenil para a análise de cromatografia líquida.

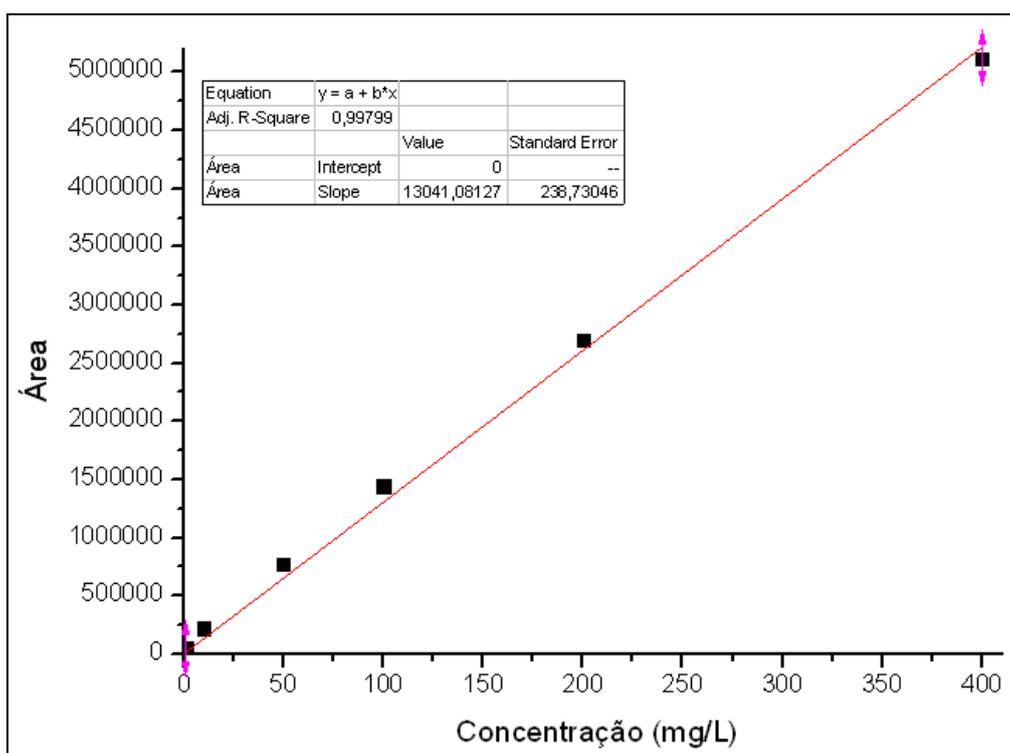


Figura VII.5: Curva de calibração do ácido antranílico para a análise de cromatografia líquida.

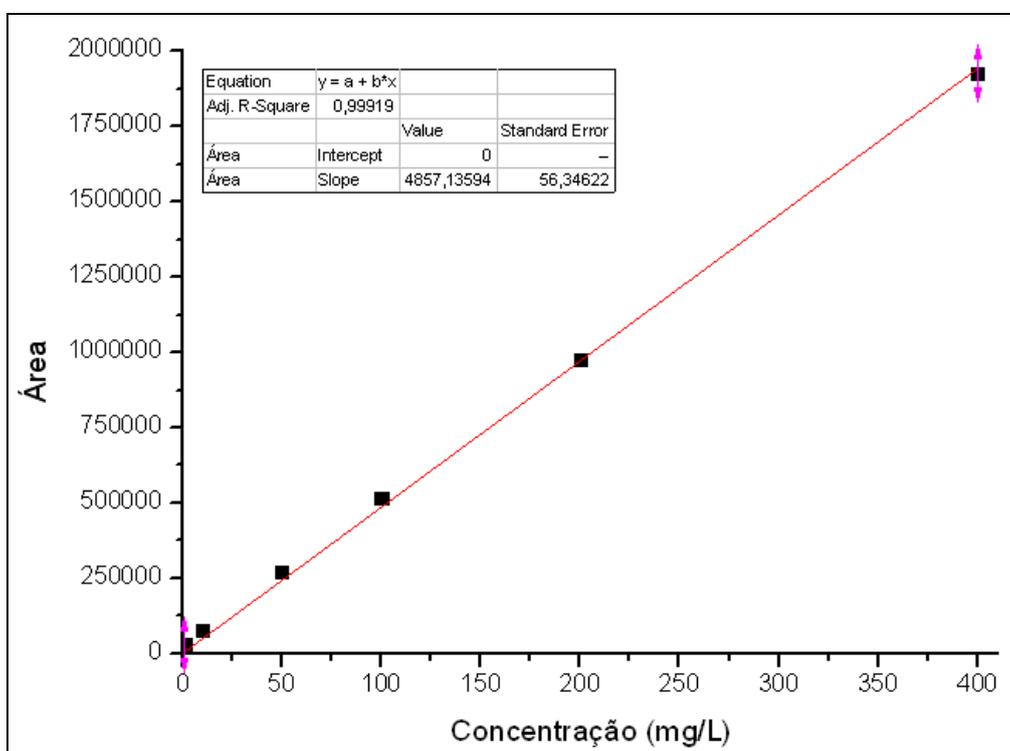


Figura VII.6: Curva de calibração do catecol para a análise de cromatografia líquida.

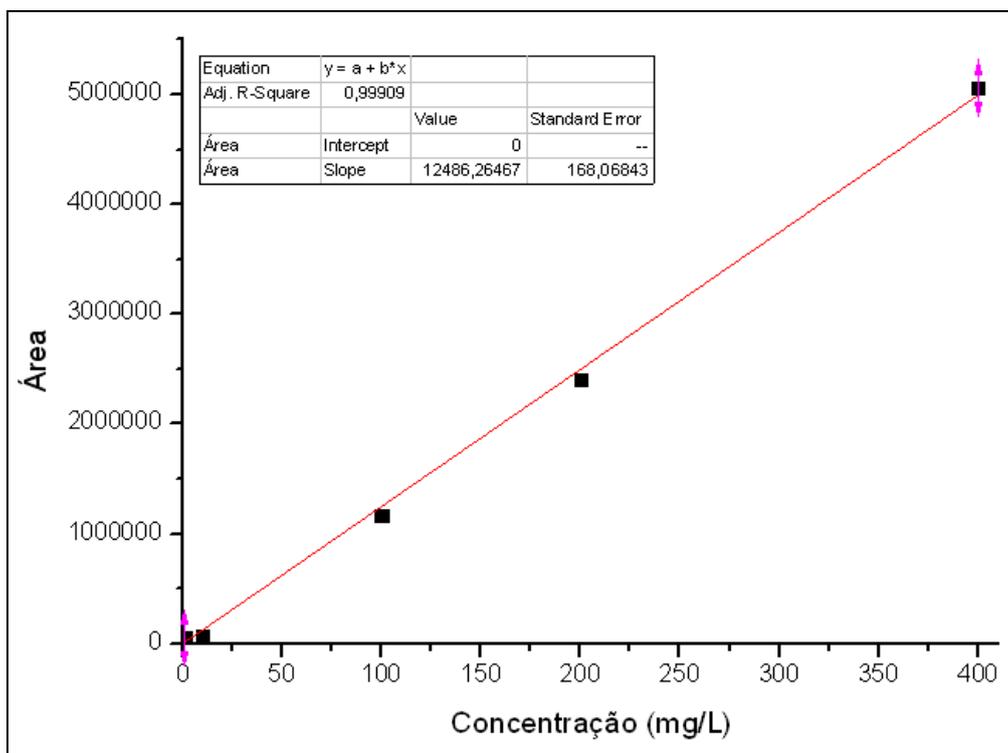


Figura VII.7: Curva de calibração do ácido cis,cis-mucônico para a análise de cromatografia líquida.

ANEXO 3

CURVA DE CALIBRAÇÃO DO NITROGÊNIO LIBERADO PELA ROTA DE DEGRADAÇÃO DO CARBAZOL UTILIZANDO A BACTÉRIA *Sphingomonas sp.* GTIN11.

O procedimento de análise para a quantificação do nitrogênio removido da molécula de carbazol foi realizado através de testes colorimétricos denominados de reação de fenol-hipoclorito (FAWCET e SCOTT, 1960; WEATHERBURN, 1967). O procedimento analítico está descrito na seção III.2.3.

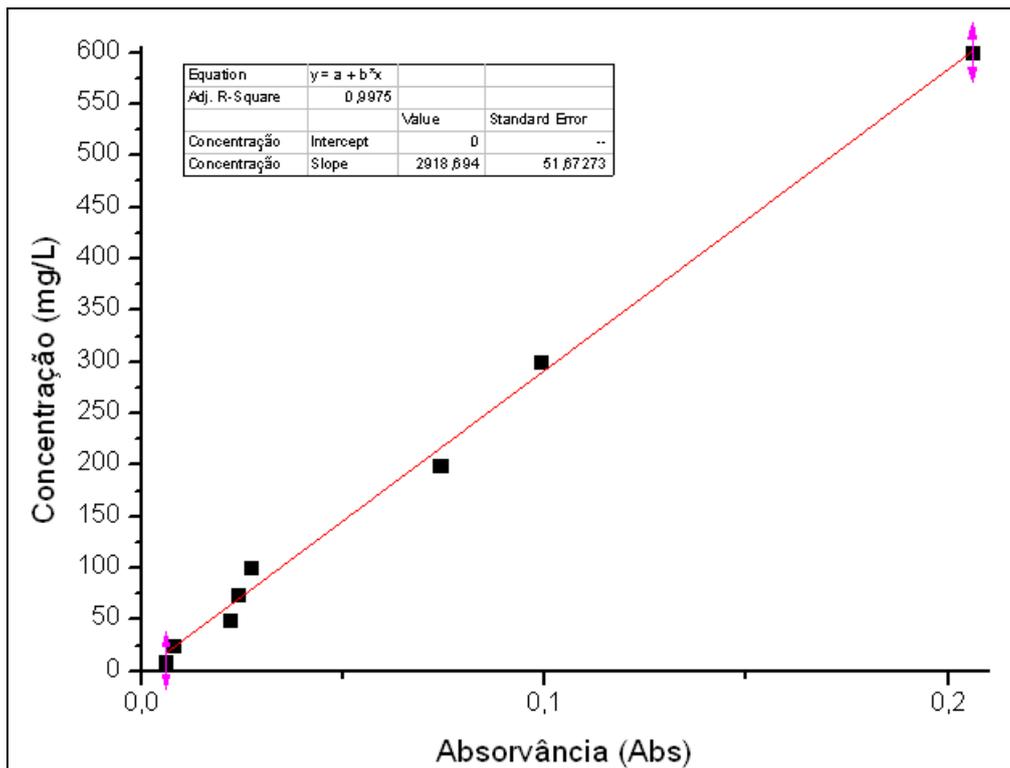


Figura VII.8: Curva de calibração para quantificação do nitrogênio removido.

A curva de calibração apresentada na figura VII.8 foi montada a partir de reações entre sulfato de amônio (substância usada como padrão para a quantificação do nitrogênio removido no experimento de degradação do carbazol utilizando a bactéria

Sphingomonas sp. GTIN11) e os reagentes descritos procedimento da seção III.2.3. Conforme mostrado na tabela VII.2, variou-se a concentração do sulfato de amônio entre 10 e 600 mg*L⁻¹ (a linha de tendência passa pela origem do gráfico), obtendo os respectivos valores de absorvância a seguir.

Tabela VII.1: Valores de absorvância a 625 nm

Concentração (mg/L)	Absorvância (Abs)
10	0,009
25	0,012
50	0,021
75	0,025
100	0,028
200	0,071
300	0,102
600	0,204

ANEXO 4

LISTAGEM DO PROGRAMA EMPREGADO NA MODELAGEM DO PROCESSO DE DESNITROGENAÇÃO DO CARBAZOL EM SISTEMA BIFÁSICO, UTILIZANDO-O COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO.

> **restart;**

Programa de Engenharia Química - COPPE/UFRJ

Processo de Biodesnitração - Cultivo de *Sphingomonas sp.* GTIN11 em meio contendo carbazol (C) como única fonte de carbono e nitrogênio. Considera-se que o carbazol é transportado termodinamicamente do óleo para a água e, intracelularmente, ele é transformado enzimaticamente em outros compostos metabólicos até a remoção do nitrogênio da molécula.

Laboratório de Bioprocessos - Modelagem de Bioprocessos

with(plots):

> Parâmetros inicialmente estimados para o teste de degradação do carbazol (*resting cells*).

>

k1:=1.06264:km1:=.315243:k2:=.502996:km2:=.313198:k3:=.00344849:km3:=.102855:k4:=.171605:km4:=.995191:k5:=.000132171:km5:=.0138187:x:=3:kla:=9.8673:keq:=240.7:

>

mu1:=k1*x*Ca(t)/(km1+Ca(t));mu2:=k2*x*Am(t)/(km2+Am(t));mu3:=k3*x*Ho(t)/(km3+Ho(t));mu4:=k4*x*An(t)/(km4+An(t));mu5:=k5*x*Ct(t)/(km5+Ct(t));

$$\mu_1 := \frac{k_1 \times Ca(t)}{k_{m1} + Ca(t)}$$

$$\mu_2 := \frac{k_2 \times Am(t)}{k_{m2} + Am(t)}$$

$$\mu_3 := \frac{k_3 \times Ho(t)}{k_{m3} + Ho(t)}$$

$$\mu_4 := \frac{k_4 \times An(t)}{k_{m4} + An(t)}$$

$$\mu_5 := \frac{k_5 \times Ct(t)}{k_{m5} + Ct(t)}$$

> Equações de balanço de massa

> Equação de equilíbrio

> **Coeq := keq * Ca(t);**

$$Coeq := keq \cdot Ca(t)$$

> Carbazol no óleo - Co(t)

> **F1:=diff(Co(t),t)=-kla*(Co(t)-Coeq);**

$$\frac{d}{dt} Co(t) = -9.8673 Co(t) + 2375.05911 Ca(t)$$

> Carbazol na água – Ca(t)

> **F2:=diff(Ca(t),t)=kla*(Co(t)-Coeq)-mu1;**

$$\frac{d}{dt} Ca(t) = 9.8673 Co(t) - 2375.05911Ca(t) - \frac{3.18792Ca(t)}{0.315243 + Ca(t)}$$

> Reações realizadas na água

> 2'-Amino bifenil-2,3-diol – Am(t)

> **F3:=diff(Am(t),t)=mu1-mu2;**

$$\frac{d}{dt} Am(t) = \frac{3.18792Ca(t)}{0.315243 + Ca(t)} - \frac{1.508988Am(t)}{0.313198 + Am(t)}$$

> HOADA – Ho(t)

> **F4:=diff(Ho(t),t)=mu2-mu3;**

$$\frac{d}{dt} Ho(t) = \frac{1.508988Am(t)}{0.313198 + Am(t)} - \frac{0.01034547Ho(t)}{0.102855 + Ho(t)}$$

> Ácido antranílico – An(t)

> **F5:=diff(An(t),t)=mu3-mu4;**

$$\frac{d}{dt} An(t) = \frac{0.01034547Ho(t)}{0.102855 + Ho(t)} - \frac{0.514815An(t)}{0.995191 + An(t)}$$

> Amônia/Amônio – Ao(t)

> **F6:=diff(Ao(t),t)=mu4;**

$$\frac{d}{dt} Ao(t) = \frac{0.514815An(t)}{0.995191 + An(t)}$$

> Catecol – Ct(t)

> **F7:=diff(Ct(t),t)=mu4-mu5;**

$$\frac{d}{dt} Ct(t) = \frac{0.514815An(t)}{0.995191 + An(t)} - \frac{0.000396513Ct(t)}{0.0138187 + Ct(t)}$$

> Ácido cis,cis-mucônico – Mc(t)

> **F8:=diff(Mc(t),t)=mu5;**

$$\frac{d}{dt} Mc(t) = \frac{0.000396513Ct(t)}{0.0138187 + Ct(t)}$$

>**F:=dsolve({F1=0,F2=0,F3=0,F4=0,F5=0,F6=0,F7=0,F8=0,Co(0)=.001833,Ca(0)=.000007637,Am(0)=.001517,Ho(0)=0,An(0)=0,Ao(0)=.001836,Ct(0)=0,Mc(0)=0},{Co(t),Ca(t),Am(t),Ho(t),An(t),Ao(t),Ct(t),Mc(t)},type=numeric,method=dverk78,output=procedu relist);**

proc(x_dverk78) ... end proc

> **P1:=plots[odeplot](F,[t, Co(t)],0 .. 60,color = red):**
> **P2:=plots[odeplot](F,[t, Ca(t)],0 .. 60,color = green):**
> **P3:=plots[odeplot](F,[t, Am(t)],0 .. 60,color = black):**
> **P9:=plots[odeplot](F,[t, Am(t)],0 .. 5,color = violet):**
> **P4:=plots[odeplot](F,[t, Ho(t)],0 .. 60,color = magenta):**
> **P5:=plots[odeplot](F,[t, An(t)],0 .. 60,color = blue):**
> **P6:=plots[odeplot](F,[t, Ao(t)],0 .. 60,color = brown):**
> **P7:=plots[odeplot](F,[t, Ct(t)],0 .. 60,color = orange):**
> **P8:=plots[odeplot](F,[t, Mc(t)],0 .. 60,color = yellow):**

> Dados experimentais obtidos

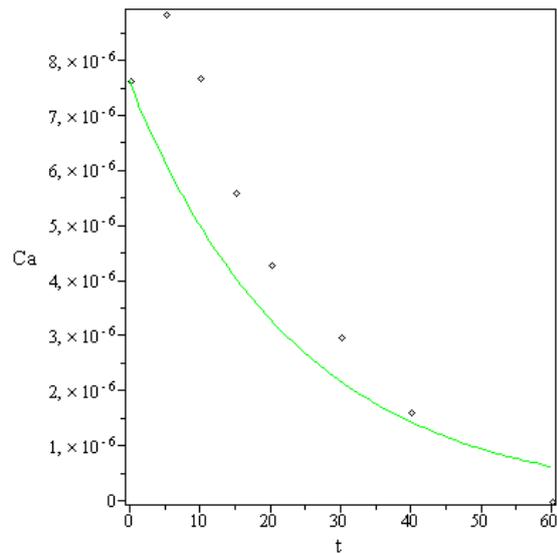
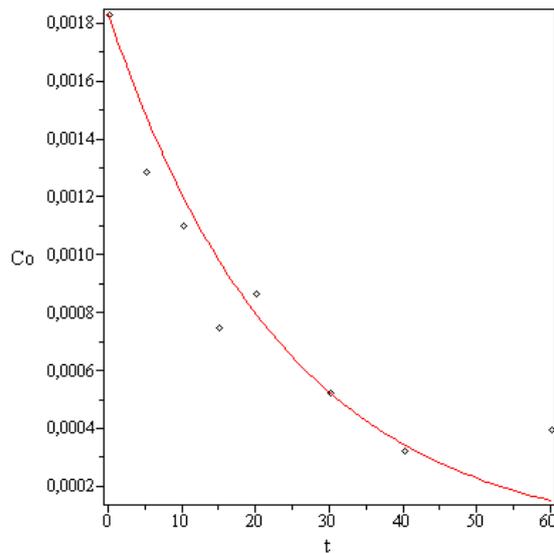
>**C1:=pointplot({[0,.001833],[5,.001290],[10,.001102],[15,.0007497],[20,.0008683],[30,.0005274],[40,.0003246],[60,.0003979]},axes = boxed):**

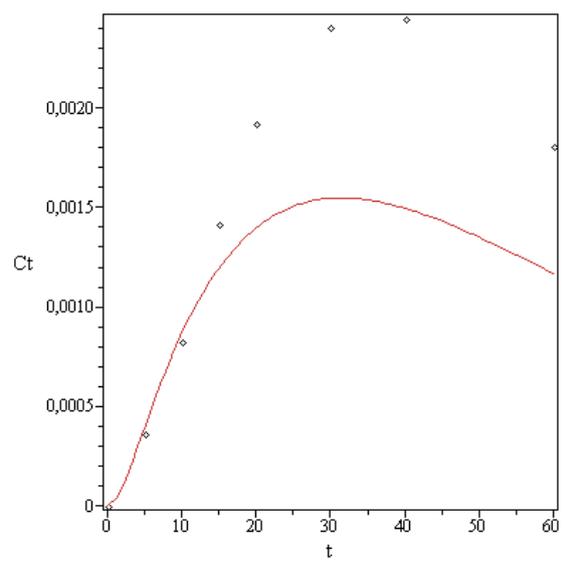
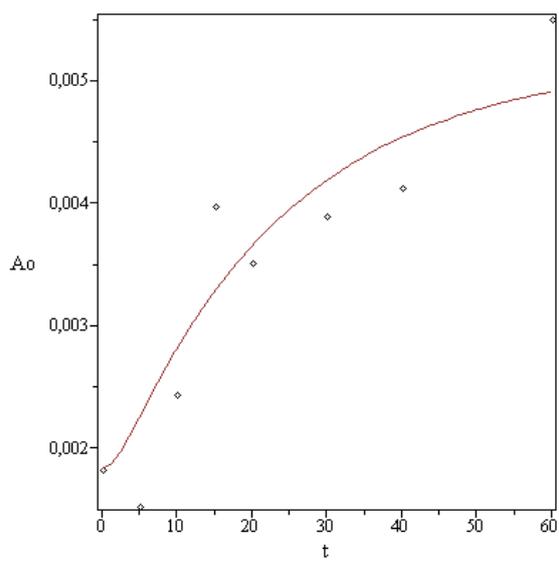
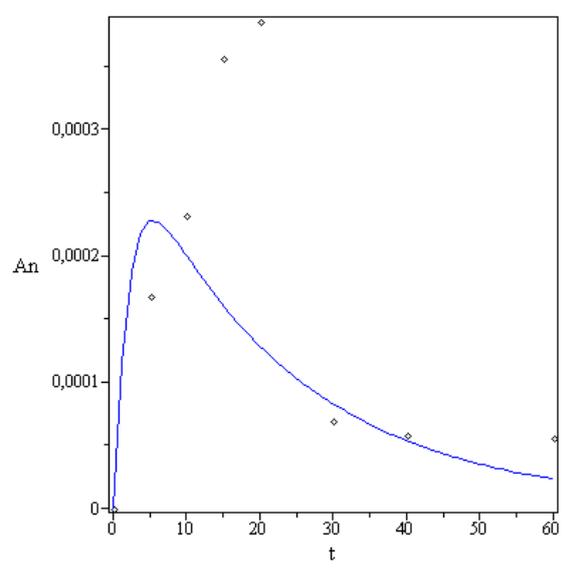
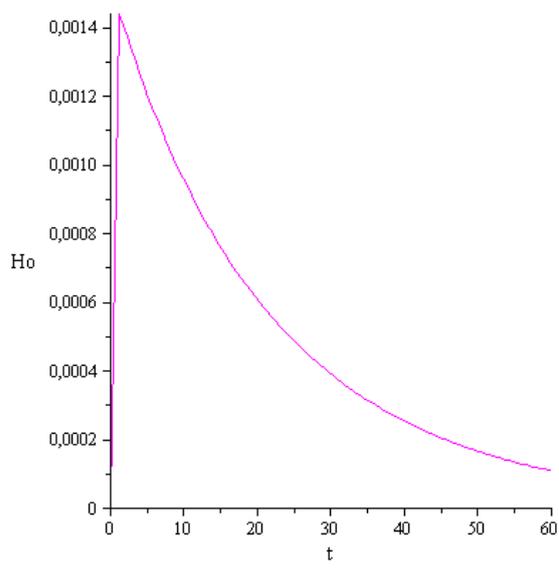
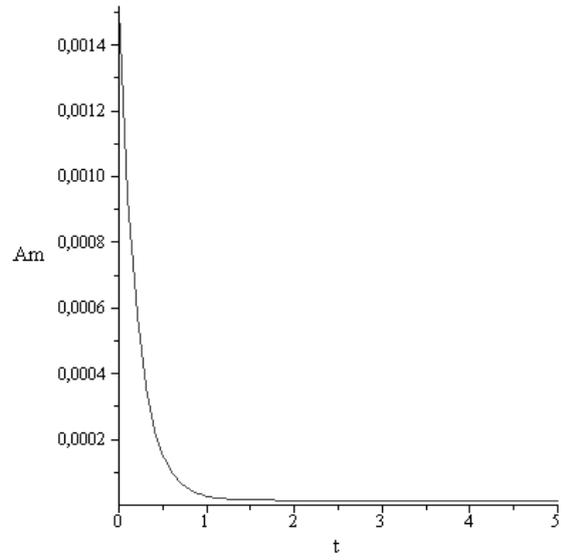
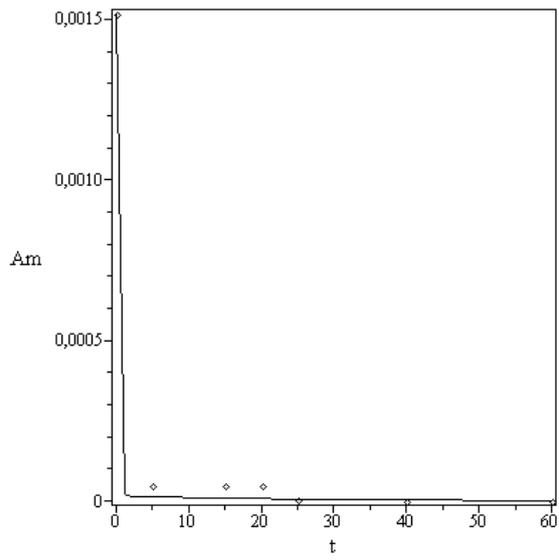
```

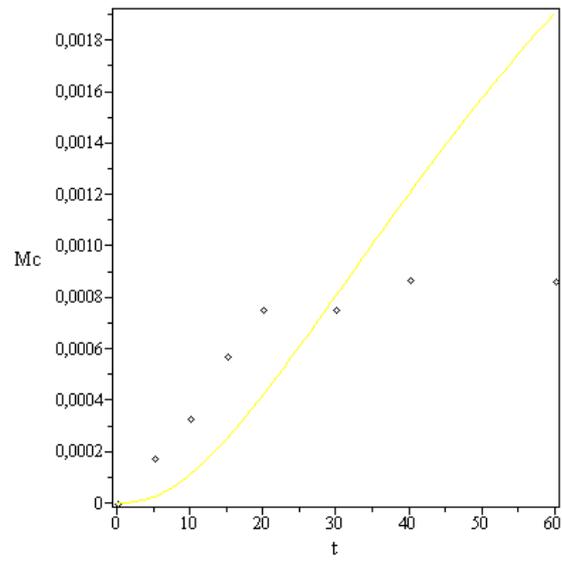
>C2:=pointplot({[0,.000007637],[5,.000008854],[10,.00000768
3],[15,.000005615],[20,.000004311],[30,.000002985],[40,.000
001633],[60,0]},axes = boxed):
>C3:=pointplot({[0,.001517],[5,.00004667],[15,.00004693],[2
0,.00004728],[25,.000004232],[40,0],[60,0]},axes = boxed):
>C4:=pointplot({[0,0],[5,.0001679],[10,.0002324],[15,.00035
63],[20,.0003857],[30,.00006997],[40,.00005852],[60,.000055
81]},axes = boxed):
>C5:=pointplot({[0,.001836],[5,.001530],[10,.002448],[15,.0
03978],[20,.003519],[30,.003906],[40,.004131],[60,.005508]}
,axes = boxed):
>C6:=pointplot({[0,0],[5,.0003607],[10,.0008279],[15,.00142
0],[20,.001925],[30,.002410],[40,.002450],[60,.001807]},axe
s = boxed):
>C7:=pointplot({[0,0],[5,.0001752],[10,.0003324],[15,.00057
47],[20,.0007519],[30,.0007538],[40,.0008680],[60,.0008638]
},axes = boxed):

>display({P1,C1});display({P2,C2});display({P3,C3});display
({P9});display(P4);display({P5,C4});display({P6,C5});displa
y({P7,C6});display({P8,C7});

```







ANEXO 5

ESPECTROS DOS COMPOSTOS PADRÃO OBTIDOS POR ESPECTRÔMETRO DE MASSAS ACOPLADO A CROMATÓGRAFO GASOSO

Espectros de massas dos compostos da rota de degradação do carbazol realizada pela bactéria *Sphingomonas* sp. GTIN11 possíveis de serem detectados em GC/MS e obtidos através de injeções no equipamento seguindo a programação descrita na seção III.2.2. A figura a) representa o espectro do padrão carbazol; b) do padrão ácido antranílico; c) do padrão catecol; e d) do padrão interno 1,7-dihidroxi naftaleno.

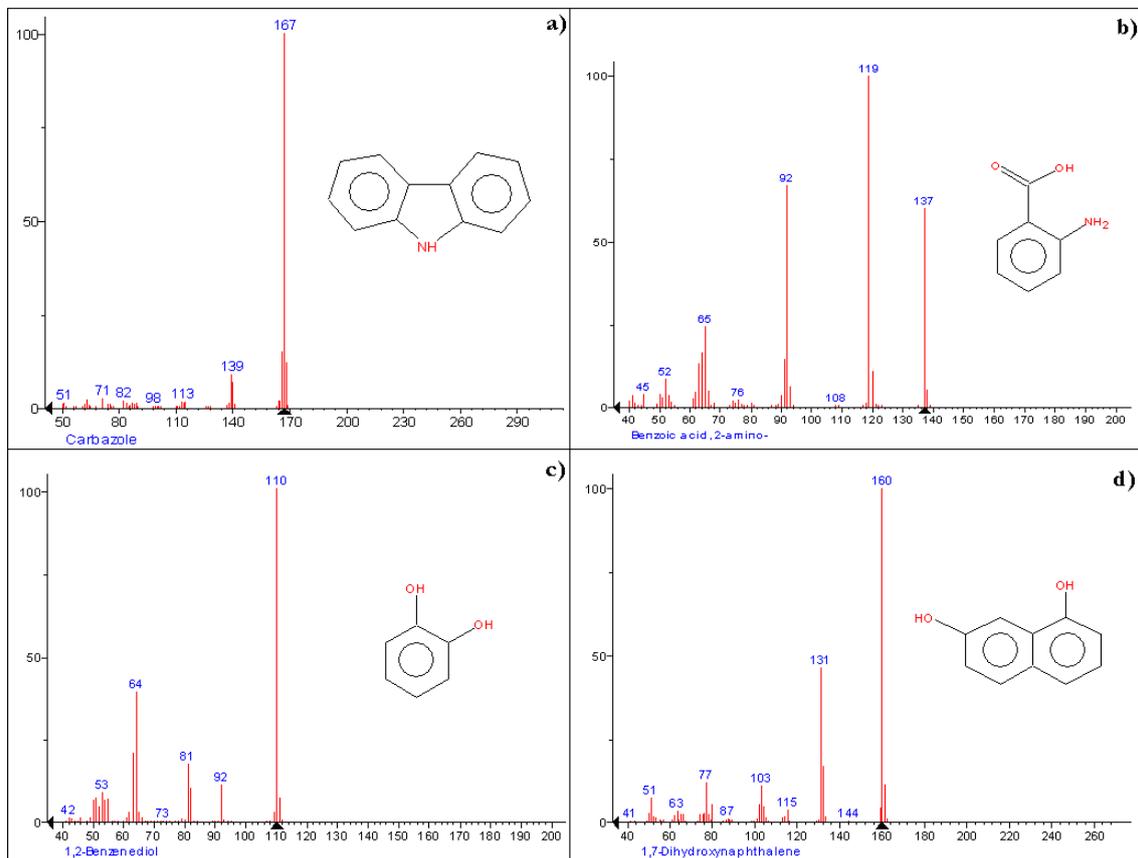


Figura VII.9: Espectros de massa do padrão interno e dos padrões da rota de degradação do carbazol.