''

Aline Ramos da Silva

**Biodegradação de hexaclorociclohexano
utilizando microrganismos e enzimas
desenhadas computacionalmente**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2013

Aline Ramos da Silva

**Biodegradação de hexaclorociclohexano
utilizando microrganismos e enzimas
desenhadas computacionalmente**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Maria Filomena de Andrade Rodrigues

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
da USP (BDTD)

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Aline Ramos da.

Biodegradação de hexaclorociclohexano utilizando microrganismos e enzimas desenhadas computacionalmente / Aline Ramos da Silva. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Filomena de Andrade Rodrigues.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biodegradação de pesticida.

Versão do título para o inglês: Biodegradation of hexachlorocyclohexane using microorganisms and computationally designed enzymes.

1. Biodegradação 2. Hexaclorociclohexano 3. Enzimas 4. Desenho computacional 5. *Sphingomonas* sp 6. Biorreatores I. Rodrigues, Profa. Dra. Maria Filomena de Andrade II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0211/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Aline Ramos da Silva.

Título da Tese: Biodegradação de hexaclorociclohexano utilizando microrganismos e enzimas desenhadas computacionalmente.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Filomena de Andrade Rodrigues.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3081.77330 - telefax : (55) (11) 3081-7438
e-mail: oep@lob.usp.br

Ilma. Sra. Aline Ramos da Silva
Instituto de Pesquisas Tecnológicas
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia-USP

Of.CEPSH.085.13

São Paulo, 21 de novembro de 2013.

Prezada Senhora,

Declaramos que o projeto intitulado: *"Biodegradação de Hexaclorociclohexano utilizando microrganismos e enzimas desenhadas computacionalmente"* sob a responsabilidade da aluna ALINE RAMOS DA SILVA e Orientadora Dr^a MARIA FILOMENA DE ANDRADE RODRIGUES, foi analisado na presente data, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação diretamente com seres humanos que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta comissão.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Aos meus pais, irmãos e avós que sempre acreditaram no meu trabalho, apoiaram-me nos momentos mais difíceis e vibraram comigo em todas as minhas conquistas. Amo vocês com todas as minhas forças!

Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria de Lourdes, minha inspiração e porto seguro, e ao meu pai, Luiz, sonhador e trabalhador incansável. Obrigada pelo amor incondicional, por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditava e por fazerem o máximo para me verem feliz!

Aos meus irmãos e sobrinho: Raphael, Daniele e Vitor, meus primeiros amigos e confidentes. Obrigada por me ensinarem como é maravilhoso ter irmãos e por me mostrarem que o tempo e a distância não mudam o amor e o companheirismo que nós temos! Ao meu cunhado, Gustavo Hauer, obrigada por fazer parte da nossa família!

Aos meus avós, Lázara e Benedito, por serem tão presentes na minha vida. Obrigada por terem escolhido viver perto da gente e terem se dedicado tanto ao nosso crescimento e educação!

Ao meu namorado, Victor E. Armini Caldas, meu parceiro de todas as horas, meu amor e meu amigo, minha dose diária de felicidade. Obrigada pela lealdade, pela ajuda na correção da minha tese e pela paciência nos momentos difíceis! Nós somos um time!

Aos queridos Alfredo Caldas e Rosangela Armini, por serem tão amáveis comigo, pela preocupação e pela força para que eu terminasse esta tese. Obrigada pelo carinho!

Às irmãs que a vida me deu: Mariana Fonte Boa, Gisele Medeiros, Diana Andreotti, Carol de Marchi, Martinha Lima, Flávia Sobrera, Roseli Salomoni e Andréia Novaga, por serem as melhores amigas que alguém pode ter! Obrigada pela amizade tão valiosa!

Às queridas Meiri Elem, Michele Silva, Nayana Camoleze, Saskia Poelman, Brenda Bley Folly, Patrícia Brondani, Cyntia Palacio e Cláudia Montans. Obrigada pelo carinho, ajuda e apoio ao longo do meu doutorado!

Aos meus amigos que, mesmo à distância, fizeram-se presentes: Bruno Zundt, Vilson Souza, Kaja Cyganik, Rodolfo Souza, Juan Pérez Valencia, Julio César (Barata), Meire Zancheta e Mônica Melina. Obrigada pela ajuda, conversas e conselhos!

Aos meus tios Eliana e Divaldo, por sempre me ampararem em São Paulo. Aos meus primos Jackeline Bernardo, Rodrigo Batista e Victor Ramos, pela amizade e companheirismo.

À minha orientadora no Brasil, Maria Filomena, pela oportunidade de trabalhar no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e por ajudar no meu trabalho. Às pesquisadoras do IPT: Rita de Cássia Paro Alli, Patrícia Léo, Elda Sabino da Silva e Débora Linhares, pela participação na primeira parte do meu doutorado.

Aos pesquisadores, funcionários e amigos do IPT: Sérgio Fernandes, Rosa Matsubara, Antônio Montemor, Aline Gonçalves, Caroline Mattos, Emílio e Vanessa, pela amizade e

ajuda em métodos e experimentos. Ao Valtinho, Eliza, Régis, Rosane, Alfredo, Marcelo Saad, Marília Moraes, Lúcia Félix, Neusa, Fabíola, Saturnino, Oliveira, Bete Mariano, Luís e Alice.

Ao meu orientador nos Países Baixos, Prof. Dick B. Janssen, pela genialidade com que conduz seu grupo de pesquisa, pela confiança no meu trabalho e por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Dr. Hein Wijma, Dra. Marleen Otzen, Robert Floor e Hesam Arabnejad, por me auxiliarem e ensinarem novas metodologias na segunda fase do meu doutorado. Obrigada por terem sido colegas de trabalho excepcionais e por vibrarem comigo a cada etapa realizada!

Ao Prof. Marco Fraaije e funcionários da Universidade de Groningen (RuG): Peter Jekel, Piet Wietzes, Christiaan Postema e Monique Smith.

Aos meus amigos em Groningen e colegas na RuG: Thai Nguyen, Marzena Krzek, Hanna Dudek, Matthew Heberling, Nikola Loncar, Dana Colpa, Alessandro Ferrari, Hugo van Beek, Tiago Nunes, Michiel Punter, Evelin Plötz, Jason Otterstrom e Noelia, Andrew e Stephanie, Joana Falcão Salles e Pim, Adriana Rezende e Alexandre. Obrigada por fazerem os meus dias em Groningen mais fáceis e felizes!

Ao Prof. Jack T. Trevors e Prof. Hung Lee por terem me recebido na Universidade de Guelph, Canadá, para estágio em biorremediação.

Ao Prof. Dr. Luiz Juliano Neto e Diego Magno Assis do Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela supervisão nos experimentos realizados com MALDI-TOF e à Prof. Dra Suzan Pantarotto Vasconcellos (UNIFESP –Diadema) pelas revisões da minha qualificação, do meu projeto no exterior e da minha tese final.

Ao meu orientador de mestrado, Prof. Michele Vitolo, por toda ajuda, amizade e apoio sempre presentes.

À coordenação e funcionários do Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP): Prof^a Ana Clara, Marcos Aurélio, Eliane e Fábia. Aos membros do Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas. Ao representante discente Mateus Luchese.

Ao Banco Nacional do Desenvolvimento (BNDES) pelo financiamento de dois anos do meu doutorado. Ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela oportunidade de ir para a Universidade de Groningen.

À Universidade de São Paulo pelo ensino gratuito e de qualidade.

A todos os meus familiares, amigos e outras pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and at the same time share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful.”

Marie Curie.

RESUMO

Silva AR. Biodegradação de hexaclorociclohexano utilizando microrganismos e enzimas desenhadas computacionalmente. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Hexaclorociclohexano (HCH), pesticida organoclorado, foi mundialmente utilizado até a década de 1970. Muitos países restringiram o uso por conta dos efeitos tóxicos à saúde humana e problemas ambientais, entretanto, ainda sofrem com a poluição de solos e águas. O HCH é uma mistura dos isômeros (α , β , γ , δ), produzidos pela cloração do benzeno em presença de luz UV. Obter a biodegradação deste composto é importante para reduzir a exposição de pessoas à contaminação e despoluir o meio ambiente. As bactérias degradadoras de HCH mais conhecidas são as *Sphingomonas* sp (anteriormente caracterizadas como *Pseudomonas*) que apresentam metabolismo aeróbio e foram encontradas em áreas contaminadas. Técnicas de biodegradação foram estudadas nesta tese, realizada em duas etapas. A primeira etapa focou na biorremediação por microrganismos autóctones ao solo contaminado, proveniente de Santo André (São Paulo – Brasil), e foi desenvolvida em biorreatores descontínuos no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). O solo foi submetido à contagem microbiana em placas, o que resultou em $2,4 \times 10^6$ UFC/g de solo após 48 h de incubação. Experimentos realizados nas fases sólida e semi-sólida mostraram que esta última atingiu em torno de 90% de degradação do HCH total após 6,5 meses de teste. Na segunda etapa, na Universidade de Groningen (RuG), Países Baixos, a biodegradação ocorreu em fase líquida. Soluções contaminadas foram tratadas por enzimas selvagens (controles) e variantes desenhadas computacionalmente. Cinco mutantes foram construídas, expressadas e purificadas. Técnica de ThermoFluor® mostrou que todas as enzimas estavam enoveladas. Os testes enzimáticos, em solução aquosa com o isômero β -HCH, receberam 5% de dimetil sulfoxido (DMSO) para melhorar a diluição do substrato. As amostras foram extraídas com acetato de etila e analisadas por cromatografia gasosa (CG), usando um detector de captura de elétrons (ECD). Todas as mutantes apresentaram menor atividade na catálise de β -HCH quando comparadas às enzimas selvagens, porém foram bem sucedidas na degradação de 1 – bromopropano.

Palavras-chave: Biodegradação. Hexaclorociclohexano. Enzimas. Desenho computacional.

Sphingomonas sp. Biorreatores.

ABSTRACT

Silva AR. Biodegradation of hexachlorocyclohexane using microorganisms and computationally designed enzymes. [Ph. D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Hexachlorocyclohexane (HCH), an organochlorine pesticide, was widely used world-wide until the 1970s. Most countries restricted its use since it is toxic to human health and causes environmental problems. However, these nations are still suffering with the pollution of soil and water. The pesticide is a mixture of isomers (α , β , γ , δ) produced by the chlorination of benzene in the presence of UV light. Obtaining biodegradation of HCH is important to reduce the exposure of people to contaminated areas and to treat the environment. The most well-known HCH-degrading bacteria are members of the genus *Sphingomonas* sp (formally *Pseudomonas*) which have aerobic metabolism and were found in upland contaminated fields. Biodegradation techniques were studied in this work, which is divided in two parts. The first one focused on the bioremediation using microorganisms endogenous to a contaminated soil, from Santo Andre (Sao Paulo – Brazil), in discontinuous bioreactors at the Institute for Technological Research (IPT). The soil was plated and presented 2.4×10^6 CFU/g of soil after 48 h of incubation. Experiments were carried in solid and slurry phases and the results showed that the last one achieved degradation around 90% of the total HCH after 6.5 months. The second part, at the University of Groningen (Rug), The Netherlands, biodegradation in liquid phase was investigated. Contaminated solutions were treated using wild-type enzymes (controls) and mutated variants computationally designed. Five mutants were constructed, expressed and purified. Thermofluor® assays showed that all the mutated enzymes were well folded. Enzymatic assays were carried in aqueous solution with β -HCH and 5% of dimethyl sulfoxide (DMSO), to improve the dissolving of the substrate. The samples were extracted with ethyl acetate and analysed by gas chromatography (GC) using an electron capture detector (ECD). All the mutated enzymes were slightly active in the catalysis of β -HCH when compared to wild-type enzymes, and succeeded in the degradation of 1-bromopropane.

Keywords: Biodegradation. Hexachlorocyclohexane. Enzymes. Computational design. *Sphingomonas* sp. Bioreactors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGAMA – Agrupamento de Geologia Aplicada ao Meio Ambiente
ATSRD – Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento
BTE – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETAE – Centro de Tecnologias Ambientais e Energéticas
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CG – Cromatografia Gasosa
CMQ – Centro de Metrologia em Química
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica
ECD – Detector de Captura de Elétrons
EPA – Environmental Protection Agency
ExPASy – Expert Protein Analysis System
GBB – Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute
HCH – Hexaclorociclohexano
IARC – International Association for Research on Cancer
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas
IRFM – Indústrias Reunidas Francisco Matarazzo
LB – Luria Bertani
LDM – Limite de Detecção do Método
LinB - haloalcano desalogenase LinB
LQP – Limite de Quantificação Praticável
LRAC – Laboratório de Resíduos e Áreas Contaminadas
MALDI-TOF/MS – Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry
MMY – Meio Mineral sem Cloro
NAC – Near Attack Conformation
NCBI – National Center for Molecular Biology Information
OGM – Organismos Geneticamente Modificados
PDSE – Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
POPs - Poluentes Orgânicos Persistentes
RuG – Rijksuniversiteit Groningen (Universidade de Groningen)
SDS-PAGE – Dodecil-Sulfato de Sódio - Gel de Poliacrilamida
Simulações MD – Simulações de Dinâmica Molecular
SVE – Soil Vapor Extraction
TB – Terrific Broth
TSA – Tryptic Soy Agar
TSB – Tryptic Soy Broth
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
USP – Universidade de São Paulo
VORs – Valores Orientadores de Referência

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem
 μM – micromol
1,2,4 – TCB – 1,2,4-triclorobenzeno
2,5 – DCHQ – 2,5 – diclorohidroquinona
2,5 – DDOL – 2,5 – dicloro- 2,5 – ciclohexadieno – 1,4 – diol
Ala – Alanina A
ALA-D – ácido delta-aminolevulínico desidratase
AN – a cetonitrila
AraC – operon arabinose
Arg – Arginina R
Asn – Asparagina N
Asp – Aspartato D
atm – atmosfera (unidade de pressão)
bp – par de bases
cm – centímetro
Cys ou Cis – Cisteína C
d(RFU) – primeira derivada da fluorescência
Da – Daltons
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
dT – derivada da temperatura
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
 Fe^{0-} ferro zero valente
g – grama
G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA – Ácido gama-aminobutírico
Gln – Glutamina Q
Glu – Glutamato E
Gly ou Gli – Glicina G
GR – glutathione redutase
GSTs – Glutathione S-transferases
h – horas
His – Histidina H
Hz*s – unidade de área de pico apresentada em cromatografia gasosa
Ile – Isoleucina I
in silico – “em ou através de uma simulação computacional”
kb – quilo pares de bases
 k_{cat} – constante catalítica
KDa – Quilodaltons
Kg – quilo
 K_M - constante de Michaelis
L – litro
Leu – Leucina L
Lys ou Lis – Lisina K
m – metro
M – mol
mesh – medida de filtros

Met – Metionina M
mg – miligrama
Milímetro de mercúrio – mmHg
min – minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimol
N – Normal
nm – nanômetro
°C – graus Celsius
pBAD/*Myc*-HisA – vetor de expressão
PCCOH ou PCHL – 2,3,4,5,6-pentaclorociclohexanol
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PDA – Potato Dextrose Agar
pEX-A – vetor de propagação
pH – potencial hidrogeniônico
Phe ou Fen – Fenilalanina F
Pro – Prolina P
PVC – policloroeteno
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotação por minuto
Ser – Serina S
*Si*LinB - LinB *indicum*
*Sj*LinB – LinB *japonicum*
SNC – Sistema nervoso central
TCCH-1,4-DOH ou TCDL – 2,3,5,6-tetraclorociclo-1,4-diol
TFA – ácido trifluoroacético
Thr ou The – Treonina T
Trp ou Tri – Triptofano W
Tyr ou Tir – Tirosina Y
UBA – Umweltbundesamt (Agência Nacional de Biomonitoramento da Alemanha)
UV – ultravioleta
V – velocidade
v/v – volume/volume
Val – Valina V
Vmax – velocidade máxima
 α -HCCA – ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
ng – nanograma
 μ g – micrograma
 μ L – microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas de isômeros do HCH, incluindo os dois α -enantiômeros.	24
Figura 2 – Efeitos toxicológicos dos isômeros de HCH.....	27
Figura 3 – Área contaminada descrita pela CETESB e objeto de estudo deste trabalho. Legenda: A1 - Área 1 – condomínios; A2 - Área 2 – células com solo contaminado, A3 - Área 3 – entorno imediato das células; A4 - Área 4 – aterro de inertes.....	29
Figura 4 – Bioestimulação da microbiota em solo e água subterrânea contaminados.	31
Figura 5 – Mapa de degradação do γ -Hexaclorociclohexano.	33
Figura 6 – Esquema catalítico realizado pela desalogenase LinB.....	36
Figura 7 – Esquema simplificado da montagem de um reator descontínuo para ensaio através do método respirométrico. Fonte: Verechia (2008).....	46
Figura 8 – Sistema de biorremediação utilizado para avaliação da biodegradabilidade do solo contaminado.	46
Figura 9 – Amostras de solo contaminado para cromatografia retiradas dos frascos de cada condição a ser testada no ensaio de biodegradação.....	47
Figura 10 – Microcosmos de diferentes condições acoplados ao respirômetro (Micro-oxymax®).....	50
Figura 11 – Programa de PCR para amplificação do gene LinB.	55
Figura 12 – Vetor pEX-A contendo o gene SiLinB e resistência à ampicilina.....	57
Figura 13 – Sequência de métodos computacionais realizados e sustentados por evolução direta.	59
Figura 14 – Programa de PCR para amplificação dos genes nas mutações sítio dirigidas.	60
Figura 15 – Diversidade microbiana encontrada na amostra de solo contaminado com HCH. Nas fotos A, B e C, o crescimento dos microrganismos ocorreu em meio TSA. Nas fotos D, E e F, em meio PDA e, em G, H e I, em meio Cetrimid.....	67
Figura 16 – Placas com colônias de fungos presentes no solo contaminado por HCH cultivados em PDA.....	68
Figura 17 – Condições do solo contaminado pré (A) e pós (B) secagem e peneiramento em condições controladas de temperatura e umidade	68
Figura 18 – Placas com bactérias (1, 2 e 4) e levedura (3) resistentes a HCH, cultivadas em TSA e selecionadas para ensaio de biodegradação.	70
Figura 19 – Placa com fungos filamentosos resistentes a HCH, cultivados em PDA e selecionados para ensaio de biodegradação.....	70

Figura 20 – Crescimento fúngico em placas contendo: meio PDA (A), em ágar com bagaço tratado (B) e em ágar com bagaço sem tratamento (C).	71
Figura 21 – Concentração de HCH presente no solo contaminado durante o ensaio sólido nas condições 1, 2 e 3.	74
Figura 22 – Concentração de HCH presente no solo contaminado durante o ensaio sólido nas condições 6, 7 e 8.	74
Figura 23 – Concentração microbiana inicial e final nos microcosmos de biorremediação em meio sólido.	75
Figura 24 – Respiração dentro nos microcosmos, medida da concentração de CO ₂ (mg) através do tempo (dias), nas condições de 0 a 8.	76
Figura 25 – Diversidade de microrganismos encontrada no solo durante ensaio em meio semi-sólido, sendo: 1 - controle; 2 – bioaugmentação; 3 – bioestimulação; 4 – bioaugmentação e bioestimulação; 5 – bioestimulação e fonte de carbono (glicose).	77
Figura 26 – Perfil de variação de pH observado durante ensaio em meio semi-sólido, sendo: C1 - controle; C2 – bioaugmentação; C3 – bioestimulação; C4 – bioaugmentação e bioestimulação; C5 – bioestimulação e fonte de carbono (glicose).	78
Figura 27 – Perfil microbiano durante os 196 dias de experimento em meio semi-sólido, sendo: C1 - controle; C2 – bioaugmentação; C3 – bioestimulação; C4 – bioaugmentação e bioestimulação; C5 – bioestimulação e fonte de carbono (glicose).	79
Figura 28 – Perfil de degradação de HCH total em ensaio em meio semi-sólido. Valores de concentrações inicial e final (após 196 dias de experimento). Destaque para as porcentagens de redução do pesticida.	79
Figura 29 – Valores acumulados totais de CO ₂ (mg) liberado por cada condição ao longo de 25 dias (600 h). Os números à direita das curvas representam as condições de ensaio, sendo: 1 – controle; 2 – produto comercial Bioclean; 3 – produto comercial EHC; 4 – bioaugmentação; 5 – bioaugmentação e fonte de carbono (glicerol).	80
Figura 30 – Concentrações microbiana e de HCH inicial e final nas condições de 1 a 5 do ensaio em respirômetro, sendo: C1 – controle; C2 – Bioclean®; C3 – EHC®; C4 – bioaugmentação; C5 – bioaugmentação e fonte de carbono (glicerol).	81
Figura 31 – Perfil cromatográfico (MALDI-TOF/MS) da bactéria <i>Cupriavidus necator</i>	84
Figura 32 – Árvore filogenética de identificação.	86
Figura 33 – Gel de agarose com produto de PCR das colônias do consórcio. Banda do gene LinB (761 bp) em <i>S. japonicum</i> e ausência da mesma nas bactérias do consórcio.	87

Figura 34 – Gel de agarose com produto de PCR após extração total de DNA. Banda do gene LinB (761 bp) em <i>S. japonicum</i> e possível presença em D1.....	88
Figura 35 – Gel de agarose com produtos de digestões dos vetores utilizando enzimas de restrição. A primeira coluna apresenta o marcador, a segunda mostra o plasmídeo pBAD/Myc-HisA aberto (4 kb) e a terceira, o vetor pEX-A (2,45 kb) e o inserto (962 bp)....	89
Figura 36 – Esquema do produto esperado da clonagem do inserto (SiLinB) no vetor de expressão pBAD/Myc-HisA.....	89
Figura 37 – Sítio-ativo da enzima SjLinB com o substrato β -HCH (cor magenta) que serviu de modelo estrutural para SiLinB durante desenho computacional.	91
Figura 38 – Sítio-ativo da enzima SiLinB com o substrato β -HCH (cor magenta) durante desenho computacional.....	92
Figura 39 – Variante mutante 1 durante desenho computacional apresentando as três mutações propostas em vermelho: fenilalanina (L138F), leucina (I211L) e alanina (L248A).93	
Figura 40 – Variante mutante 2 durante desenho computacional apresentando a quatro mutações propostas em vermelho: triptofano (F169W), metionina (V173M), leucina (I211L), alanina (L248A).....	94
Figura 41 – Variante mutante 3 durante desenho computacional apresentando as cinco mutações propostas em vermelho: metionina (L138M), triptofano (F169W), metionina (V173M), leucina (I211L) e valina (L248V).....	95
Figura 42 – Variante mutante 4 durante desenho computacional apresentando as quatro mutações propostas em vermelho: metionina (L138M), triptofano (F169W), leucina (I211L) e valina (L248V).	96
Figura 43 – Variante mutante 5 durante desenho computacional apresentando as quatro mutações propostas em vermelho: isoleucina (L138I), triptofano (F169W), metionina (V173M), leucina (I211L), alanina (L248A).....	97
Figura 44 – Enzima mutante nº 1 apresentando três mutações.	98
Figura 45 – Enzima mutante nº 2 apresentando quatro mutações.	98
Figura 46 – Enzima mutante nº 3 apresentando cinco mutações.	99
Figura 47 – Enzima mutante nº 4 apresentando quatro mutações.	99
Figura 48 – Enzima mutante nº 5 apresentando cinco mutações.	100
Figura 49 – Gel de SDS-PAGE com as enzimas purificadas: SiLinB (controle) e mutantes (1 a 5). A primeira coluna apresenta o marcador de referência Page Ruler™.	101
Figura 50 – Estabilidade térmica das enzimas controle SiLinB e SjLinB. Determinação das temperaturas aparentes de desnaturação por Thermofluor®.....	102

Figura 51 – Estabilidade térmica das enzimas mutantes 1, 2 e 5. Determinação das temperaturas aparentes de desnaturação por ThermoFluor®.....	102
Figura 52 – Estabilidade térmica das enzimas mutantes 3 e 4. Determinação das temperaturas aparentes de desnaturação por ThermoFluor®.....	103
Figura 53 – Calibração da concentração de β -HCH (μ M) dissolvido em tampão Tris-SO ₄ (pH8,2) e extraído com hexano.	104
Figura 54 – Calibração da concentração de β -HCH (μ M) dissolvido em tampão Tris-SO ₄ (pH8,2) e extraído com hexano. Valores da área do pico de β -HCH e de β -HCH (μ M).	104
Figura 55 – Perfil cromatográfico de β -HCH (t= 23,6 min) e padrão interno 1,2,4- TCB (t= 10,9 min) extraídos de solução aquosa por hexano. Coluna utilizada: <i>Chirasil-L-Val</i>	107
Figura 56 – Calibração da concentração de β -HCH (μ M) dissolvido diretamente em acetato de etila. Aumento das áreas dos picos de β -HCH.....	108
Figura 57 – Calibração da concentração de β -HCH (mg/L) dissolvido diretamente em acetato de etila. Aumento das áreas dos picos de β -HCH.....	108
Figura 58 – Calibração da concentração de β -HCH (μ M) dissolvido em DMSO (5%) e tampão PBSG. Extração feita com acetato de etila.....	110
Figura 59 – Calibração da concentração de β -HCH (μ M) dissolvido em DMSO (5%) e tampão PBSG, extração feita com acetato de etila.....	110
Figura 60 – Produtos da degradação de β -HCH: PCHL (t = 11,771 min) e TCDL (t = 11,582 min) aos 3 min de reação enzimática com <i>SiLinB</i>	111
Figura 61 – Produtos da degradação de β -HCH: PCHL (t = 11,771 min) e TCDL (t = 11,582 min) aos 20 min de reação enzimática com <i>SiLinB</i>	111
Figura 62 – Degradação de β -HCH pela enzima <i>SiLinB</i> . Extração com hexano e cromatografia gasosa utilizando coluna <i>Chirasil-L-Val</i>	109
Figura 63 – Degradação de β -HCH pela enzima <i>SjLinB</i> . Extração com hexano e cromatografia gasosa utilizando coluna <i>Chirasil-L-Val</i>	109
Figura 64 – Degradação total de β -HCH pela enzima <i>SiLinB</i> , com formação dos produtos PCHL e TCDL. A equação de regressão linear é: $y = 38.901x + 30.506$ ($r^2=0,99$), na qual 38,901 é a taxa de formação de TCDL por minuto.	111
Figura 65 – Degradação total de β -HCH pela enzima <i>SjLinB</i> , com formação dos produtos PCHL e TCDL. A equação de regressão linear é: $y = 0,505x - 1.9036$ ($r^2=0,94$), na qual 0,505 é a taxa de formação de TCDL por minuto.	111
Figura 66 – Degradação de β -HCH (μ M/min) utilizando as enzimas mutantes 1 a 5.....	112
Figura 67 – Curva de calibração para quantificação da concentração de Br ⁻ (mM).....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades químicas dos isômeros de HCH.....	25
Tabela 2 – Formas de apresentação e tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nas diferentes condições de tratamento do solo com HCH.....	43
Tabela 3 – Compostos químicos e concentração utilizada para meio mineral.....	44
Tabela 4 – Descrição das condições de degradação testadas no ensaio de biorremediação do solo contaminado.....	48
Tabela 5 – Condições e preparação do ensaio em meio semi-sólido	49
Tabela 6 – Condições para o teste de biodegradabilidade do solo contaminado com HCH sendo acompanhado por Micro-Oxymax®.	50
Tabela 7 – Protocolos para digestão dos vetores de expressão e de propagação.	54
Tabela 8 – Protocolos para digestão dos vetores de expressão e de propagação.	58
Tabela 9 – Protocolo para ligação do inserto no plasmídeo de expressão.	58
Tabela 10 – Protocolo para realização da PCR nas mutações sítio dirigidas.	60
Tabela 11 – Oligonucleotídeos sense e anti-sense usados em rodadas de PCR para a realização de mutações sítio dirigidas.	61
Tabela 12 – Soluções utilizadas para calibração da quantificação de β -HCH no primeiro método de cromatografia com hexano.....	64
Tabela 13 – Soluções utilizadas para calibração (a) da quantificação de β -HCH.....	64
Tabela 14 – Quantificação dos isômeros de HCH no solo contaminado.	69
Tabela 15 – Concentração microbiana do bagaço in natura.	71
Tabela 16 – Valores de pH das condições do ensaio de biorremediação do HCH.....	72
Tabela 17 – Descrição das condições de ensaio de biorremediação usando bioaugmentação e bioestimulação.....	73
Tabela 18 – Resultados da inspeção de microrganismos por técnica de MALDI-TOF/MS (seis réplicas).	83
Tabela 19 – Variação do resultado (score value) e sua correlação com a inspeção dos microrganismos.	83
Tabela 20 – Relatório apresentando as cinco espécies semelhantes à bactéria analisada.	85
Tabela 21 – Mutações propostas por desenho computacional baseando-se em resultados do NAC (%).	90
Tabela 22 – Taxas de degradação de β -HCH pelas enzimas controle e variantes mutantes.	112

Tabela 23 – Atividades específicas das enzimas controle e variantes mutantes na degradação de 1-bromopropano.	115
Tabela A.1 – Compostos acima ou próximos dos VORs nas células.	136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Legislação vigente no Brasil e área contaminada estudada neste trabalho	27
2.2 Modelos de Remediação	29
2.3 Biorremediação: modelo escolhido	31
2.4 Enzima haloalcano desalogenase (LinB)	34
2.5 Desenho Computacional da enzima LinB	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
3.2.1 Primeira fase	38
3.2.2 Segunda fase.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Metodologia realizada na primeira fase do doutorado (Brasil)	40
4.1.1 Concentração e diversidade microbiana nas amostras de solo contaminado	41
4.1.2 Seleção dos microrganismos resistentes ao HCH e com potencial de biodegradação	42
4.1.3 Preparo de bagaço de cana-de-açúcar e caracterização da microbiota para uso no ensaio de biorremediação	42
4.1.4 Preparo do consórcio de microrganismos para bioaugmentação.....	43
4.1.5 Solução nutriente (meio mineral) utilizada nas condições de bioestimulação	43
4.1.6 Ensaio de biodegradabilidade do solo contaminado: biorremediação por bioaugmentação e bioestimulação em meio sólido.....	44
4.1.7 Ensaio de biodegradação com solo em fase de lama (semi-sólido).....	48
4.1.8 Ensaio em Respirômetro (Micro-Oxymax®) utilizando produtos comerciais de biorremediação	49
4.1.9 Tolerância de consórcio isolado do solo contaminado ao HCH em meio líquido.....	51
4.1.10 Inspeção dos microrganismos do consórcio por MALDI-TOF/MS	51
4.2 Metodologia realizada na segunda fase do doutorado (Países Baixos).....	52
4.2.1 Liofilização e reativação dos consórcios bacterianos	52
4.2.2 Identificação de bactéria por sequenciamento de rDNA 16S	53
4.2.3 Rastreamento do gene LinB através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	53
4.2.4 Sequenciamentos	55

4.2.5 Preparação de células CaCl_2 -competentes a partir de <i>E. coli</i> Top 10 e transformação bacteriana.....	55
4.2.6 Desenho de plasmídeo com gene <i>LinB</i> selvagem (de <i>Sphingobium indicum</i>)	56
4.2.7 Clonagem gênica.....	56
4.2.8 Desenho computacional das enzimas mutantes a partir de linhagem selvagem de <i>Sphingobium indicum</i>	59
4.2.9 Mutações sítio dirigidas	60
4.2.10 Expressão e purificação de proteínas	61
4.2.11 Desnaturação protéica	62
4.2.12 Equação de calibração para análise de β -HCH e metodologia da cromatografia gasosa	63
4.2.13 Ensaios enzimáticos para degradação de β -HCH.....	65
4.2.14 Ensaios enzimáticos para degradação de 1-bromopropano e verificação da atividade enzimática das variantes mutantes e das enzimas controle	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Primeira fase (Brasil)	67
5.1.1 Concentração e diversidade microbiana nas amostras de solo contaminado com HCH	67
5.1.2 Seleção dos microrganismos resistentes ao HCH e com possível potencial de biodegradação	69
5.1.3 Caracterização da microbiota no bagaço de cana de açúcar para uso no ensaio de biorremediação	70
5.1.4 Ensaio de biodegradabilidade do solo contaminado através de biorremediação, utilizando as técnicas de bioestimulação e bioaumentação	71
5.1.5 Ensaio em meio semi-sólido (fase lama).....	76
5.1.6 Ensaio em Respirômetro (Micro-Oxymax®) utilizando produtos comerciais de biorremediação	80
5.1.7 Tolerância de consórcio isolado do solo contaminado ao HCH em meio líquido	81
5.1.8 Inspeção dos microrganismos do consórcio por MALDI-TOF/MS	82
5.2 Segunda fase (Países Baixos)	85
5.2.1 Reativação dos consórcios bacterianos.....	85
5.2.2 Identificação de bactéria por técnica convencional de biologia molecular 16S	85
5.2.3 Rastreamento do gene <i>LinB</i> através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	86

5.2.4 Clonagem gênica.....	88
5.2.5 Desenho computacional das enzimas mutantes a partir de linhagem selvagem de <i>Sphingobium indicum</i>	90
5.2.6 Mutações sítio dirigidas	98
5.2.7 Expressão e purificação de proteínas.	100
5.2.8 Desnaturação proteica por Thermofluor®	101
5.2.9 Equações de calibração para análise de β -HCH	103
5.2.10 Ensaio enzimático para degradação de β -HCH	108
5.2.11 Ensaio enzimático para degradação de 1-bromopropano e verificação da atividade enzimática das variantes mutantes e das enzimas controle	114
6 CONCLUSÕES.....	116
REFERÊNCIAS	117
APÊNDICE A – Alinhamento LinB <i>japonicum</i> e LinB <i>indicum</i>	125
APÊNDICE B – Sequências de D1	126
APÊNDICE C – Sequência encomendada à empresa Eurofins.	129
ANEXO A – Relatório CETESB de dezembro/2010	130
ANEXO B – Fragmento do Relatório Técnico do IPT/BNDES Nº 117 893-205 45/269	131
ANEXO C – Fragmento do Relatório Técnico do IPT/BNDES Nº 117 893-205 45/269	134

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e a maior demanda por alimentos impulsionaram o desenvolvimento da agricultura intensiva, bem sucedida nas últimas décadas devido ao uso de: insumos agrícolas, fertilizantes, pesticidas, variedades de alto rendimento e organismos geneticamente modificados (OGM). Um dos inseticidas mais utilizados na agricultura nas décadas de 1960 a 1980 foi o hexaclorociclohexano (HCH) (Heeb et al., 2014; Rubinos et al., 2007), especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde houve maior incentivo à atividade agrícola para a exportação de matérias-primas (Chowdhury et al., 2008; Polti et al., 2014).

O uso contínuo de agrotóxicos gera o acúmulo destas substâncias e de seus subprodutos nos ecossistemas de solos e águas. Bactérias, fungos, algas e protozoários dão uma valiosa contribuição através do seu papel catabólico primordial na degradação de substâncias tóxicas e na ciclagem dos nutrientes. Pesticidas que interrompem as atividades destes microrganismos podem afetar a qualidade dos ecossistemas e causar graves consequências ecológicas (Dua et al., 2002; Semple et al., 2001).

No atual contexto ambiental, o gerenciamento de recursos naturais e a destinação de resíduos sólidos tornou-se caso de saúde e segurança públicas. Alguns temas vieram à tona, como: a degradação de pesticidas, a eficácia no controle da praga, a exposição de organismos não alvos, a infertilidade de solos, a contaminação de águas, os riscos às saúdes humana e ambiental (Hafez; Theimann, 2003; Zhu et al., 2004). Baseando-se nas preocupações atuais, este trabalho investigou métodos de biodegradação de HCH, os quais são considerados pouco agressivos ao meio ambiente. Na primeira fase, no Brasil, uma área contaminada por HCH (ítem 2.1 e ANEXO B) forneceu o solo utilizado nos estudos da microbiota e da biorremediação em reatores. Na segunda fase, nos Países Baixos, microrganismos biodegradadores do pesticida forneceram enzimas para a modelagem computacional de variantes mutantes. Testes realizados em soluções aquosas contaminadas avaliaram o uso potencial de enzimas em processos de recuperação ambiental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Hexaclorociclohexano ($C_6H_6Cl_6$) é um nome usado coletivamente para os isômeros de 1, 2, 3, 4, 5, 6 – HCH, denotado pelas letras gregas α , β , γ , δ , diferindo em seu padrão de substituição axial-equatorial na estrutura química (Lal et al., 2006). A figura 1 apresenta os isômeros mais abundantes no produto comercial de HCH, o popular BHC® (*Imperial Chemical Industries*, Grã-Bretanha).

Figura 1 – Estruturas de isômeros do HCH, incluindo os dois α -enantiômeros.

Fonte: Modificado de Phillips (2004).

A produção do pesticida dá-se por cloração do benzeno de forma não específica, conduzindo à mistura de vários isômeros. Sua composição centesimal é de 65 - 70% para o isômero α ; 7-10% para o β ; 14-15% para o γ ; 7% para o δ e 1- 2% para impurezas e

subprodutos. A tabela 1 apresenta algumas características dos diferentes isômeros. Dentre os isômeros, o γ -HCH, conhecido como lindano, é o que possui maior propriedade inseticida e o β -HCH é o mais persistente no ambiente, por possuir uma configuração mais estável que dificulta a degradação da molécula (Willet et al., 1998). O HCH faz parte da lista de poluentes orgânicos persistentes (POPs) da Convenção de Estocolmo, tratado internacional que banuiu o uso deste organoclorado em 52 países, incluindo o Brasil.

Tabela 1 – Propriedades químicas dos isômeros de HCH.

Propriedades químicas	HCH Isômeros			
	α (alfa)	β (beta)	γ (gama)	δ (delta)
CAS #	319-84-6	319-85-7	58-89-9	319-86-8
Massa molar (g/mol)	290,83			
Cor	branco			
Estado físico (a 25 °C)	Sólido cristalino, primas monoclinicos	Sólido cristalino	Sólido cristalino, primas monoclinicos	Placas finas
Ponto de fusão (°C)	159-160	314-315	112,5	141-142
Ponto de ebulição (°C)	288 (760 mmHg)	60 (0,5 mmHg)	323 (760 mmHg)	60 (0,4 mmHg)
Densidade (g/cm ³)	1,9 (20 °C)	1,9 (19 °C)	1,9 19 °C)	sem dados
Solubilidade em água (mg/L)	10	5	17	10
Solubilidade em solventes orgânicos	1,8g/100g etanol; 6,2g/100g éter	1,1g/100g etanol; 1,8g/100g éter; 1,9/100g benzeno	6,4g/100g etanol; 20,8g/100g éter; 28,9/100g benzeno	24,4g/100 g etanol; 35,4g/100 g éter; 41,4g/100 g benzeno

Fonte: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1999).

A exposição ao HCH traz riscos substanciais à saúde de humanos e de outros animais, como apresentado na Figura 2. Estudos apresentados pela ATSDR (1999) mostram que a ingestão de 0,2 a 0,3 mg/L de HCH em alimentos, durante 14 dias em média, já seriam suficientes para causar danos a saúde. Os isômeros são bem absorvidos pelas vias digestiva e dérmica, depositando-se no tecido adiposo a uma taxa de 150 a 200 vezes maior do que no sangue. Em seres humanos, esses compostos podem ser encontrados no plasma, no soro, no tecido adiposo e no leite materno (Ministério da Saúde, 2002).

No Brasil, um incidente que ficou bastante conhecido foi o da fábrica que produzia HCH (grau técnico), pertencente ao antigo Instituto de Malariologia, então Ministério da Educação e Saúde. Localizada na Cidade dos Meninos (Duque de Caxias, RJ), a fábrica foi desativada em 1955, porém toneladas de produto e de seus resíduos foram abandonadas no local. A ação das intempéries, assim como a movimentação de centenas de pessoas, provocaram a disseminação do lixo tóxico. Um estudo realizado pelo Ministério da Saúde (2002) avaliou a contaminação de HCH no leite materno de mulheres que viviam próximas ao local da contaminação. Observou-se a presença de HCH em taxas até mil vezes superiores às doses de referência usadas pela Agência Nacional de Biomonitoramento da Alemanha (Umweltbundesamt - UBA).

Richardson e colaboradores (2009) afirmam que o desenvolvimento da doença de Parkinson pode estar relacionado a altos níveis de β -HCH no sangue. Amostras de sangue de pacientes foram analisadas e verificou-se a presença de organoclorados, sendo o β -HCH detectado em 76% dos pacientes doentes, ao passo que no grupo controle, o isômero foi encontrado em 40% dos indivíduos.

Solos impactados por HCH representam ameaças potencialmente graves, pois embora a contaminação possa ser biodegradável, a meia-vida é longa (ATSRD, 2005), variando de 270 dias (γ -HCH) a 8 anos (α e β -HCH).

Figura 2 – Efeitos toxicológicos dos isômeros de HCH.

Fonte: Andersen et al., 2000; IARC, 2001; Willet et al., 1998.

2.1 Legislação vigente no Brasil e área contaminada estudada neste trabalho

No Brasil, segundo a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989 (Lei dos Agrotóxicos), artigo 3º, parágrafo 6º, é proibido o registro de agrotóxicos:

a) para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;

b) para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;

c) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;

d) que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais segundo critérios técnicos e científicos atualizados;

e) cujas características causem danos ao meio ambiente.

Devido aos danos à saúde e ao meio ambiente, o uso geral do HCH foi proibido em 1985 no Brasil e nos Estados Unidos da América, ficando restrito apenas a campanhas de saúde pública (Portaria do Ministério da Agricultura nº 329 de 2.9.1985) (Oliveira et al., 1995).

Por ser bastante industrializado e também agrícola, o estado de São Paulo é acometido por muitas áreas contaminadas, o que suscitou na Lei nº 13.577, de 8 de julho de 2009. No artigo 2º, parágrafos 3º ao 5º, constitui objetivo desta lei garantir: 1) procedimentos para identificação de áreas contaminadas; 2) a saúde e a segurança da população exposta à contaminação; 3) a promoção da remediação de áreas contaminadas e das águas subterrâneas por elas afetadas.

Em dezembro de 2010, a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), ligada à Secretaria do Meio Ambiente do governo paulista, apresentou um relatório sobre as “Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo”, no qual, a área de estudo deste projeto (Rua Cápuia s/ nº, Santo André – SP) foi inserida e classificada como “contaminada sob investigação” (ANEXO A). De acordo com a Lei nº 13.577/09, a remediação de áreas contaminadas deve ser realizada, por isto, a área de estudo deste projeto passou por tratamento para que esteja de acordo com a legislação vigente.

A contaminação do local ocorreu através do descarte/disposição de pesticida, e resíduos de produção de HCH, em células que foram enterradas no solo, à esquerda do córrego Oratório, tributário da margem direita do Rio Tamanduateí e atualmente, encontra-se ao lado um condomínio residencial (Figura 3), Os meios impactados são o subsolo e as águas subterrâneas. Como medida emergencial, foram feitos o isolamento da área e proibição de acesso.

Figura 3 – Área contaminada descrita pela CETESB e objeto de estudo deste trabalho. Legenda: A1 - Área 1 – condomínios; A2 - Área 2 – células com solo contaminado, A3 - Área 3 – entorno imediato das células; A4 - Área 4 – aterro de inertes.

De acordo com relatório técnico Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) nº 118 870-205, o órgão responsável pelo terreno é o Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAEE), que foi autuado e notificado em 1996, pelo Inquérito Civil - IC nº 01/96 – da Promotoria de Justiça do Meio Ambiente de Santo André, para o provimento de soluções para a área em questão. Em resposta ao inquérito, representantes do DAEE, CETESB e IPT reuniram-se no Fórum de Santo André. Conforme o Termo de Comparecimento e Deliberação deste inquérito (PPIC nº 01/96) propôs-se uma atuação conjunta das três instituições citadas, sendo o IPT contratado através do convênio BNDES/Funtec Nº 09.2.0085.1, para o projeto 3691.01-A, intitulado: “Desenvolvimento e validação de tecnologias para remediação de solo e água subterrânea contaminados com organoclorados”. Mais informações podem ser encontradas no (ANEXO B).

2.2 Modelos de Remediação

As técnicas de tratamento de solos contaminados mais conhecidas e utilizadas são as remediações: química (oxidação química *in-situ* e incineração), física (extração de vapores no solo) e biológica (biorremediação). Cada técnica de tratamento depende de vários fatores,

entre eles: 1) condições físico-químicas e biológicas do local contaminado; 2) concentração do contaminante e; 3) tempo requerido para a degradação ou a remoção do composto alvo, conforme a técnica empregada. (Andrade et al, 2010).

A oxidação química *in-situ*, consiste na injeção de compostos químicos reativos diretamente no local contaminado, com o objetivo de degradar rapidamente os contaminantes por meio de reações de oxidação ou redução. Também conhecido como ISCO (*In-Situ Chemical Oxidation*), de acordo com Brown (2003), o processo é frequentemente empregado em locais com elevadas concentrações de contaminante, geralmente, presentes na fonte e na pluma de contaminação. Em geral, este método é caro, pode eliminar a microbiota local e não ser eficiente, por conta do HCH ter elevada estabilidade química e não reagir facilmente.

O método mais empregado para destruir organoclorados é a incineração, porém, preocupações com o meio ambiente e saúde têm incentivado o desenvolvimento de alternativas tecnológicas sustentáveis para evitar a combustão dos agentes (Lee e Huffman, 1989). Outra técnica é a escavação do solo transportando-o para um aterro certificado, porém, os custos deste processo são elevados e o problema da contaminação não é resolvido.

O *air sparging* é uma tecnologia de remediação que reduz as concentrações de constituintes voláteis adsorvidos ao solo ou dissolvidos nas águas subterrâneas. Esta tecnologia envolve a injeção de ar (livre de contaminação) dentro da subsuperfície da zona saturada, permitindo transferência do contaminante da fase dissolvida para a fase de vapor. Em seguida, o ar contaminado é expelido através da zona insaturada e frequentemente, coletado por “*soil vapor extraction*” (SVE) ou extração de vapores do solo (United States Environmental Protection Agency, 2003). A técnica de SVE baseia-se na aplicação de vácuo em pontos estratégicos do solo, a fim de induzir o fluxo controlado de ar removendo os contaminantes. Os vapores extraídos devem, obrigatoriamente, passar por etapas de tratamento antes de serem lançados para a atmosfera. Estas técnicas não foram indicadas para o HCH por seu alto elevado ponto de ebulição, entre 280 e 323°C.

Os modelos biológicos visam ao estímulo e/ou aumento da microbiota (Andreoni et al., 2007; Viladi, 2001), através da adição de nutrientes (bioestimulação) ou de microrganismos (bioaugmentação). A aplicação pode ser generalista, atingindo a microbiota como um todo, ou específica, visando ao favorecimento de um grupo específico (Rieger et al., 2002). Para tanto, introduz-se soluções aquosas, com composição determinada, através de galerias. Esta forma de tratamento também atua no controle hidráulico do sistema, prevendo a migração dos nutrientes e microrganismos pela área tratada (Seabra et al., 2005). Estudos cinéticos em microcosmos são realizados para verificar a adaptação e competição entre a

microbiota pré-existente e a adicionada (Vogel et al., 1996). Na Figura 4, observa-se um esquema de bioestimulação *in situ*.

Figura 4 – Bioestimulação da microbiota em solo e água subterrânea contaminados.

Traduções: nutrient enrichment (enriquecimento de nutriente); adsorbed phase (fase adsorvida); dissolved phase (fase dissolvida); free product (produto livre). Fonte: Modificado de US EPA, 2003.

2.3 Biorremediação: modelo escolhido

A biorremediação é uma alternativa de degradação promovida por microrganismos, sejam autóctones ao meio contaminado, exóticos ou geneticamente modificados (Cunha; Leite, 2000). Este método busca degradar substâncias tóxicas convertendo-as em substâncias de menor toxicidade ou, preferencialmente, atóxicas como CO_2 e H_2O (Gavrilescu, 2005).

Quando um solo contaminado permanece sem qualquer tratamento, a atenuação da toxicidade ocorre naturalmente em baixa velocidade. No caso do solo sofrer interferência de tecnologias ativas, os microrganismos são estimulados e a velocidade da biodegradação aumenta (Bento et al, 2003, 2005). De acordo com Dua et al., 2002, a capacidade dos microrganismos em decompor uma enorme quantidade de substâncias deve-se ao fato de eles terem coexistido por bilhões de anos com uma imensa variedade de compostos orgânicos. A grande diversidade de substratos, utilizados na obtenção de energia, permitiu a seleção de enzimas capazes de degradar os mais diferentes compostos através de mecanismos catalíticos variados.

Do ponto de vista do metabolismo microbiano, a biodegradação pode ocorrer de duas maneiras: catabólica ou co-metabólica. No catabolismo, os microrganismos utilizam o substrato (ex.: poluente, substância tóxica) como fonte de carbono (assimilação) e/ou energia (respiração) para o seu crescimento. O co-metabolismo, por outro lado, ocorre através da degradação do substrato e seus produtos por enzimas de vários microrganismos diferentes, cada espécie é responsável por uma etapa catalítica e as reações não são realizadas para obtenção de energia. (Alexander, 1999; Borja, et al., 2002; Field, Sierra-Alvarez, 2008).

No caso do HCH, os microrganismos capazes de degradá-lo são: fungos (Singh, Kuhad, 2000), cianobactérias (Kuritz, Wolk, 1995), bactérias anaeróbias (Boyle et al., 1999; Jagnow et al., 1977; MacCrae et al., 1969) e aeróbias, incluindo as dos gêneros: *Sphingomonas* (Kumari et al., 2002; Nagata et al., 1999, 2007), *Rhodanobacter* (Nalin et al., 1999; Thomas et al., 1996) e *Pandoraea* (Okeke et al., 2002).

As bactérias mais conhecidas por degradar HCH são as proteobactérias do gênero *Sphingomonas* (anteriormente agrupadas dentro do gênero das *Pseudomonas*), aeróbias e encontradas na superfície de solos contaminados. *Sphingomonas paucimobilis* UT26, também conhecida como *Sphingobium japonicum*, foi isolada de áreas contaminadas com HCH. O microrganismo em questão tem um gene específico que codifica a enzima LinB haloalcano desalogenase (E.C. 3.8.1.5.) que catalisa a reação do γ -HCH em 1,3(R),4(S),5(S),6(R)-Pentaclorociclohexeno (Imai et al., 1991; Nagata et al., 1999). A cianobactéria *Anabaena* sp. PCC7120 e a *Nostoc ellipsosporum*, além de degradarem o lindano, também catalisam o 1,3(R),4(S),5(S),6(R)-Pentaclorociclohexeno em uma mistura de 1,2,4- e 1,2,3-triclorobenzenos (Kuritz, Wolk, 1995). O mapa de degradação de γ -HCH pode ser observado na figura 5.

Figura 5 – Mapa de degradação do γ -Hexaclorociclohexano.

Fonte: Traduzido e modificado a partir de Biocatalysis/Biodegradation Database (2011) e Camacho-Pérez (2012).

Neste trabalho, a microbiota o solo contaminado foi investigada, buscando-se possíveis microrganismos degradadores de HCH. Em seguida, o solo foi homogeneizado e utilizado em processos de biorremediação em biorreatores descontínuos, no qual o tempo de residência é igual para reagentes, produtos e biocatalizador (Tomotani, 2006). A metodologia é adequada às características da área contaminada e poderia ser aplicada em campo por conta dos altos teores de umidade e nutrientes do solo e condições climáticas locais (temperaturas elevadas).

Os biorreatores foram montados com o solo contaminado em condições de bioestimulação e/ou bioaumentação, nas fases sólida e semi-sólida (lama). Nos casos de bioestimulação, foram utilizados macro e micro nutrientes ou bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço é um resíduo lignocelulósico que sobra após o processo de moagem e extração do caldo da cana (destinado à produção de açúcar e etanol). O material é constituído por 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (Pandey et al., 2000). De acordo com Abhilash e Singh (2008), o bagaço pode acelerar a degradação de HCH por contribuir com microbiota, nutrientes e evitar a dispersão do pesticida no solo por meio do efeito adsorvente de suas fibras, além de ser um material abundante e de baixo custo.

Experimentos com água contaminada por HCH também foram realizados utilizando microrganismos autóctones do solo, enzimas selvagens e enzimas variantes provenientes de mutações desenhadas computacionalmente.

Estudos em laboratório e em campo mostram que a aplicação de duas ou mais tecnologias associadas garantem uma maior taxa de degradação dos contaminantes, principalmente em casos de contaminação mista, ou seja, por mais de uma substância (CETESB, 2001). Nos modelos de biorremediação *in situ* e *ex situ*, contribuições externas de insumos, nutrientes, oxigênio ou microrganismos devem ser avaliadas de acordo com o tipo de solo, equipamentos utilizados e, principalmente, os contaminantes presentes. Esta técnica também pode ser realizada em biorreatores com a presença de um biocatalisador: enzima, organela celular ou anticorpo.

2.4 Enzima haloalcano desalogenase (LinB)

A especificidade e atividade das enzimas envolvidas na biodegradação de HCH são o ponto crítico do processo de degradação por bactérias e determinam se um isômero será catalisado. O HCH é um composto que não ocorre na natureza e começou a ser utilizado a partir dos anos 1940. As enzimas desalogenases tiveram relativamente pouco tempo de

seleção para sofrer evolução adaptativa e adquirir uma atividade eficiente frente à estrutura deste organoclorado, diferente de compostos halogenados naturais. Desta forma, o conhecimento estrutural e melhora da atividade específica das desalogenases seriam promissores para a biodegradação de compostos halogenados tóxicos e para a aplicação dos métodos em biotecnologia ambiental (Janssen et al., 2001).

A enzima de interesse biotecnológico, em questão, é a haloalcano desalogenase LinB (E.C. 3.8.1.5.) de *Sphingobium japonicum*, que tem a capacidade de degradar β -HCH - o isômero mais recalcitrante - além de outros cloroalcanos e bromoalcanos, convertendo-os em seus respectivos álcoois e haletos hidrogenados. A LinB *japonicum* (SjLinB, *Protein Data Bank identification*: 1CV2) catalisa a hidrólise de ligações carbono-cloro e carbono-bromo (Janssen, 2004), em comparação com outras enzimas do mesmo tipo, tem a capacidade de converter substratos maiores. Entretanto, a atividade catalítica e as taxas de degradação são muito baixas, sugerindo que LinB não está otimamente evoluída para degradar este isômero. Desta forma, a construção de variantes melhoradas pode permitir imediata declorinação hidrolítica.

De acordo com Janssen (2004), a cavidade do sítio-ativo de LinB é livre de água e possui grupos doadores de ligações de H, o que reduz a barreira energética para atingir o estado de transição, em comparação com uma reação sem a enzima. Estruturas de raio-X de diferentes desalogenases foram comparadas e observou-se um padrão reacional. Para isso, os cristais foram diluídos em solução aquosa com o substrato em diferentes pHs. Os complexos intermediários acumulados foram encaminhados para cristalografia e, posteriormente, estudados. Observou-se que, no caso de SjLinB, a catálise é mediada pelo trio de aminoácidos Glu-His-Asp no sítio-ativo. Inicialmente, um oxigênio carboxilado do aspartato ataca o átomo de carbono onde o haleto (Cl) do substrato está ligado, substituindo-o e configurando o mecanismo Sn2, também chamado de substituição nucleofílica bimolecular (Figura 6 (a)).

Após o deslocamento nucleofílico, uma asparagina e um triptofano (Asn 38 e Trp 109) ligam-se ao haleto, através dos átomos de hidrogênio, estabilizando-o. O intermediário covalente resultante desta reação é um éster, sendo o oxigênio da dupla compartilhado com a enzima. Além disto, forma-se o complexo alquil-enzima, na região do glutamato (Glu 132), para estabilizar a carga positiva que se desenvolve na histidina (His 272) durante a hidrólise do éster. O oxigênio carboxilado não reagente do aspartato (Asp 108) permanece ligado ao hidrogênio da cadeia principal de amidas (Trp 109)(Figura 6 (b)). A última etapa é a liberação do haleto do sítio-ativo (Janssen, 2004).

Figura 6 – Esquema catalítico realizado pela desalogenase LinB.

Fonte: Modificado de Janssen (2004).

2.5 Desenho Computacional da enzima LinB

O método mais bem sucedido atualmente para obtenção de enzimas modificadas é a evolução direta (Turner, 2009). Por conta do fator randômico, este método requer uma longa fase de triagem, além de ser mais adequado para o melhoramento das propriedades de enzimas de alto rendimento e da qualidade da biblioteca de variantes (maior quantidade de enzimas com mutações para as funções desejadas). Esta técnica foi extensivamente explorada

para uma haloalcano desalogenase (van Leeuwen et al., 2012), no qual utilizou-se o conhecimento da relação estrutura-função para focar nas mutações em posições selecionadas.

Outro método em pleno desenvolvimento é o desenho computacional de enzimas. Este método integra análises *in silico* com técnicas de engenharia de proteínas para redesenhá-las. Através de mutações pontuais, diversas características físico-químicas e reacionais da enzima podem ser alteradas. Uma alteração comum é a adição ou remoção de cisteínas, que formam ligações dissulfeto. Para a modificação da atividade, o alvo dos estudos é sítio-ativo, com enfoque no complexo enzima-substrato, baseado em estruturas cristalográficas (raio-X). A alta resolução dos métodos cristalográficos permite que as interações químicas sejam avaliadas por simulações de dinâmicas moleculares (*Molecular Dynamics Simulation* ou simulações MD), permitindo a verificação do impacto de cada mutação na estrutura do complexo ativado. Tais simulações são a principal ferramenta tanto para prever a estabilidade das variantes mutantes quanto o comportamento do substrato no sítio-catalítico (Westerbeek et al., 2011b).

Os estudos das estruturas cristalográficas e modelagem computacional demonstraram que os átomos – da enzima e do substrato – estão precisamente posicionados e orientados para a formação do complexo ativado. Esta pré-organização seleciona as conformações espaciais favoráveis, seja por ligações de van der Waals ou ligações de hidrogênio, para que a reação atinja o estado de transição e ocorra a catálise. Bruice (2006) chamou tais conformações de *Near Attack Conformation (NAC)*, que podem ser observadas através do uso de simulações MD e quantificadas em porcentagem de tempo em que os átomos têm potencial de formar ligações.

Ainda de acordo com Bruice (2006), os valores de NAC correlacionam-se com k_{cat}/K_M , sendo k_{cat} a constante que incorpora as taxas para todas as reações entre o complexo enzima-substrato (ES) e enzima-produto ($E + P$); e K_M (constante de Michaelis) que é associada com a afinidade da enzima pelo substrato, dada pela concentração de substrato em que a velocidade de reação é metade do valor máximo ($V = V_{max}/2$).

A utilização de métodos computacionais pode reduzir o trabalho experimental, pois menores bibliotecas de mutantes são feitas e a frequência de mutantes obtidas é maior do que em um experimento randômico. Apesar destas técnicas serem muito utilizadas atualmente, alguns pontos precisam ser melhorados, como: a precisão das estruturas preditas, a orientação espacial do substrato no sítio-ativo, a forma de utilizar as simulações de dinâmica molecular, o desenho de bibliotecas e a escolha das posições-alvo para mutações de forma a introduzir na enzima as propriedades desejadas (Janssen, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi o estudo da biodegradação de HCH utilizando microrganismos autóctones e nutrientes, para biorremediar o solo contaminado, proveniente da cidade de Santo André – SP, em diferentes modelos de cultivo. Microrganismos capazes de degradar HCH forneceram enzimas selvagens para a construção de variantes mutantes, possivelmente mais ativas, através de desenho computacional. Esta tese foi realizada em duas fases: a primeira desenvolvida no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) no Brasil, e a segunda, realizada na Universidade de Groningen (RuG) nos Países Baixos, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Primeira fase

Os objetivos específicos da primeira parte do trabalho, desenvolvida no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), foram:

- Investigação da concentração e diversidade de microrganismos no solo contaminado e avaliação da sua resistência/tolerância a diferentes concentrações de HCH no solo;
- Estudos de biodegradação de HCH utilizando bioestimulação, por sais minerais e/ou bagaço de cana-de-açúcar, e bioaugmentação em reatores, com solo nos meios: sólido e semi-sólido (lama);
- Estudos utilizando produtos comerciais para estimular a biorremediação;
- Avaliar o consórcio microbiano por MALDI-TOF/MS, como técnica alternativa para predizer o gênero dos microrganismos.

3.2.2 Segunda fase

Para a segunda parte, na Universidade de Groningen (Países Baixos), os objetivos específicos foram:

- Identificar a presença de do gene LinB nos microrganismos selecionados;
- Acompanhar as etapas de desenho computacional de novas enzimas mutantes a partir de LinB selvagem (proveniente de *Sphingobium indicum*);
- Obtenção das mutantes e comparação das enzimas mutadas em relação à selvagem, quanto à degradação de β -HCH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia realizada na primeira fase do doutorado (Brasil)

No IPT, foram realizados ensaios em meio sólido, semi-sólido e líquido afim de encontrar a condição mais favorável à biorremediação do solo contaminado. Microrganismos autóctones à área contaminada, tolerantes ao solo com HCH, foram isolados. A bioestimulação e bioaumentação foram estudadas em diferentes sistemas em escala laboratorial. O solo utilizado para os experimentos foi coletado da área A2, apresentada na Figura 3.

Para cada um dos pontos de coleta procedeu-se, primeiramente, com a desinfecção dos instrumentos utilizados através seguinte sequência: lavagem do material em água potável, água deionizada, ácido clorídrico 5%, água deionizada, hexano, etanol e finalmente, água deionizada. Em todos os pontos de coleta, a vegetação superficial (gramíneas) foi removida e as amostras de solo foram retiradas. O solo foi transferido para embalagens plásticas estéreis apropriadas para coleta e conservado em 4°C até o momento da homogeneização e utilização das amostras nos testes. As informações de coleta e amostragem estão disponíveis no ANEXO C, e estão de acordo com o capítulo VI do “Manual de gerenciamento de áreas contaminadas” da CETESB (2001).

No Centro de Tecnologias Ambientais e Energéticas (CETAE/IPT), o solo foi estudado em relação à sua composição mineralógica (argilo-mineral), sendo composto por: 85-90% de caulinita, 10-15% de illita, <5% de vermiculita e gibbsita (IPT, 2010, Relatório BNDES 117 893-205). Amostras foram alíquotadas, em porções de 5 g e enviadas ao Centro de Metrologia em Química (CMQ/IPT) para análise cromatográfica. As amostras foram extraídas com solvente por Soxhlet, de acordo com a metodologia US EPA 3540C, e injetadas no cromatógrafo gasoso Agilent 7890A, com detector de captura de elétrons (GC-ECD). A coluna utilizada foi a DB-1301 (30mx250umx1um). Todas as análises cromatográficas de solo deste trabalho foram inteiramente realizadas pelos técnicos do CMQ, sendo eles os detentores do método. Nosso grupo, do Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI/IPT), recebeu 20 kg de solo para os testes subsequentes de biorremediação.

4.1.1 Concentração e diversidade microbiana nas amostras de solo contaminado

Para a quantificação inicial dos microrganismos, os procedimentos foram baseados no Manual de Testes para avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos do IBAMA, ensaio “E.1.1.2 - Teste de Biodegradabilidade Imediata de substâncias orgânicas hidrossolúveis ou pouco hidrossolúveis, não voláteis, pela medida do Dióxido de carbono desprendido em sistema aberto”. Uma mistura de 250 g de solo contaminado em 1 litro de água destilada foi colocada sob agitação por 15 min para homogeneização. Em seguida, esta mistura ficou em descanso por 15 min para decantação do solo e, posterior, filtragem em gaze para retenção de grandes partículas. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de solo foi depositada em 9 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) com o qual foram feitas sucessivas diluições (de 10^{-1} até 10^{-5}). Os procedimentos foram realizados em triplicata (3 placas para cada diluição e para cada meio de cultura), através da técnica de plaqueamento por espalhamento em superfície, usando alça de *Drygalski*.

Os meios utilizados para quantificação total de bactérias foram: TSA (Tryptic Soy Agar) e Cetrimid (Merck Art. 1.05284.0500 Lote VM01684), para evidenciar a presença de *Pseudomonas* e *Sphingomonas*. Para a quantificação de fungos, utilizou-se o meio Potato Dextrose Agar - PDA (Merck 1.10130.500) com adição de 200 µL de ácido tartárico para inibir o crescimento de bactérias.

As placas foram incubadas em estufa a 30 °C e as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizadas após 24 e 48 h de incubação. Em seguida, procedeu-se com o isolamento e caracterização das diferentes colônias obtidas por distinção morfológica e técnica de coloração de Gram (Claus, 1992).

Devido à dificuldade de homogeneização do solo, naturalmente muito úmido e com grumos, foi necessário fazer secagem para possibilitar o uso nos testes de biorremediação. Para tanto, dois tempos diferentes de secagem foram testados, de forma a definir qual deles seria menos agressivo à microbiota. Uma amostra de 25 g de solo foi seca em estufa à 30°C por 3 h, e a outra, à 25°C por 2 h. Ambas as amostras foram peneiradas (malha de 2 mm) e 1 g, proveniente de cada tipo secagem, foi adicionado a 9 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Fez-se diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-5} . Em seguida, alíquotas de 200 µL foram plaqueadas em meio TSA (Tryptic Soy Agar - Oxoid CM 129) e contadas (UFC/g de solo) após 24 h e 48 h de incubação.

4.1.2 Seleção dos microrganismos resistentes ao HCH e com potencial de biodegradação

Determinada a concentração microbiana do solo, seguiu-se com testes para a escolha dos microrganismos a serem utilizados no reator descontínuo (teste de biodegradação).

Os testes consistiram em aclimação da microbiota do solo contaminado a uma concentração mais elevada de HCH durante um mês. Desta forma, os microrganismos que sobrevivessem no meio poderiam apresentar a capacidade de degradação do organoclorado. Para isso, preparou-se uma solução estoque de HCH (0,2 g/L de acetona), a partir de BHC®. Após a dissolução no solvente, uma grande quantidade de veículo sólido (talco acrescentado no produto comercial) decantou. Do sobrenadante, retiraram-se alíquotas de 30 mg/L (103,2 µM) e 15 mg/L (51,6 µM) de HCH total, que foram transferidas para dois frascos Erlenmeyers vazios. Após a evaporação da acetona, cada frasco recebeu 100 mL de água destilada e 25 g de solo contaminado.

4.1.3 Preparo de bagaço de cana-de-açúcar e caracterização da microbiota para uso no ensaio de biorremediação

Para o ensaio de biodegradação, bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado a fim de observar a influência de seus nutrientes e microbiota para acelerar o processo de biorremediação. O bagaço recebeu o mesmo tratamento químico descrito no trabalho de Abhilash e Singh (2008), resumido na Tabela 2 e, antes da moagem, passou por uma secagem branda a 37° C até atingir um teor de umidade próximo a 6%, que mantém as propriedades da celulose. A concentração de microrganismos do bagaço, sem tratamento químico ou esterilização, foi determinada da mesma forma como feita para as amostras de solo. Os meios utilizados foram o TSA (bactérias) e o PDA (fungos). As contagens foram realizadas em triplicata após 24 e 48 h de incubação.

Para selecionar as linhagens fúngicas do consórcio, utilizado na condição de bioaumentação, realizou-se um teste de crescimento utilizando bagaço como única fonte de carbono. O objetivo foi verificar se o tratamento químico do material influenciaria o crescimento dos microrganismos. Os fungos testados foram inoculados por estriamento em placas de Petri contendo ágar (2%) e bagaço (3% do tratado quimicamente e, em separado, do sem tratamento) e incubadas a 30°C. Os testes foram realizados em duplicata e como controle, utilizou-se PDA. A contagem das colônias foi feita após 72 e 120 h.

Tabela 2 – Formas de apresentação e tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nas diferentes condições de tratamento do solo com HCH.

Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço esterilizado e sem tratamento químico	Bagaço esterilizadoe com tratamento químico
200 g de bagaço, secos a 37° C, moídos a 20 mesh.	500 g de bagaço, secos a 37° C, moídos a 20 mesh e esterilizados.	200 g de bagaço tratados em solução de H ₂ O ₂ 10%, a 60°C por 24 h. Secagem a 37° C, moagem a 20 <i>mesh</i> e esterilização.

4.1.4 Preparo do consórcio de microrganismos para bioaugmentação

As linhagens bacterianas selecionadas para o consórcio foram cultivadas em meio líquido. Uma colônia isolada de cada microrganismo foi inoculada, individualmente, em tubo contendo 10 mL de meio TSB (Tryptic Soy Broth – Oxoid CM 129). Após 24 h de incubação a 30 °C e 120 rpm, uma alíquota de 250 µL de cultura foi inoculado em frascos de Erlenmeyer contendo 25 mL de meio TSB, mantendo-se as condições de temperatura e agitação. As culturas foram utilizadas no experimento de bioaugmentação quando atingiram a concentração de 10⁴ células por mL.

Em relação aos fungos selecionados, a suspensão de esporos de cada linhagem foi preparada por raspagem, com alça de platina estéril, de cultivos em meio PDA, em fase de esporulação (crescimento de 5 dias). Um volume de 8 mL de água destilada estéril foi adicionada a cada placa para a coleta de esporos. A suspensão foi submetida à agitação de 200 rpm por 30 min em frasco com pérolas de vidro, para a dissociação de micélios e esporos, e em seguida, filtrada em lã de vidro para retenção de micélio. O filtrado foi transferido para um tubo de ensaio estéril e realizou-se a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. As suspensões foram padronizadas para a concentração final de 10⁶ esporos por mL.

4.1.5 Solução nutriente (meio mineral) utilizada nas condições de bioestimulação

Para as condições de bioestimulação com adição de nutrientes foi preparada uma solução de sais de acordo com o Manual de Testes para avaliação da Ecotoxicidade de

Agentes Químicos do IBAMA (ensaio E.1.1.2). A solução, preparada com água destilada, é isenta de fontes de carbono e contém a formulação descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Compostos químicos e concentração utilizada para meio mineral.

Composto químico	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	8,50
K_2HPO_4	21,75
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,40
NH_4Cl	20,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,5
CaCl_2	27,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,04
H_3BO_3	0,06
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,043
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,035
$\text{FeCl}_3\text{-EDTA}$	0,1

4.1.6 Ensaio de biodegradabilidade do solo contaminado: biorremediação por bioaugmentação e bioestimulação em meio sólido

Para avaliar a biodegradabilidade do solo contaminado em reator descontínuo, um teste de biodegradação foi realizado conforme demonstrado na Figura 7. O ensaio teve duração de 12 e 16 meses, dependendo da condição/tratamento, e seguiu o protocolo definido por Verechia (2008). Frascos de vidro âmbar (microambiente de remediação), com capacidade de 1 L, foram previamente esterilizados em autoclave (1 atm, 121°C por 20 min) e identificados. Amostras de solo contaminado foram adicionadas em 12 frascos. Os controles foram obtidos a partir de solo comprovadamente não contaminado.

Aos microambientes de remediação foram adicionados, além de solo contaminado, nutrientes em solução, descritos em 4.1.5. Para cada um dos 12 frascos foi bombeado ar atmosférico (vazão média de 100 mL/min, distribuída para os frascos) isento de dióxido de carbono, por ser lavado previamente em seis frascos conectados em série contendo 500 mL de NaOH 10 N. A vazão foi mantida durante 40 h semanais (horário comercial), pois o sistema necessitava observação periódica. O ar de saída oriundo de cada microambiente, e rico em CO_2 , passou por frascos lavadores de gases, contendo 100 mL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ a 0,025 N. O $\text{Ba}(\text{OH})_2$ residual, resultante da reação do CO_2 com o $\text{Ba}(\text{OH})_2$, foi titulado com solução de

HCl 0,05 N após adição do indicador fenolftaleína. O cálculo do CO₂ total absorvido em um determinado período de tempo foi calculado pela equação a seguir:

$$M_{CO_2} = V_{HCl} - V'_{HCl} \times f_{HCl}$$

Massa de CO₂ (mg) = (Volume de HCl₍₁₎ – Volume HCl₍₂₎) x f_{HCl}

Sendo:

Volume de HCl₍₁₎ – volume da solução de HCl (mL) necessária para titular a solução de Ba(OH)₂ contida nos frascos no início dos testes.

Volume de HCl₍₂₎ – volume da solução de HCl (mL) necessária para titular a solução de Ba(OH)₂ no momento das coletas, após determinado período.

f_{HCl}: fator igual a 1,1.

A biodegradação acumulada foi calculada somando-se todas as massas de CO₂ (mg), observadas em cada um dos intervalos de tempo analisados.

Por tratar-se de um ensaio com diferentes condições, a montagem deu-se em várias etapas. Inicialmente, o sistema foi preparado e testado para incubação dos microcosmos e captura do CO₂ produzido. O fluxo de ar no sistema deu-se através de frascos e mangueiras de silicone e fez o seguinte caminho: saída de ar comprimido para os frascos com solução de NaOH, em seguida, para os frascos de ensaio (microcosmos) e finalmente, para os frascos lavadores de gases, onde ocorreu a captura do CO₂ proveniente de cada microcosmo. Os testes confirmaram que o sistema estava livre de vazamentos.

Como controle de saturação da própria solução de Ba(OH)₂, foram instalados frascos lavadores de gases em uma saída de ar que não passava por frasco de microcosmo com solo. A figura 8 mostra o sistema montado.

O bagaço de cana de açúcar, a solução de nutrientes e o consórcio de microrganismos foram preparados conforme descrito nos itens anteriores. Cinco amostras de 5 g de solo de cada microcosmo seguiram para análise cromatográfica (Figura 9) para quantificar a concentração de HCH inicial.

Figura 7 – Esquema simplificado da montagem de um reator descontínuo para ensaio através do método respirométrico. Fonte: Verechia (2008).

Figura 8 – Sistema de biorremediação utilizado para avaliação da biodegradabilidade do solo contaminado. Foto: Aline Ramos da Silva.

As soluções (nutrientes e/ou consórcio de microrganismos) foram adicionadas de forma que o volume total proporcionasse ao material uma umidade de aproximadamente 18 % em massa, correspondente ao valor inicial de umidade do solo coletado. Em condições de bioestimulação, foram adicionados 5 mL de solução nutriente e, em condições de bioaumentação, 8 mL da suspensão de microrganismos (4 mL de solução bacteriana e 4 mL de solução de esporos fúngicos). Para completar a umidade desejada, 16 mL de água destilada

foram adicionadas nas condições apenas com solo e 25 mL nas condições com solo e bagaço. A Tabela 4 apresenta as condições ensaiadas.

Figura 9 – Amostras de solo contaminado para cromatografia retiradas dos frascos de cada condição a ser testada no ensaio de biodegradação. Foto: Débora do Carmo Linhares.

Após a montagem, foram retiradas alíquotas de 1g de cada frasco das condições “0”, “1” e “8” para contagem de bactérias aeróbias totais e fungos. Apenas amostras destes frascos foram plaqueadas por serem, inicialmente, representativas de todas as condições. As diferentes composições de solo contaminado, solo não contaminado e bagaço tiveram os valores de pH medidos em suspensão aquosa na proporção 1:5 (g solo : mL de água).

Tabela 4 – Descrição das condições de degradação testadas no ensaio de biorremediação do solo contaminado.

	Condições testadas	Replicatas	Motivo
0	100% solo sem contaminação (225 g) + consórcio de microrganismos.	2	Controle 1: observar se os microrganismos continuaram viáveis após o funcionamento do sistema.
1	100% solo contaminado (225 g)	2	Controle 2: observar a degradação sem adição de insumos.
2	100% solo contaminado (225 g) + solução nutriente	3	Bioestimulação
3	100% solo contaminado (225 g) + solução nutriente + consórcio de microrganismos	3	Bioestimulação + Bioaugmentação
4	80% em volume de solo contaminado (220 g) + 20% em volume de bagaço tratado e moído estéril (55 g)	3	Bioestimulação
5	80% em volume de solo contaminado (220 g) + 20% em volume de bagaço moído estéril (55g)	3	Bioestimulação
6	80% em volume de solo contaminado (220 g) + 20% em volume de bagaço moído estéril (55 g) + solução nutriente	3	Bioestimulação
7	80% em volume de solo contaminado (220 g) + 20% em volume de bagaço moído estéril (55 g) + solução nutriente + consórcio de microrganismos	3	Bioestimulação + Bioaugmentação
8	80% em volume de solo contaminado (220 g) + 20% em volume de bagaço moído <i>in natura</i> (55 g)	3	Bioestimulação + Bioaugmentação

4.1.7 Ensaio de biodegradação com solo em fase de lama (semi-sólido)

Neste experimento, com duração de 196 dias (6,5 meses), adicionou-se água destilada estéril ao solo contaminado com o objetivo de aumentar a disponibilidade dos nutrientes e do HCH - solubilizados - aos microrganismos do solo contaminado. Em todas as condições, 30 g do solo a ser biorremediado receberam 70 mL de água destilada estéril e 500 µL de acetona com HCH em concentração de 18 mg/L (62 µM). Adicionou-se solução de glicose em algumas das condições para verificar a toxicidade do HCH, assim, observou-se a sobrevivência dos microrganismos na presença do pesticida sem que este fosse necessariamente metabolizado pelas linhagens. De acordo Cuozzo et al. (2009), a concentração de glicose adicionada como fonte de carbono foi de 4 mg/mL. O teste foi

realizado em triplicata. Os frascos (Erlenmeyers) foram colocados sob 150 rpm de agitação e à temperatura de 30 °C. As condições estabelecidas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições e preparação do ensaio em meio semi-sólido

Frascos	Condições	Motivo
1	Solo contaminado + HCH	Observação da microbiota do solo.
2	Solo contaminado + HCH + Consórcio de microrganismos	Bioaumentação.
3	Solo contaminado + HCH + Sais minerais	Bioestimulação.
4	Solo contaminado + HCH + Sais minerais + Consórcio de microrganismos	Bioestimulação e Bioaumentação.
5	Solo contaminado + HCH + Sais minerais + fonte de Carbono	Bioestimulação e verificação do efeito de toxicidade.

Nas condições de bioaumentação, o consórcio de microrganismos inoculado foi composto por linhagens isoladas pelo meio seletivo Cetrimid (apropriado para *Pseudomonas spp*).

4.1.8 Ensaio em Respirômetro (Micro-Oxymax®) utilizando produtos comerciais de biorremediação

Neste ensaio, feito em duplicata, com duração de 90 dias (3 meses), utilizou-se o respirômetro Micro-Oxymax® da Columbus Instruments (Ohio, EUA) para medir a produção e consumo de vários gases simultaneamente (Figura 10). Os dados são reportados como concentrações em porcentagem de cada um dos gases e de cada microcosmo acoplado ao equipamento, mostrando as taxas de acúmulo/consumo de gás. O equipamento tem a capacidade de detectar as concentrações a uma taxa de sensibilidade de até 0,2 µL/h.

Foram delineadas quatro condições de ensaio em duplicata (Tabela 6). Duas condições receberam produtos comerciais para bioestimulação: Bioclean® (Organica Biotec Pvt. Ltd., Mumbai, Maharastra, Índia) e EHC® (Adventus Company, Guelph, Ontario, Canadá). O primeiro produto possui uma concentração microbiana de 10^3 UFC/mL de solução, enquanto o segundo é isento de microrganismos e tem base vegetal com pequena parcela de partículas

de ferro zero valente (Fe^0), descrito na literatura pelo seu uso no tratamento de águas contaminadas por HCH (Elliott et al., 2008).

Tabela 6 – Condições para o teste de biodegradabilidade do solo contaminado com HCH sendo acompanhado por Micro-Oxymax®.

Condições	Frascos/Canais	Descrição (15 g solo contaminado + 35 mL líquidos*)
1	1 e 2	Solo contaminado + 250 μL de extrato de HCH**
2	3 e 4	Solo contaminado + 250 μL de extrato de HCH + 1mL de <i>Bioclean</i> ®
3	5 e 6	Solo contaminado + 250 μL de extrato de HCH** + 16,7g <i>EHC</i> ® (0,33 g/mL – de acordo com recomendação do fabricante)
4	7 e 8	Solo contaminado + 250 μL de extrato de HCH** + 500 μL de consórcio a 10^4 (isolado de meio Cetrimid)
5	9 e 10	Solo contaminado + 250 μL de extrato de HCH** + 500 μL de consórcio a 10^4 (isolado de meio Cetrimid) + 12,5 mL de solução de glicerol (5g/L)

*Água destilada foi utilizada para atingir o volume total de 35 mL de líquidos.

** A adição de 250 μL de extrato de HCH corresponde a um incremento de 90 mg/L (310 μM) de HCH para a massa total no frasco (50g).

Figura 10 – Microcosmos de diferentes condições acoplados ao respirômetro (Micro-oxymax®). Foto: Débora C. Linhares.

4.1.9 Tolerância de consórcio isolado do solo contaminado ao HCH em meio líquido

A microbiota isolada do solo contaminado (consórcio) foi exposta a um ambiente com concentrações de HCH maiores que as encontradas na amostra de origem, para avaliar a capacidade de aclimação dos microrganismos ao pesticida. Para isso, foram preparados frascos com diferentes concentrações de HCH em acetona, da mesma forma que a seção 4.1.2. Cada frasco recebeu um volume diferente de acetona contendo as seguintes concentrações, respectivamente: 30 mg/L (103,2 μ M), 15 mg/L (51,6 μ M), e 3 mg/L (10,3 μ M). Após a evaporação da acetona, os frascos receberam 100 mL de água destilada e, 25 g de solo contaminado.

Após uma semana de incubação, a 30° C e 120 rpm, amostras de 200 μ L de cada frasco foram plaqueadas em ágar com solução nutriente (meio mineral descrito na seção 4.1.5) e HCH a 5 mg/L (17 μ M), como a única fonte de carbono. As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias.

As pequenas colônias das placas foram raspadas e inoculadas em meio mineral líquido contendo 100 μ M de HCH e 0,2 % de glicose. Após uma semana, alíquotas de 1 mL das culturas foram passadas para novos frascos com a mesma composição de meio. Esse procedimento foi repetido três vezes e realizado a cada semana, totalizando um mês de ensaio.

As linhagens que resistiram até o fim do experimento foram diluídas 1:1 (v/v) em solução de glicerol a 20%, distribuídas em microtubos de 1,5 mL e estocadas a -80 °C. As bactérias foram inspecionadas através da técnica de MALDI-TOF/MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry). Estas mesmas linhagens foram levadas para a Universidade de Groningen, nos Países Baixos, para avaliar a presença de enzima com capacidade de degradação de HCH.

4.1.10 Caracterização dos microrganismos do consórcio por MALDI-TOF/MS

O método de MALDI-TOF/MS é auxiliar na identificação de microrganismos (Fenselau, Demirev, 2001; Lay, 2001) e para este experimento, utilizou-se o equipamento Bruker Daltonics MALDI Biotyper®.

A metodologia é baseada na medida dos padrões criados após a ionização, separação e detecção, pelo espectrômetro de massas, das muitas biomoléculas presentes em um microrganismo. O *software* analisa os diferentes perfis cromatográficos que são característicos de cada espécie (Assis et al., 2011). Entretanto, esta técnica não substitui a

identificação por rDNA 16S, apenas complementa. Desta forma, os resultados das análises dos perfis são similares às árvores filogenéticas quando comparados aos métodos clássicos de biologia molecular. A técnica em questão analisou os espectros de massa na faixa de 2000 a 20.000 KDa, e comparou com o perfil de massa (das proteínas ribossomais) da *E. coli*, usada como controle nos testes.

Utilizando suabes estéreis, cada colônia isolada teve seu material colhido, depositado em placa metálica (própria do equipamento) e fixado através de solução-matriz ácida saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (α -HCCA) em 50% de acetonitrila (AN) e 2,5% de ácido trifluoroacético (TFA). Após a secagem da solução, a placa foi inserida no equipamento para a aquisição do perfil cromatográfico de cada microrganismo. Os testes foram feitos com seis repetições para reduzir o erro experimental e realizados no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Juliano Neto e do então doutorando Diego Magno Assis.

4.2 Metodologia realizada na segunda fase do doutorado (Países Baixos)

4.2.1 Liofilização e reativação dos consórcios bacterianos

Para o envio das bactérias à Universidade de Groningen, os consórcios foram liofilizados. Para isso, foram inoculados em 100 mL de meio mineral (seção 4.1.5.) com 30 mg/L (103 μ M) de HCH e 3 g/L de *Tryptic Soy Broth* (TSB). A incubação foi realizada durante 4 dias a 30 °C e 200 rpm e, em seguida, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 5 mL de solução estéril de leite em pó desnatado (9%) com glutamato de sódio (5%). Alíquotas de 500 μ L foram transferidas para ampolas de vidro e congeladas a -80 °C por 12 h, antes de serem liofilizadas pelo equipamento *Thermo Fisher Scientific* (FR- *Drying Digital Unit* – Modulyod – 115).

A reativação das bactérias foi realizada no Instituto de Biotecnologia e Ciências Biomoleculares de Groningen (*Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute* – *GBB*). Os consórcios foram incubados em frascos com 50 mL de meio mineral líquido MMY (Janssen et al., 1989), 30 mg/L (103 μ M) de Pestanal® (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha), mistura equimolar dos isômeros α , β , γ , σ de HCH, e 3 g/L de TSB. Os frascos foram mantidos a 30 °C sob agitação de 200 rpm, durante 24 h. Em outra condição testada, os consórcios em meio MMY receberam apenas HCH como fonte de carbono.

Após a incubação em meio líquido, seguiu-se com o plaqueamento em MMY ágar, com 30 mg/L de Pestanal® (103 µM) e TSB (3 g/L). Alíquotas de 200 µL das culturas foram espalhadas em placas utilizando alça de Drigalski e incubadas a 30 °C por 24 h.

4.2.2 Identificação de bactéria por sequenciamento de rDNA 16S

A identificação foi realizada pela empresa Baseclear, localizada em Leiden (Países Baixos). A amostra foi escolhida ao acaso, entre as demais, e enviada em uma placa de petri com MMY, 30 mg/L HCH e 3 g/L de TSB contendo colônias de bactéria isolada nomeada de A1. O número de análise registrado foi o 54185-MS121170A. A metodologia utilizada foi a Microseq® da empresa Applied Biosystems (Bleiswijk, Países Baixos), que se baseia na amplificação por PCR da sequência de DNA codificante da subunidade 16S do ribossomo bacteriano, por ser altamente conservados entre as espécies bacterianas. O produto do PCR foi detectado e analisado usando eletroforese capilar. Os resultados foram comparados com os dados da biblioteca validada do Microseq®.

4.2.3 Rastreamento do gene *LinB* através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A enzima LinB foi caracterizada e estudada anteriormente no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise da Universidade de Groningen (Janssen et al. 1994; Prokop et al. 2003), sendo a segunda proteína catalisadora na cascata de degradação do isômero α e a primeira do isômero β . O gene LinB de *Sphingobium indicum* (SiLinB) é descrito na literatura por codificar a enzima capaz de realizar duas etapas de degradação do β -HCH (Raina et al., 2008), primeiro em pentaclorociclohexanol (PCCOH) e, em seguida, em tetraclorociclohexenol (TCCH-1,4-DOH). Este gene foi utilizado como controle e ponto de partida para o desenho computacional de novas mutantes para este trabalho. O gene LinB de *Sphingobium japonicum* UT26 (SjLinB) também foi utilizado como controle nos experimentos, porém, usualmente, catalisa apenas a retirada de um Cl⁻ (Geueke et al., 2013). A partir disto, definiu-se por focar na degradação apenas do β -HCH, o mais estável e recalcitrante isômero.

Para rastrear a presença do gene LinB nas bactérias isoladas de consórcio, dois procedimentos foram realizados: PCR das colônias, e PCR com DNA extraído pelo kit *Wizard Genomic DNA purification* (Promega, Madison, EUA). Para o primeiro experimento,

uma colônia de cada linhagem foi colocada individualmente em microtubos estéreis, e diluídas em 10 µL de água bidestilada autoclavada. Os tubos foram aquecidos por 10 min a 98 °C e, em seguida, centrifugados por 5 min a 13200 rpm. As amostras de DNA foram retiradas do sobrenadante. No segundo experimento, após a utilização do kit, a amostra de DNA podia ser coletada diretamente.

Ambos os experimentos de PCR foram realizados utilizando o *kit Hot Star Taq* da Quiagen (Quiagen, Venlo, Países Baixos), de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 – Protocolos para digestão dos vetores de expressão e de propagação.

Reação	Volume (µL)
Amostra de DNA	2
água bidestilada	8
oligonucleotídeo sense (LinB fw) 10 µM	0,4
oligonucleotídeo anti-sense (LinB rev) 10 µM	0,4
dNTPs a 10 µM	0,3
Taq polimerase	0,3
tampão 10x	1,25
Total	12,65

Os genes de interesse (LinB) continham 891 bp, e o fragmento amplificado deveria conter 741 bp. Utilizando a ferramenta BLAST (NCBI), as sequências de *SjLinB* e *SiLinB* foram alinhadas e apresentaram 99% de identidade, como pode ser observado no APÊNDICE A. Duas regiões conservadas, uma no início e outra no fim dos genes em ambas sequências, deram origem aos *primers* utilizados:

- LinB fw (5' → 3'): TGGCCTATATCGATGAAGGG
- LinB rev (3' → 5'): CGTGATTTCGGTCTGGTTTG

Os detalhes dos ciclos de PCR estão descritas na Figura 11. O produto da amplificação foi aplicado a gel de agarose (1,2%), e brometo de etídio (0,01% v/v) para separação das bandas por comprimento. O marcador utilizado foi *Gene Ruler*TM 1kb (5 µL), e os poços seguintes continham as amostras de DNA amplificado (12 µL), com 3 µL de corante (6x *DNA loading dye* da empresa New England Biolabs, Hitchin, Grã-Bretanha). O gel foi colocado em cuba com tampão Tris/Acetato/EDTA (2%) por 40 min a 90 V. Em seguida, o gel foi exposto à luz UV para revelar as bandas amplificadas.

Figura 11 – Programa de PCR para amplificação do gene LinB.

4.2.4 Sequenciamentos

Todos os sequenciamentos de DNA foram realizados pela empresa GATC Biotech AG (Colônia, Alemanha) através do procedimento de LightRun®. As amostras foram enviadas em microtubos (1,5 mL de capacidade) contendo 5 µL de solução de plasmídeo purificado (80 – 100 ng/µL) ou solução de produto de PCR purificado (20 – 80 ng/µL); e 5 µL de primer a 5 µM (sense ou anti-sense), totalizando 10 µL de amostra.

4.2.5 Preparação de células CaCl_2 -competentes a partir de *E. coli* Top 10 e transformação bacteriana

Para a preparação de células quimiocompetentes inoculou-se *E. coli* Top 10 (de estoque de glicerol a -80 °C) em 5 mL de meio Luria Bertani – LB – estéril (10 g de tripton, 5 g de extrato de levedura e 10 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada, pH 7.0-7.5) por 16 h a 37 °C e 120 rpm. Em seguida, a amostra foi diluída 1:100 em meio LB. e incubada a 37 °C e 120 rpm, até que atingisse densidade óptica (OD) entre 0,3 e 0,5 em 600 nm. A cultura foi centrifugada por 5 min a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. A partir deste ponto, as células foram mantidas em gelo e então, ressuspensas em 25 mL de solução estéril gelada de 0,1 M de CaCl_2 , incubando-as por 10 min, e centrifugando novamente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5 mL de solução estéril gelada de 0,1 M de CaCl_2 com 10% de glicerol. Alíquotas de 100 µL foram depositadas em microtubos de 1,5 mL e congeladas em nitrogênio líquido, antes de serem estocadas a -80 °C.

Para a transformação e comprovação da competência, um microtubo com 100 µL de células quimiocompetentes foi retirado do ambiente a -80 °C e mantido em gelo. De forma asséptica, uma alíquota de 1 a 10 µL de DNA plasmidial foi adicionada ao microtubo, que continuou incubado a 0 °C por 30 min. Em seguida, as células receberam choque térmico em banho-maria a 42 °C por 1 min e, então, incubadas novamente em gelo por 2 min. 500 µL de meio LB estéril foram adicionados ao microtubo seguindo para incubação por 30 min a 37 °C. Após a incubação, alíquotas de 50 µL, 100 µL e 50 µL (com as células decantadas após centrifugação) foram plaqueadas em LB ágar (15 g/L) com antibiótico ampicilina (50 µg/mL). As placas foram mantidas por 16 h em estufa a 37 °C para o crescimento de colônias bacterianas transformadas.

4.2.6 Desenho de plasmídeo com gene *LinB* selvagem de *Sphingobium indicum*

Por conta da indisponibilidade, no nosso laboratório, do microrganismo *Sphingobium indicum* e do gene *SiLinB*, fez-se necessária a compra do gene em uma empresa especializada. A empresa escolhida foi a Eurofins (Oosterhout, Países Baixos), que constrói e insere sequências gênicas de interesse em vetor de propagação (plasmídeo *pEX-A*®). Para isso, desenhou-se a sequência a ser encomendada (APÊNDICE C), utilizando o programa Clone Manager Suite 7, já inserindo-a no plasmídeo utilizado pela empresa (Figura 12) e apresentando as seguintes características:

- a- Cauda de histidina (*His-tag*), amino-terminal (*N-terminal*) em relação ao gene, para auxiliar na purificação;
- b- Resistência à Ampicilina, marcador de seletividade;
- c- Sítios de restrição *NcoI* (5') e *XhoI* (3'), para realização da clonagem entre vetores de propagação e expressão.

4.2.7 Clonagem gênica

O gene *SiLinB* foi sintetizado pela empresa Eurofins e subclonado em vetor de propagação (*pEX-A*). Entretanto, para expressão da proteína fez-se necessário a clonagem do gene para o vetor de expressão *pBAD/Myc-HisA* (Invitrogen™, EUA) que possui o operon arabinose (*AraC*). O procedimento utilizado foi retirar o inserto de *pEX-A* e inserir em um *pBAD/Myc-HisA* vazio, utilizando os sítios de restrição *NcoI* e *XhoI*.

Os vetores de expressão e propagação foram digeridos com enzimas de restrição em microtubos diferentes, seguindo o protocolo da Tabela 8.

Figura 12 – Vetor pEX-A contendo o gene SiLinB e resistência à ampicilina

O tampão NEB4 e as enzimas são provenientes da New England Biolabs. Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima requerida para a digestão de 1 µg de DNA em 1 h a 37°C em um volume reacional total de 50 µL. Portanto, os microtubos foram mantidos por 4 horas a 37°C.

As reações de digestão foram, então, purificadas utilizando o kit *QIAquick*® (Quiagen) para remover as enzimas e, em seguida, alíquotas de 2 µL foram medidas em espectrofotômetro (NanoDrop, modelo ND- 1000, Thermo Scientific) a 260 nm para obter a concentração de DNA em cada microtubo. Para a observação da digestão, seguiu-se com eletroforese em gel de agarose. Amostras de 2 µL de DNA com 1 µL de tampão de cada microtubo foram, separadamente, aplicadas em gel de agarose (1,2%), e brometo de etídio

(0,01% v/v) para separação das bandas por comprimento. O marcador utilizado foi *Gene Ruler*TM 1kb (5 µL). A eletroforese ocorreu a 90 V e 400 mA durante 1 h. As bandas foram observadas sob luz UV.

Tabela 8 – Protocolos para digestão dos vetores de expressão e de propagação.

Protocolos	Volume (µL)
pBAD/Myc-HisA (100 ng/µL) ou pEX-A (350 ng/µL)	15
NcoI (10000 U/mL)	1
XhoI (10000 U/mL)	3
água bidestilada	7
albumina de soro bovino (BSA) (100 µg/mL)	3
NEB4	3
Total	32

O inserto retirado de pEX-A, com aproximadamente 2450 bp, foi recortado do gel e extraído com o kit QIAEX II® *Gel Extraction* (Qiagen). Para ligar o inserto no plasmídeo de expressão, realizou-se o protocolo descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Protocolo para ligação do inserto no plasmídeo de expressão.

Reação	Volume (µL)
vetor pBAD/Myc-HisA	2
inserto (<i>SiLinB</i>)	6
tampão de diluição 5x (#2)	2
de tampão de ligação 2x (#1)	10
enzima ligase (#3)	2
Total	22

As enzimas e tampões são do kit *Rapid DNA Ligation* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). O meio reacional permaneceu por 30 min em temperatura ambiente (25°C) e, então, prosseguiu-se com a transformação dos plasmídeos em *E. coli* Top 10. Após o crescimento das colônias em placas com LB ágar e ampicilina, 6 colônias foram coletadas e individualmente inoculadas em tubos contendo 5 mL de LB líquido e ampicilina (50 µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C por 16 h e, em seguida, realizou-se extração de plasmídeos das culturas líquidas através do kit Qiaprep® *Miniprep* (Qiagen). Os plasmídeos foram enviados para sequenciamento e confirmação dos resultados.

4.2.8 Desenho computacional das enzimas mutantes a partir de linhagem selvagem de *Sphingobium indicum*

Para a construção das variantes enzimáticas, a enzima LinB de *Sphingobium indicum* foi usada com controle para as mutações. Entretanto, por ainda não ter sua estrutura cristalográfica estudada, os desenhos basearam-se na estrutura cristalográfica da enzima *SjLinB* (Uniprot accession number P51698)(Westerbeek et al., 2011a). O desenho computacional das cinco variantes foi realizado pelo colaborador Dr. Hein J. Wijma da Universidade de Groningen, utilizando *software Rosetta Design* para prever as mutações que favoreceriam o aumento da atividade enzimática. As mutações selecionadas foram baseadas na porcentagem de proximidade para a ocorrência do estado de transição, conhecido como *Near Attack Conformation* (NAC), de acordo com Hur e Bruice (2003) e Buice (2006), definidas durante simulações MD através do *software Yasara*.

Variantes com 3 a 5 mutações foram desenhadas para melhorar a conversão de β -HCH. A sequência de procedimentos foi resumida na Figura 13. Os desenhos computacionais foram classificados por simulações MD, no qual realizou-se *docking*, método que calcula o estado conformacional de menor energia entre o complexo enzima-substrato. Desta forma, verificou-se se o substrato permanecia ligado à enzima com uma conformação cataliticamente relevante, em acordo com os valores preditos pelos cálculos de NAC (%).

Figura 13 – Sequência de métodos computacionais realizados e sustentados por evolução direta.

4.2.9 Mutações sítio dirigidas

Após a obtenção do vetor de expressão com o inserto (*SiLinB*), seguiu-se com as mutações sítio dirigidas no gene para a obtenção das enzimas mutantes desenhadas computacionalmente. As mutações foram construídas utilizando o kit *Quik Change Mutagenesis - PfuUltra Hotstart PCR Master Mix* (Agilent, New Castle, EUA). Para isso, ciclos de PCR foram realizadas utilizando diferentes oligonucleotídeos (Tabela 11), cada par contendo novas sequências de DNA, de forma a criar as mutações pontuais de interesse.

Para a PCR, utilizou-se o protocolo descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Protocolo para realização da PCR nas mutações sítio dirigidas.

Reação	Volume (μL)
mistura de primer sense e anti-sense a 1 μM	1
pBAD/ <i>Myc-HisA-LinBindicum</i> (~ 25 ηg/μL)	1
água bidestilada	12
dNTP mix	1
tampão de reação (10x)	5
DNA polimerase	1
Total	21

A enzima, o tampão e a mistura de dNTPs são do kit *PfuUltra Hotstart PCR Master Mix*. O programa de PCR utilizado está descrito na Figura 14.

Figura 14 – Programa de PCR para amplificação dos genes induzindo às mutações sítio dirigidas.

Tabela 11 – Oligonucleotídeos sense e anti-sense usados em ciclos de PCR para a realização de mutações sítio dirigidas.

Mutações	Oligonucleotídeos sense (5'-3')
L138F	GGTCACCATGCCGC/TTCGAATGGGCGGA
L138M	GCGGTCACCATGCCGC/ATC/GGAATGGGCGGATTTT
L138I	GGTCACCATGCCGC/ATCGAATGGGCGGA
F169W_V173M	GAAGAATTGGTGTTCAGGACAATGTTTT/GT/GGTCTGAACAAG/ATT/GCTCCCCGGATTGATC
F169W	TGGTGTTCAGGACAATGTTTT/GT/GGTCTGAACAAGTTCTCCC
I211L	CTGTCTTGGCCTCGCCAAA/CTCCCGATCGC
L248A	GAGCCGGGACACC/GT/CGACCACGGGCCG
L248V	AGCCGGGACACC/GTGACCACGGGC
Oligonucleotídeos anti-sense (3'-5')	
L138F	TCCGCCCATTCGAG/ACGGCATGGTGACC
L138M	AAAATCCGCCCATTCG/CAG/TCGGCATGGTGACCGC
L138I	TCCGCCCATTCGAG/TCGGCATGGTGACC
F169W_V173M	GATCAATCCGGGGAGA/CAC/TTTGTTCGAACA/CA/CAAACATTGTCCTGCAACACCAATTCTTC
F169W	GGGAGAACTTGTTCGACA/CA/CAAACATTGTCCTGCAACACCA
I211L	GCGATCGGGAT/GTTGGCGAGGCCAAGACAG
L248A	CGGCCCGTGGTCA/GG/CGTGTCCCGGCTC
L248V	GCCCGTGGTCAG/CGTGTCCCGGCT

Os produtos de PCR foram tratados com 1 µL de DpnI por 2h30 a 37°C, já que esta enzima de restrição cliva apenas sítios metilados, digerindo DNA bacteriano e não aquele produzido na reação de PCR. Desta forma, apenas os plasmídeos com as novas sequências mutadas foram selecionados e posteriormente, transformados por choque térmico em células competentes *E. coli* Top 10. A incorporação das mutantes foi confirmada por sequenciamento de DNA e alinhamento da sequência controle com as mutadas, usando o programa *Clone Manager Suite 7*.

4.2.10 Expressão e purificação de proteínas

A produção de enzimas selvagens (*SjLinB* e *SiLinB*) e das variantes mutadas foi realizada utilizando *E. coli* Top 10.

Para iniciar a expressão, 0,5 L de cultura em meio Terrific Broth (TB) foi inoculada com 0,5 % (v/v) de cultura preparada anteriormente incubada por 16 h. O frasco foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir a densidade óptica (OD) de 0,6 a 600 nm. Em seguida, a cultura foi induzida com L-arabinose em concentração final de 0,04% (p/v) e incubada a 24°C por 20 h. Após este período, foi centrifugada a 4°C (Beckman Coulter, JLA 9.1) por 15 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 15 mL de tampão Tris-SO₄ (20 mM) com 0,5 M de NaCl e pH 7,5 (tampão #1). A suspensão de células foi lisada por sonicação com sequências de 10 s ligado e 30 s desligado por 5 min, em amplitude de 50%. O lisado foi centrifugado (Beckman Coulter, JA 17) por 45 min, a 13000 rpm e 4°C.

Para a purificação, os restos celulares foram descartados e o sobrenadante (extrato celular) aplicado a uma coluna de 2 mL de Ni-sefarose (possui afinidade com a cauda de histidina) e incubado por 40 min a 4°C, sob leve rotação. O extrato celular foi eluído da coluna e lavado com 6 mL de tampão #1. Para eluir a proteína, a coluna foi lavada com tampões contendo diferentes concentrações de imidazol, que compete pelo Ni liberando as caudas de histidina das enzimas. Primeiramente, a coluna recebeu 6 mL de tampão #1 contendo 15 mM de imidazol, que foram eluídos e descartados. Em seguida, aplicou-se mais 6 mL de tampão #1, desta vez, contendo 500 mM de imidazol, que foram eluídos e coletados em microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, o imidazol foi retirado das amostras utilizando a coluna EconoPac 10-DG (Biorad, California, EUA) pré-incubada com tampão 50 mM de fosfato de potássio com 10 % de glicerol (PBSG) em pH 7,5 (Ito et al., 2007).

A solução final com enzima dessalinizada foi lida em espectrofotômetro a 280 nm e o valor foi aplicado à lei de Beer-Lambert (Fuwa, Valle, 1963), relação linear entre a absorbância e a concentração de espécies absorvidas. O coeficiente de extinção molar foi definido pela ferramenta *ExPASy* (Protparam, 2013) tendo o valor de 55920 M⁻¹cm⁻¹. A pureza das amostras foi analisada aplicando-se 10 µg de enzima purificada com tampão para proteínas em gel de SDS-PAGE a 12% de poliacrilamida (Weber, Osborn, 1969). O primeiro poço do gel recebeu tampão de referência de pesos moleculares (*Page Ruler™ Prestained Protein Ladder*).

4.2.11 Desnaturação protéica

Para determinar a temperatura média de desnaturação das enzimas mutantes comparadas com as selvagens, utilizou-se ensaio do *Thermofluor®* ou fluorimetria exploratória diferencial (*differential scanning fluorimetry* - DSF). A técnica conhecida é utilizada para observar se a proteína/enzima está nativa, ou seja, enovelada e em estado

funcional (Ulrika et al., 2006). Para isso, adiciona-se um fluorocromo hidrofóbico (*Sypro Orange*®) similar ao ácido 1-anilino-naftaleno-8-sulfônico (ANS) que em solução aquosa, e na presença de proteínas enoveladas, emite baixa fluorescência. Entretanto, quando a temperatura é elevada e a proteína desnatura, as regiões hidrofóbicas – que antes estavam voltadas para o interior da proteína – ficam expostas e ligam-se ao fluorocromo que, excitado a 490 nm, aumenta sua emissão de fluorescência a 575 nm.

Para as medições, 5 µL de *Sypro Orange* (Life Technologies, California, EUA) diluído 100 vezes foi adicionado a 20 µL de enzima (1mg/ml). As amostras foram transferidas para placa de PCR de 96 poços (Biorad, California, EUA) e, em seguida, seladas. A placa foi inserida em um equipamento de PCR em tempo real (CFX96 Q-PCR, Biorad) e a fluorescência monitorada enquanto a temperatura variava de 20 a 99°C aumentando 1°C/min. Para definir a temperatura média de desnaturação, fez-se a relação entre o valor máximo da primeira derivada da fluorescência pelo valor da derivada da temperatura ($d(RFU)/dT$).

4.2.12 Equação de calibração para análise de β -HCH e metodologia da cromatografia gasosa

As análises de cromatografia gasosa usando o detector de captura de elétrons (*Gas Chromatography – Electron Capture Detector*) foram destinadas às análises quantitativas de β -HCH em meio aquoso e as equações utilizadas após os ensaios enzimáticos. Duas metodologias foram desenvolvidas e realizadas no equipamento Agilent 7890A. Todas as pesagens de β -HCH foram realizadas em balança de ultramicro precisão (Cubis® Ultramicro Balance MSA2.7S-000-DF, Sartorius) com legibilidade de 0,0001 mg e erro menor que 5%.

O primeiro método, para calibração da concentração de β -HCH, utilizou hexano, como solvente, e 4 µM (0,01 mg/L) de 1,2,4-triclorobenzeno, como padrão interno. Uma solução tampão Tris-SO₄ (pH8,2) recebeu 16,5 µM (~ 5 mg/L) de β -HCH e serviu de matriz para a preparação de soluções apresentadas na Tabela 12.

A cromatografia foi realizada utilizando a coluna capilar Agilent #CP7495-Chirasil-L-Val, podendo ser aquecida à temperatura máxima de 200°C e tendo as medidas: 25m x 250 µm x 0,12 µm. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C por 5 min; depois aquecida à uma taxa de 10°C/min até 200°C (por 5 min) e, finalmente, resfriada a 40°C a uma taxa de 10°C/min, por se tratar de uma coluna quiral e ser sensível às variações bruscas de temperatura. O volume de injeção foi de 1 µL e razão de separação (*split ratio*) de 50:1. Os tempos de retenção do padrão interno e do β -HCH foram: 11,1 min e 23,8 min,

respectivamente. As áreas dos picos obtidos nestes tempos foram plotadas e submetidas à regressão linear para obtenção da equação para quantificação da concentração de β -HCH.

Tabela 12 – Soluções utilizadas para calibração da quantificação de β -HCH no primeiro método de cromatografia com hexano.

Soluções (concentração)	
μM	Valor aproximado em mg/L
13,2	4
9,9	3
6,6	2
3,3	1
1,65	0,5

O segundo método, para calibração da concentração de β -HCH, utilizou acetato de etila, como solvente, e 4 μM (0,01 mg/L) de 1,2,4-triclorobenzeno, como padrão interno. Duas soluções foram preparadas: (a) utilizando β -HCH dissolvido diretamente em acetato de etila e, (b) extraído, com acetato de etila, o β -HCH dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e tampão 50 mM de fosfato de potássio com 10% de glicerol (pH 7,5).

Em (a), uma solução de 342 μM (100 mg/L) de β -HCH serviu de matriz para a preparação de soluções apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Soluções utilizadas para calibração (a) da quantificação de β -HCH.

Soluções (concentração)	
μM	mg/L
171	50
68,4	20
34,2	10
17,1	5
13,7	4
10,3	3
6,84	2
3,42	1
1,71	0,5

Em (b), uma solução de DMSO com 95,8 μM (28 mg/L) de β -HCH serviu de matriz para a preparação de soluções com: 10; 5; 3; 1 e 0,5 μM , diluídas em tampão e extraídas com o mesmo volume de acetato de etila (1 solução : 1 solvente).

Em (a) e (b), a cromatografia foi adaptada do trabalho de Ito et al. (2007) e realizada utilizando a coluna capilar Restek Rtx-1, que pode ser elevada até a temperatura de 350°C e apresenta as dimensões: 25m x 250 μm x 0,25 μm . A coluna foi aquecida a 80°C, depois, a

20°C/min até 160°C; em seguida, a 200°C a 4°C/min e, finalmente, a 260°C a uma taxa de 20°C/min. O volume de injeção foi de 1 µL e razão de separação (*split ratio*) de 20:1. Os tempos de retenção do padrão interno, do β-HCH, do 2,3,5,6 – tetraclorociclohexano-1,4- diol (TCDL) e do 2,3,4,5,6 - pentaclorociclohexanol (PCHL) foram: 4,64 min; 10,7 min; 11,58 min; e, 11,77 min, respectivamente. As áreas dos picos obtidos nestes tempos foram plotadas e submetidas à regressão linear para obtenção da equação.

4.2.13 Ensaios enzimáticos para degradação de β-HCH

Inicialmente, os experimentos foram realizados em microtubos com 0,5 mL de tampão Tris-SO₄ 50 mM em pH 8,2 (Westerbeek et al., 2011a) e 16,5 µM de β-HCH, além de, enzima *SiLinB* ou *SjLinB* em concentração final de 108 µg/mL (3 µM). A reação foi realizada a 30°C e as amostras retiradas nos tempos: 0 (controle sem enzima), 15, 30, 60, 90, 120 e 180 min. Neste caso, o método de cromatografia utilizado foi o primeiro descrito na seção 4.2.12, onde utilizou-se hexano para extração e a coluna capilar Agilent #CP7495-Chirasil-L-Val .

Para os experimentos seguintes, utilizou-se o segundo método de cromatografia (descrito em 4.2.12), no qual o solvente foi o acetato de etila para extração e a coluna capilar Restek Rtx-1. As cinco enzimas mutantes foram testadas e comparadas com as controles: *SiLinB* e *SjLinB*. Em um tubo de vidro e tampa de politetrafluoretileno, adicionou-se 14,25 mL de tampão fosfato de potássio a 50 mM com 10 % de glicerol (pH 7,5), 750 uL de β-HCH dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para concentrações finais de 4 µM e 5%, respectivamente; e 125 µL de enzima (diluída ou concentrada, quando necessário), para concentração final de 0,5 µM (18,7 µg/mL).

Amostras de 0,5 mL foram retiradas nos tempos: 0 (controle sem enzima), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 40 e 60 min. Cada amostra foi extraída com 0,5 mL de acetato de etila contendo 4 µM de padrão interno 1,2,4- triclorobenzeno (1,2,4-TCB). Após serem agitadas em vórtex, foram centrifugadas por 5 min a 13200 rpm. Em seguida, desidratadas com aproximadamente 20 mg de MgSO₄ e centrifugadas novamente, antes de serem transferidas para frascos de vidro (*crimp vials*).

Em todos os ensaios enzimáticos, tubos controles seguiram em paralelo contendo todas as substâncias adicionadas, de acordo com cada método, exceto pela enzima, que foi substituída pelo mesmo volume em tampão. Além disto, foram todos conduzidos com temperatura fixada de 30°C.

Equações de regressão linear foram aplicadas aos dados dos testes, de tal forma: as taxas de formação de produto foram definidas como “a”; a área do pico fornecida do cromatógrafo (em Hz*s) como “y”; o valor da área do pico quando o tempo é zero como “b”; e o tempo decorrido como “x”, em “ $y=ax+b$ ”.

4.2.14 Ensaios enzimáticos para degradação de 1-bromopropano e verificação da atividade enzimática das variantes mutantes e das enzimas controle

Para verificar se as cinco variantes mutantes estavam ativas, realizou-se experimentos com um substrato halogenado mais simples e facilmente degradado pela enzima *SjLinB*, o 1-bromopropano. *LinB indicum* também foi utilizada como controle.

Os testes ocorreram em estufa a 30°C, em placas de 96 poços (*microtitre plate*). Adicionou-se 285 µL de 1-bromopropano na concentração de 28,5 mM em tampão 50 mM Tris-SO⁴ (pH 8,2). Em seguida, 20 µL de enzima (0,2 mg/mL) foram adicionados ao substrato na placa. Amostras do meio reacional de 40 µL foram coletadas nos intervalos: 1, 3, 5, 7, 9, 12 e 15 min; e, misturadas com 160 µL de uma mistura reagente feita de 16 µL de 0,25 M de NH₄Fe(SO₄)₂ em 9M de HNO₃, 16 µL de solução saturada de Hg(SCN)₂ em etanol e, 128µL de água bidestilada. Esta mistura reagente é responsável por parar a reação de desalogenação de forma a produzir coloração, permitindo a quantificação da concentração de halogênios livres (Br⁻, Cl⁻, I⁻, F⁻ etc).

As amostras com o reagente colorido foram incubadas por 5 min a 20°C e, em seguida, lidas em espectrofotômetro (SMX *plate reader*, Biotek, Winooski, EUA) a 460 nm. A curva de calibração foi feita com NaBr (de 0 a 2 mM) e a concentração de Br⁻ livre foi calculada por equação adquirida por regressão linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeira fase (Brasil)

5.1.1 Concentração e diversidade microbiana nas amostras de solo contaminado com HCH

Uma grande variedade de microrganismos foi encontrada nas amostras de solo contaminado. A contagem de colônia nas placas resultou em $6,3 \times 10^4$ UFC/g de solo em 24 h, e $2,4 \times 10^6$ UFC/g de solo em 48 h de incubação. Algumas das colônias distintas morfológicamente foram isoladas e preservadas, sendo elas: 14 colônias entre bactérias e leveduras, e 26 colônias de fungos filamentosos. Na Figura 15 está representada uma parte da diversidade microbiana encontrada, cada coluna representa replicatas de uma mesma amostra. A Figura 16 apresenta algumas das placas com colônias de fungos. Em relação às bactérias, a maioria eram bacilos Gram negativos, e em alguns casos, o isolamento das colônias foi difícil ou não ocorreu, pois muitos microrganismos podem ser co-dependentes e desenvolvem-se apenas em consórcios. Em estudo de Dadhwal et al. (2009), 24 colônias bacterianas foram isoladas em solo indiano, contaminado por HCH, após incubação de 5 dias em meio de cultura Luria Bertani (LB) com nistatina.

Figura 15 – Diversidade microbiana encontrada na amostra de solo contaminado com HCH. Nas fotos A, B e C, o crescimento dos microrganismos ocorreu em meio TSA. Nas fotos D, E e F, em meio PDA e, em G, H e I, em meio Cetrimid. Foto: Aline R Silva.

Figura 16 – Placas com colônias de fungos presentes no solo contaminado por HCH cultivados em PDA. Foto: Aline R da Silva.

Em relação à preservação de microrganismos após a secagem, a contagem das colônias nas placas, onde o solo foi seco a 30° C por 3h, resultou em uma concentração de 4×10^4 UFC/g de solo em 24 h e 2×10^5 UFC/g de solo em 48 h de incubação. Quando o solo foi seco a 25° C por 1 hora, uma maior quantidade de colônias viáveis foi observada: $2,7 \times 10^6$ UFC/g de solo em 24 h e $7,5 \times 10^6$ UFC/g de solo em 48 h de incubação. Devido a estes resultados, optou-se pela secagem em condições mais brandas de temperatura. Na Figura 17 estão ilustradas as condições do solo contaminado pré e pós-secagem e peneiramento.

Figura 17 – Condições do solo contaminado pré (A) e pós (B) secagem e peneiramento em condições controladas de temperatura e umidade. Foto: Caroline Matos de Mello.

Uma parte do solo contaminado foi submetido ao processo de secagem durante 2 horas a 25° C e 5 alíquotas deste material, de 5 g cada, foram encaminhadas ao Centro de Metrologia Química (CMQ) do IPT para a quantificação de HCH total. Todo o processo de extração e análise foi feito pelos técnicos do CMQ, utilizando metodologia descrita em Materiais e Métodos (seção 4.1.). A Tabela 14 apresenta os resultados das concentrações de cada isômero analisado.

Tabela 14 – Quantificação dos isômeros de HCH no solo contaminado.

Isômeros	Solo (mg/kg de peso seco)		Determinação (mg de HCH/kg de solo)				
	LDM	LQP**	1	2	3	4	5
α -HCH	0,003	0,009	54,7	41,2	42,5	41,1	39,5
β -HCH	0,005	0,015	65,7	50,3	43,8	34,4	31,8
γ -HCH	0,003	0,009	49,6	1,0	1,9	2,2	1,0
δ -HCH	0,003	0,009	2,7	5,2	2,4	1,3	3,0
Total	-	-	172,7	97,7	90,6	79,0	75,3

*LDM: Limite de Detecção do Método. **LQP: Limite de Quantificação Praticável.
Termos descritos na Resolução CONAMA nº 420 de 28/12/2009.

Os resultados para cada um dos isômeros foram bastante próximos nas diferentes amostras analisadas, exceto pelo resultado de γ -HCH na alíquota nº 1. Esses resultados evidenciam a importância da secagem e homogeneização adequada do solo contaminado, pois a contaminação não foi homogênea. Em relação aos valores orientadores fornecidos pela CONAMA nº 420 (28/12/2009), as concentrações de HCH encontradas no solo são até 100 vezes mais elevadas do que os valores considerados aceitáveis.

5.1.2 Seleção dos microrganismos resistentes ao HCH e com possível potencial de biodegradação

A microbiota do solo contaminado foi exposta durante um mês a diferentes concentrações de HCH em meio líquido. Após este período, a concentração microbiana foi verificada através de plaqueamento em meio de cultura isento de HCH. A contagem de microrganismos, que tiveram contato com 15 a 30 mg/L do pesticida, foi de 1×10^7 UFC/g de solo após 48 h de incubação. Deste crescimento, foram isoladas três colônias de bactéria, uma de levedura e três de fungo filamentosos. Este foi o consórcio utilizado no ensaio de biorremediação para avaliação da biodegradabilidade dos contaminantes do solo. Portanto, das 40 colônias encontradas (seção 5.1.1), apenas 7 suportaram o ambiente estressante com HCH. De forma parecida, das 24 colônias bacterianas isoladas em estudo de Dadhwal et al., (2009), apenas 7 sobreviveram.

Nas Figuras 18 e 19 estão ilustradas as colônias selecionadas para o consórcio de microrganismos.

Figura 18 – Placas com bactérias (1, 2 e 4) e levedura (3) resistentes a HCH, cultivadas em TSA e selecionadas para ensaio de biodegradação. Foto: Aline R Silva.

Figura 19 – Placa com fungos filamentosos resistentes a HCH, cultivados em PDA e selecionados para ensaio de biodegradação. Foto: Aline R Silva.

5.1.3 Caracterização da microbiota no bagaço de cana de açúcar para uso no ensaio de biorremediação

Antes de dar início ao tratamento químico e esterilização do bagaço, realizou-se a quantificação de microrganismos presentes. Com os resultados apresentados na Tabela 15, observou-se que o bagaço apresentava uma grande quantidade de microrganismos. Desta forma, além da sua possível capacidade de adsorção de HCH, o bagaço também disponibilizaria microrganismos, dos quais, algum poderia degradar o pesticida. Por isso, foi considerada a adição do insumo nos processos de biorremediação, além de possibilitar comparação com trabalho de Abhilash e Singh (2008).

Tabela 15 – Concentração microbiana do bagaço in natura.

Tempo de incubação (h)	Bactérias (UFC/g)	Fungos (UFC/g)
24	$4,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
48	$1,2 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$

O crescimento dos fungos foi semelhante aos incubados em bagaço tratado quimicamente e sem tratamento, e como esperado, em quantidades inferiores ao controle em PDA. Após este resultado, o tratamento químico do bagaço foi dispensado, implicando em redução de custos e tempo de preparação. Na Figura 20 estão representadas as placas com o crescimento dos fungos.

Figura 20 – Crescimento fúngico em placas contendo: meio PDA (A), em ágar com bagaço tratado (B) e em ágar com bagaço sem tratamento (C). Foto: Aline R Silva & Débora C. Linhares.

5.1.4 Ensaio de biodegradabilidade do solo contaminado através de biorremediação, utilizando as técnicas de bioestimulação e bioaumentação

Neste ensaio foram testadas diferentes condições para avaliar a biodegradabilidade do solo através das técnicas de bioestimulação e bioaumentação, sendo que uma das condições recebeu o bagaço de cana de açúcar, para servir de adsorvente, condicionante do solo e fornecedor de nutrientes para os microrganismos. Em todos os frascos e condições do experimento, inclusive naqueles nos quais não houve adição de nutrientes ou microrganismos, a microbiota aeróbia do solo foi estimulada devido à passagem forçada de ar no sistema.

Para o estudo da bioestimulação, algumas condições receberam bagaço de cana de açúcar e/ou solução nutriente estéril (seções 4.1.3 e 4.1.5) com a função de disponibilizar sais minerais, e outros nutrientes, para estimular o crescimento dos microrganismos presentes no solo contaminado, acelerando a degradação do pesticida. O pH de cada condição foi medido (Tabela 16) e observou-se que os valores variaram entre 6,3 e 7,2, próximos ao PH neutro.

Tabela 16 – Valores de pH das condições do ensaio de biorremediação do HCH.

Combinação	pH
Solo sem contaminação	6,3
Solo contaminado	7,2
Solo contaminado + bagaço tratado	6,2
Solo contaminado + bagaço não tratado	6,72

Na condição de bioaumentação, o consórcio microbiano utilizado contava com os microrganismos resistentes ao HCH (descritos na seção 5.1.2), sendo eles: três linhagens de bactérias (bacilos Gram negativos), três fungos filamentosos e uma levedura. O consórcio foi preparado em concentração de 10^4 UFC/g de solo.

No tempo inicial (zero) do ensaio, foram plaqueadas as seguintes condições: condição 0, demonstrou a presença das linhagens do consórcio adicionado (total de 2×10^4 UFC/g de solo, em meio TSA); condição 1, apresentou a concentração de microrganismos do solo contaminado no momento inicial do ensaio (10^4 UFC/g de solo, em meio TSA); e, condição “8”, evidenciou a contribuição da microbiota do bagaço de cana (10^6 UFC/g de solo, em meio TSA), como mostrado na Tabela 17.

Ainda no instante $t = 0$, cada um dos microcosmos forneceu amostras de material para análise cromatográfica de HCH. Outras análises foram realizadas durante o experimento que durou 12 meses, para algumas condições, e 16 meses para outras.

Tabela 17 – Descrição das condições de ensaio de biorremediação usando bioaumentação e bioestimulação

Condições	Descrição
0	solo sem contaminação + consórcio de microrganismos.
1	solo contaminado
2	solo contaminado + solução nutriente
3	solo contaminado + solução nutriente + consórcio de microrganismos
4	solo contaminado + bagaço tratado estéril
5	solo contaminado + bagaço sem tratamento químico estéril
6	solo contaminado + bagaço sem tratamento estéril + solução nutriente
7	solo contaminado + bagaço sem tratamento estéril + solução nutriente + consórcio de microrganismos
8	solo contaminado + bagaço moído <i>in natura</i>

A condição 0 manteve-se isenta de HCH do tempo inicial ao fim dos testes (16 meses) por se tratar de solo controle, sem contaminação. As condições 1, 2 e 3, com duração de 12 meses, apresentaram redução das quantidades de HCH em: 71,1%; 76,1 %; e 74,2 %, respectivamente, como mostra a Figura 21. As condições 6, 7 e 8 (Figura 22) com bagaço, apresentaram degradação de: 76,2; 45,8 e 61,0 %, respectivamente, nas taxas de HCH, quando comparadas as amostras de 3 meses com as finais. Uma explicação para o aumento de HCH, após 3 meses, pode ser o fato do bagaço e a umidade terem biodisponibilizado mais pesticida no meio. Em estudo *in situ* de Phillips et al. (2006), os tratamentos tiveram redução de HCH de até 95% em 53 semanas de ensaio, porém, o controle também apresentou degradação de até 70%.

Nas condições 4 e 5, os resultados foram discrepantes, pois as concentrações de HCH iniciais foram menores que as finais. Isto pode ser devido à insuficiente homogeneização inicial das amostras ou o pesticida estava em forma de cristais e, após adição de água e bagaço de cana, biodisponibilizou-se ao fim do experimento. Segundo Phillips et al. (2006), nestes casos não se pode afirmar se os tratamentos foram relevantes para a degradação, mostrando um padrão de dispersão desconhecida do HCH no solo.

Figura 21 – Concentração de HCH presente no solo contaminado durante o ensaio sólido nas condições 1, 2 e 3.

Figura 22 – Concentração de HCH presente no solo contaminado durante o ensaio sólido nas condições 6, 7 e 8.

Em relação à concentração microbiana, observa-se que houve um aumento expressivo no número de microrganismos após 12 meses de ensaio. Isto demonstra que os microcosmos forneceram condições propícias para o crescimento de microbiota (Figura 23).

Figura 23 – Concentração microbiana inicial e final nos microcosmos de biorremediação em meio sólido.

Além das concentrações microbianas e das análises cromatográficas, a liberação de CO₂ dentro dos frascos (respiração) em cada condição experimental foi medida. Como esperado, os resultados indicam maior respiração, possivelmente por maior atividade microbiana, no início do procedimento (Figura 24). Isto é devido à quantidade de nutrientes adicionados e, principalmente, por conta dos microcosmos terem recebido bagaço de cana de açúcar (tratamentos 4 ao 8), com destaque para o tratamento 8 que recebeu o material *in natura* (Figura 24) e, provavelmente, proporcionou o aumento de microrganismos oportunistas. De forma que, não foi possível fazer uma correlação direta entre a degradação do pesticida e o aumento da respiração.

Em estudo de Abhilash e Singh (2008), o bagaço de cana de açúcar foi utilizado como biotratamento para o solo (bioestimulação e bioaumentação) e rendeu um aumento de 53% da degradação do HCH comparado com outros tratamentos. O bagaço utilizado foi pré-tratado (branqueado com H₂O₂) para facilitar o ataque dos microrganismos às fibras de celulose. Por outro lado, nossos testes com bagaço tratado mostraram que a etapa de branqueamento elevaria o custo do processo e não estimularia consideravelmente a microbiota do solo. Ainda assim, os bagaços tratado e sem tratamento foram testados, porém, em nenhum dos casos houve aumento da biodegradação do pesticida.

Figura 24 – Respiração dentro nos microcosmos, medida da concentração de CO_2 (mg) através do tempo (dias), nas condições de 0 a 8.

5.1.5 Ensaio em meio semi-sólido (fase lama)

Neste ensaio, descrito na seção 4.1.7., a adição de água aumentou a biodisponibilidade de nutrientes e do HCH presentes no solo. Por conta do meio estar com aspecto de lama, a agitação e temperatura foram constantes. A Figura 25 mostra parte da diversidade microbiana encontrada neste ensaio. Após o plaqueamento, observou-se a presença de fungos e bactérias com capacidade de suportar o ambiente estressante (alta concentração de HCH) e, possivelmente, com capacidade de degradação do pesticida.

A Figura 26 apresenta os valores de pH encontrados durante o experimento. A concentração microbiana esteve elevada no início do ensaio, quando o pH era mais propício para o desenvolvimento dos microrganismos. Paralelamente à queda do pH, a concentração da microbiota reduziu (Figura 27). Isto pode ser devido à degradação de HCH que produz íons Cl^- , acidificando o meio.

Figura 25 – Diversidade de microrganismos encontrada no solo durante ensaio em meio semi-sólido, sendo: 1 - controle; 2 – bioaugmentação; 3 – bioestimulação; 4 – bioaugmentação e bioestimulação; 5 – bioestimulação e fonte de carbono (glicose). Foto: Aline R Silva.

De acordo com estudo de Okeke et al. (2002) também realizado na fase de lama (*slurry*), concentrações de HCH, na faixa dos 50-200 mg/kg, podem ser reduzidas em até 59% após 9 semanas de ensaio quando o sistema recebe bioaugmentação de bactérias autóctones. Os autores inocularam *Pandorea sp*, encontrada no solo estudado. Em contrapartida, nosso trabalho partiu de uma concentração de HCH acima dos 200 mg/kg e após 26 semanas (196 dias) de ensaio, foi possível observar as taxas de degradação de HCH total acima dos 90% (Figura 28). Estudo semelhante realizado por Dadhwal et al. (2009), com concentração inicial de HCH total de 75 mg/kg de solo, também apresentou resultados acima dos 90% de

degradação quando houve bioestimulação (por adição de macro e micro nutrientes) em ensaios realizados a 30 °C durante 32 semanas.

Figura 26 – Perfil de variação de pH observado durante ensaio em meio semi-sólido, sendo: C1 - controle; C2 – bioaumentação; C3 – bioestimulação; C4 – bioaumentação e bioestimulação; C5 – bioestimulação e fonte de carbono (glicose).

Apesar da redução nas concentrações de HCH, não houve diferença significativa entre as condições. Entretanto, comparando os ensaios em meio sólido e semi-sólido (lama), observa-se que este último é capaz de proporcionar degradação de até 60% mais HCH que o ensaio anterior e na metade do tempo. Isto é devido à adição de água juntamente de agitação e temperatura constantes, o que proporcionam maior biodisponibilidade do pesticida.

Segundo Robles-González et al. (2008), o tratamento em fase de lama é eficaz tanto *in situ* quanto *ex situ*, principalmente quando a biorremediação é realizada em curtos períodos e quando há monitoramento por parte das agências reguladoras.

Figura 27 – Perfil microbiano durante os 196 dias de experimento em meio semi-sólido, sendo: C1 - controle; C2 – bioaugmentação; C3 – bioestimulação; C4 – bioaugmentação e bioestimulação; C5 – bioestimulação e fonte de carbono (glicose).

Figura 28 – Perfil de degradação de HCH total em ensaio em meio semi-sólido. Valores de concentrações inicial e final (após 196 dias de experimento). Destaque para as porcentagens de redução do pesticida.

5.1.6 Ensaio em Respirômetro (Micro-Oxymax®) utilizando produtos comerciais de biorremediação

Neste ensaio, a medição do CO₂ foi contínua e mais precisa, quando comparada ao ensaio em meio sólido (titulado). Ainda assim, não foi possível fazer correlação direta entre a taxa de respiração e degradação de HCH, pelos mesmos motivos do ensaio anterior. Tanto o solo quanto os produtos comerciais possuem compostos orgânicos passíveis de serem decompostos. De qualquer forma, a visualização da respiração é importante para observar se existe fluxo de gases e decomposição.

A Figura 29 apresenta os valores acumulados (totais) de CO₂ desprendido de cada frasco ao longo dos primeiros 25 dias de tratamento (600 h). A condição 4, com bioaugmentação, apresentou maior taxa de respiração, 53 mg de CO₂, seguida da condição 3, com adição de EHC® (Fe⁰), que liberou 41 mg de CO₂. Na condição 5, possivelmente, ocorreu vazamento.

Figura 29 – Valores acumulados totais de CO₂ (mg) liberado por cada condição ao longo de 25 dias (600 h). Os números à direita das curvas representam as condições de ensaio, sendo: 1 – controle; 2 – produto comercial Bioclean; 3 – produto comercial EHC; 4 – bioaugmentação; 5 – bioaugmentação e fonte de carbono (glicerol).

Em relação às concentrações de HCH total, todos as condições de tratamento proporcionaram biodegradação (Figura 30). Este ensaio teve duração total de 90 dias (3 meses), e se comparado aos tratamentos anteriores (em meio sólido e semi-sólido) apresentou

uma porcentagem de degradação satisfatória, haja vista que os outros tratamentos foram conduzidos por períodos mais longos, 12 meses e 6,5 meses, respectivamente.

Figura 30 – Concentrações microbiana e de HCH inicial e final nas condições de 1 a 5 do ensaio em respirômetro, sendo: C1 – controle; C2 – Bioclean®; C3 – EHC®; C4 – bioaumentação; C5 – bioaumentação e fonte de carbono (glicerol).

Em estudo de Phillips et al. (2006), o produto Daramend® (EHC® sem adição Fe⁰) foi utilizado *in situ* durante 371 dias (53 semanas), proporcionando até 75% de redução do HCH total (de $21,1 \times 10^3$ para $5,1 \times 10^3$ mg/kg de solo contaminado). Entretanto, a autora relata que o ensaio controle (sem adição de produto comercial) também sofreu queda na concentração do contaminante, o que pode demonstrar falta de homogeneidade das amostras de solo.

5.1.7 Tolerância de consórcio isolado do solo contaminado ao HCH em meio líquido

Deste ensaio, apenas bactérias foram observadas após o plaqueamento. Os cristais de HCH podiam ser vistos no meio líquido sem solo, já que o pesticida dissolve-se em água até a concentração máxima de 17 mg/L (isômero γ). Entretanto, a concentração foi mantida para observar se durante a incubação a diluição dos cristais aconteceria em função da degradação do pesticida. Porém, os cristais podiam ser vistos mesmo depois de uma semana em contato com as bactérias, além do crescimento não ser expressivo, com densidade ótica final (600 nm)

menor que 0,05. Possivelmente, as bactérias consumiram apenas a glicose em solução e não conseguiram degradar o pesticida, ou degradaram apenas até as primeiras fases, sem ter todas as enzimas suficientes para utilizar o HCH como fonte de energia. Ainda assim, foram capazes de sobreviver em ambiente contaminado quando ainda havia outra fonte de carbono.

5.1.8 Caracterização dos microrganismos do consórcio por MALDI-TOF/MS

Através da técnica de MALDI-TOF/MS foram obtidos os perfis cromatográficos de oito microrganismos isolados do solo contaminado e expostos ao HCH em meio mineral líquido. Todas as linhagens tiveram correlação com algum microrganismo da biblioteca do equipamento. Os gêneros bacterianos sugeridos pelo equipamento estão apresentadas na Tabela 18. A variação do resultado está descrita na Tabela 19.

Segundo trabalho de Elcey e Kunhi (2010), um consórcio microbiano de dez linhagens foi isolado do solo de canavial, que recebeu HCH técnico por um longo período. Os microrganismos foram identificados por sequenciamento do rDNA 16S. Os resultados dos autores apresentam correlação com os microrganismos sugeridos por MALDI-TOF/MS. Ambos os trabalhos, sugerem a alta incidência de bactérias do gênero *Pseudomonas* (Figura 31). Este gênero foi reportado pela primeira vez, como degradador aeróbico de HCH (Matsumura et al., 1976). Desde então, essas bactérias são vastamente estudadas dentro deste contexto.

Após alguns estudos, bactérias com capacidade de degradação de HCH classificadas na época como *Pseudomonas*, foram reclassificadas a *Sphingomonas*, por apresentarem esfingolipídeos e padrões diferentes de poliaminas (Al-Anazi et al., 2008; Busse et al., 1999; Nikishawa et al., 1998). Portanto, as bactérias sugeridas neste experimento, como sendo *Pseudomonas*, podem ser *Sphingomonas*, pois a biblioteca do programa não é especializada em amostras ambientais, apenas em amostras de análises clínicas.

A espécie *Burkholderia cepacia*, é atualmente denominada de *Cupriavidus necator* (Vandamme, Coenye, 2004). Esta bactéria (Figura 31, microrganismo B1 da Tabela 12) é mais conhecida pela capacidade de produzir grandes quantidades de polímeros (polihidroxialcanoatos - PHA). Porém, de acordo com Elcey e Kunhi (2010) a linhagem tem capacidade de degradação de γ -HCH, atingindo uma média de liberação de Cl^- de 77 a 82%, sendo apenas inferior às médias de *Pseudomonas*, que atingem 100% de liberação de Cl^- , no período de 6-24 horas a uma taxa de degradação de 10 $\mu\text{g/mL}$ de γ -HCH.

Tabela 18 – Resultados da inspeção de microrganismos por técnica de MALDI-TOF/MS (seis réplicas).

Nome analítico (fictício)	Organismo (melhor correlação com a biblioteca)	Resultado (<i>score value</i>)
A1_A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1.895 (+)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.881 (+)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.839 (+)
	<i>Pseudomonas vancoverensis</i>	1.828 (+)
	<i>Pseudomonas vancoverensis</i>	1.754 (+)
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1.727 (+)
A1_B	<i>Achromobacter spanius</i>	2.002 (++)
	<i>Achromobacter spanius</i>	1.973 (+)
	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.943 (+)
	<i>Achromobacter spanius</i>	1.906 (+)
	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	1.856 (+)
	<i>Achromobacter spanius</i>	1.833 (+)
B1	<i>Cupriavidus necator</i>	2.224 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.223 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.214 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.212 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.1 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.044 (++)
B11	<i>Cupriavidus necator</i>	2.294 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.247 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.213 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.193 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.168 (++)
	<i>Cupriavidus necator</i>	2.136 (++)
B16	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.993 (+)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.912 (+)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1.861 (+)
	not reliable identification	1.531 (-)
	not reliable identification	1.395 (-)
	not reliable identification	1.282 (-)
CTM	<i>Pseudomonas vancoverensis</i>	2.023 (++)
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1.926 (+)
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1.908 (+)
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1.864 (+)
	<i>Pseudomonas vancoverensis</i>	1.848 (+)
	not reliable identification	1.679 (-)

Nota: os microrganismos denotados como A1_A, A1_B e B1 são bactérias isoladas do meio semi-sólido (seção 5.1.5). As restantes fizeram parte do consórcio utilizado para biorremediação (seção 5.1.4).

Tabela 19 – Variação do resultado (*score value*) e sua correlação com a inspeção dos microrganismos.

Variação do resultado (<i>score value</i>)	Descrição	Símbolos
2.300 ... 3.000	Alta probabilidade de identificação da espécie	(+++)
2.000 ... 2.299	Identificação segura do gênero, provável identificação da espécie	(++)
1.700 ... 1.999	Provável identificação do gênero	(+)

Bactérias do gênero *Achromobacter* (Tabela 18, microrganismo A1_B) também são descritas na literatura como responsáveis pela degradação de pesticidas organoclorados como o endosulfan (Singh, Singh, 2011) e outros contaminantes orgânicos (Azaizeh et al., 2011; Gomila, et al., 2010). Portanto, sua presença no solo contaminado em questão pode estar associada à degradação de metabólitos do HCH.

Figura 31 – Perfil cromatográfico (MALDI-TOF/MS) da bactéria *Cupriavidus necator*.

5.2 Segunda fase (Países Baixos)

5.2.1 Reativação dos consórcios bacterianos

Todos os consórcios apresentaram unidades formadoras de colônias quando cultivados com TSB em meio líquido, porém, nenhum crescimento foi evidenciado nos cultivos apenas com HCH. Após o plaqueamento, não foi possível observar crescimento em todos os consórcios. De acordo com Manonmani et al. (2000), isso demonstra que os microrganismos em questão podem ter uma relação de co-metabolismo ou mutualismo. Apenas 4 microrganismos foram passíveis de isolamento, e foram nomeados de: A1, B1, C1, D1. A bactéria A1 identificada por sequenciamento do gene de rRNA 16S.

5.2.2 Identificação de bactéria por técnica convencional de biologia molecular 16S

O relatório da identificação da bactéria A1, pela empresa Baseclear, sugeriu que *Pseudomonas fulva* é a espécie com maior porcentagem de identidade com 99,29% de correlação (Figura 32), considerando a biblioteca do Microseq® (Tabela 20.). O gênero *Pseudomonas* já era esperado por ser relacionado com resistência e degradação de pesticidas. De acordo com Ni et al. (2010), *Pseudomonas fulva* seria capaz de degradar BTE (benzeno, tolueno e etilbenzeno), produtos possivelmente formados pela degradação de HCH após sua declorinação total.

Tabela 20 – Relatório apresentando as cinco espécies semelhantes à bactéria analisada.

Espécies	% de identidade
<i>Pseudomonas fulva</i>	99,29
<i>Pseudomonas jessenii</i>	98,32
<i>Pseudomonas straminea</i>	98,23
<i>Pseudomonas mohnii</i>	97,96
<i>Pseudomonas monteilii</i>	97,68

Figura 32 – Árvore filogenética de identificação.

Fonte: Relatório Baseclear, análise nº 54185-MS121170A.

5.2.3 Rastreamento do gene *LinB* através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após a realização da PCR das colônias, apenas o controle positivo *S. japonicum* apresentou a banda com 741 bp, o que demonstraria a ausência de *LinB* nas bactérias provenientes do consórcio (Figura 33). Entretanto, após a realização da PCR com DNA extraído, além do controle positivo, a bactéria D1 apresentou uma banda com baixa amplificação na região dos 741 bp (Figura 34). Por conta disto, o material genético amplificado de D1 foi enviado para sequenciamento. Após fazer o alinhamento da sequência de D1 com *SjLinB* e *SiLinB*, observou-se que o fragmento amplificado não apresentava a sequência de interesse (APÊNDICE B). A identidade não ocorreu nem mesmo nas regiões conservadas, de modo que os consórcios brasileiros não seguiram para os experimentos subsequentes.

O fato dos microrganismos selecionados não possuírem *LinB* não exclui a possível presença de *LinA*, primeira enzima de degradação do isômero γ , ou de outra enzima que faça parte de rota metabólica ainda desconhecida. Testes para detecção de *LinA* não foram realizados pois o foco era a enzima *LinB*, rotineiramente utilizada no Laboratório de Biotransformação e Biocatálise da Universidade de Groningen. Outra explicação é que apenas 1% da comunidade bacteriana provinda amostras ambientais é cultivável, de forma que não existe correlação direta entre diversidade e culturabilidade (Staley & Konopka, 1985).

Figura 33 – Gel de agarose com produto de PCR das colônias do consórcio. Banda do gene LinB (761 bp) em *S. japonicum* e ausência da mesma nas bactérias do consórcio.

Figura 34 – Gel de agarose com produto de PCR após extração total de DNA. Banda do gene LinB (761 bp) em *S. japonicum* e possível presença em D1.

5.2.4 Clonagem gênica.

As bandas tanto do vetor de expressão (pBAD/*Myc*-HisA) quanto do inserto (gene de *SiLinB*) foram observadas sob luz UV, demonstrando que as digestões com as enzimas de restrição ocorreram (Figura 35). Após a purificação, as amostras de vetor e inserto foram medidas a 260 nm e apresentaram as seguintes concentrações de material genético: 23,4 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ e 125 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente. Após o sequenciamento, observou-se a ligação correta do vetor de expressão com o inserto de interesse (Figura 36).

Figura 35 – Gel de agarose com produtos de digestões dos vetores utilizando enzimas de restrição. A primeira coluna apresenta o marcador, a segunda mostra o plasmídeo pBAD/Myc-HisA aberto (4 kb) e a terceira, o vetor pEX-A (2,45 kb) e o inserto (962 bp).

Figura 36 – Esquema do produto esperado da clonagem do inserto (SiLinB) no vetor de expressão pBAD/Myc-HisA.

5.2.5 Desenho computacional das enzimas mutantes a partir de linhagem selvagem de *Sphingobium indicum*

As variantes foram definidas com base nos valores de NAC (%). As mutações propostas por desenho computacional são apresentadas na Tabela 21. Os aminoácidos mutados estão representados na forma “aminoácido a ser mutado/posição/aminoácido proposto”, ou seja, no caso de L138F, lê-se que para o aminoácido Leucina na posição 138 foi proposta a mutação para Fenilalanina, e assim respectivamente com as outras mutações.

Tabela 21 – Mutações propostas por desenho computacional baseando-se em resultados do NAC (%).

Enzimas	NACs(%)	Mutantes
<i>SiLinB</i> (controle)	0,075	Nenhuma
1	0,388	L138F_I211L_L248A
2	0,723	F169W_V173M_I211L_L248A
3	1,1	L138M_F169W_V173M_I211L_L248V
4	0,944	L138M_F169W_I211L_L248V
5	0,857	L138I_F169W_V173M_I211L_L248A

As Figuras 37 a 43 apresentam as enzimas em sua estrutura terciária, onde os aminoácidos do sítio catalítico e os aminoácidos mutados estão, respectivamente, representados pelas cores: amarela e vermelha. O substrato β -HCH está posicionado dentro dos sítios-ativos das enzimas e é apresentado na cor magenta, com cada um dos seis átomos de cloro em verde. O restante da enzima está em verde, no qual as folhas-beta são representadas por setas planas e as alfa-hélices, por espirais.

Figura 37 – Sítio-ativo da enzima SjLinB com o substrato β -HCH (cor magenta) que serviu de modelo estrutural para SiLinB durante desenho computacional.

Figura 38 – Sítio-ativo da enzima SiLinB com o substrato β -HCH (cor magenta) durante desenho computacional

Figura 39 – Variante mutante 1 durante desenho computacional apresentando as três mutações propostas em vermelho: fenilalanina (L138F), leucina (I211L) e alanina (L248A).

Figura 40 – Variante mutante 2 durante desenho computacional apresentando a quatro mutações propostas em vermelho: triptofano (F169W), metionina (V173M), leucina (I211L), alanina (L248A).

Figura 41 – Variante mutante 3 durante desenho computacional apresentando as cinco mutações propostas em vermelho: metionina (L138M), triptofano (F169W), metionina (V173M), leucina (I211L) e valina (L248V).

Figura 42 – Variante mutante 4 durante desenho computacional apresentando as quatro mutações propostas em vermelho: metionina (L138M), triptofano (F169W), leucina (I211L) e valina (L248V).

Figura 43 – Variante mutante 5 durante desenho computacional apresentando as quatro mutações propostas em vermelho: isoleucina (L138I), triptofano (F169W), metionina (V173M), leucina (I211L), alanina (L248A).

5.2.6 Mutações sítio dirigidas

Os cinco plasmídeos contendo os genes das enzimas mutadas foram sequenciados e analisados. O alinhamento das sequências, quando comparados com a controle (*Sl*LinB), revelaram que as mutações foram realizadas de acordo com os desenhos computacionais preditos. As figuras 44 a 48 mostram os alinhamentos e em amarelo, os aminoácidos mutados.

Figura 44 – Enzima mutante n° 1 apresentando três mutações.

LinB ind	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYL
Mutante 1	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYL *****
LinB ind	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL
Mutante 1	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL *****
LinB ind	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL
Mutante 1	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL *****
LinB ind	181	QDNVFVEQVLPGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA
Mutante 1	181	QDNVFVEQVLPGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQLPIAGTPADVVAIA *****
LinB ind	241	RDYAGWLSESPKLPKFINAEPGHITTTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA
Mutante 1	241	RDYAGWLSESPKLPKFINAEPGHATTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA *****
LinB ind	301	AIAAFVRRRLRPA
Mutante 1	301	AIAAFVRRRLRPA *****

Número de registro na empresa GATC: *LightRun* 33JA34.

Figura 45 – Enzima mutante n° 2 apresentando quatro mutações.

LinB ind	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYL
Mutante 2	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYL *****
LinB ind	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL
Mutante 2	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL *****
LinB ind	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL
Mutante 2	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL *****
LinB ind	181	QDNVFVEQVLPGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA
Mutante 2	181	QDNVWVEQMLPGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQLPIAGTPADVVAIA **** *
LinB ind	241	RDYAGWLSESPKLPKFINAEPGHITTTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA
Mutante 2	241	RDYAGWLSESPKLPKFINAEPGHATTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA *****
LinB ind	301	AIAAFVRRRLRPA
Mutante 2	301	AIAAFVRRRLRPA *****

Número de registro na empresa GATC: *LightRun* 33JA24.

Figura 46 – Enzima mutante n° 3 apresentando cinco mutações.

LinB ind	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNTSSYL
Mutante 3	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNTSSYL *****
LinB ind	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL
Mutante 3	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL *****
LinB ind	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL
Mutante 3	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPMEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL *****
LinB ind	181	QDNVFEQVLPLGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA
Mutante 3	181	QDNVWVEQMLPLGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA *** **
LinB ind	241	RDYAGWLSSEPIPKLFINAEPGHITTTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA
Mutante 3	241	RDYAGWLSSEPIPKLFINAEPGHVTTTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA *****
LinB ind	301	AIAAFVRRRLRPA
Mutante 3	301	AIAAFVRRRLRPA *****

Número de registro na empresa GATC: *LightRun 33JB73*.**Figura 47** – Enzima mutante n° 4 apresentando quatro mutações.

LinB ind	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNTSSYL
Mutante 4	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRMAYIDEGTGDPILFQHGNTSSYL *****
LinB ind	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL
Mutante 4	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL *****
LinB ind	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL
Mutante 4	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPMEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL *****
LinB ind	181	QDNVFEQVLPLGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA
Mutante 4	181	QDNVWVEQVLPLGLILRPLSEAEAAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA *** **
LinB ind	241	RDYAGWLSSEPIPKLFINAEPGHITTTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA
Mutante 4	241	RDYAGWLSSEPIPKLFINAEPGHVTTTGRIRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA *****
LinB ind	301	AIAAFVRRRLRPA
Mutante 4	301	AIAAFVRRRLRPA *****

Número de registro na empresa GATC: *LightRun 33JB77*.

Figura 48 – Enzima mutante n° 5 apresentando cinco mutações.

LinB ind	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYL
Mutante 5	1	HHHHHHSSGLVPRGSHMSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYL *****
LinB ind	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL
Mutante 5	61	WRNIMPHCAGLGRLIACDLIGMGDSKLDPSGPERYTYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVL *****
LinB ind	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL
Mutante 5	121	VVHDWGSVLGFDWARRHRERVQGIAYMEAVTMPLEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVL *****
LinB ind	181	QDNVVEQVLPGLILRPLSEAEMAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA
Mutante 5	181	QDNVWVEQMLPGLILRPLSEAEMAAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIA **** **
LinB ind	241	RDYAGWLSESPKLFINAEPGHITTTGRIRDFCRTCWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA
Mutante 5	241	RDYAGWLSESPKLFINAEPGHATTGRIRDFCRTCWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGA *****
LinB ind	301	AIAAFVRRRLRPA
Mutante 5	301	AIAAFVRRRLRPA *****

Número de registro na empresa GATC: *LightRun* 33JB81.

5.2.7 Expressão e purificação de proteínas.

Após a expressão, purificação e dessalinização, as enzimas apresentavam as concentrações mostradas na tabela 22. O rendimento de purificação (mg/L de cultura) da enzima selvagem *SiLinB* foi o mais alto, quando comparado à *SjLinB* e às mutantes.

Tabela 22 – Enzimas controle e mutantes em relação ao rendimento e concentração após purificação.

Enzimas	Rendimento (mg/L de cultura)	Concentração (mg/mL de tampão)
<i>SjLinB</i>	50	1,70
<i>SiLinB</i>	181	2,263
M 1	36,1	4,81
M 2	22,3	2,974
M 3	69,3	4,62
M 4	38,1	2,54
M 5	12,4	1,66

O gel (Figura 49) mostra que todas as enzimas foram purificadas, e que as variantes 3 e 4 possuíam menor quantidade de impurezas.

Figura 49 – Gel de SDS-PAGE com as enzimas purificadas: SiLinB (controle) e mutantes (1 a 5). A primeira coluna apresenta o marcador de referência Page Ruler™.

5.2.8 Desnaturação proteica por ThermoFluor®

Mesmo após as mutações, as enzimas variantes mantiveram a capacidade de enovelamento comprovada pela técnica de *ThermoFluor*®. Quando comparadas, ambas as enzimas controle, *SiLinB* e *SjLinB* apresentaram temperaturas similares de desnaturação aparente, em torno dos 51°C (Figura 50). Quando comparadas as enzimas *SiLinB* e as suas variantes, observou-se que as mutantes apresentaram redução na estabilidade térmica. A mutante 1 teve média de redução de 1°C na temperatura de desnaturação, enquanto que, as mutantes 4 e 5 tiveram média de decaimento de até 5°C (Figuras 51 e 52).

Figura 50 – Estabilidade térmica das enzimas controle SiLinB e SjLinB. Determinação das temperaturas aparentes de desnaturação por Thermofluor®.

Figura 51 – Estabilidade térmica das enzimas mutantes 1, 2 e 5. Determinação das temperaturas aparentes de desnaturação por Thermofluor®.

Figura 52 – Estabilidade térmica das enzimas mutantes 3 e 4. Determinação das temperaturas aparentes de desnaturação por Thermofluor®.

5.2.9 Equações de calibração para análise de β -HCH

Inicialmente, a equação utilizada para determinar a concentração de β -HCH nos testes foi: $y = 0.0301x + 0.0031$, com $r^2 = 0.9949$, onde y é a relação das áreas dos picos de β -HCH dividido pelo valor da área do padrão interno (1,2,4-TCB), e x é o valor de β -HCH (μM), como a apresentada na Figura 53. Entretanto, durante as medições, observou-se que as áreas dos picos de β -HCH eram relativamente baixas, com um sinal abaixo de 4000 Hz*s (unidade de área de pico apresentada no relatório cromatográfico) em torno dos 17 μM de β -HCH (Figura 54). A figura 55 mostra o perfil cromatográfico de β -HCH e do padrão interno, entretanto, juntamente com o pesticida (tempo de retenção= 23,6 min) houve extravasamento de material da coluna, dos 21 min até 27 min, o que dificultou a quantificação. Isto ocorreu, provavelmente, por conta da coluna quiral não ser ideal ao processo. Uma coluna deste tipo seria própria para testes com os enantiômeros de α -HCH, por exemplo, pois separa compostos opticamente ativos. Como os testes utilizaram apenas o β -HCH como substrato, esta coluna foi utilizada apenas inicialmente, enquanto o método estava sendo padronizado e até que a coluna quiral fosse substituída por uma de uso geral para compostos apolares, a Restek Rtx-1, de acordo com trabalho de Ito et al. (2007).

A primeira equação de calibração de β -HCH foi feita nos moldes dos testes realizados usualmente no laboratório, os quais utilizaram tampão Tris- SO_4 em pH 8,2 (Westerbeek et al, 2011a).

Figura 53 – Calibração da concentração de β -HCH (μM) dissolvido em tampão Tris- SO_4 (pH8,2) e extraído com hexano.

Figura 54 – Calibração da concentração de β -HCH (μM) dissolvido em tampão Tris- SO_4 (pH8,2) e extraído com hexano. Valores da área do pico de β -HCH e de β -HCH (μM).

Figura 55 – Perfil cromatográfico de β -HCH (t_r = 23,6 min) e padrão interno 1,2,4-TCB (t_r = 10,9 min) extraídos de solução aquosa por hexano. Coluna utilizada: *Chirasil-L-Val*.

Além da mudança de coluna quiral para a Restek Rtx-1, o solvente utilizado nos testes também foi modificado de hexano para acetato de etila, em conformidade com trabalho anterior de Ito et al. (2007). As mudanças de coluna e solvente podem ser observadas pelas Figuras 56 a 59, isto porque as áreas dos picos de β -HCH nos cromatogramas aumentaram usando a nova metodologia, o que permitiu um sinal mais expressivo para o limite de detecção do método. Outra vantagem foi o uso de acetato de etila, mais polar e menos tóxico do que o hexano, facilitando a extração dos produtos da degradação de β -HCH: 2,3,4,5,6-pentaclorociclohexanol (PCHL) e 2,3,5,6-tetraclorociclo-1,4-diol (TCDL), como apresentados nas Figuras 60 e 61.

Figura 56 – Calibração da concentração de β -HCH (μM) dissolvido diretamente em acetato de etila. Aumento das áreas dos picos de β -HCH.

Figura 57 – Calibração da concentração de β -HCH (mg/L) dissolvido diretamente em acetato de etila. Aumento das áreas dos picos de β -HCH.

Figura 58 – Calibração da concentração de β -HCH (μM) dissolvido em DMSO (5%) e tampão PBSG. Extração feita com acetato de etila.

Figura 55 – Calibração da concentração de β -HCH (μM) dissolvido em DMSO (5%) e tampão PBSG, extração feita com acetato de etila. Valores da área do pico de β -HCH e de β -HCH (μM).

Figura 60 – Produtos da degradação de β -HCH: PCHL ($t = 11,771$ min) e TCDL ($t = 11,582$ min) aos 3 min de reação enzimática com *SiLinB*.

Figura 61 – Produtos da degradação de β -HCH: PCHL ($t = 11,771$ min) e TCDL ($t = 11,582$ min) aos 20 min de reação enzimática com *SiLinB*.

5.2.10 Ensaios enzimáticos para degradação de β -HCH

Os ensaios foram padronizados para obtenção das condições ideais com as enzimas selvagens, para então seguir os experimentos em mutantes. Nos testes (Figuras 62 e 63), observou-se que após 60 min de experimento ainda havia cerca de 4 a 5 μM de β -HCH nas reações de ambas enzimas controle. Dos 60 min de reação até 180 min, não houve degradação aparente do substrato, o que poderia demonstrar que o β -HCH não estava bem dissolvido no

meio, pois algumas partículas podiam ser vistas a olho nu após a centrifugação dos frascos com meio reacional.

Figura 562 – Degradação de β -HCH pela enzima SiLinB. Extração com hexano e cromatografia gasosa utilizando coluna Chirasil-L-Val.

Figura 57 – Degradação de β -HCH pela enzima SjLinB. Extração com hexano e cromatografia gasosa utilizando coluna Chirasil-L-Val.

Por conta da difícil dissolução do β -HCH apenas em tampão, utilizou-se para os experimentos seguintes, o co-solvente DMSO a 5%, que por ser miscível em água, foi utilizado anteriormente em experimentos com a enzima *SjLinB*, e variantes mutantes, a uma concentração de até 50% do meio reacional (Westerbeek et al, 2011a).

Os experimentos com enzima controle *SiLinB*, 5% de DMSO e tampão PBSG, utilizando acetato de etila para extração e o segundo método de cromatografia (descrito em 4.2.12), mostraram-se eficientes na degradação total de β -HCH. Em 5 min, os 4 μ M de substrato foram totalmente degradados e convertidos em 2,3,4,5,6-pentaclorociclohexanol (PCHL) e 2,3,5,6-tetraclorociclo-1,4-diol (TCDL), como observa-se na Figura 64. Esta metodologia foi satisfatória na dissolução do substrato e degradação do mesmo, por isso, foi utilizada para testar a outra enzima controle (*SjLinB*) e as variantes mutantes.

Testes com *SjLinB*, usando a mesma concentração enzimática (0,5 μ M) mostraram que a enzima não foi capaz de degradar todo o substrato em um período de 60 min (Figura 65), além disto, houve baixa formação dos produtos PCHL e TCDL quando comparados aos testes com *SiLinB*. Este resultado era esperado, pois de acordo com trabalho de Lal et al (2010), a enzima *SjLinB* teria como produto final apenas o PCHL, sendo a produção de TCDL baixa ou nula. Os valores nas Figuras 64 e 65 são as áreas dos picos de substrato e produtos ao invés das concentrações absolutas, pois a quantificação de PCHL e TCDL não foi possível devido à inexistência destas substâncias para compra, o que impossibilitou uma curva de calibração. Em trabalho de Sharma et al (2006), os dados foram reportados da mesma forma e pelo mesmo motivo.

Equações de regressão linear foram aplicadas aos dados dos testes, de tal forma: as taxas de formação de produto foram definidas como “a”; a área do pico fornecida do cromatógrafo (em Hz*s) como “y”; o valor da área do pico quando o tempo é zero como “b”; e o tempo decorrido como “x”, em “ $y=ax+b$ ”.

Figura 6458 – Degradação total de β -HCH pela enzima SiLinB, com formação dos produtos PCHL e TCDL. A equação de regressão linear é: $y = 38.901x + 30.506$ ($r^2=0,99$), na qual 38,901 é a taxa de formação de TCDL por minuto.

Figura 6559 – Degradação total de β -HCH pela enzima SjLinB, com formação dos produtos PCHL e TCDL. A equação de regressão linear é: $y = 0,505x - 1.9036$ ($r^2=0,94$), na qual 0,505 é a taxa de formação de TCDL por minuto.

Em relação às taxas de degradação de β -HCH, a atividade enzimática das enzimas (em μM de β -HCH/min) estão apresentadas na Tabela 22. Observa-se que a enzima controle *SiLinB* apresenta a maior taxa de degradação do substrato, entretanto, as enzimas mutantes não apresentaram taxa reacional satisfatória (Figura 66). Para obtenção dos valores de β -HCH em μM , utilizou-se a equação $y = 0.159x$ (Figura 58).

Tabela 22 – Taxas de degradação de β -HCH pelas enzimas controle e variantes mutantes.

Enzima	Taxa de degradação (μM de β -HCH/min)
<i>SjLinB</i>	0.0211
<i>SiLinB</i>	1.5785
Mutante 1	0.0132
Mutante 2	0.0043
Mutante 3	0.0013
Mutante 4	0.0055
Mutante 5	0.0005

Figura 6660 – Degradação de β -HCH ($\mu\text{M}/\text{min}$) utilizando as enzimas mutantes 1 a 5.

Uma das possíveis explicações para as enzimas mutantes não serem mais rápidas na degradação de β -HCH, em comparação com a controle *SiLinB*, seria o encaminhamento de etapas catalíticas incorretas para o desenho computacional, por exemplo, etapas da reação

poderiam ser mais lentas para a conversão do substrato do que as que foram calculadas. Além disto, a catálise de HCH pela LinB deve começar com a ligação do substrato, que migra de fora para dentro do sítio-ativo. Esta migração requer alguns rearranjos espaciais da enzima, pois a entrada não é extensa o suficiente para a entrada do substrato. Pode ocorrer que esses rearranjos seriam mais rápidos em *SiLinB* do que em *SjLinB* – usada como modelo cristalográfico – e esta etapa seria importante para a rápida conversão do substrato. Outra explicação seria a fraca ligação do complexo enzima-substrato. Nesta situação, a velocidade da reação pode ser mais baixa.

Por não terem sido desenhadas enzimas focadas em rápida entrada do substrato no sítio-ativo ou para aumento de força de ligação do complexo ativo, a enzima *SiLinB* pode ter uma conformação mais propícia para ambas as situações, sendo possíveis questões para o insucesso das variantes mutantes.

A princípio, e de acordo com revisão da literatura (Janssen, 2004), assumimos que a etapa crítica para a enzima LinB seria a reação inicial do substrato com o aspartato nucleofílico. A partir disto, o foco foi o desenho de variantes com a maior frequência de NAC, refletindo a melhor orientação do substrato no sítio-ativo. A seleção de mutantes com alto NAC e baixa atividade sugere que esta não é a etapa crítica. Por outro lado, simulações MD iniciais deste trabalho demonstraram que variantes de *SjLinB* tinham NAC inferior ao de *SiLinB*, o que explicaria o fato desta última ser dez vezes mais ativa e sugerindo que a reação inicial do substrato era importante. Os resultados desta tese sugerem que *SiLinB* é ainda mais ativa – 100 vezes mais rápida do que *SjLinB* – sugerindo que há mais fatores envolvidos na conversão do substrato além da reação inicial com aspartato nucleofílico.

Mais uma possibilidade não investigada, que pode ser a razão da baixa atividade das mutantes, é a etapa de hidrólise do intermediário alquil-enzima. Possivelmente, esta etapa é mais rápida para *SiLinB* do que para *SjLinB*, o que também pode ter afetado os cálculos de NAC. Além disto, após a reação enzimática, o produto precisa ser liberado do sítio catalítico. Se as mutações afetaram esta etapa, a liberação foi lenta e dificultou a entrada da próxima molécula de substrato.

Por fim, a questão que também pode ter prejudicado o desenho de mutantes foi a utilização da estrutura cristalográfica de *SjLinB* como modelo para *SiLinB*. A estrutura pode não ser precisa o suficiente para servir de modelo, ou as simulações MD não foram precisas para prever a melhor orientação do sítio-ativo para a ligação do substrato. Como muitas mutantes foram geradas, apenas aquelas com alto NAC foram selecionadas, porém pode

ocorrer de as variantes não refletirem com precisão a situação do substrato dentro do sítio-ativo.

Por fim, não encontramos na literatura estudos anteriores similares ao estudo desta tese, onde a enzima *SiLinB* serviu de base para o desenho computacional de mutantes direcionadas ao aumento da atividade enzimática. Entretanto, encontramos trabalho de Ito et al. (2007), onde a enzima LinB MI1205 ,foi isolada da linhagem *Sphingobium sp*, MI1205, encontrada em área contaminada por HCH, e estudada em relação à sua capacidade catalítica. Esta bactéria apresentou maior velocidade de degradação de HCH quando comparada à *S. iaponicum* UT26, além de converter PCHL em TCDL, assim como *Sphingobium indicum*. Tanto a enzima LinB MI1205 quanto a *SiLinB* possuem sete aminoácidos diferentes em comparação com *SjLinB*, do total de 296 aminoácidos, mas também diferem entre si. LinB MI1205 serviu de base para mutações pontuais e modelagem computacional para desvendar mecanismos catalíticos no sítio-ativo. O estudo sugeriu que dois aminoácidos (Val134 e His247), dos sete diferentes, formavam um arcabouço catalítico propício para a ligação de PCHL e sua conversão em TCDL, entretanto, estes aminoácidos não foram mutados em *SiLinB*, neste trabalho, para efeito de comparação.

5.2.11 Ensaaios enzimáticos para degradação de 1-bromopropano e verificação da atividade enzimática das variantes mutantes e das enzimas controle

A curva de calibração usada para quantificar Br^- (mM), produzido a partir da catálise de 1-bromopropano, está apresentada na Figura 67.

Após os testes com as enzimas controle e variantes mutantes, observou-se que todas as enzimas mostraram-se ativas na degradação de 1-bromopropano, já que este substrato é mais simples, quando comparado ao HCH, pois possui apenas um haleto (Br^-) para ser removido (Tabela 23). Além disto, o uso de DMSO não foi necessário, pois o substrato é solúvel em água (2,5 g de 1-bromopropano /L de água).

Figura 617 – Curva de calibração para quantificação da concentração de Br⁻ (mM).

As taxas de degradação ou atividades enzimáticas foram definidas pela inclinação das retas (a) em $y = ax+b$, e os valores de atividade específica definidos como a razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteína. A enzima *SjLinB* apresentou maior atividade específica em comparação com a outra enzima controle, *SiLinB*, e as enzimas mutantes.

Tabela 23 – Atividades específicas das enzimas controle e variantes mutantes na degradação de 1-bromopropano.

Enzima	Atividade específica (mM de 1-bromopropano/min.mg de enzima)
<i>SjLinB</i>	6,32 +/- 0,14
<i>SiLinB</i>	5,3 +/- 0,12
Mutante 1	3,4 +/- 0,14
Mutante 2	0,43 +/- 0,011
Mutante 3	4,41 +/- 0,02
Mutante 4	5,22 +/- 0,02
Mutante 5	0,075 +/- 0,005

6 CONCLUSÕES

Após os estudos realizados no Brasil utilizando o solo contaminado, observou-se que as estratégias de secagem branda e peneiramento proporcionaram a homogeneização do solo mantendo suas características, como concentração de HCH e microbiota viável. Isto permitiu a sua utilização em diferentes técnicas de biorremediação em escala de bancada. Entre os testes, destacou-se o realizado em meio semi-sólido (fase lama) em biorreator, demonstrando que a adição de água, além de, agitação e temperatura constantes garantem taxas mais altas de degradação do pesticida.

Mesmo estando com alta contaminação de HCH, o solo estudado apresentou microbiota viável para ser utilizada em experimentos de bioaugmentação. Posteriormente, os microrganismos cultiváveis foram investigados quanto aos gêneros através de MALDI-TOF/MS, que remeteu os dados às *Pseudomonas*, conhecidas na literatura por resistirem e degradarem HCH e seus produtos. A identificação da bactéria *Pseudomonas fulva* por rDNA 16S, confirmou os resultados do experimento anterior.

O gene LinB não foi encontrado nos consórcios bacterianos, isolados do solo contaminado brasileiro, o que não descarta a possibilidade de que estes microrganismos possuam outra enzima responsável pela degradação de HCH. Por isso, seguiu-se com o desenho computacional da enzima SiLinB, conhecida na literatura por catalisar a retirada de dois Cl⁻ de β -HCH. Cinco enzimas mutantes foram desenhadas, expressadas em *E. coli* e purificadas. Todas as variantes mantiveram a capacidade de enovelamento comprovada por Thermofluor®.

Nas reações utilizando as enzimas controle e mutantes, o uso de DMSO como co-solvente permitiu melhor dissolução dos cristais de β -HCH em meio aquoso, tornando a solução homogênea e permitindo os ensaios enzimáticos com este isômero, o mais recalcitrante.

Apesar da baixa atividade enzimática frente à degradação de β -HCH, as mutantes apresentaram atividade relevante na degradação de 1-bromopropano. A falta da estrutura cristalográfica de SiLinB seria o principal fator que resultou em variantes com baixa atividade enzimática. Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos e devem ser estudados, como: a velocidade das etapas de reação, os rearranjos enzimáticos para a entrada do substrato e seu posicionamento preciso dentro do sítio-catalítico.

REFERÊNCIAS¹

- Abhilash PC, Singh N. Influence of the application of sugarcane bagasse on lindane (γ -HCH) mobility through soil column: implication for biotreatment. *Bioresource Technology*. 2008;99:8961–6.
- Alexander M. Biodegradation and bioremediation. 2nd ed. San Diego, California: Academic Press; 1999. 453 p.
- Al-Anazi KA, Abu-Jafar S, Al-Jasser AM, Al-Shangeeti A, Chaudri NA, Al-Jurf MD, Al-Mohareb FI. Septic shock caused by *Sphingomonas paucimobilis* bacteremia in a patient with hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Infectious Disease*. 2008;10:142–4. doi: 10.1111/j.1399-3062.2007.00262.x
- Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology*. 2000;144:121-7.
- Andrade JA, Augusto F, Jardim ICSF. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclet Quím* [online]. 2010;35(3):17-43. ISSN 0100-4670.
- Andreoni V, Gianfreda L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2007;76:287–308. DOI 10.1007/s00253-007-1018-5
- Assis, AM, Juliano L, Juliano MA. A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações*; ago./dez. 2011;9(2):344-55.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Department of Health and Human Services, toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta-hexachlorocyclohexane. Clement Assoc. 1999:11–25.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for alpha-, beta-, gamma-, and delta – hexachlorocyclohexane. U.S. Department of Health and Human Services; 2005. [2013 Mai 27]. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43-c6.pdf>
- Azaizeh H, Castro PML, Kidd P. Biodegradation of organic xenobiotic pollutants in the rhizosphere. *Plant Ecophysiology*. 2011;8(3):191-15. doi: 10.1007/978-90-481-9852-8_9.
- Bento FM; Camargo FAO, Okeke B, Frankenberger-Júnior WT. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Braz J Microbiol*. 2003;34:65-8.
- Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Techn*. 2005;96:1049-55.

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Biocatalysis/Biodegradation Database. gamma-Hexachlorocyclohexane Pathway Map. University of Minnesota. 2011. [2011 Jul 20]. Disponível em: <http://umbbd.msi.umn.edu/ghch/ghch_map.html>

Boyle AW, Haggbloom MM, Young YL. Dehalogenation of lindane (Q-hexachlorocyclohexane) by anaerobic bacteria from marine sediments and by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 1999;29:379-87.

Borja R, Rincon B, Raposo F, Alba J, Martin A. A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at meso-philic temperature. *Process Biochem*. 2002;38:733-42.

Brown RA. In situ chemical oxidation: performance, practice, and pitfalls. AFCEE Technology Transfer Workshop, San Antonio, Texas, 2003. [2011 Nov 06]. Disponível em: http://www.clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/In_Situ_Oxidation/download/techfocus/chemox/4_brown.pdf.

Busse HJ, Kämpfer P, Denner EBM. Chemotaxonomic characterisation of *Sphingomonas*. *Journ Indust Miobiol Biotechn*. 1999;23(4-5):242-51. doi: 10.1038/sj.jim.2900745.

Buice TC. Computational approaches: reaction trajectories, structures, and atomic motions. *Enzyme Reactions and Proficiency*. *Chem Rev*. 2006;106:3119-39.

Camacho-Pérez B, Ríos-Leal E, Rinderknecht-Seijas N, Poggi-Varaldo HM. Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review. *J Environmental Management*. 2012;95:306-18.

Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian J Microbiol*. 2008;48:114-27.

Claus D. A standardized Gram staining procedure. *W J Microbiol Biotech*. July 1992;8(4):451-2.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. 2. ed. 2001. 389 p. [2011 nov 06] Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/manual-de-gerenciamento-de-areas-contaminadas/7-manual-de-gerenciamento-das--acs>

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relação de áreas contaminadas, 2010. [2011 nov 06] Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Decisão de Diretoria nº 103/2007/C/E, de 22 de junho de 2007, 2007a. 40p. [2011 nov 06] Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Avaliação do Uso de Produtos Biotecnológicos para Tratamento de Efluentes Líquidos, Resíduos Sólidos e Remediação de Solos e Águas – L1.022, 2007b. 21p. [2011 nov 06] Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>

Cunha CD, Leite SGF. Gasoline Biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2000;31:45-9. ISSN 1517-8382.

Cuozzo AS, Rollán GC, Abate CM, Amoroso MJ. Specific dechlorinase activity in lindane degradation by *Streptomyces* sp. M7. *W Journ Microbiol Biotechn*. 2009;25(9):1539-46. doi: 10.1007/S11274-009-0039-X.

Dadhwal, M, Jit S, Kumari H, Lal R. *Sphingobium chinhatense* sp. nov., a hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium isolated from an HCH dumpsite. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59:3140-4.

Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biot*. 2002;59:143-52.

Elcey CD, Kunhi A M. Substantially Enhanced Degradation of Hexachlorocyclohexane Isomers by a Microbial Consortium on Acclimation. *J Agric Food Chem*. 2010;58:1046-54. doi:10.1021/jf9038259.

Elliott DW, Lien H, Zhang W. Zerovalent Iron Nanoparticles for Treatment of Ground Water Contaminated by Hexachlorocyclohexanes. *J Environ Qual*. 2008;37:2192-101. doi:10.2134/jeq2007.0545

Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2001;20:157-71. doi: 10.1002/mas.10004.

Field JA, Sierra-Alvarez R. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Reviews. Environ Sci Bio/technol*. 2008;7(3):211-41.

Fuwa K, Valle BL. The Physical Basis of Analytical Atomic Absorption Spectrometry. The Pertinence of the Beer-Lambert Law. *Anal Chem*. 1963;35(8):942-6. doi: 10.1021/ac60201a006.

Gavrilescu, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Science*. 2005;5:497-525.

Geueke B, Garg N, Ghosh S, Fleischmann T, Holliger C, Lal R, Kohler HPE. Metabolomics of hexachlorocyclohexane (HCH) transformation: ratio of LinA to LinB determines metabolic fate of HCH isomers. *Environ Microbiol*. 2013;15(4):1040-9.

Gomila M, Tvrtzová L, Teshim A, Sedláček I, González-Escalona N, Zdráhal Z, Sedo O, González J.F, Bennasar A, Moore A.R.B, Lalucat J, Murialdo S.E. *Achromobacter marplatensis* sp. nov., isolated from a pentachlorophenol-contaminated soil. *Intern Journ Systematic Evolution Microbiol*. 2010;61(9):2231-7. doi:10.1099/ijs.0.025304-0.

Hafez HFH, Theimann WHP. Persistence and biodegradation of iazinone and imidacloprid in soil. *Proc. XII Symp. Pest. Chem. Congress Centre Universita Cattolica, Via Emilia Parmense 84, Piacenza*. 2003;35-42.

Heeb NV, Wyss SA, Geueke B, Fleischmann T, Kholer HPE, Lienemann P. LinA2, a HCH-converting bacterial enzyme that dehydrohalogenates HBCDs. *Chemosphere*. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.035>

Hur S, Bruice TC. The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction. *PNAS*. 2003;100(21):12015-0.

IARC: International Association for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some thyrotropic agents. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France. 2001;v.79.

Imai R, Nagata Y, Fukuda M, Takagi TM, Yanot K. Molecular Cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* Gene Encoding a 17-Kilodalton Polypeptide That Eliminates HCl Molecules from γ -Hexachlorocyclohexane. *J Bacteriol*. Nov 1991;173(21):6811-9.

Ito M, Prokop Z, Klvaka M, Otsubo Y, Tsuda M, Damborský J, Nagata Y. Degradation of β -hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from γ -hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium* sp. MI1205. *Arch Microbiol*. 2007;188:313–25.

Jagnow G, Haider K, Ellwardt PC. Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch Microbiol*. 1977;115:285–92.

Janssen DB, Pries F, Van-Der-Ploeg J, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of the *dhla* gene. *J Bacteriol*. 1989;171(12):6791-9.

Janssen DB, Pries F, van-der-Ploeg JR. Genetics and Biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annu Rev Microbiol*. 1994;48:163-91.

Janssen DB, Oppentocht JE, Poelarends GJ. Microbial dehalogenation. *Cur Opin Biotechnol*. 2001;12:254–8.

Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases. *Cur Opin Chem Biol*. 2004;8:150-9.

Kumari R, Subudhi S, Suar M, Dhingra G, Raina V, Dogra C, Lal S, Van-Der- Meer JR, Holliger C, Lal R. Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* strain B90. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:6021–8.

Kuritz T, Wolk P. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl Environ Microb*. 1995;61:234–8.

Lal R, Dogra C, Malhotra S, Sharma P, Pal R. Diversity, distribution and divergence of *lin* genes in hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonads*. *Trends in Biotechnology*. 2006;24(3).

Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, Raina V, Kohler HPE, Holliger C, Jackson C, Oakeshott JG. Biochemistry of Microbial Degradation of

Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev.* March 2010;74(1):58-80.

Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* 2001;20:172–94. doi: 10.1002/mas.10003.

Lee CC, Huffman GL. Innovative thermal destruction technologies. *Environ Prog.* 1989;8:190–9.

Manonmani HK, Chandrashekaraiiah DH, Sreedhar-Reddy N, Elcey CD, Kunhi AAM. Isolation and Acclimation of a Microbial Consortium for Improved Aerobic Degradation of α -Hexachlorocyclohexane. *J Agric Food Chem.* 2000;48(9):4341–51. doi: 10.1021/jf990712c.

Matsumura F, Benzet HJ, Patil KC. Factors affecting microbial metabolism of γ -BHC. *J Pestic Sci.* 1976;1:3–8.

Maccrae IC, Raghu K, Bautista EM. Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp. *Nature.* 1969;221:859–60.

Ministério Da Saúde. Exposição Humana a Resíduos Organoclorados na Cidade dos Meninos, Município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. Relatório de Trabalho da Comissão Técnica, Assessora ao Ministério da Saúde, instituída pela Portaria MS/GM n.º 896, de 9 de maio de 2002. [2009 nov 05] Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/exposicao_humana.pdf

Nagata Y, Futamura A, Myauchi, K, Takagi M. Two different types of dehalogenases, LinA and LinB, involved in gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J Bacteriol.* 1999;181:5409–13.

Nagata Y, Endo R, Ito M, Ohtsubo Y, Tsuda M. Aerobic degradation of lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76:741–2.

Nalin R, Simonet P, Vogel TM, Normand P. *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:19–23.

Ni YY, Kim DY, Chunga MG, Leea SH, Park HY, Rhee YH. Biosynthesis of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16. *Bioresource Technology.* 2010;101:8485–8.

Nishikawa S, Sonoki T, Kasahara T, Obi T, Kubota S, Kawai S, Morohoshi N, Katayama Y. Cloning and Sequencing of the *Sphingomonas* (*Pseudomonas*) *paucimobilis* Gene Essential for the O Demethylation of Vanillate and Syringate. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(3):836–42.

Okeke BC, Siddique T, Arbestain CM, Frankenberger WT. Biodegradation of gamma-hexachlorocyclohexane (Lindane) and alpha-hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandoraea* species. *J Agric Food Chem.* 2002;50:2548–55.

Oliveira, R.M.; Brilhante, O.G.; Moreira, J.C.; Miranda, A.C. Contaminação por hexaclorociclohexanos em área urbana da região Sudeste do Brasil. São Paulo. Rev Saúde Pública. 1995;29(3). doi: 10.1590/S0034-89101995000300011.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource Technology. 2000;74(1):69-80.

Phillips TM. Bioremediation Of A Soil Contaminated With Hexachlorocyclohexane (HCH). [thesis (Doctor of Philosophy)]. Guelph, Ontario: The Faculty of Graduate Studies of The University of Guelph; 2004.

Phillips T M, Lee H, Trevors JT, Seech AG. Full-scale in situ bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil. J Chem Technol Biotechnol. 2006;81:289–98.

Polti MA, Aparicio JD, Benimeli CS, Amoroso MJ. Simultaneous bioremediation of Cr(VI) and lindane in soil by actinobacteria. International Biodeterioration & Biodegradation. 2014;88:48-55.

Prokop Z, Monincova M, Chaloupkova R, Klvana M, Nagata Y, Janssen DB, Damborsky J. Catalytic Mechanism of the Haloalkane Dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. J Biol Chemist. 2003;278(46):45094–100.

Raina V, Suar M, Singh A, Prakash O, Dadhwal M, Gupta S.K, Dogra C, Lawlor K, Lal S, Van Der Meer J.R, Holliger C, Lal R. Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. Biodegradation. 2008;19:27–40.

Richardson JR, Shalat SL, Buckley B, Winnik B, Padraig O'suilleabhain P, Diaz-Arrastia R, Reisch JR, German DC. Elevated Serum Pesticide Levels and Risk of Parkinson Disease. Archives of Neurology. 2009;66(7):870-5.

Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB, Roush RT. Pollen-Mediated Movement of Herbicide Resistance Between Commercial Canola Fields. Science. 2002;296(5577):2386-8.

Robles-González IV, Fava F, Poggi-Varaldo HM. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and Sediments. Microb. Cell Factor. 2008;7:5. doi:10.1186/1475-2859-7-5.

Rubinos DA, Villasuso R, Muniategui S, Barral MT, Díaz-Fierros F. Using the Landfarming Technique to Remediate Soils Contaminated with Hexachlorocyclohexane Isomers. Water, Air, & Soil Pollution. 2007;181(1-4):385-99.

Seabra PNC. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo. [tese (Doutorado no Programa de Engenharia Química)]. Rio de Janeiro: COPPE , Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.

Semple KT, Reid BJ, Fermor TR. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environ Pollut. 2001;112:269–83.

Sharma P, Raina V, Kumari R, Malhotra S, Dogra C, Kumari H, Kohler HP, Buser HR, Holliger C, Lal R. The haloalkane dehalogenase LinB is responsible for b- and d-

hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:5720–7.

Sigma-Aldrich. Product: Lindane (number 233390). Material Safety Data Sheet. Version 4.2. Revision Date 01/12/2011.

Singh BK, Kuhad RC. Degradation of insecticide lindane (γ -HCH) by white-rot fungi *Cyathus bulleri* and *Phanerochaete sordida*. *Pest Manag Sci.* 2000;56:493.

Singh NS, Singh DK. Biodegradation of endosulfan and endosulfan sulfate by *Achromobacter xylosoxidans* strain C8B in broth medium. *Biodegradation.* 2011;22(5):845-57. doi: 10.1007/S10532-010-9442-0.

Staley, J.T. & Konopka, A. Measurements of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology.* 1985;39, 321-346.

Thomas JC, Berger F, Jacquier M, Bernillon D, Baud-Grasset F, Truffaut N, Normand P, Vogel TM, Simonet P. Isolation and characterization of a novel γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *J Bacteriol.* 1996;178:6049–55.

Tomotani EJ. Bioconversão de Sacarose em Ácido Glicônico e Frutose usando Reator de Membrana. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2006. 102 p.

Turner NJ. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nature Chem Biol.* 2009;5:567-73.

Ulrika B, Ericsson U, Hallberg BM, Detitta GT, Dekker N, Nordlund P. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem.* 2006;15; 357(2): 289–98.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). Bioremediation in the field, 2003. 39 p. [2012 mar 06]. Disponível em: <http://www.epa.gov/>.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). Method 8081A, Organochlorine pesticides by gas chromatography. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste*. Revision. 2005. Sw 846.

Vandamme P, Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Intern. Journ. Systematic Evolut Microbiol.* 2004;54:2285–9. doi 10.1099/ijs.0.63247-0.

Van Leeuwen JG, Wijma HJ, Floor RJ, Van Der Laan JM, Janssen DB. Directed evolution strategies for enantiocomplementary haloalkane dehalogenases: from chemical waste to enantiopure building blocks. *Chembiochem.* 2012;13:137-48.

Verechia CT. Avaliação da biorremediação de solo contaminado por óleo de transformador. [dissertação (Mestre em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Universidade de São Paulo; 2008.

Viladi, M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*. 2001;73:1163–72.

Vogel, T.M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opin Biotechnol*. 1996;7(3):311–6.

Weber K, Osborn M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969;244:4406-12.

Westerbeek A, Szymański W, Wijma HJ, Marrink SJ, Feringa BL, Janssen DB. Kinetic resolution of α -bromoamides: experimental and theoretical investigation of highly enantioselective reactions catalyzed by haloalkane dehalogenases. *Adv Synth Catal*. 2011a;353:931–44.

Westerbeek A, Szymański W, Feringa BL, Janssen DB. Dynamic Kinetic Resolution Process Employing Haloalkane Dehalogenase. *ACS Catalysis*. 2011b;1(12):1654-60.

Willett KL, Ulrich EM, Hite RA. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ Sci Technol*. 1998;32:2197–207.

Zhu G, Wu H, Guo J, Kimaro FME. Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. *Water Air Soil Poll*. 1998;153:35–44.

APÊNDICE A – Alinhamento LinB *japonicum* e LinB *indicum*

Sequências de LinB *japonicum* e LinB *indicum* alinhadas via BLAST (NCBI) e o programa Clone Manager Suite 7., com 99% de identidade. Primers destacados.

japonicum Li	1	atgagcctcggcgcaaagccatttggcgagaagaaattcattgagatcaa
indicum lin	1	atgagcctcggcgcaaagccatttggcgagaagaaattcattgagatcaa
japonicum Li	51	gggccggcgca tgccctatatcgatgaaggg accggcgatccgatcctct
indicum lin	51	gggccggcgca tgccctatatcgatgaaggg accggcgatccgatcctct
japonicum Li	101	tccagcacggcaatccgacgtcgtcctatctgtggcgcaatatcatgccg
indicum lin	101	tccagcacggcaatccgacgtcgtcctatctgtggcgcaatatcatgccg
japonicum Li	151	cattgcgcggggtgggacggctgatcgccctgtgacctgatcggcattggg
indicum lin	151	cattgcgcggggtgggacggctgatcgccctgtgacctgatcggcattggg
japonicum Li	201	cgattcggacaagctcgatccgtcggggcccgagcggttatgcctatgccg
indicum lin	201	cgattcggacaagctcgatccgtcggggcccgagcggttatgcctatgccg
japonicum Li	251	agcatcgtgactatctcgacgcgctgtgggaggcgctcgatctcggggac
indicum lin	251	agcatcgtgactatctcgacgcgctgtgggaggcgctcgatctcggggac
japonicum Li	301	agggttgttctggtcgtgcatgactgggggtccgcctcggcttcgactg
indicum lin	301	agggttgttctggtcgtgcatgactgggggtccgcctcggcttcgactg
japonicum Li	351	ggcccgccgccaccgcgagcgtgtacaggggattgcctatatggaagcga
indicum lin	351	ggcccgccgccaccgcgagcgtgtacaggggattgcctatatggaagcgg
japonicum Li	401	tcgccatgccgatcgaatggcggtatttcccgaacaggatcgcgatctg
indicum lin	401	tcaccatgccgctcgaatggcggtatttcccgaacaggatcgcgatctg
japonicum Li	451	tttcaggcctttcgctcgcaggcgggcgaagaattggtgttgaggacaa
indicum lin	451	tttcaggcctttcgctcgcaggcgggcgaagaattggtgttgaggacaa
japonicum Li	501	tggttttgtcgaacaagtctccccggattgatcctgcgccccttaagcg
indicum lin	501	tggttttgtcgaacaagtctccccggattgatcctgcgccccttaagcg
japonicum Li	551	aagcggagatggccgcctatcgcgagcccttcctcgccgcccggcgaagcc
indicum lin	551	aagcggagatggccgcctatcgcgagcccttcctcgccgcccggcgaagcc
japonicum Li	601	cgtcgaccgaccctgtcttggcctcgccaaatcccgatcgaggcacc
indicum lin	601	cgtcgaccgaccctgtcttggcctcgccaaatcccgatcgaggcacc
japonicum Li	651	ggccgacgtggtcgcgatcgccgggactatgccggctgggtcagcgaaa
indicum lin	651	ggccgacgtggtcgcgatcgccgggactatgccggctgggtcagcgaaa
japonicum Li	701	gcccgattccgaaactcttcatcaacgccgagccgggagccctgaccacg
indicum lin	701	gcccgattccgaaactcttcatcaacgccgagccgggagacctgaccacg
japonicum Li	751	ggccgaatgcgcgacttctgccgcacatggc caaaccagaccgaaatcac
indicum lin	751	ggccgaatacgcgacttctgccgcacatggc caaaccagaccgaaatcac
japonicum Li	801	ggtcgcaggcgccatttcatccaggaggacagtccggacgagattggcg
indicum lin	801	ggtcgcaggcgccatttcatccaggaggacagtccggacgagattggcg
japonicum Li	851	cggcgattgcggcggtttgtccggcgattgcgcccagcataa
indicum lin	851	cggcgattgcggcggtttgtccggcgattgcgcccagcataa

APÊNDICE B – Sequências de D1

As sequências da proteína D1, com primers sense (13D196 FW e 13DI97 RV) e anti-sense (i-13DI98 RV e i-13DI99 RV) alinhadas com *LinB japonicum* e *LinB indicum* utilizando o programa Clone Manager Suite 7. Não houve identidade da sequência de D1 com as dos genes de interesse.

13D196 FW	1	---agtcctcc-----	aggagctctagctgctcaa
13DI97 FW	1	---agtcctcc-----	aggagctctagctgctcaa
i-13DI98 RV	1	---agtcctcc-----	aggagctctagctgctcaa
i-13DI99 RV	1	---agtcctcc-----	aggagctctagctgctcaa
japonicum Li	1	atgagcctcggcgcaaagccatttggcgaga	agaatcattgagatcaa
indicum lin	1	atgagcctcggcgcaaagccatttggcgaga	agaatcattgagatcaa
13D196 FW	27	ggat--gcggatgac---tatggcctccgcttcagac-----	tcccca
13DI97 FW	27	ggat--gcggatgac---tatggcctccgcttcagac-----	tcccca
i-13DI98 RV	27	ggat--gcggatgac---tatggcctccgcttcagac-----	tcccca
i-13DI99 RV	27	ggat--gcggatgac---tatggcctccgcttcagac-----	tcccca
japonicum Li	51	gggccggcgcatggcctatatcgatgaaggga	ccggcgatccgatcctct
indicum lin	51	gggccggcgcatggcctatatcgatgaaggga	ccggcgatccgatcctct
13D196 FW	65	acgagaggggcatagtgatcaaagatgtcgtccaggtcactctg-cgctg	
13DI97 FW	65	acgagaggggcatagtgatcaaagatgtcgtccaggtcactctg-cgctg	
i-13DI98 RV	65	acgagaggggcatagtgatcaaagatgtcgtccaggtcactctg-cgctg	
i-13DI99 RV	65	acgagaggggcatagtgatcaaagatgtcgtccaggtcactctg-cgctg	
japonicum Li	101	tccagcacggca-----atc--cgacgtcgtcc---	tatctgtggcgcaa
indicum lin	101	tccagcacggca-----atc--cgacgtcgtcc---	tatctgtggcgcaa
13D196 FW	114	gatcggtt---attgcgactctc-ggcacggctcaccacttagccttga	
13DI97 FW	114	gatcggtt---attgcgactctc-ggcacggctcaccacttagccttga	
i-13DI98 RV	114	gatcggtt---attgcgactctc-ggcacggctcaccacttagccttga	
i-13DI99 RV	114	gatcggtt---attgcgactctc-ggcacggctcaccacttagccttga	
japonicum Li	141	tatcatgccgcattgcgccgggctgggacggctgatcgccctgtgacctga	
indicum lin	141	tatcatgccgcattgcgccgggctgggacggctgatcgccctgtgacctga	
13D196 FW	160	-cggc-tgctagatcagta--a-----	gtttgcccgcgctccgctgcttc
13DI97 FW	160	-cggc-tgctagatcagta--a-----	gtttgcccgcgctccgctgcttc
i-13DI98 RV	160	-cggc-tgctagatcagta--a-----	gtttgcccgcgctccgctgcttc
i-13DI99 RV	160	-cggc-tgctagatcagta--a-----	gtttgcccgcgctccgctgcttc
japonicum Li	191	tcggcatgggcgattcggacaa-----	gctcgatc-cgtcgg--ggccc
indicum lin	191	tcggcatgggcgattcggaa--caagctc	gatccgtcggggcccagacgt-
13D196 FW	200	aatcccaacgtcaatcgcttgca-----	agtgccacgactcg-----
13DI97 FW	200	aatcccaacgtcaatcgcttgca-----	agtgccacgactcg-----
i-13DI98 RV	200	aatcccaacgtcaatcgcttgca-----	agtgccacgactcg-----
i-13DI99 RV	200	aatcccaacgtcaatcgcttgca-----	agtgccacgactcg-----
japonicum Li	232	gagcggttatgcctatgccgagcatcgtgactatctcgacgcgctgtggga	
indicum lin	238	tatacctatgccgagcatc-gtg-----	actatctcgacgcgctgtggga
13D196 FW	237	gcctcaagatagcgggtcatggcacgcttcacatggt-----	acag-
13DI97 FW	237	gcctcaagatagcgggtcatggcacgcttcacatggt-----	acag-
i-13DI98 RV	237	gcctcaagatagcgggtcatggcacgcttcacatggt-----	acag-
i-13DI99 RV	237	gcctcaagatagcgggtcatggcacgcttcacatggt-----	acag-
japonicum Li	282	ggcgctcgatctcggg----gacagggttggtcgtgcatgactg-	
indicum lin	282	ggcgctcgatctcggg----gacagggttggtcgtgcatgactg-	
13D196 FW	278	acga-tccc-----	ggtcggtagcctcggccagcttgtc

13DI97 FW	278	acga-tccc-----ggtcggtagcctcgccagcttgctc
i-13DI98 RV	278	acga-tccc-----ggtcggtagcctcgccagcttgctc
i-13DI99 RV	278	acga-tccc-----ggtcggtagcctcgccagcttgctc
japonicum Li	327	gggg-tccgccctcggttcgactgggcccgcgccaccgcgagcgtgta
indicum lin	320	atgactggg-----ggtcctg--cctcggc-----tt
13D196 FW	311	cagctgggaaacaatctcttcttcaaggcgaaa-----cgacagaaca
13DI97 FW	311	cagctgggaaacaatctcttcttcaaggcgaaa-----cgacagaaca
i-13DI98 RV	311	cagctgggaaacaatctcttcttcaaggcgaaa-----cgacagaaca
i-13DI99 RV	311	cagctgggaaacaatctcttcttcaaggcgaaa-----cgacagaaca
japonicum Li	376	cag--ggg----attgcctatatggaagcgatcgccatgcccgatcgaatg
indicum lin	345	cgactggg-----ccgcgcgccaccgcga-----gcgtgtaca
13D196 FW	354	ggcgaa-g---ccattat---ag---cgccctccggtttacgttggtatacg
13DI97 FW	354	ggcgaa-g---ccattat---ag---cgccctccggtttacgttggtatacg
i-13DI98 RV	354	ggcgaa-g---ccattat---ag---cgccctccggtttacgttggtatacg
i-13DI99 RV	354	ggcgaa-g---ccattat---ag---cgccctccggtttacgttggtatacg
japonicum Li	420	ggcgga-ttttccgaac---aggatcgcgatctgtttcaggcct-ttcg
indicum lin	378	ggggattg---cctatatggaag---cggtcaccatgccgctcgaatggg
13D196 FW	394	atgtttacttttgcaattgaagt---atacgtttaaa-----cgtacac
13DI97 FW	394	atgtttacttttgcaattgaagt---atacgtttaaa-----cgtacac
i-13DI98 RV	394	atgtttacttttgcaattgaagt---atacgtttaaa-----cgtacac
i-13DI99 RV	394	atgtttacttttgcaattgaagt---atacgtttaaa-----cgtacac
japonicum Li	465	ct-----cgcaggcgggcgaaga---attggt-----
indicum lin	422	cggatt--ttcccgaaacaggatcgcgatctgtttcaggcctttcgctcgc
13D196 FW	435	aattcaacgaatatattg-----aataatcgtg-----acgagtg
13DI97 FW	435	aattcaacgaatatattg-----aataatcgtg-----acgagtg
i-13DI98 RV	435	aattcaacgaatatattg-----aataatcgtg-----acgagtg
i-13DI99 RV	435	aattcaacgaatatattg-----aataatcgtg-----acgagtg
japonicum Li	489	-gttgccaggacaatggt-----ttgtcg-a-----acaagtt
indicum lin	470	aggcgggcgaagaattggtgtgtgcaggacaaatgtttttgtcgaacaagtt
13D196 FW	468	gttcgccgataggtgcag-----gactttgcaattga
13DI97 FW	468	gttcgccgataggtgcag-----gactttgcaattga
i-13DI98 RV	468	gttcgccgataggtgcag-----gactttgcaattga
i-13DI99 RV	468	gttcgccgataggtgcag-----gactttgcaattga
japonicum Li	520	ctccccgattgatcctg-----cgccccttaagcga
indicum lin	520	ctccccgattgatcctgcgccccttaagcgaagcggagatggccgccta
13D196 FW	500	ttgcaa-cgctagctcacctggcggcatagcgc-accgcggc-----tc
13DI97 FW	500	ttgcaa-cgctagctcacctggcggcatagcgc-accgcggc-----tc
i-13DI98 RV	500	ttgcaa-cgctagctcacctggcggcatagcgc-accgcggc-----tc
i-13DI99 RV	500	ttgcaa-cgctagctcacctggcggcatagcgc-accgcggc-----tc
japonicum Li	552	-----agcggagatggccgcctatcgcgagcccttc-----tc
indicum lin	570	tcgcgagcccttctctgcc-gccggcgaagccc-gtcgaccgaccctgtc
13D196 FW	543	tggaacagaaggaggcgtgctgggatgcagcagctgataggtgct---ga
13DI97 FW	543	tggaacagaaggaggcgtgctgggatgcagcagctgataggtgct---ga
i-13DI98 RV	543	tggaacagaaggaggcgtgctgggatgcagcagctgataggtgct---ga
i-13DI99 RV	543	tggaacagaaggaggcgtgctgggatgcagcagctgataggtgct---ga
japonicum Li	586	-----gccgcggcgaagc--ccgtcgaccgaccct---gt
indicum lin	618	ttggcctcgccaaatcccgatcgaggcacccggccgacgtggctcgcg
13D196 FW	590	--tggccagggccaa-----gatggct--gcgatagctgcggcgctcgtgc
13DI97 FW	590	--tggccagggccaa-----gatggct--gcgatagctgcggcgctcgtgc
i-13DI98 RV	590	--tggccagggccaa-----gatggct--gcgatagctgcggcgctcgtgc
i-13DI99 RV	590	--tggccagggccaa-----gatggct--gcgatagctgcggcgctcgtgc
japonicum Li	617	cttggcctcgccaaatccc-gatcgca--ggcaccggc--cgacgtgg
indicum lin	668	--tcgcccgggactatgcgggctggctcagcgaaagc--ccgattc-cga

13D196 FW	631	aagtagttg----cgcatggtagggcgccctcggtgggttgagt-----cg
13DI97 FW	631	aagtagttg----cgcatggtagggcgccctcggtgggttgagt-----cg
i-13DI98 RV	631	aagtagttg----cgcatggtagggcgccctcggtgggttgagt-----cg
i-13DI99 RV	631	aagtagttg----cgcatggtagggcgccctcggtgggttgagt-----cg
japonicum Li	662	tcgcgat-----cgcccggaactatgcccggctggctcagcgaaagcccg
indicum lin	713	aactcttcatcaa cgccgagccgggacacctgaccacgggc-----cg
13D196 FW	670	cttccgattgtcatgtca-cgacggcggggctatcagcaccgactttccga
13DI97 FW	670	cttccgattgtcatgtca-cgacggcggggctatcagcaccgactttccga
i-13DI98 RV	670	cttccgattgtcatgtca-cgacggcggggctatcagcaccgactttccga
i-13DI99 RV	670	cttccgactgtcatgtca-cgacggcggggctatcagcaccgactttccga
japonicum Li	706	attccgaaactc--ttcatcaacgccgagccgggagccctgaccacgggc
indicum lin	756	aatacgc--cgacttctgc-cgcacatggccaaaccagaccgaaat---ca
13D196 FW	719	agtacgcccgc-----tgccaagtacagggcctagc-----atcacg
13DI97 FW	719	agtacgcccgc-----tgccaagtacagggcctagc-----atcacg
i-13DI98 RV	719	agtacgcccgc-----tgccaagtacagggcctagc-----atcacg
i-13DI99 RV	719	agtacgcccgc-----tgccaagtacagggcctagc-----atcacg
japonicum Li	754	cgaatgcgcgacttctgcc--gcacatggccaaacagaccgaaatcacg
indicum lin	800	cggtcgcagg-----cgccatttca-----tcc-----aggagg
13D196 FW	755	acgccccgcgc-agactg-cg-----cataacgggcgattatgg-
13DI97 FW	755	acgccccgcgc-agactg-cg-----cataacgggcgattatgg-
i-13DI98 RV	755	acgccccgcgc-agactg-cg-----cataacgggcgattatgg-
i-13DI99 RV	755	acgccccgcgc-agactg-cg-----cataacgggcgattatgg-
japonicum Li	802	gtcgcaggcgc-ccattt-catccaggagga cagtc cggacgagattgg-
indicum lin	830	acagtccggacgagattggcg-----c-----ggcgattgcggc
13D196 FW	792	-taaataccg--ggggc--cttccttcttc-----
13DI97 FW	792	-taaataccg--ggggc--cttccttcttc-----
i-13DI98 RV	792	-taaataccg--gggct--cctatctctac-----
i-13DI99 RV	792	-taaatacgc--gaggc--cctctatgctc-----
japonicum Li	849	-cgcggcgattgcggc--gtttgtccggcgattgcgccagcataa
indicum lin	864	gtttgtccg--gcgattgcgc ccagcataa-----

APÊNDICE C – Sequência encomendada à empresa Eurofins.

Sítios de restrição: NcoI (5'); XhoI (3').

Elongação (bases aleatórias no início e no fim do gene para evitar erros na sequência)

His-tag (Cauda de histidina na posição amino-terminal)

Gene LinB *indicum* (SiLinB)

GATCGATCGATCCCATGGGCAGCAGC

CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT

ATGAGCCTCGGCGCAAAGCCATTTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATCAAGGGCCGGC
GCATGGCCTATATCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGCAATCCGA
CGTCGTCCTATCTGTGGCGCAATATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACGGCTGATCG
CCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTTCGGACAAGCTCGATCCGTCGGGGCCCGAGCGTT
ATACCTATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGACGCGCTGTGGGAGGCGCTCGATCTCGGGG
ACAGGGTTGTTCTGGTCGTGCATGACTGGGGGTCCGTCCTCGGCTTCGACTGGGCCCCGCC
GCCACCGCGAGCGTGTACAGGGGATTGCCTATATGGAAGCGGTCACCATGCCGCTCGAAT
GGGCGGATTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGCAGGCGGGCG
AAGAATTGGTGTTGCAGGACAATGTTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGGATTGATCCTGC
GCCCCTTAAGCGAAGCGGAGATGGCCGCCTATCGCGAGCCCTTCCTCGCCGCCGGCGAAG
CCCGTCGACCGACCCTGTCTTGGCCTCGCCAAATCCCGATCGCAGGCACCCCGGCCGACG
TGGTCGCGATCGCCGGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAAGCCGATTCCGAAACTCT
TCATCAACGCCGAGCCGGGACACCTGACCACGGGCCGAATACGCGACTTCTGCCGCACAT
GGCCAAACCAGACCGAAATCACGGTCGCAGGCGCCCATTTCATCCAGGAGGACAGTCCGG
ACGAGATTGGCGCGGCGATTGCGGCGTTTGTCCGGCGATTGCGCCCAGCATAA

CTCGAGGATCGATCGATC

ANEXO A – Relatório CETESB de dezembro/2010

Figura A.1 – Descrição da área contaminada.

Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo			
DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA RUA CÁPUA S/N - VILA METALÚRGICA - CEP: 9220780 - STO ANDRÉ			
Atividade	☐ indústria	☐ comércio	☐ posto de combustível ☒ resíduo ☐ acidentes ☐ agricultura ☐ desconhecida
Coordenadas (m): fuso 23 DATUM SAD89	UTM_E 343.279,60	UTM_N 7.387.473,35	CNPJ: 46853800000156
Classificação	contaminada sob investigação ☐ reutilização		
Etapas do gerenciamento			
☐ avaliação da ocorrência ☐ medidas para eliminação de vazamento ☐ investigação confirmatória ☐ investigação detalhada e plano de intervenção ☐ remediação com monitoramento da eficiência e eficácia ☐ monitoramento para encerramento		☐ avaliação preliminar ☒ investigação confirmatória ☐ investigação detalhada ☐ avaliação de risco/ gerenciamento do risco ☐ concepção da remediação ☐ projeto de remediação ☐ remediação com monitoramento da eficiência e eficácia ☐ monitoramento para encerramento	
Fonte de contaminação			
☐ armazenagem ☐ produção ☐ manutenção ☐ emissões atmosféricas ☐ tratamento de efluentes ☒ descarte disposição ☐ infiltração ☐ acidentes ☐ desconhecida			
Meios impactados			
Meio impactado	Propriedade		
	Dentro	Fora	
solo superficial	☐	☐	
subsolo	☒	☐	
águas superficiais	☐	☐	
águas subterrâneas	☒	☐	
sedimentos	☐	☐	
ar	☐	☐	
biota	☐	☐	
☐ existência de fase livre ☐ existência de POPs			
Contaminantes			
☐ combustíveis líquidos ☐ metais ☐ outros inorgânicos ☐ solventes halogenados ☐ solventes aromáticos ☐ solventes aromáticos halogenados ☐ PAHs ☐ PCBs ☐ metano/outras vapores/gases		☐ fenóis ☒ biocidas ☐ ftalatos ☐ dioxinas e furanos ☐ anilinas ☐ radionuclídeos ☐ microbiológicos ☒ outros	
Medidas emergenciais			
☒ isolamento da área (proibição de acesso à área) ☐ ventilação/exaustão de espaços confinados ☐ monitoramento do índice de explosividade ☐ monitoramento ambiental ☐ remoção de materiais (produtos, resíduos, etc.) ☐ fechamento/interdição de poços de abastecimento ☐ interdição edificações ☐ proibição de escavações ☐ proibição de consumo de alimento			
Medidas de controle institucional			
restrição	proposta na avaliação de risco ou no plano de intervenção	comunicada ao órgão responsável	implantada
uso de solo	☐	☐	☐
uso água subterrânea	☒	☐	☐
uso água superficial	☐	☐	☐
consumo alimentos	☐	☐	☐
uso de edificações	☐	☐	☐
trabalhadores de obras	☐	☐	☐
Medidas de remediação			
☐ bombeamento e tratamento ☐ extração de vapores do solo (SVE) ☐ air sparging ☐ biosparging ☐ bioventing ☐ extração multifásica ☐ decoloração reductiva		☐ oxidação/redução química ☐ barreiras reativas ☐ lavagem de solo ☐ remoção de solo/resíduo ☐ recuperação fase livre ☐ encapsulamento geotécnico ☐ cobertura de resíduo/solo contaminado ☐ barreira física ☐ barreira hidráulica ☐ biorremediação ☐ fitorremediação ☐ biopilha ☐ atenuação natural monitorada ☐ outros	
Medidas de controle de engenharia			

ANEXO B – Fragmento do Relatório Técnico do IPT/BNDES Nº 117 893-205 45/269

Informações retiradas, na íntegra, do Relatório Técnico do IPT/BNDES Nº 117 893-205 45/269, sobre o histórico da área estudada.

“Histórico da área– Rua Cápuia s/nº

O local do estudo é uma área com cerca de 72.545 m², situada no bairro da Vila Metalúrgica, município de Santo André - SP, junto à divisa com o município de São Paulo - SP, na margem esquerda do córrego do Oratório, tributário da margem direita do rio Tamanduateí, com acesso pela Rua Cápuia. Esta área foi utilizada, com a autorização do proprietário, como bota-fora de solo contaminado (resíduo) proveniente das Indústrias Reunidas Francisco Matarazzo, mais conhecida pela sigla IRFM.

As instalações das IRFM em São Caetano do Sul, conhecida na época como “Grupo São Caetano”, consistiam em um complexo com cerca de 20 unidades fabris, quase todas pertencentes ao ramo químico. Entre as unidades pertencentes a esse grupo, podem-se citar a refinaria de petróleo, fábricas de HCH (conhecido popularmente como BHC ou “pó de broca”), fábrica de soda cáustica, fábrica de sulfato de alumínio, fábrica de Rayon (Viscose), fábrica de papelão e lavagem de caulim. As atividades foram desenvolvidas de 1912 a 1982, restando após este período somente a fábrica de cerâmica.

Em 1987, foi iniciado pelo DAEE um trabalho de escavação para a construção de um canal na área da antiga indústria, que consistiu numa retificação do córrego dos Meninos, município de São Caetano do Sul – SP. O material resultante da escavação do canal foi depositado em um terreno pertencente ao DAEE localizado na Rua Cápuia - Bairro da Vila Metalúrgica.

Os resíduos foram dispostos diretamente na área de bota-fora, sem nenhuma proteção do subsolo, em um terreno da Rua Cápuia. Devido ao forte odor de HCH que emanava, a população residente no bairro da Vila Metalúrgica mobilizou-se para que providências fossem tomadas. Em 22 de setembro de 1987 foram realizadas, pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), amostragens dos resíduos. Nesta ocasião foi constatada uma concentração de HCH de 435 mg/kg. Conforme a *International Association for Research on Cancer* (IARC), o HCH é classificado como possível carcinogênico humano. “Possível” devido à inexistência de confirmações epidemiológicas capazes de associar o surgimento do câncer efetivamente à exposição ao HCH (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR RESEARCH ON CANCER, 2001).

Após uma reunião realizada em 23 de outubro de 1987, entre representantes da CETESB e DAEE ficou acordado que os resíduos, devido à alta toxicidade do HCH, deveriam ser dispostos em um “sistema temporário de disposição”. Este sistema contemplaria a construção de 05 células com geomembrana de PVC e geotêxtil não-tecido. Estas células consistiram em escavações no terreno natural, de cerca de 3 m de profundidade, com o fundo preenchido por brita 3 ou 4 e 20 cm de areia. Sobre essa camada, de brita e areia, foi colocado um geotêxtil não-tecido, coberto por uma geomembrana de PVC de 0,8 mm, que se estendia até as bordas da célula. Essa geomembrana de PVC foi coberta com 30 a 50 cm de argila, deixando as bordas à vista na superfície do terreno.

O resíduo foi então depositado e coberto por outra geomembrana de PVC e mais uma camada de argila com 20 a 30 cm de espessura. Em 07 de maio de 1988, verificou-se a necessidade de construir mais duas valas de contenção dos resíduos, pois as 05 construídas já estavam cheias e ainda existia material a ser disposto. Em 30 de agosto de 1988 a construção das 07 células de contenção estava concluída.

Em 2000, conforme convênio celebrado entre o DAEE e o IPT, regulado pelo termo nº 41.487 de 18/12/98, a antiga Seção de Águas Subterrâneas do Agrupamento de Geologia Aplicada ao Meio Ambiente (AGAMA) elaborou o Relatório Técnico Convênio DAEE/IPT nº 06: Parecer Técnico do IPT nº 7.775/00, que corresponde à Proposta de Trabalho nº 25.846/00. Este Parecer teve como objetivo a elaboração de diagnóstico de possível contaminação de solo e água subterrânea na área do bota-fora da Rua Cápuia, em Santo André-SP.

A conclusão deste trabalho aponta que os resultados obtidos das análises químicas realizadas no solo e na água subterrânea existente no entorno das células, constataram a presença do composto HCH em concentrações que não representam riscos adversos, porém indicando provável fuga do material acondicionado nas células. Em dois locais amostrados, foram identificadas concentrações anômalas de HCH. Estas anomalias eram pontuais e poderiam estar associadas aos volumes originais remanescentes do resíduo não adequadamente disposto na área, antes da fase de envelopamento, não sendo, portanto, resultado de fuga a partir das células. O mapa potenciométrico levantado na época mostrou que a direção preferencial do fluxo subterrâneo é para o córrego do Oratório (sentido noroeste), o que contraria o fato de terem sido encontrados contaminantes para lado direito (leste) das células. Análises das amostras de água do córrego do Oratório não confirmaram a presença dos compostos denominados hexaclorociclohexano em concentrações suficientes para caracterizar estes locais como poluídos por tais compostos.

No relatório Instituto de Pesquisas Tecnológicas (2000), foram feitas recomendações de remoção de todo o resíduo contido nas células, juntamente com o solo onde foram identificadas anomalias, para deposição em aterro industrial controlado (Resíduos Classe I). Recomendou-se que, após a retirada, fosse coberta toda a área das células com solos limpos e fosse desconsiderada, como alternativa para consumo, a água do aquífero livre ocorrente na área, uma vez que esta se mostra inadequada para consumo humano. Tendo como meta resolver o assunto, o DAEE contratou o IPT para a execução de serviços de assessoria técnica relativa às alternativas de remediação da área da Rua Cápuia, com a intenção de encontrar a melhor solução para o problema. Deste modo, estes trabalhos dão sequência aos estudos iniciados no ano de 2000 (Parecer Técnico IPT nº 7.775/00).

Em 08 de dezembro de 2003, o IPT elaborou a Proposta de Trabalho nº 30.065/03 intitulada “Assessoria técnica ao DAEE relativamente às alternativas de remediação de área contaminada localizada no final da Rua Cápuia, Vila Metalúrgica, Santo André, SP”. Esta proposta culminou no Relatório Técnico IPT No 80063-205 de 2005, relativo às alternativas de descontaminação da área contaminada por HCH. Neste relatório, foram estudados vários métodos de remediação, podendo-se ressaltar três metodologias em ordem crescente de prioridades que podem ser aplicadas na área: disposição em aterro ou célula de segurança, biorremediação e oxidação química (IPT, 2005).

Após apresentado o relatório de 2005, o DAEE foi incumbido de apresentar uma proposta concreta de tratamento dos resíduos contaminados com HCH, com respectivo cronograma de ações, bem como realizar a investigação confirmatória da contaminação da área do entorno das células utilizadas no seu armazenamento provisório. Em 2009, o IPT realizou uma reavaliação da contaminação das células de resíduos contaminados por HCH, e o seu entorno, localizadas no bota-fora da Rua Cápuia, Município de Santo André (SP), e estudo visando o desenvolvimento de tecnologias de remediação do solo contaminado.

ANEXO C – Fragmento do Relatório Técnico do IPT/BNDES Nº 117 893-205 45/269

Informações retiradas na íntegra do Relatório Técnico do IPT/BNDES Nº 117 893-205 45/269, sobre a coleta de solo contaminado.

“Coleta de amostras de resíduo (solo contaminado com HCH)

Em 2009, para o projeto Rua Cápua – DAEE, as amostras de resíduos foram coletadas, em princípio, com trado tipo holandês, devido à maior sensibilidade na perfuração, permitindo identificar a posição inicial da geomembrana de topo. Os pontos centrais de cada célula foram amostrados, sendo perfurados até uma profundidade de 2 m, totalizando 7 (sete) pontos de amostragem (1 para cada vala), sendo denominados da seguinte maneira: C1-R1, C2-R1, C3-R1, C4-R1, C5-R1, C6-R1 e C7-R1, a localização das células e dos pontos previstos para amostragem podem ser observados, respectivamente, na Figura A2. Como podemos observar na a célula 5, correspondente ao ponto C5-R1, não foi amostrada por se encontrar totalmente alagada.

Após as primeiras 7 (sete) amostras coletadas com trado, tendo maior conhecimento da espessura média da camada de argila superficial de recobrimento de cada célula, foram amostrados 5 (cinco) pontos aleatórios em cada célula com equipamento de cravação contínua e hidráulica (Geoprobe®), totalizando previsão de amostragem de mais 35 pontos. Este equipamento permitiu a coleta dos resíduos através de *liners*, conservando-se de melhor maneira as características originais dos resíduos, e evitando a perda de partículas voláteis. Durante esta campanha, foram coletadas amostras até a profundidade de 2,30 m. Porém, devido ao período de chuvas intensas no final de 2009, os pontos C2-R2, C2-R4, C2-R5, C3-R2, C3-R4, C4-R3, C5-R2, C5-R3, C5-R4, C5-R5, C7-R1, C7-R2, C7-R4 e C7-R5 não foram amostrados com *liner* por estarem alagados.

Figura A.2 – Disposição das células (à direita), pontos de amostragem previstos para células de resíduos (meio) e pontos amostrados nas células (à direita).

Fonte: Elaborado pelas equipes do Centro de Tecnologias Ambientais e Energéticas (CETAE) e Laboratório de R

Somente foi considerado como resíduo o material coletado a partir da geomembrana de PVC de cobertura da vala, sendo desconsiderada a porção de argila. Das 18 (dezoito) amostras coletadas com o *Geoprobe*®, as quais foram analisadas pelo Laboratório de Análises Químicas (LAQ/IPT), 14 (quatorze) foram homogeneizadas em laboratório, antes da análise química, e 04 (quatro) amostras centrais, denominadas C1-R1, C2-R1, C3-R1 e C6-R1

ensaiadas separadamente em diferentes profundidades, foram encaminhadas para ensaios químicos e físicos, caracterizando-se assim os resíduos.

Resíduos

A amostragem nas células C1, C2, C3, C4, C6 e C7 (Figura A2) foram realizadas de 06 a 20 de outubro de 2009. Foram coletadas amostras em 24 pontos de amostragem, sendo cinco pontos coletados nas células 01, 06 e 07, dois na célula 02, três na célula 03 e quatro na célula 04. Na célula 05 não foi possível coletar amostras, pois durante toda a campanha esta célula apresentou-se totalmente alagada. Em princípio era para ser coletadas 05 amostras por célula, porém, como a campanha foi realizada em período de muita chuva, alguns pontos não puderam ser coletados por haver encharcamento em algumas áreas das células, impossibilitando a coleta. A **Tabela 24** apresenta a concentração dos compostos detectados acima ou próximos aos Valores Orientadores de Referência (VORs) nos resíduos contidos nas células investigadas, com os compostos que apresentaram as maiores concentrações.

Tabela 24 – Compostos acima ou próximos dos VORs nas células.

Compostos	VOR	Maiores concentrações (mg/kg)					
		Célula C1	Célula C2	Célula C3	Célula C4	Célula C6	Célula C7
Hexaclorobenzeno	1,0E-01	ND	9,5E-02	1,5E-01*	ND	ND	ND
PCBs	3,0E-02	1,1E-01	1,5E-02	4,2E-01*	1,9E-01	2,4E-01	7,8E-02
α-HCH	1,0E-01	2,4E+03*	6,4E+02	4,2E+02	4,7E+02	2,9E+01	3,0E+00
β-HCH	1,0E-01	1,7E+03*	1,9E+02	1,6E+02	6,5E+02	1,9E+01	4,4E+00
γ-HCH (lindano)	7,0E-02	8,3E+01*	1,3E+01	1,5E+01	1,4E+01	8,1E-01	7,4E-01
δ-HCH [†]	1,0E-01	1,0E+02*	6,7E+01	2,5E+01	3,8E+01	2,3E+01	1,3E+01
Σ-HCHs [†]	1,0E-01	4,2E+03*	7,6E+02	6,0E+02	1,1E+03	6,0E+01	1,8E+01
Benzeno	0,08	0,3	10,3	10,6*	5,8	0,2	0,02
Antimônio	10	15*	ND	ND	ND	ND	ND
Chumbo	300	965*	204	312	425	594	258
Cobre	400	417	143	239	2658*	57	83
Mercúrio	36	9	22	33	60	72*	32
Níquel	100	233*	32	29	30	22	14

†Somatória dos isômeros de HCH; ‡Valores de referência definidos pela USEPA; *Maior concentração encontrada.

Valores acima do VOR.

Valores próximos do VOR

Fonte: Elaborado pelas equipes do Centro de Tecnologias Ambientais e Energéticas (CETAE) e Laboratório de Resíduos e Áreas Contaminadas (LRAC) do IPT.”