

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COMO RESULTADO DA BIODEGRADAÇÃO DE NAFTALENO POR *Pseudomonas fluorescens* HK44

Hugo Monteiro de Magalhães

Bolsista de Iniciação Científica, Química Bacharel e Licenciatura, UFF

Erika Valdman

Orientadora, Eng^a. Química, Dr^a.

Resumo

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) consistem um grupo de compostos que agredem ao meio ambiente e, conseqüentemente, ao ser humano. Um processo eficaz para a degradação desses compostos é a biorremediação. Esta técnica fundamenta-se na oxidação biológica por microrganismos, transformando as substâncias nocivas em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade. Neste trabalho, avaliou-se a concentração de proteínas resultante da degradação de naftaleno pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44. Os experimentos de biodegradação foram realizados diversas vezes sem alterar as concentrações iniciais do poliaromático (10mg/L) e de células (0,2g/L). As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry. Após 100 minutos de testes, observou-se que o percentual de proteínas aumentou cerca de 20% em ambos os frascos em um dos testes realizados. O resultado obtido com a análise proteica mostrou que esta técnica pode ser uma alternativa na quantificação do processo de biodegradação de naftaleno.

1. Introdução

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) são uma classe de contaminantes bastante conhecidos, originados da combustão incompleta de compostos orgânicos e processos geoquímicos. Estes podem ser encontrados em todos os segmentos ambientais, incluindo solo, água e ar e são passíveis de serem biodegradados (Valdman, 2004).

Dentre os PAHs, o naftaleno foi estudado como modelo por possuir a maior solubilidade em água (31,7mg/L) (Valdman *et al.*, 2004). Este hidrocarboneto, quando ingerido ou inalado pelo homem, pode provocar diversos efeitos na saúde, dentre eles: anemia hemolítica, catarata, aumento do baço, danos aos rins e ao cérebro.

Uma das formas de tratar efluentes e locais contaminados por naftaleno é a biorremediação, que consiste no uso de microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, para degradar substâncias nocivas, transformando-as em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade (Tiburtius *et al.*, 2004).

A degradação de hidrocarbonetos em moléculas mais simples envolve uma série de reações químicas na qual proteínas do tipo: lipases, catalases e desidrogenases são sintetizadas. A quantificação dessas proteínas vem sendo utilizada para monitorar o processo de remoção de hidrocarbonetos por vários grupos de pesquisa, segundo a revisão consultada (Mailaa *et al.*, 2005).

Neste trabalho, a determinação proteica foi utilizada como medida do processo de biodegradação de naftaleno, utilizando uma bactéria como agente degradador.

2 Objetivo

Verificar a viabilidade da utilização do Método de Lowry para quantificar o conteúdo proteico resultante do processo de biodegradação do naftaleno pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo de Estudo

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* HK44 (DMSZ 6700) foi gentilmente cedida pela Prof.^a Dr.^a Selma G. F. Leite do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química – UFRJ. Esta bactéria foi isolada de solo contaminado com PAHs (King *et al.*, 1990).

A quantificação celular foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 546nm a partir da curva de calibração obtida em trabalho anterior (Magalhães *et al.*, 2004).

3.2 Meios, Soluções e Reagentes.

3.2.1 Utilizados nos experimentos de biodegradação:

- ✓ Solução estoque de naftaleno em etanol (10mg/mL).
- ✓ Solução estoque de tetraciclina em etanol:água (1:1) (15mg/mL).
- ✓ Meio de crescimento (YEPG-Tc) - Extrato de lêvedo (0,2g/L); Peptona de caseína (2,0g/L); Glicose (1,0g/L); Nitrato de amônio (0,2g/L) e tetraciclina (15mg/L).
- ✓ Meio de degradação (MD-Tc) - Extrato de lêvedo (0,1 g/L) e tetraciclina (15mg/L).

3.2.2 Utilizados para análise de proteínas:

- ✓ Solução padrão de BSA (Albumina de Soro Bovino) em água (0,1g/L);
- ✓ Reagente A (25mL): Solução de sulfato de cobre (1%) (0,25mL); Solução de tartarato de sódio e potássio (0,1N) (0,25mL); Solução de carbonato de sódio (2%) em hidróxido de sódio (0,1N) (completar volume)
- ✓ Reagente B: Solução de Folin-Ciocalteu (Diluição em água destilada 1:1) (10mL, uma vez que foi necessário 0,2mL deste para cada amostra)

3.3 Curva de calibração para proteína (BSA) e para naftaleno

Partindo de soluções padrão de BSA e de naftaleno, item 3.2, realizaram-se algumas diluições em água na faixa de 0,01 a 0,1g/L para proteína e de 0,2 a 12mg/L para naftaleno. Fez-se a leitura da absorvância correspondente no comprimento de onda ótimo para cada substância 660nm e 274nm, respectivamente.

Com os valores obtidos, graficaram-se as absorvâncias medidas *versus* as concentrações de proteína e de naftaleno, obtendo-se as curvas de calibração para ambos.

3.4. Experimento de Biodegradação de Naftaleno

Após o crescimento celular ter chegado na fase estacionária, fase esta definida em estudos que antecederam este projeto (Magalhães *et al.*, 2004), as células foram centrifugadas por 25 minutos a 3500rpm. Ressuspendeu-se a biomassa em pequeno volume de água destilada e mediu-se a DO_{546nm} da suspensão celular resultante.

Com o auxílio do peso seco, também realizado em estudo preliminar, cálculos foram realizados para saber qual o volume (mL) deste concentrado celular deveria ser adicionado nos frascos (250mL) contendo 50mL de meio de degradação para se obter a concentração celular 0,2g/L nos experimentos de biodegradação.

Após adição da biomassa no meio de detecção, uma alíquota de 5mL foi retirada para quantificação de proteínas referente ao ponto inicial.

O início do teste de biodegradação foi dado no momento em que se adicionou 50 μ l da solução estoque de naftaleno para que a concentração do mesmo no meio já inoculado fosse de 10mg/L. Neste momento, foi retirada uma outra alíquota de 3mL, para análise inicial de naftaleno (ponto 0h) e os frascos foram colocados a 28°C sob agitação constante de 150rpm durante 100 minutos.

Após o término do experimento, fez-se uma centrifugação da suspensão a fim de obter as células que sofreriam lise para análise de proteínas. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação do naftaleno.

Como controle para naftaleno (**C1**), utilizou-se um frasco isento de bactéria HK44 e com as mesmas quantidades de meio e naftaleno, para verificar a perda do hidrocarboneto por volatilização.

Já como controle para as proteínas (**C2**), utilizou-se um frasco isento de naftaleno e com as mesmas quantidades de meio e bactéria HK44, para verificar a quantidade de proteínas normalmente produzidas pelo metabolismo celular.

Os experimentos de biodegradação foram realizados em duplicata a fim de se obter uma maior precisão dos resultados.

3.5 Quantificação de Proteínas

Antes de realizar a quantificação protéica, fez-se necessário um procedimento para obtenção das amostras na seguinte ordem:

- Centrifugação (20 minutos, 3000 rpm) de 5mL das amostras inicial e final coletadas durante o experimento contendo 0,2g/L de células

- Descarte do sobrenadante e ressuspensão de 2,0 mg de células em 2,0 mL de água destilada;
- Adição de 0,2 mL de NaOH (1,0N);
- Aquecimento da suspensão a 100°C (banho maria) por 10 minutos;
- Centrifugação, por 40 minutos, a 3000 rpm;
- Separação do sobrenadante para quantificação de proteínas.

A quantificação de proteínas nas amostras foi realizada pelo Método de Lowry que consiste em duas reações colorimétricas: A reação de Biureto, na qual os íons Cu^{2+} interagem com as ligações peptídicas originando uma coloração azul intensa; E a reação que envolve a adição do reagente de Folin-Ciocalteu em uma mistura complexa de sais inorgânicos cuja reação com a tirosina e o triptofano resulta em uma coloração azul esverdeada intensa. A combinação dessas duas reações fornece um teste muito mais sensível que as duas reações isoladamente. (Lowry *et al.*, 1951).

Nesta etapa, foram combinados 0,5mL do sobrenadante obtido no final do procedimento descrito, com 2mL do Reagente A (Vide 3.2.2) e foram aguardados 10 minutos a 30°C. Passado este tempo, adicionou-se 0,2mL do Reagente B (Vide 3.2.2) e um tempo de 50 minutos foi aguardado sob 30°C em estufa. A intensidade da cor violeta resultante foi analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda ótimo 660nm. (Lowry *et al.*, 1951).

4. Resultados e Discussão

4.1 Curva de Calibração para Proteína BSA (Albumina do Soro Bovino)

Tradicionalmente, a proteína BSA (Albumina do Soro Bovino) é utilizada como padrão para a quantificação proteica resultante do metabolismo celular (Lowry *et al.*, 1995). Para obtenção da curva padrão para proteína, foram feitas sete medidas de absorvâncias, a 660nm, para diferentes diluições (Fig. 1).

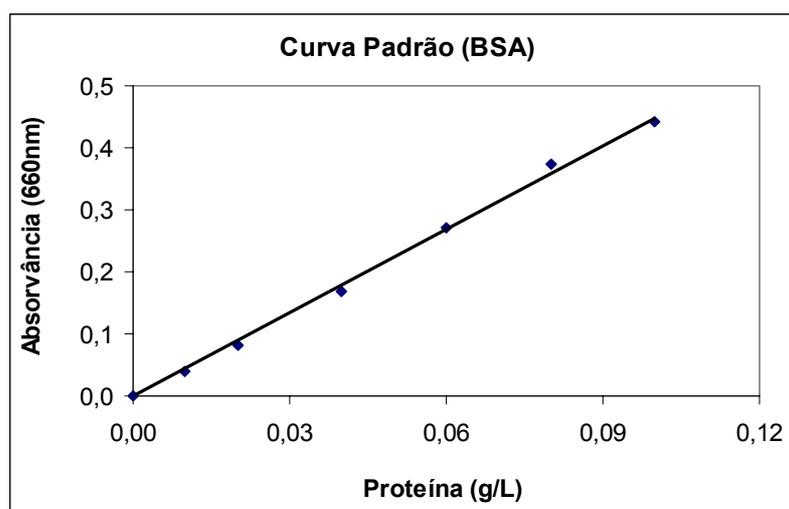


Figura 1: Curva de calibração para proteína na água.

Pelo resultado obtido, pode-se observar uma boa correlação linear ($R^2 = 0,9974$) na faixa entre 0 e 0,12 g/L e uma relação direta entre a concentração de proteína (g/L) e a densidade ótica lida:

$$D.O._{660nm} = 4,4824x[Proteínas]$$

Com a equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas (g/L) provenientes das células, medindo a absorvância da amostra no comprimento de onda ótimo: 660nm.

4.2 Curva de Calibração para Naftaleno.

A fim de saber se a solução estoque de naftaleno manteria a mesma concentração se estocada no congelador, realizaram-se duas curvas de calibração, uma para solução preparada horas antes da análise e outra para solução preparada e estocada há aproximadamente 15 dias. Utilizando água como solvente, 7 diluições foram feitas para cada uma das soluções e suas respectivas absorvâncias foram medidas a 274nm (Fig. 2).

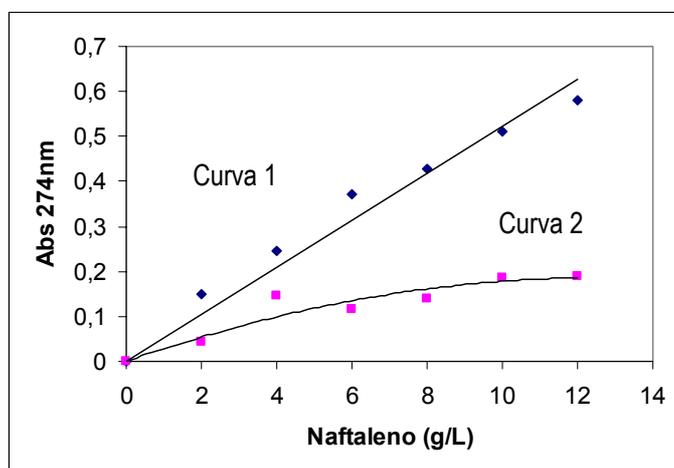


Figura 2. Curva de calibração para naftaleno no meio aquoso. (◆) Curva 1 - Solução preparada horas antes, (■) Curva 2 - Solução preparada há 15 dias.

Pela Figura 2, nota-se que os pontos obtidos para uma solução preparada recentemente (**curva 1**) estão mais lineares que os pontos da mesma solução preparada há 15 dias e estocada no congelador (**curva 2**). Tal linearidade pode ser comprovada pela análise do (R^2) das duas curvas uma vez que, para a primeira, tem-se ($R^2 = 0,9645$), enquanto que para segunda, tem-se ($R^2 = 0,8955$).

Deste modo, descarta-se a possibilidade de armazenamento de soluções desse poluente durante períodos longos provavelmente devido à volatilização do poliaromático utilizado. Assim, todas as soluções de naftaleno utilizadas foram recém-preparadas.

Uma vez que a **curva 1** apresentou uma relação direta entre a densidade ótica e a concentração de naftaleno (mg/L), pode-se utilizar a equação de reta fornecida pela mesma, para quantificação do poluente.

$$D.O._{274nm} = 0,0522x[Naft.]$$

4.3 Quantificação do Experimento de Biodegradação

A concentração celular utilizada nos experimentos foi de 0,2g/L, a mesma utilizada em testes anteriores que mostraram uma remoção de 54,9% do poliaromático em questão pela bactéria de estudo através da quantificação de naftaleno inicial e final. (Magalhães *et al.*, 2004)

Conforme mencionado anteriormente, os testes foram realizados em duplicata (A e B) e os controles de naftaleno (C₁) e de proteínas (C₂) foram assim denominados.

Diversos experimentos em duplicata foram realizados para verificar se a concentração de proteínas resultantes do metabolismo celular também poderia ser um indicativo deste processo de biodegradação de naftaleno pela bactéria HK44. O melhor resultado obtido após a quantificação proteica segue na **Tabela 01**.

Tabela 01 – Aumento de proteínas (%) no teste de biodegradação.

Frascos	Teste 1
C2	0
A	21
B	18

Tabela 1. Quantificação de proteínas nos teste de biodegradação.

O controle C1 não está apresentado na tabela acima uma vez que este era isento de células e, conseqüentemente, não havia proteínas a serem quantificadas. Já no Controle C2, não se observou uma variação protéica, o que era esperado por não haver contaminante nesses frascos.

Pela análise dos resultados alcançados pode-se observar uma elevação do percentual de proteínas em ambos os frascos do teste, sendo que no frasco A, o aumento foi um pouco maior, chegando a 21% de aumento de proteínas, o que confere uma maior degradação de naftaleno no mesmo.

O aumento de cerca de 20% da concentração proteica obtido no experimento está de acordo com a remoção de 54,9% de naftaleno observada em teste anterior.

Sabe-se que a eficácia do processo de biodegradação é diretamente proporcional à concentração de proteínas. (Sandrin *et al.*, 2000).

A fim de ratificar a eficiência do método, outros testes estão sendo realizados para avaliar a relação entre o percentual de remoção de naftaleno e a produção de proteínas pela bactéria *Ps. fluorescens* HK44.

5. Conclusões

- ✓ Obteve-se a curva de calibração para proteínas, no comprimento de onda ótimo, 660nm, $D.O_{.660nm} = 4,4824x[Proteína]$ ($R^2=0,9974$), na faixa de concentração de 0,01 a 0,1 mg/L .
- ✓ A melhor curva de calibração para naftaleno foi referente à solução recém-preparada, obtida no comprimento de onda ótimo, 274nm, $D.O_{.274nm} = 0,0522x[Naft.]$ ($R^2 = 0,9645$), na faixa de concentração de 0,2 a 0,12 g/L. Comprova-se assim a não possibilidade de estocagem desta solução por longos períodos.
- ✓ A análise de proteínas mostrou ser uma técnica alternativa de quantificação da biodegradação do naftaleno pela bactéria *Ps. fluorescens* HK44 uma vez que o percentual de proteínas aumentou cerca de 20% nos dois frascos.

6. Bibliografia

- Magalhães, H. M.; Valdman, E.; (2004) "Cinética de Biodegradação de Naftaleno por *Pseudomonas fluorescens* HK44 " XII Jornada Interna de Iniciação Científica do CETEM/MCT.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, R. L.; Randall, R. J.; (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193:265–275.
- Mailaa, M. P.; Cloeteb T. E.; (2005) "The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants— perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review" International Biodeterioration & Biodegradation 55, 1–8.
- Sandrin, T. R.; Chech, A. M.; Maier, R. M.; (2000) "A Rhamnolipid Biosurfactant Reduces Cadmium Toxicity during Naphthalene Biodegradation" Appl. Environ. Microbiol. 66, nº 10, 4585–4588.
- Dorn, J. G.; Frye, R. J. e Maier, R. M. (2003) "Effect of Temperature, pH, and Initial Cell Number on luxCDABE and nah Gene Expression during Naphthalene and Salicylate Catabolism in the Bioreporter Organism *Pseudomonas putida* RB1353." Appl. Environ. Microbiol. 69, 2209-2216.
- King, J.M.H.; Digrazia, P.M.; Applegate, B.; Burlage, R.; Sanseverino, J.; Dunbar, P.; Larimer, F. E Sayler, G.S. (1990) "Rapid Sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation." Science. 249, 778-781.
- Tiburtius, E. R. L.; Zamora, P. P.; Leal, E. S. (2004) "Contaminação de águas por BTXS e processos utilizados na remediação de sítios contaminados." Quím. Nova 27(3):441-446.

Valdman, E.; Valdman, B.; Battaglini, F. e Leite, S. G. F. (2004) "On line detection of low naphthalene concentrations by a bioluminescent sensor". Proc. Biochem. 39(10):1217-1222.

Valdman, E. (2004) "Desenvolvimento e aplicação de um biossensor luminescente para detecção de naftaleno", Tese D.Sc., Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro.