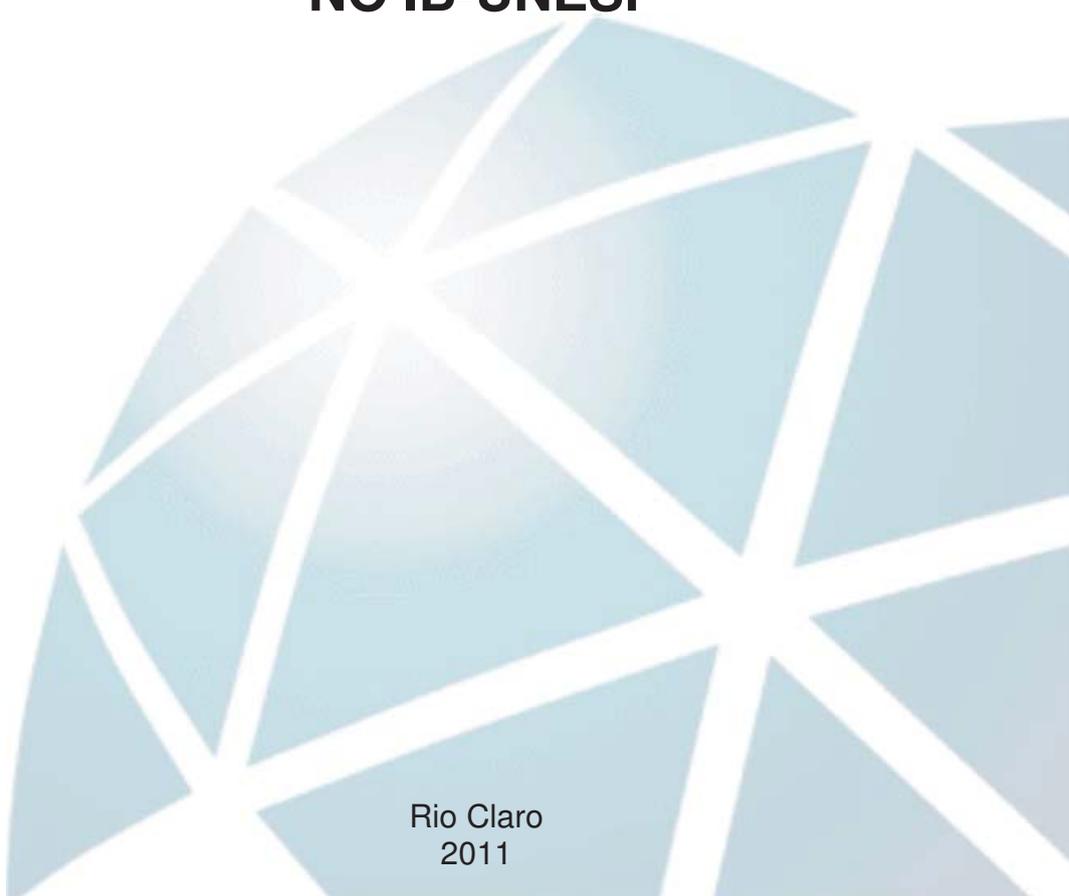

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCAS DE FREITAS COLI ROCCO

**PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA
A DETOXIFICAÇÃO DE RESÍDUOS
CONTENDO ACETONITRILA GERADOS
NO IB-UNESP**



Rio Claro
2011

LUCAS DE FREITAS COLI ROCCO

PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS PARA A DETOXIFICAÇÃO DE
RESÍDUOS CONTENDO ACETONITRILA GERADOS NO IB-UNESP

Orientador (a): PROFA. DRA. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2011

620.112 Rocco, Lucas de Freitas Coli
2 Processos Biotecnológicos para a Detoxificação de
R671p Resíduos Contendo Acetonitrila Gerados no IB-UNESP /
 Lucas de Freitas Coli Rocco. - Rio Claro : [s.n.], 2011
 51 f. : il., figs., tabs., fots. + 1 Questionário

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Profa. Dra. Cintia Duarte de Freitas Milagre

1. Biodegradação . 2. Biodegradação de acetonitrila. 3.
Resíduos tóxicos. 4. Micro-organismo. I. Título.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. Micro-organismos	4
1.2. Processos Biotecnológicos.....	5
1.2.1. Biodegradação.....	7
1.3. Nitrilas	8
1.3.1. Acetonitrila.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Levantamento de dados sobre produção de resíduos contendo acetonitrila	13
3.2. Materiais e procedimentos gerais	13
3.2.1. Reagentes e solventes.....	13
3.2.2. Micro-organismos utilizados nas reações de biodegradação	13
3.2.3. Procedimentos gerais adotados no laboratório.....	13
3.3. Meios de cultura.....	14
3.3.1. Meio NB (Nutrient Broth).....	14
3.3.2. Meio Mineral.....	14
3.3.3. Meio MM2	15
3.4. Coleta dos micro-organismos	15
3.4.1. Amostra de solo.....	15
3.4.2. Amostra de mandioca.....	16
3.5. Cultivo dos micro-organismos para isolamento	16
3.6. Procedimentos para isolamento dos micro-organismos.....	16
3.6.1. Diluições seriadas.....	16
3.6.2. Isolamento das colônias em placas de Petri	17
3.7. Preservação e armazenamento dos micro-organismos	18
3.7.1. Preservação das culturas à curto prazo.....	18
3.7.2. Preservação das culturas à médio prazo.....	18
3.8. Procedimento geral para os ensaios de triagem enzimática.....	19
3.8.1. Preparo da solução tampão Sørensen 10 mM pH 7.2 pKa = 7,20	20
3.9. Procedimento geral para os ensaios de determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	21
3.9.1. Preparo da solução de MTT	21
3.10. Avaliação da fonte de carbono e pH nas reações de biodegradação.....	22

3.11. Método Cromatográfico.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Levantamento de dados sobre consumo de acetonitrila e produção de resíduos provenientes do descarte da mesma.....	24
4.2. Isolamento e seleção de micro-organismos do solo e de mandioca.....	25
4.2.1. Coleta de solo UNESP - RC.....	26
4.2.2. Coleta de raiz de mandioca	26
4.2.3. Seleção microbiana	27
4.3. Preservação e armazenamento das colônias	30
4.4. Triagens enzimáticas.....	31
4.5. Ensaios de MIC – Concentração Mínima Inibitória	37
4.6. Avaliação da influência do pH e fonte de C na biodegradação da ACN.....	41
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Micro-organismos

Estima-se que a Terra tenha surgido há 4,6 bilhões de anos atrás. No início a atmosfera tinha uma composição anóxica, ou seja, sem a presença de oxigênio, tendo disponível apenas nitrogênio (N_2), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), amônia (NH_3) e outros gases que seriam tóxicos à maioria dos seres vivos em nosso planeta hoje. Sabe-se que foi deste ambiente que, há cerca de 3,9 bilhões de anos, surgiram as primeiras formas de vida a exibir características básicas de sistemas vivos, os micro-organismos. Sua estrutura simples, unicelular, procarionte, permitia a sobrevivência em um ambiente inóspito, motivos pelos quais surgiram primeiramente micro-organismos capazes de realizar metabolismo anaeróbio, ou seja, sem a utilização de oxigênio para obtenção de energia, como as bactérias fototróficas anoxigênicas. (MADIGAN et al, 2010).

A partir de então houve uma grande diversificação de micro-organismos que resultou no aparecimento das cianobactérias, capazes de captar o CO_2 da atmosfera e após utilizá-lo liberar O_2 . Este processo causou uma lenta oxigenação da atmosfera e permitiu o surgimento e evolução das formas de vida multicelulares que conhecemos hoje. Desta forma os micro-organismos são considerados os seres vivos mais antigos e duradouros da Terra. Mesmos nos grandes eventos de extinção que ocorreram ao longo dos anos, os micro-organismos conseguiram perseverar graças a sua excepcional capacidade de adaptação ao meio e sobrevivência a condições adversas (MADIGAN et al, 2010).

Os micro-organismos constituem, coletivamente, a maior massa de matéria viva do planeta e estão associados a muitos outros organismos multicelulares e processos bioquímicos. Desta forma é inerente o interesse pelos micro-organismos e por possíveis aplicações destes para beneficiar o homem. Desde o início das civilizações há relatos sobre sua utilização, inicialmente relacionada com a produção de bebidas alcoólicas através da fermentação dos cereais ou grãos, há cerca de 6000 a. C. pelos sumérios e babilônios. Seguido a este processo também há a produção de vinagre pelos egípcios há 5000 a. C., através da biotransformação do etanol em ácido acético, e utilização de fermento para a fabricação de pães, há cerca de 2000 a. C.. Além dessas aplicações, a produção de queijo, iogurtes e outros produtos alimentícios através da utilização de micro-organismos são utilizados pelo homem

há séculos (800 a. C), embora o real papel dos micro-organismos nestes processos de fabricação não fosse compreendido (OLIVEIRA et al, 2009).

Apenas após 1856, período posterior à invenção do microscópio, Louis Pasteur conseguiu provar que os processos fermentativos eram realizados por micro-organismos, evidenciando também uma relação entre os micro-organismos e os processos realizados pelos mesmos. Desta forma, aprofundou o estudo desses seres vivos até então pouco conhecidos, estudo que a partir de 1899 ficou conhecido como Microbiologia. A origem etimológica da palavra microbiologia ilustra o conceito que ela carrega: a junção de elementos de composição grega, micro vem de *mikrós*, que significa pequeno, bio vem de *bíos*, que significa vida e logia vem de *lógos*, que significa estudo.

1.2. Processos Biotecnológicos

A Microbiologia é dividida basicamente em duas grandes áreas, uma que abrange o estudo dos processos básicos da vida dos seres vivos microscópicos e seu entendimento (Microbiologia Básica) e a segunda que utiliza os conhecimentos a respeito da primeira para aplicá-los de forma a beneficiar a humanidade (Microbiologia Aplicada) (MADIGAN et al, 2010). Um grande marco na história da humanidade foi a Revolução Industrial, que ocorreu no século XIX e definiu a forma de vida que a sociedade leva até hoje. Este período teve também sua importância para a Microbiologia, pois deu-se início aos estudos de micro-organismos aplicados a processos industriais em grande escala. Assim começou a chamada era da Biotecnologia (WOHLGEMUTH, 2009), que segundo a Convenção sobre Diversidade Biológica da ONU (Organização das Nações Unidas) é definida* como “*qualquer aplicação tecnológica que use sistemas biológicos, organismos vivos ou derivados destes, para fazer ou modificar produtos ou processos para uso específico*”.

Sabe-se que os micro-organismos são utilizados pelo homem há milênios, porém o advento de novas tecnologias permitiu estudos mais aprofundados dos micro-organismos. Através destes estudos houve um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelos seus processos metabólicos. Descobriu-se que estes processos ocorrem pela ação de biocatalisadores, as enzimas, presentes nos micro-organismos. As enzimas ocuparam lugar de destaque nas pesquisas pela sua grande capacidade catalítica, quimioespecificidade,

* Esta definição foi ratificada por 168 países incluindo o Brasil, sendo aceita pela FAO (Food and Agriculture Organization) e a OMS (Organização Mundial de Saúde).

regioespecificidade e estereoespecificidade, além de atuarem em condições brandas de reação (pH próximo ao neutro e à temperatura e pressão ambiente) que evitam possíveis reações laterais. Estas características as colocam como candidatas ideais para as reações industriais.

A aplicação de processos biotecnológicos no Brasil começou na década de 70 com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), um período em que a crise do petróleo fez crescer a busca por fontes alternativas de energia que não combustíveis fósseis. Como o Brasil possui um setor açucareiro bem desenvolvido, que remonta ao período colonial, com mão de obra disponível, terras e climas propícios para o plantio da cana-de-açúcar, a produção de álcool combustível no país se instalou rapidamente. Entretanto era necessária uma busca por leveduras mais resistentes e que realizassem o processo de fermentação alcoólica com maior eficiência (OLIVEIRA et al, 2009).

Foi neste período que o CNPq lançou dois programas para incentivar os trabalhos em biotecnologia no país, denominados de Programa Integrado de Desenvolvimento (PID) e Programa Integrado em Doenças Endêmicas (PIDE). A partir de então o governo vem lançando sucessivos programas que permitiram o aumento de participação de pesquisadores brasileiros nas sub-áreas de Biotecnologia e as Fundações de Amparo à Pesquisa (FAPs) têm investido muito na área. Um exemplo disto é a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que vem sendo bastante ativa no fomento de projetos da área de Biotecnologia no sudeste do Brasil (OLIVEIRA et al, 2009).

Nas últimas décadas observa-se um grande crescimento na área de Biotecnologia pelo fato das indústrias estarem sendo alvo de constantes pressões de cunho ambiental. Tanto a sociedade quanto os órgãos reguladores vem exigindo que as indústrias busquem novas maneiras de realizar seus processos de forma eficiente e ecologicamente correta, respeitando e resguardando a natureza e conseqüentemente os próprios seres humanos. Isso acarreta uma maior demanda por processos biotecnológicos que sejam capazes de melhorar a eficiência dos processos e diminuir os poluentes gerados e liberados.

Neste contexto, a área de Biotransformações, que inclui estudos de Biodegradação, ocupa um espaço de destaque nos setores de P&D (Pesquisa e Desenvolvimento). Atualmente é uma tecnologia estabelecida e atraente frente aos processos químicos tradicionais para a manufatura de produtos químicos, farmacêuticos e agroquímicos com alto valor agregado e também para os processos de biodegradação de poluentes.

1.2.1. Biodegradação

Quase todos os seres vivos são dotados basicamente de um nível mínimo de habilidades de desintoxicação, tais como a mineralização, transformação e imobilização de poluentes. No entanto, os micro-organismos, especialmente as bactérias, têm sido bem estudados e utilizados para a realização das atividades de desintoxicação pelas suas capacidades singulares (WATANABE, BAKER, 2000; RIEGER et al, 2002; ZHONG, ZHOU, 2002). Bactérias abrigam uma enorme diversidade metabólica, permitindo-lhes utilizar os produtos químicos complexos e/ou tóxicos como fontes de energia (RIEGER et al, 2002; DIAZ, 2004). Além disso, sua habilidade de sofrer uma rápida evolução genética também aumenta sua chance de adquirir novos potenciais metabólicos para a degradação das substâncias químicas xenobióticas recentemente introduzidas, como as substâncias resultantes do grande desenvolvimento industrial necessário para sustentar uma contínua expansão da população humana (OGAWA et al, 2003; SYMONS, e BRUCE, 2006; COHEN, 2007). O aumento da consciência pública e necessidade, do ponto de vista ambiental, também têm levado os pesquisadores a procurar por melhores formas de desintoxicar/remover esses compostos dos resíduos para que não afetem o ambiente natural.

Existem muitas estratégias para a degradação de poluentes. A incineração é uma delas, porém em sua utilização é gasto muito combustível fóssil e também acarreta na liberação de poluentes secundários para a atmosfera. Há também o tratamento químico, que envolve reatores trabalhando em condições extremas (de temperatura e pressão) para a realização da reação, além disto o custo do processo é bastante elevado e pode acarretar na liberação de poluentes secundários. Ainda existem alguns processos físicos, porém não são muito eficientes do ponto de vista ambiental. Assim, durante as duas últimas décadas a biodegradação, por ser uma alternativa mais ambientalmente amigável e econômica (embora os custos de capital desses sistemas de biorremediação possam ser iguais comparado ao dos outros tratamentos, os custos operacionais do tratamento são significativamente menores), se tornou uma opção viável e promissora para o tratamento de resíduos contaminados (CHAUHAN et al, 2010; AKCIL, 2003; GUPTA et al, 2010).

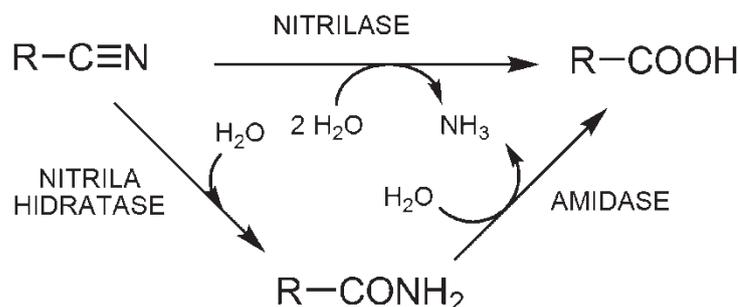
A biodegradação utilizada para o descarte correto de substâncias tóxicas exige métodos e procedimentos comprovadamente eficazes para atenuar ou eliminar o poluente. Deste modo é necessário procurar por novas linhagens de micro-organismos capazes de metabolizar substâncias tóxicas, encontrar novas técnicas/procedimentos e condições

(temperatura, pH, concentração da substância tóxica, etc.) para cada tipo de resíduo de forma a aliar o desenvolvimento com a consciência ambiental.

1.3. Nitrilas

Uma das substâncias em destaque nos estudos de biodegradação são as nitrilas. Estas possuem estrutura geral $R-C\equiv N$ e podem ocorrer naturalmente, em plantas superiores, insetos e micro-organismos ou serem introduzidas no meio ambiente pelo homem, sendo utilizada como solvente, na síntese de plásticos, borracha sintética, produtos farmacêuticos, herbicidas, cosméticos, e outros produtos químicos (HENAHAN, IDOL, 1971). Portanto como os compostos nitrilados têm uma alta utilização nas indústrias, há uma grande produção de resíduos contendo nitrilas. O problema está no descarte desses resíduos, uma vez que possuem alta toxicidade e são potencialmente carcinogênicos e/ou teratogênicos, inclusive um número significativo deles constam na “Priority Pollutant List” do USEPA (United States Environmental Protection Agency) e na “Priority List of Hazardous Substances” da ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (MARTINKOVA et al, 2009). Quando tratados, a maior parte dos resíduos contendo nitrilas é incinerado, uma metodologia que consome grande quantidade de combustíveis fósseis além de poluir a atmosfera pela emissão de gases tóxicos. Neste contexto, a utilização de processos microbianos para o tratamento destes resíduos têm se mostrado uma alternativa promissora, uma vez que os sistemas biológicos são ricos em catalisadores que atuam como agentes químicos ambientalmente amigáveis e que podem atenuar ou até mesmo eliminar a toxicidade dos resíduos (OLIVEIRA et al, 2009).

As biodegradações microbianas de nitrilas podem ocorrer por duas vias enzimáticas distintas (Esquema 1). Na primeira ocorre a reação em uma única etapa catalisada por nitrilases (E.C. 3.5.5.1), enzimas que transformam a nitrila diretamente em ácido carboxílico com liberação de amônia (KOBAYASHI et al, 1994). Na segunda via, a hidrólise de nitrilas ocorre em duas etapas: inicialmente ocorre a hidratação da nitrila catalisada por uma nitrila hidratase (E.C. 4.2.1.84), formando a amida correspondente que posteriormente sofre hidrólise catalisada por uma amidase (E.C. 3.5.1.4), formando o ácido carboxílico correspondente e liberando amônia (NAGASAWA et al, 1989).



Esquema 1. Enzimas microbianas utilizadas nas respectivas vias de biodegradação de nitrilas.

Portanto, além do enorme potencial de aplicação biotecnológica na área de biocatálise, os micro-organismos contendo nitrilases, nitrilas hidratase e amidases têm sido utilizados para fins de controle ambiental (biodegradação e/ou biorremediação) (BAXTER et al, 2006), uma vez que foi demonstrado o significativo potencial de muitos grupos de micro-organismos para a degradação de nitrilas, sendo que muitos deles demonstraram atividades enzimáticas altamente específicas. Isto possibilita a sua aplicação em processos biotecnológicos visando a detoxificação de resíduos nitrilados (MARTINKOVA et al, 2009).

1.3.1. Acetonitrila

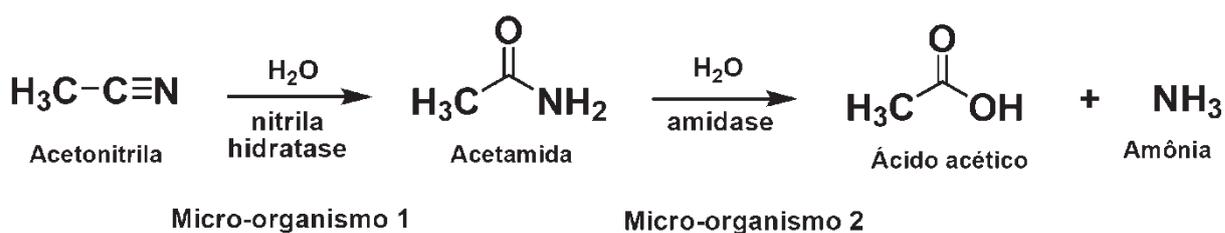
A acetonitrila (ACN), pertencente ao grupo das nitrilas, tem fórmula química $\text{H}_3\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$ e é o composto de interesse do presente estudo. A ACN é muito utilizada em processos industriais: na produção de perfumes, produtos derivados da borracha, pesticidas ou farmacêuticos e em laboratórios de pesquisa: para extrair ácidos graxos de óleos animais ou vegetais e, principalmente, vinculado a equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC: High Performance Liquid Chromatography), onde é utilizada como solvente da fase móvel (FENG, LEE, 2009). O interesse no estudo de resíduos contendo esta substância deve-se ao fato dela ser altamente tóxica, volátil, potencialmente carcinogênica, mutagênica e teratogênica e ser uma substância de grande circulação nos laboratórios de pesquisa, não apenas em nosso campus, mas no mundo todo..

Sua toxicidade chega a prejudicar, em altas concentrações, até mesmo os micro-organismos que a utilizam como fonte de nitrogênio e carbono. Ou seja, caso o descarte for realizado de forma incorreta, pode acabar ocasionando um grande impacto ambiental. Mesmo a incineração, método no qual atualmente são tratados os resíduos contendo ACN do campus da UNESP-Rio Claro tem seus problemas em nível ambiental. Deste modo torna-se

necessário levantar dados sobre a utilização de ACN pelo campus e encontrar uma forma de tratamento alternativo à incineração, como a biodegradação.

É importante o rastreamento de linhagens microbianas capazes de utilizar ACN como fonte de carbono e nitrogênio. Nesta direção existem muitos estudos utilizando linhagens puras comprovando a capacidade de degradação de ACN pelo respectivo micro-organismo, como *Mesorhizobium* sp. F28 (FENG et al, 2009), *Candida guilliermondii* CCT 7202 (DIAS et al, 2001), *Comamonas testosteroni* e *Acidovorax* sp. (WANG et al, 2004), *Klebsiella oxytoca* (KAO et al, 2006), *Nocardia rhodochrous* (DIGERONIMO, ANTOINE, 1976), *Pseudomonas marginalis* (BABU et al. 1995), *Pseudomonas putida* (NAWAZ et al, 1989), *Rhodococcus erythropolis* A10 (ACHARYA, DESAI, 1997), *Rhodococcus erythropolis* BL1 (LANGDANHL et al, 1996), *R. rhodochrous* PA-34 (BHALLA et al, 1992), *Rhodococcus* sp. N 774 (ENDO, WATANABE, 1989). Mas cabe ainda encontrar um que execute esta tarefa de forma mais eficiente e também definir as condições que aperfeiçoem este processo.

A detoxificação da ACN pode também ser feita por um consórcio de micro-organismos, podendo ocorrer de duas maneiras. Na primeira, um micro-organismo é responsável pela produção da enzima nitrila hidratase que degrada a ACN em acetoamida e outro da amidase, degradando a acetoamida em ácido acético e amônia (Esquema 2). Vale lembrar que este processo pode ser realizado por apenas um micro-organismos, mas o ganho de dois seria que cada um é especializado na produção de um só dos tipos de enzima (nitrila hidratase ou amidase), tornando o processo mais rápido (KOHYAMA et al, 2006).



Esquema 2. Vias de detoxificação de ACN realizadas por dois micro-organismos em conjunto.

Na segunda estratégia, é feito o isolamento de micro-organismos do solo por metodologias de enriquecimento, ou seja, em um meio contendo apenas ACN como fonte de nitrogênio e carbono. Porém neste caso os micro-organismos não são isolados em cultura pura

e sim utilizados na forma de consórcios microbianos onde cada micro-organismo atuará em diferentes níveis e velocidades (LI et al, 2007).

Há também cientistas que discutem a utilização de biodegradação de ACN por rotas anaeróbicas ou aeróbicas, porém a maioria dos estudos é em condições aeróbicas, uma vez que no processo anaeróbico a toxicidade da ACN limita severamente a reação, resultando em uma taxa de biodegradação de ACN menor do que aerobicamente (LI et al, 2007).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é iniciar o desenvolvimento de uma metodologia para o tratamento dos resíduos contendo ACN através de catálise enzimática. Resíduos estes produzidos na UNESP Campus de Rio Claro, mais especificamente nos departamentos do Instituto de Biologia (IB). Para tanto duas etapas deverão ser cumpridas:

1. Isolamento e triagem de micro-organismos capazes de realizar a biodegradação da ACN.
2. Otimização das condições nutricionais e físico-químicas para o aumento do desempenho do(s) micro-organismo(s) selecionado(s) durante o processo de biodegradação da ACN.

Concomitantemente será realizado um levantamento da quantidade de ACN utilizada e da produção de resíduos contendo ACN nos Laboratórios de Pesquisa do Instituto de Biociências da UNESP Campus de Rio Claro. Também serão pesquisadas as formas de tratamento e descarte utilizados dos mesmos, deste modo permitindo uma noção exata da dimensão do uso de ACN em nosso campus.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Levantamento de dados sobre produção de resíduos contendo acetonitrila

Foi elaborado um questionário (Anexo 1) abordando o consumo de ACN, geração de resíduos provenientes da utilização da mesma e a maneira como é feito o armazenamento e posterior descarte deste resíduo. Este questionário foi impresso e os docentes do Instituto de Biociências da UNESP- RC convidados a respondê-lo.

3.2. Materiais e procedimentos gerais

3.2.1. Reagentes e solventes

Foram utilizados reagentes e solventes grau P.A. e usados sem purificação posterior com exceção do acetato de etila que foi submetido a destilação.

3.2.2. Micro-organismos utilizados nas reações de biodegradação

Os micro-organismos avaliados foram provenientes da Coleção de Culturas Tropicais (CCT, <http://www.cct.org.br/>), da Fundação André Tosello, Campinas – SP, e os micro-organismos ainda não identificados foram isolados do solo da UNESP-RC e de raiz de mandioca e pertencem à Coleção de Micro-organismos do grupo de Biocatálise do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP-RC.

3.2.3. Procedimentos gerais adotados no laboratório

Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas, secas e acondicionadas em papel para esterilização em autoclave a 121 °C, 1,5 KPa por 15 min, e posterior secagem em estufa 45 °C. Todo o material utilizado em contato direto com os micro-organismos foram autoclavados à 121 °C, 1,5 KPa por 40 min. antes de serem descartados ou reaproveitados. Soluções de

álcool 70% (v/v) e solução de HClO 5% (v/v) foram utilizadas para desinfetar as bancadas de trabalho e cabine de segurança biológica, diminuindo a contaminação do material manipulado e do meio externo. Todos os procedimentos foram realizados utilizando luvas previamente enxaguadas com solução de álcool 70% para evitar contaminação.

3.3. Meios de cultura

3.3.1. Meio NB (Nutrient Broth)

O meio de cultura complexo NB foi preparado segundo instruções do fabricante do mesmo (Acumedia). Adicionou-se 8 g/L do meio de cultura NB em água deionizada e a solução resultante foi autoclavada.

3.3.2. Meio Mineral

O meio de cultura definido mineral foi adaptado daquele descrito por Layh et al (1992). O meio foi preparado e, após a autoclavagem e esfriamento do mesmo, acrescentado 1 mL/L de solução de elementos traços, 1 ml/L de solução de vitaminas e 0,5 mM de ACN. A composição do meio mineral, da solução de elementos traços e vitamínica está descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das soluções utilizadas no preparo do meio mineral.

Meio Mineral	Solução de elementos traços	Solução de vitaminas
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ----- 14 g/L	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -- 200 mg/L	Biotina ----- 0,05 g/L
KH_2PO_4 ----- 2 g/L	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 10 mg/L	Pantotenato de Cálcio -- 1 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 0,05 g/L	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ----- 3 mg/L	Ácido Nicotínico ----- 1 g/L
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----- 0,05 g/L	H_3BO_3 ----- 30 mg/L	Inositol ----- 25g/L
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -- 0,05 g/L	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----- 20 mg/L	Tiamina HCl ----- 1 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 0,02 g/L	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 1 mg/L	H ₂ O Deionizada
Glicose ----- 10 mM	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ----- 2 mg/L	
H ₂ O Deionizada	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- 3 mg/L	
	H ₂ O Deionizada	

3.3.3. Meio MM2

O meio MM2 foi preparado segundo a composição descrita na Tabela 2:

Tabela 2. Composição meio MM2

FeCl ₃ · 6 H ₂ O -----	0,083 g/L
CaCl ₂ -----	0,025 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O -----	0,02 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O -----	4 g/L
KH ₂ PO ₄ -----	2 g/L
Glicose -----	1,8 g/L



Ordem de adição dos reagentes com agitação magnética

Após a autoclavagem e esfriamento do meio, foi acrescentado 1 mL/L de solução de elementos traços, 1 mL/L de solução de vitaminas e 0,5% v/v de ACN. A composição das soluções de elementos traços e de vitaminas está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Composição da solução de elementos traços e de vitaminas para meio MM2.

Solução de elementos traços	Solução de vitaminas
MnCl ₂ · 1 H ₂ O ----- 0,030 g/L	Biotina ----- 0,1 g/L
NaVO ₃ · 1 H ₂ O ----- 0,003 g/L	Pantotenato de cálcio ----- 0,02 g/L
Na ₂ WO ₃ · 2 H ₂ O ----- 0,002 g/L	Inositol ----- 0,1 g/L
H ₃ BO ₃ ----- 0,005 g/L	Ácido nicotínico ----- 0,02 g/L
NiSO ₄ · 6 H ₂ O ----- 0,005 g/L	H ₂ O deionizada
ZnSO ₄ · 1 H ₂ O ----- 0,006 g/L	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O ----- 0,004 g/L	
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O ----- 0,002 g/L	
CuSO ₄ ----- 0,003 g/L	
H ₂ O deionizada	

3.4. Coleta dos micro-organismos

3.4.1. Amostra de solo

A coleta foi realizada com luvas para evitar contaminação humana e da amostra e todo o material utilizado foi previamente esterilizado. A amostra de solo foi colocada em saco

estéril para coleta, realizando a identificação com informações do local. Todas as amostras foram mantidas em caixa térmica até a chegada ao laboratório. Em cada ponto de coleta anotou-se as coordenadas geográficas com o auxílio do GPS e foram retiradas fotos como forma de registro.

3.4.2. Amostra de mandioca

A coleta foi realizada com luvas para evitar contaminação humana e da amostra e todo o material utilizado foi previamente esterilizado. Foram cortadas rodela de uma raiz de mandioca, obtida em um supermercado local, que continha crescimento de micro-organismos em sua extremidade. As regiões de amostragem da raiz da mandioca foram identificadas.

3.5. Cultivo dos micro-organismos para isolamento

Foram pesados 2 g (amostras de solo) ou 1 g (amostras de mandioca) e inoculados em meios de cultura adequado. As amostras de solo foram inoculadas em meio NB e meio Mineral enquanto as amostras de mandioca inoculadas em meio MM2. Estas suspensões foram mantidas sob agitação orbital em shaker a 29 °C, 120 rpm por 3 dias. Após este período um alíquota de cada amostra (1:10 v/v) foi transferida para meio correspondente recém-preparado e incubada nas condições descritas anteriormente. Este processo foi repetido por mais 2 vezes.

3.6. Procedimentos para isolamento dos micro-organismos

3.6.1. Diluições seriadas

Nove tubos tipo Falcon contendo 9 mL de água deionizada foram esterilizados. Ao primeiro tubo foi adicionado 1 mL do inóculo de solo enriquecido e esta suspensão foi homogeneizada. 1 mL desta suspensão foi transferido para o segundo tubo Falcon e homogeneizado. Este procedimento foi repetido até o último tubo Falcon, sendo que no

último 1 mL da suspensão foi descartado após homogeneização. Assim foram produzidas 6 inóculos diluídos seriadamente (10^{-1} a 10^{-6}).

3.6.2. Isolamento das colônias em placas de Petri

Ao meio (MM2, Mineral ou NB) foi acrescentado 1,5% de ágar-ágar e autoclavado. O meio foi vertido nas placas de Petri estéreis e aguardou-se sua solidificação. De cada inóculo diluído seriadamente retirou-se uma alíquota de 200 μ L e a plaqueou, através da técnica de semeadura por espalhamento pela superfície do ágar com alça de Drigalsk descartável. As placas foram incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand) à 29 °C por 3 dias. Após o crescimento das colônias, foi realizado o isolamento dos micro-organismos com o auxílio da alça de inoculação, em meio (MM2, Mineral ou NB) sólido (1,5% de ágar) estéril, através da técnica de esgotamento por estrias para a obtenção de culturas puras (Figura 1). Para a esterilização da alça, foi utilizado esterilizador de infra-vermelho por 10 segundos a 800 °C.

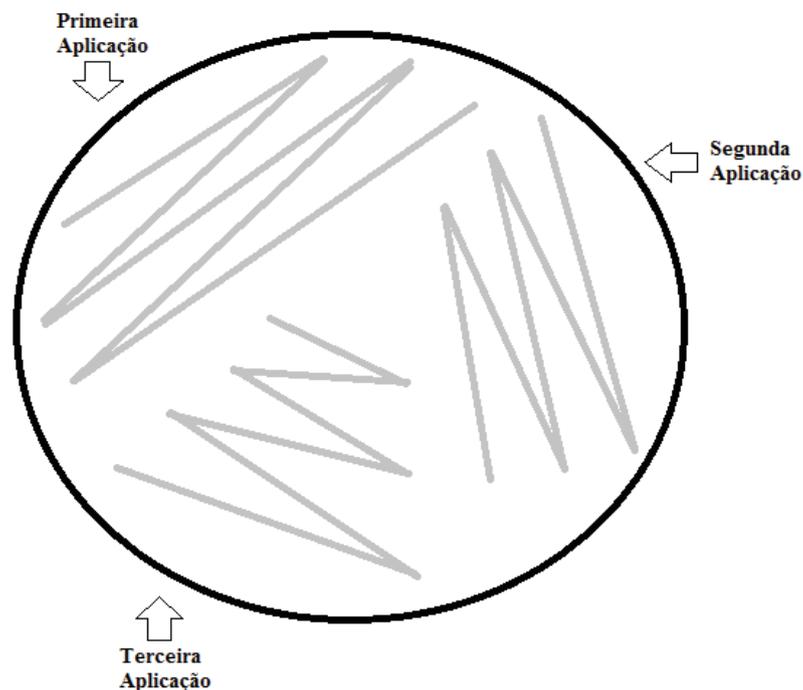


Figura 1. Metodologia de isolamento de micro-organismos por esgotamento por estrias.

As placas foram incubadas em BOD à 29 °C por 9 dias e quando apresentaram crescimento de um único tipo de micro-organismo foram submetidas aos processos de preservação e armazenamento a médio e curto prazo. Quando houve mais de um tipo

morfológico de colônia observável macroscopicamente na placa foi necessário necessário realizar o replaqueamento até a purificação destas.

3.7. Preservação e armazenamento dos micro-organismos

3.7.1. Preservação das culturas à curto prazo

Preparou-se tubos de ensaio com 5 mL de meio em cada um (MM2, Mineral ou NB) acrescido de 1,5% de ágar, e foi autoclavado. O meio utilizado para armazenamento correspondia àquele no qual a cultura foi isolada. Os tubos foram inclinados até a solidificação do meio. Cada cultura pura foi transferida com alça de platina por estriamento em superfície para os tubos de ensaio inclinados. Este procedimento foi realizado em duplicata. A alça foi esterilizada em esterilizador de infra-vermelho por 10 segundos a 800 °C. Os tubos foram incubados em BOD à 29 °C por 1 dia. Após o crescimento microbiano, os tubos com ágar inclinados foram mantidos à 4 °C em refrigerador.

3.7.2. Preservação das culturas à médio prazo

Foram preparados tubos eppendorfs com 0,5 mL de meio de cultura NB acrescido de 1,5% de ágar. Estes foram autoclavados e em seguida, inclinados até a solidificação do meio. Paralelamente foram preparadas as soluções aquosas de glicerol 10%, 20% e 30%. Cada micro-organismo foi transferido para os tubos eppendorfs recém preparados com o auxílio da alça de platina através da técnica de estriamento superficial. A alça foi esterilizada em esterilizador de infra-vermelho por 10 segundos a 800 °C. Os eppendorfs foram incubados em BOD à 29 °C por 1 dia. Após o crescimento microbiano, foi adicionado em cada duplicata as soluções de glicerol 10%, 20% e 30%. O volume de glicerol utilizado foi a quantidade necessária para cobrir todo o ágar. Para a adaptação à temperatura, primeiramente conservou os eppendorfs à 4 °C por 1 hora, e depois os tubos foram conservados à -20 °C em superfreezer.

3.8. Procedimento geral para os ensaios de triagem enzimática

Os micro-organismos mantidos à 4 °C foram ativados em meio de cultura líquido MM2 acrescido da acetonitrila 0,5% v/v. Incubou-se em shaker à 29 °C, 120 rpm, por 2 dias. Após este período, realizou-se a segunda ativação, retirando alíquota de cada amostra (1:6 v/v) e transferindo para um erlenmeyer contendo meio MM2 recém preparado. Este processo foi repetido mais uma vez, totalizando 3 ativações.

Após a terceira etapa de ativação, realizou-se o preparo das suspensões celulares na concentração de 200 mg/mL. Para cada micro-organismo, pesou-se tubo Falcon vazio estéril, realizando sua identificação. Foram transferidos 7 mL das células crescidas na cultura de enriquecimento para o tubo Falcon e este foi centrifugado por 10 minutos a 3600 rpm. Desprezou-se o sobrenadante. Com os tubos bem vedados, pesou-se novamente, realizando a diferença dos valores obtidos com o tubo vazio e com o tubo com células para a preparação da suspensão celular. As células foram lavadas através da adição de 5 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,2 (pKa 7,2) e agitação em vórtex para completa homogeneização da solução. Repetiu-se o processo de centrifugação por mais 10 minutos a 3600 rpm e desprezou-se o sobrenadante. No final, adicionou-se tampão fosfato 10 mM na proporção de 200 mg de célula por 1 mL de tampão e os tubos foram agitados em vórtex. Os ensaios e controles foram realizados em triplicata em microplaca de polipropileno com 96 poços. Cada microplaca foi incubada em shaker à 29 °C, 120 rpm, por 7 dias, realizando-se a leitura e fotodocumentação do ensaio diariamente. O volume final de cada poço foi de 189,5 µL, utilizando as seguintes proporções:

Controle de acetonitrila: 4,5 µL de solução de acetonitrila a 500 mM em etanol, 167 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01% e 18 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2.

Controle de acetamida: 4,5 µL de solução de acetamida a 500 mM em etanol, 167 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01% e 18 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2.

Controle de ácido acético: 4,5 µL de solução ácido acético a 500 mM em etanol, 167 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01% e 18 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2.

Controle de DEPA: 10 µL de solução DEPA 10 mM em etanol, 167 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01% e 12,5 µL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2.

Controle microbiano: 18 μL de suspensão celular, 167 μL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01% e 4,5 μL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2.

Ensaio sem DEPA: 18 μL de suspensão celular, 4,5 μL de solução de acetonitrila a 500 mM em etanol e 167 μL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01%.

Ensaio com DEPA: 18 μL de suspensão celular, 4,5 μL de solução de acetonitrila a 500 mM em etanol, 10 μL de solução DEPA 10 mM em etanol e 157 μL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 + Azul de Bromotimol 0,01%.

3.8.1. Preparo da solução tampão Sørensen 10 mM pH 7.2 pKa = 7,20

A solução tampão 10 mM pH 7,2 foi preparada através da diluição em água deionizada de uma solução tampão 100 mM pH 7,2 e autoclavada. Para o preparo da solução tampão 100 mM pH 7,2 seguiu-se às indicações da Tabela 4 e foi acrescentado igual volume de água deionizada ao final.

Tabela 4. Sorensen's Phosphate Buffer; pH 5,8-8,0, pKa 7,20

Soluções Estoque	A 0,2 M NaH_2PO_4	B 0,2 M Na_2HPO_4	pH
	A (mL)	B (mL)	
	92,0	8,0	5,8
	87,7	12,3	6,0
	81,5	18,5	6,2
	68,5	31,5	6,5
	62,5	37,5	6,6
	56,5	43,5	6,7
	51,0	49,0	6,8
	45,0	55,0	6,9
	39,0	61,0	7,0
	33,0	67,0	7,1
	28,0	72,0	7,2
	23,0	77,0	7,3
	19,0	81,0	7,4
	16,0	84,0	7,5
	8,5	91,5	7,8
	5,3	94,7	8,0

3.9. Procedimento geral para os ensaios de determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os micro-organismos mantidos à 4 °C foram ativados em meio de cultura MM2 acrescido da acetonitrila 0,5% v/v por 3 vezes, como descrito anteriormente.

Após a etapa de ativação, realizou-se o preparo das suspensões celulares na concentração de $3,0 \times 10^8$ ufc/mL segundo a escala Mc Farland. Para tanto foram transferidos 7 mL das células crescidas na cultura de enriquecimento para tubo Falcon. Os tubos Falcon foram centrifugados por 10 minutos a 3600 rpm, e o sobrenadante desprezado. Com uma alça de inoculação calibrada (1 µL) e descartável retirou-se uma alíquota das células precipitadas e as transferiu para um tubo de ensaio contendo 10 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7.2. Homogeinizou-se a solução e comparou-se seu grau de turvação com o tubo 1,0 da escala nefelométrica de Mc Farland.

Os ensaios e controles foram realizados em duplicata e a microplaca de polipropileno com 96 poços foi incubada na BOD à 29 °C por 2 dias. O volume final de cada poço foi de 200 µL, utilizando as seguintes proporções:

Controle microbiano: 150 µL de meio NB e 50 µL de suspensão celular.

Controle positivo 1: 100 µL de solução de cloranfenicol 20 ppm em H₂O deionizada, 50 µL de meio NB e 50 µL de suspensão celular.

Controle positivo 2: 100 µL de solução de nistatina 20 ppm em H₂O deionizada, 50 µL de meio NB e 50 µL de suspensão celular.

Ensaio: 100 µL de solução de tampão fosfato 10 mM pH 7.2 com acetonitrila em concentrações crescentes (variando de 1.529 ppm a 391.500 ppm), 50 µL de meio NB e 50 µL de suspensão celular.

Após o período de incubação da microplaca foi adicionado em todos os poços 100 µL de solução de MTT. As microplacas foram tampadas novamente e incubadas na BOD a 30 °C por 60 minutos. Ao final deste período realizou-se a leitura do ensaio e o registro fotográfico.

3.9.1. Preparo da solução de MTT

A solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi preparada a 0,025 % p/v em 80 % de água deionizada + 20 % Dimetilsulfóxido (DMSO). A água deionizada utilizada foi esterilizada em autoclave a 121°C e 1,5 kPa por 15 minutos.

3.10. Avaliação da fonte de carbono e pH nas reações de biodegradação

A partir dos ensaios de triagens enzimáticas e MIC foram selecionados três micro-organismos para a avaliação da fonte de carbono e pH nas reações de biodegradação. Estes micro-organismos mantidos à 4 °C foram ativados em meio de cultura MM2 acrescido da acetonitrila 0,5% v/v por 3 vezes, como descrito anteriormente.

Paralelamente foram preparadas soluções tampão fosfato, segundo a tabela 4, com 100 mM pH 5.8, 7.2 e 8.0. Todas foram diluídas para a concentração de 10 mM. A cada solução foi acrescido os reagentes do meio MM2 (menos Na₂HPO₄, KH₂PO₄ e glicose). Após a autoclavagem e esfriamento, foi adicionado 1 mL/L de solução de elementos traços, 1 ml/L de solução de vitaminas e 0,5 % v/v de ACN.

Pesou-se um tubo Falcon vazio estéril. Foram transferidos 7 mL das células crescidas na cultura de enriquecimento e os tubos centrifugados por 10 minutos a 3600 rpm. Desprezou-se o sobrenadante. Com os tubos bem vedados, pesou-se novamente, quantificando a massa celular. Estas células foram inoculadas em seis erlenmeyers contendo meio MM2 com variações no pH e na presença de glicose, como demonstrado na tabela 5. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação orbital em shaker a 29 °C, 120 rpm por 1 dia.

Tabela 5. Parâmetros avaliados – pH e fonte de C.

Meio MM2	
pH	Fonte de Carbono
5.8	acetonitrila
5.8	glicose
7.2	acetonitrila
7.2	glicose
8.0	acetonitrila
8.0	glicose

Após o tempo de incubação o conteúdo de cada erlenmeyer foi centrifugado durante 10 minutos a 3600 rpm e a massa celular desprezada. Ao sobrenadante (fase aquosa) foi adicionado NaCl até a supersaturação e esta fase aquosa foi extraída com acetato de etila pré destilado. A fase orgânica foi separada da fase aquosa, seca sob MgSO₄ e analisada por GC-FID (do inglês: Gas Chromatography – Flame Ionization Detection; Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama).

3.11. Método Cromatográfico

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso Shimadzu modelo GC-2010 PLUS AF e coluna capilar com sílica fundida da marca Restek RTX-5 (30 m X 0,25 mm, 0.25 μ m). As condições de análise foram 52 KPa de H₂ na cabeça da coluna, temperaturas do injetor e detector iguais a 260 e 320 °C, respectivamente; e injeção automática de 1 μ L de amostra no modo Split. A programação utilizada correspondeu a temperatura inicial de 35 °C por 3 minutos, com rampa de aquecimento de 25 °C /min até 280 °C e mantida em 280 °C por 5 minutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Levantamento de dados sobre consumo de acetonitrila e produção de resíduos provenientes do descarte da mesma

Foi realizada uma coleta geral de resíduos químicos no campus da UNESP-Rio Claro em 2009. Segundo os dados fornecidos pelo Prof. Dr. José Carlos Marconato, atual presidente da Comissão de Ética Ambiental (CEA) da UNESP-RC, havia aproximadamente 150 L de solventes, dentre eles resíduos contendo acetonitrila. Porém não há dados quantitativos relativos ao volume discriminado dos resíduos contendo acetonitrila. Todo o resíduo coletado foi encaminhado à empresas terceirizadas para o descarte apropriado.

Visando quantificar o volume de acetonitrila utilizado pelo Instituto de Biociências (IB), realizou-se uma amostragem através da aplicação de um questionário (Anexo 1) aos docentes do IB. Esta amostragem incluiu todos os departamentos do IB no campus da UNESP-Rio Claro. Através desta pesquisa foi confirmado que o uso de acetonitrila está fortemente vinculado ao uso de cromatógrafos líquidos de alta eficiência (em inglês HPLC). Dos 26 docentes entrevistados, 5 (19.2 %) utilizam ACN rotineiramente em seus laboratórios. Destes cinco, quatro (80%) têm o uso de ACN vinculado à equipamento de HPLC e apenas um (20%) tem seu uso vinculado à espectrometria de massas.

Em HPLC, a acetonitrila é utilizada como solvente orgânico da fase móvel e normalmente não é utilizada pura, mas diluída em água ou tampão. Isto resulta em uma geração de resíduos contendo acetonitrila em maior quantidade que a originalmente utilizada. Somando-se todas as quantidades de resíduos contendo acetonitrila geradas pelos laboratórios amostrados, chegou-se a uma quantidade de 72 L de ACN pura utilizada por ano, além dos resíduos aquosos contendo ACN provenientes dos equipamentos de HPLC. Levando-se em consideração o crescente número de pesquisas nas áreas da Biologia que utilizam o HPLC como ferramenta de análise, pode-se dizer que este valor tende a aumentar ano a ano.

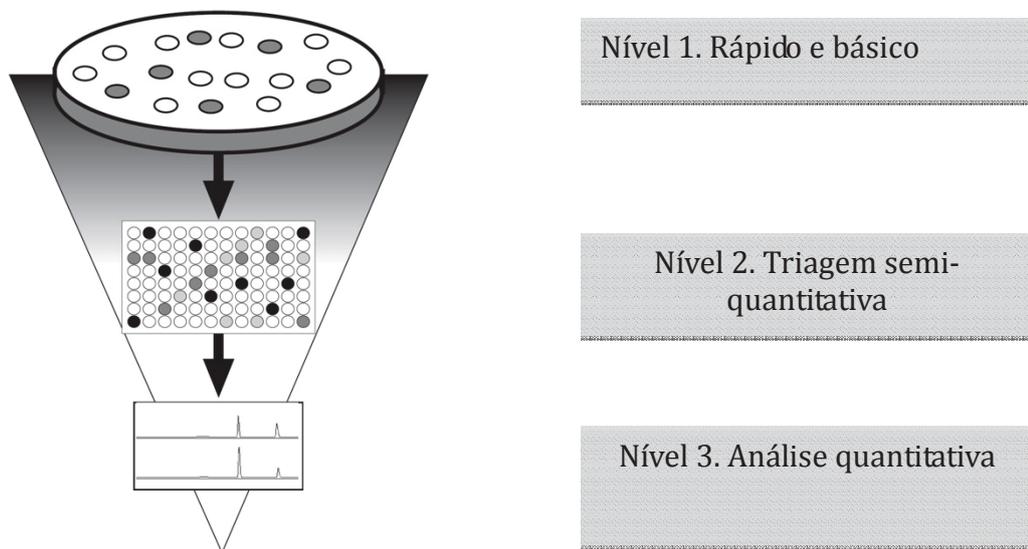
Também foram realizadas perguntas a respeito do modo como o resíduo é armazenado e a forma de descarte do mesmo. Dentre todos os laboratórios que utilizam acetonitrila, variou-se o recipiente de armazenamento. No laboratório que não tem o uso da acetonitrila vinculado ao HPLC, a quantidade gerada de resíduos da mesma é muito pouca, portanto é armazenada junto com descarte de solventes. Nos que geram maiores volumes de resíduos, foram citados como recipientes: frascos âmbar, galões de plástico de 5L e galões de vidro.

Porém todos os laboratórios rotulam adequadamente os vasilhames contendo ACN e estes são armazenados a temperatura ambiente.

A respeito do tipo de tratamento que este resíduo recebe todos os amostrados foram unânimes em responder que os resíduos são recolhidos pela UNESP e encaminhados a uma empresa terceirizada para tratamento e descarte.

4.2. Isolamento e seleção de micro-organismos do solo e de mandioca

É importante o emprego de estratégias racionais durante a realização de bioprospecções para se evitar demanda muito longa de tempo na prospecção e geração de número excessivo de dados, porém com informações nem sempre expressivas. Buscou-se neste trabalho construir uma Coleção de Culturas Microbianas capazes de metabolizar acetonitrila, e que estes micro-organismos tenham um potencial de aplicação biotecnológica. Portanto, a metodologia de trabalho foi direcionada para este fim e adotou-se uma estratégia hierárquica nos ensaios para seleção microbiana e triagens enzimáticas conforme apresentado no Esquema 3.



Esquema 3. Estratégias para a triagem enzimática microbiana.

4.2.1. Coleta de solo UNESP - RC

A bioprospecção por micro-organismos da diversidade brasileira capazes de metabolizar os compostos nitrilados iniciou-se pela coleta de micro-organismos. Esta coleta foi regulada junto ao SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e do MMA (Ministério do Meio Ambiente) através do Comprovante de Registro para Coleta de Material Fúngico, Botânico e Microbiológico No. 258491- e registro no IBAMA No. 5122212.

A escolha do local da coleta e os procedimentos de isolamento microbiano são parâmetros chave no sucesso da construção de uma Coleção de Culturas com finalidades específicas, como é o caso desta pesquisa. Assim, realizou-se uma coleta de solo em um “ponto controle” dentro do Campus da UNESP-RC, em um local onde o solo não havia entrado em contato com acetonitrila (Tabela 6).

Tabela 6. Ponto de coleta de micro-organismos no Campus da UNESP-RC



Identificação	Coordenadas geográficas
Ponto 3 – Redondezas do Jardim Experimental	S 22° 23' 823'' W 047° 32' 645'' Altitude 638 m

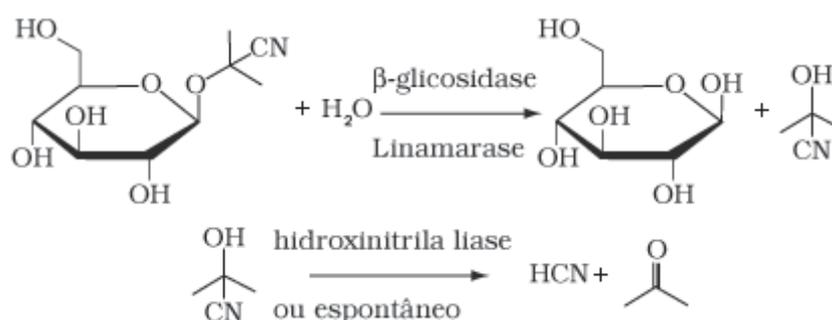
S – latitude sul; W – longitude oeste; Altitude em relação ao nível do mar.

4.2.2. Coleta de raiz de mandioca

A segunda coleta foi realizada em um local onde houve o contato prévio do inóculo com organonitrilas na tentativa de selecionarmos micro-organismos pré-aclimatados a nitrilas e que apresentassem seu maquinário enzimático induzido para a produção de enzimas capazes de degradar a acetonitrila. Para tanto foi utilizada uma mandioca, adquirida junto a um

supermercado local, e que estava estragada (havia micro-organismos em grande quantidade em uma de suas extremidades).

A mandioca é uma planta cianogênica, ou seja, capaz de produzir cianeto (-CN). A toxicidade cianogênica da mandioca origina-se da formação do ácido cianídrico (HCN) a partir da hidrólise enzimática de glicosídeos cianogênicos presentes, especialmente da linamarina. A hidrólise deste heterosídeo está apresentada no esquema 4 e, como pode ser visto, produz, além do ácido cianídrico, D-glicopiranosose e propanona. A concentração de glicosídeos pode variar amplamente entre os cultivares, tanto por razões genéticas, como por fatores ambientais (localização, tipos de solo, estação), podendo atingir valores de até 2000 mg/kg, tanto nos tubérculos, quanto nas folhas (FURTADO et al, 2007).



Esquema 4. Degradação enzimática da linamarina

Desta forma, os micro-organismos endofíticos da mandioca têm grande probabilidade de serem resistentes a compostos nitrilados e, portanto, de interesse para o presente estudo. Foram realizadas duas coletas na mesma mandioca, uma proveniente da região mediana e outra da extremidade contendo micro-organismos.

4.2.3. Seleção microbiana

Foram empregadas duas metodologias para o isolamento dos micro-organismos. Na primeira, o inóculo foi cultivado em meio complexo NB sem adição de acetonitrila. Na segunda, adotou-se a estratégia de seleção no qual empregou-se condições que favoreçam exclusivamente a sobrevivência dos micro-organismos de interesse, ou seja, aqueles capazes de metabolizar acetonitrila. Para isto, as amostras de solo e mandioca (2,0 g da amostra de solo e 1,0 g da amostra de mandioca) foram inoculadas em meio de cultura definido e tamponado (pH 7,2) composto de sais minerais, solução de elementos traços, glicose como

única fonte de carbono e acetonitrila como única fonte de nitrogênio. Como o nitrogênio é um dos macronutrientes essenciais à manutenção da vida dos micro-organismos, pois é matéria prima para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e outras biomoléculas importantes, apenas os micro-organismos capazes de utilizar a acetonitrila fornecida sobreviveriam neste meio e posteriormente seriam isolados. O inóculo foi incubado sob agitação orbital a 120 rpm, 29 °C por 3 dias. Após este período uma alíquota de cada inóculo foi transferido para meio de cultura de igual composição recém preparado e este processo de enriquecimento foi repetido 3 vezes. Desta maneira, as chances de enriquecimento do inóculo com os micro-organismos do nosso interesse são elevadas.

Em seguida, os inóculos foram submetidos a seis diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}). A técnica de diluição é muito útil quando se deseja isolar unidades formadoras de colônias (ufc) existentes em uma suspensão microbiana. A metodologia consiste na diluição progressiva da suspensão bacteriana, tomando-se uma pequena alíquota (1000 μ L) de uma suspensão mais concentrada, de onde se faz a transferência desta para uma solução salina ou água deionizada esterilizada, com volume previamente determinado (Figura 2). De cada diluição, procede-se imediatamente o semeio através do espalhamento de um pequeno volume do extrato em meio de cultura, utilizando uma alça de Drigalski, com posterior incubação (29 °C / 24 a 72 horas dependendo da velocidade de crescimento dos micro-organismos), quando então verificam-se as placas que tiveram suas colônias crescidas separadamente, de forma a permitir o seu isolamento.

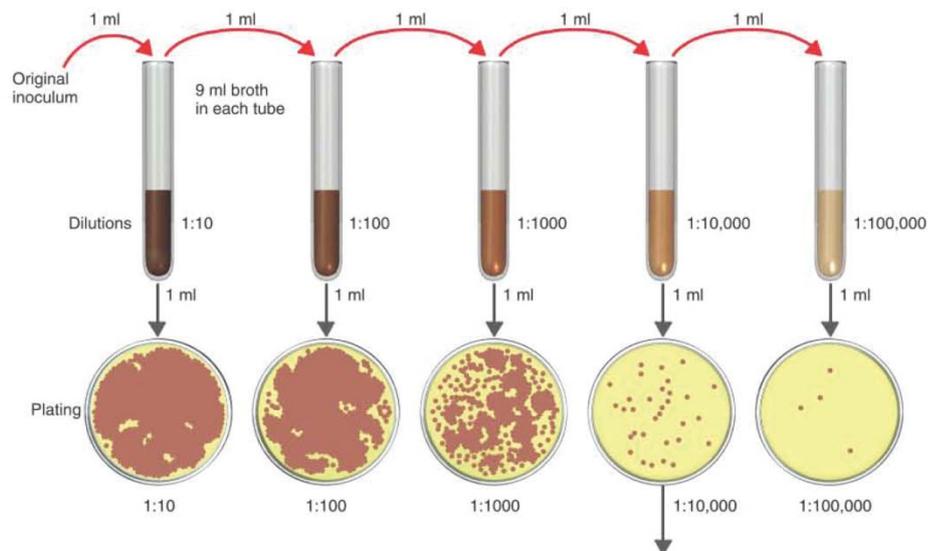


Figura 2. Diluições seriadas e sementeira em placa de Petri.¹

¹ Figura adaptada do livro: Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. *Microbiology: an introduction*. 10th Ed. Pearson Education Inc. 2010.

As colônias foram pinçadas com alça de inoculação aleatoriamente (levou-se em consideração o aspecto morfológico macroscópico das ufc) e semeadas em novas placas de Petri através da técnica de semeadura por esgotamento por estrias e incubadas em BOD a 29 °C para se averiguar a pureza das colônias (Figura 3). Aquelas que estavam puras passaram para a etapa seguinte de preservação enquanto as que não estivessem suficientemente puras foram re-submetidas ao processo de semeadura por esgotamento por estrias em placa quantas vezes fossem necessárias até a obtenção das colônias puras.



Figura 3. Fotos de semeadura por esgotamento por estrias.²

Ao final deste processo foram obtidos 31 micro-organismos, conforme apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Micro-organismos isolados.

Fonte dos micro-organismos	Número de colônias isoladas
Solo da UNESP-RC – Ponto 3	15
Mandioca	16
Total	31

A coleta do solo deu origem a 15 culturas microbianas com aspecto morfológico macroscópico distinto. A nomenclatura utilizada foi de UNP3 (UN - Universidade e P3 - ponto de coleta 3), sendo que cada cultura recebeu uma numeração. Das culturas, 7 são oriundas do isolamento em meio NB, ou seja, não passaram por um processo de seleção (UNP3 1, UNP3 2, UNP3 3, UNP3 4, UNP3 5, UNP3 6 e UNP3 13) e 8 do isolamento em

² Banerjee A.; Kaul, P.; Sharma, R.; Banerjee, U. C. *J. Biomol. Screen* **2003**, 8, 559-565.

meio Mineral com ACN 0,5 mM como única fonte de nitrogênio (UNP3 7, UNP3 8, UNP3 9, UNP3 10, UNP3 11, UNP3 12, UNP3 14 e UNP3 15).

A coleta de mandioca deu origem a 16 culturas de micro-organismos. A nomenclatura utilizada foi: MANM para inóculo da região mediana da mandioca; MANE para inóculo da extremidade da mandioca (MAN – Mandioca; M – Meio; E – Extremidade), sendo que cada cultura recebeu uma numeração. Todas as culturas passaram por processo de seleção juntamente com o isolamento (meio MM2 + ACN 0,5% v/v). Das culturas, 7 são oriundas da região mediana da mandioca (MANM 1, MANM 2, MANM 3, MANM 4, MANM 5, MANM 6, MANM 7) e 9 da extremidade infectada (MANE 1, MANE 2, MANE 3, MANE 4, MANE 5, MANE 6, MANE 7, MANE 8, MANE 9).

Todos os micro-organismos isolados foram armazenados e preservados para utilização a curto e médio prazo.

4.3. Preservação e armazenamento das colônias

A preservação das culturas microbianas é uma etapa crucial para que as mesmas possam ser acessadas quando necessário e a qualquer tempo sem que haja prejuízo em relação à sua pureza, viabilidade e características fisiológicas originais. Assim, as culturas recém isoladas foram preservadas a curto e médio prazo, sempre em duplicatas.

A preservação a curto prazo, ou seja, aquela que permite o acesso aos micro-organismos para os trabalhos de rotina foi realizada através do repique contínuo, cujo princípio está focado na diminuição do metabolismo dos micro-organismos. Desta forma, tubos de ensaio com ágar inclinado e as colônias puras são mantidos a 4 °C (geladeira) e estão prontamente disponíveis para o uso. Cada cultura é armazenada no mesmo meio em que foi isolada, apenas com adição de ágar 1,5% p/p. As vantagens do repique contínuo são o baixo custo operacional, não requer equipamentos especializados e o manuseio é simples.

Para a conservação a médio prazo utilizou-se a preservação em glicerol seguida de congelamento à -20 °C. Tubos tipo eppendorf contendo NB + ágar inclinado foram inoculados por estriamento e após o crescimento das colônias preenchidos com solução aquosa de glicerol. O glicerol foi utilizado como agente crioprotetor com a função de impedir a formação de cristais de gelo nas células microbianas e que pudessem romper a parede celular. Diferentes concentrações de glicerol (10%, 20% e 30%) foram utilizadas com a finalidade de verificar a melhor concentração para a conservação, pois cada micro-organismo requer

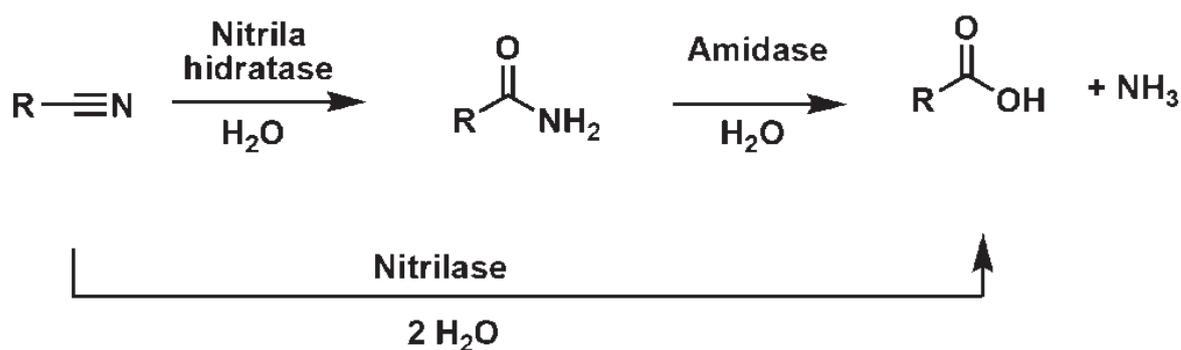
condições específicas. Todas as culturas isoladas foram preservadas deste modo no superfreezer, com excessão da cultura UNP3 7, que apresentou pouco crescimento.

Após seis meses, as culturas submetidas a preservação a médio prazo serão avaliadas quanto à qualidade da preservação através da contagem população viável e pureza das colônias. Após avaliação das condições ideais de armazenamento e preservação de cada cultura a médio prazo, as mesmas serão preservados a longo prazo através de liofilização e/ou congelamento a -70 °C. Uma vez que estes procedimentos foram realizados no mês de abril de 2011, até o presente momento ainda não foram realizados testes para verificar sobrevivência, estabilidade e pureza das amostras.

4.4. Triagens enzimáticas

Antes de iniciarmos os ensaios com os micro-organismos recém isolados realizamos alguns ensaios descritos na literatura utilizando micro-organismos da Coleção de Culturas Tropical (CCT) adquiridos junto a Fundação André Tosello (Campinas-SP). O objetivo é validar o teste antes de aplica-lo aos micro-organismos recém isolados das coletas. Os micro-organismos utilizados na validação do ensaio enzimático colorimétrico para detecção de nitrilases, nitrila hidratases e amidases foram: *Pseudomonas putida* CCT 2357, *Pseudomonas fluorescens* CCT 3178, *Arthrobacter* sp. CCT 1875, *Rhodococcus equi* CCT 0541, *Nocardia simplex* CCT 3022, *Nocardia brasiliensis* CCT 3439, *Rhodococcus ruber* CCT 1879, *Rhodococcus erythropolys* CCT 1878.

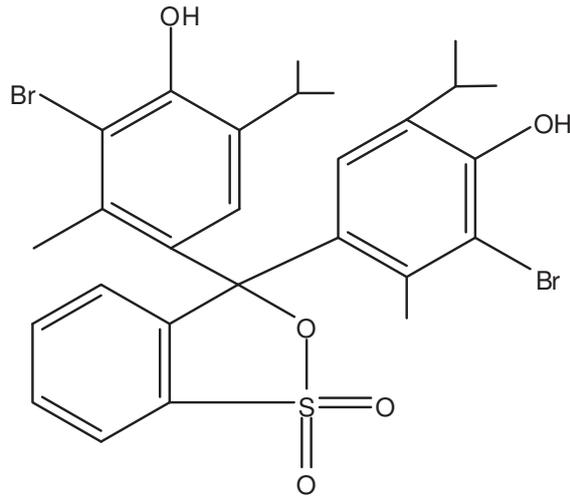
A primeira abordagem consistiu de um ensaio colorimétrico em placas de Petri descrito por Santoshkumar et al (2010). O princípio do ensaio é a alteração de cor do ágar em função das variações no pH decorrentes da formação de amônia como apresentadas no Esquema 5:



Esquema 5. Biotransformação de nitrilas por nitrilases e nitrila hidratases/amidases

O ágar foi preparado com o meio de cultura adequado ao crescimento dos micro-organismos (NA-Agar nutriente, SM- Streptomyces medium ou MM1), ajustado para pH 7,0 com NaOH ou HCl e acrescido do indicador de pH vermelho de fenol (0,02 % p/v). As placas de Petri com ágar ficavam alaranjadas após a semeadura dos micro-organismos e ficaria rosa/roxa na presença da amônia resultante da hidrólise enzimática da acetonitrila. Este ensaio foi realizado inúmeras vezes sem sucesso. As possíveis causas de erro para o teste seriam a baixa difusividade da amônia no agar, elevada capacidade tamponante do meio de cultura ou ainda falha na indução enzimática nas linhagens adquiridas. Este ensaio também foi realizado, sem sucesso, utilizando os micro-organismos isolados do solo da UNESP-RC (UNP3 1 a 15).

Para investigar os qual(is) os motivos da falha deste teste realizamos outro ensaio colorimétrico porém em meio líquido e em condições reacionais distintas. O novo ensaio enzimático colorimétrico foi realizado em microplacas de polipropileno com 96 poços. A triagem miniaturizada nestas microplacas não só evita consumo desnecessário de reagentes e geração de resíduos como também permite o monitoramento de reações em paralelo e já se encontra em formato adequado para automatização e robotização, uma abordagem rotineira nos laboratórios de pesquisa industrial e acadêmica em algumas partes do mundo. Realizamos um ensaio enzimático para nitrilases descrito por Banerjee et al (2003). Neste ensaio uma suspensão bacteriana acrescida de tampão fosfato pH 7,2 e indicador azul de bromotimol (esquema 6) era colocada em contato com a acetonitrila e a formação do ácido acético seria detectada pela alteração de cor do azul intenso para amarelo após incubação da microplaca.



Esquema 6. Estrutura química do indicador Azul de bromotimol

Realizamos este procedimento e observamos resultado positivo para os micro-organismos: *Pseudomonas putida* CCT 2357, *Pseudomonas fluorescens* CCT 3178, *Arthrobacter sp* CCT 1875, *Rhodococcus ruber* CCT 1879, e *Nocardia simplex* CCT 3022. Concluimos que o problema com o ensaio em placa de Petri não era a indução enzimática. Porém as informações fornecidas pelo ensaio em microplacas não são conclusivas em relação a qual sistema enzimático está agindo para a formação do ácido acético: (i) apenas nitrilases, (ii) apenas nitrilases/amidases ou (iii) ambos os sistemas.

Como os resultados do ensaio para nitrilase com o indicador de pH azul de bromotimol em pH 7,2 10 mM foram bastante satisfatórios deixamos de lado os ensaios colorimétricos em placas de Petri e adaptamos o ensaio em microplaca para que o mesmo fornecesse uma resposta mais conclusiva. Nesta nova abordagem inserimos um experimento com um inibidor de amidase, o DEPA (dietilaminofosforamida). Assim é possível concluirmos qual (is) enzima(s) está (ao) atuando. Este ensaio foi composto pelos seguintes experimentos: controle microbiano (coloração azul), controle da acetonitrila (coloração azul), controle dos produtos: acetamida (coloração azul) e ácido acético (coloração amarelo), controle do inibidor DEPA (coloração azul), experimento sem adição do inibidor de amidase e experimento com adição do inibidor de amidase. As microplacas foram montadas de forma a comportar a avaliação em triplicata para 8 micro-organismos diferentes, conforme mostra a tabela 8.

Tabela 8. Montagem da microplaca de 96 poços para os ensaios enzimáticos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C _{ACN}	C _{ACN}	C _{ACN}	C _{ACT}	C _{ACT}	C _{ACT}	C _{AA}	C _{AA}	C _{AA}	C _{DEPA}	C _{DEPA}	C _{DEPA}
B	MO 1	MO 1	MO 1	MO 3	MO 3	MO 3	MO 5	MO 5	MO 5	MO 7	MO 7	MO 7
C	MO 1	MO 1	MO 1	MO 3	MO 3	MO 3	MO 5	MO 5	MO 5	MO 7	MO 7	MO 7
D	MO 1	MO 1	MO 1	MO 3	MO 3	MO 3	MO 5	MO 5	MO 5	MO 7	MO 7	MO 7
E												
F	MO 2	MO 2	MO 2	MO 4	MO 4	MO 4	MO 6	MO 6	MO 6	MO 8	MO 8	MO 8
G	MO 2	MO 2	MO 2	MO 4	MO 4	MO 4	MO 6	MO 6	MO 6	MO 8	MO 8	MO 8
H	MO 2	MO 2	MO 2	MO 4	MO 4	MO 4	MO 6	MO 6	MO 6	MO 8	MO 8	MO 8

C_{ACN}: Controle acetonitrila; C_{ACT}: Controle acetamida; C_{AA}: Controle ácido acético; C_{DEPA}: Controle DEPA; MO: Micro-organismo.

A figura 4 mostra os resultados obtidos deste primeiro ensaio realizado com os micro-organismos comerciais.

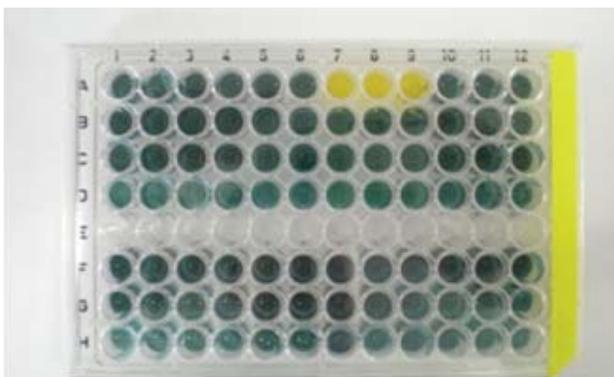
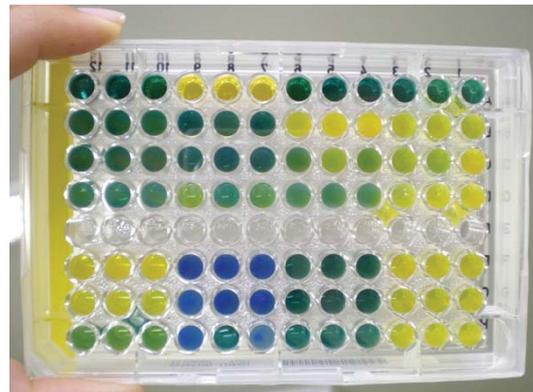
**A****B**

Figura 4. Fotos dos ensaios enzimáticos para detecção de nitrilases e nitrila hidratases/amidases. A: tempo = zero; B: Tempo = 36 h.

Os resultados positivos obtidos neste primeiro ensaio enzimático para detecção de nitrilase, nitrila hidratase e amidase são apresentados na Tabela 9.

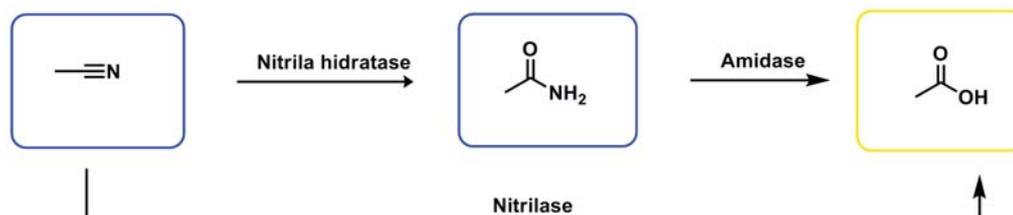
Tabela 9. Ensaio enzimáticos para detecção de nitrilase, nitrila hidratase e amidase.

Código do Micro-organismo	Controle microbiano	Ensaio sem DEPA	Ensaio com DEPA
<i>Pseudomonas putida</i>	Azul	Amarelo	Amarelo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Azul	Amarelo	Amarelo
<i>Arthrobacter sp</i>	Amarelo	Amarelo	Verde
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Azul	Azul	Azul
<i>Nocardia simplex</i>	Azul	Amarelo	Verde
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Azul	Azul	Azul
<i>Rhodococcus equi</i>	Azul	Azul	Azul
<i>Rhodococcus ruber</i>	Azul	Azul	Verde

Controle da acetnitrila: coloração azul; Controle do DEPA: coloração azul; Controle do ácido acético: coloração amarela; Controle da acetamida: coloração azul.

Analisando a tabela, pode-se concluir que a *Pseudomonas putida* e a *Pseudomonas fluorescens* são positivas para nitrilase uma vez que a adição do inibidor de amidase não interrompeu a formação do ácido acético, resultando em ensaios de coloração amarela. A *Nocardia simplex* é positiva para nitrila hidratases/amidases e não para nitrilases. Nos ensaios sem inibidor de amidase houve formação de ácido que poderia ser tanto produzida pela nitrila hidratase/amidase quanto pela nitrilase. Porém com adição de inibidor específico para amidase a formação do ácido foi interrompida indicando a presença de nitrila hidratases. Caso houvesse nitrilases presentes elas não seriam inibidas no ensaio com inibidor de amidase e a coloração amarela persistiria.

De posse das culturas microbianas recém isoladas e puras em mãos e com o ensaio enzimático colorimétrico devidamente validado submetemos os micro-organismos recém isolados ao ensaio enzimático para detecção de nitrilases, nitrila hidratases e amidases. Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de nitrilase, nitrila hidratase e amidase são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Ensaio enzimáticos para detecção de nitrilase, nitrila hidratase e amidase

Código do Micro-organismo	Controle microbiano	Ensaio sem DEPA	Ensaio com DEPA
UNP3 9	Azul	Azul	Azul
UNP3 10	Azul	Azul	Azul
UNP3 11	Azul	Azul	Azul
UNP3 12 (48h)	Verde	Amarelo	Amarelo
UNP3 13	Azul	Azul	Azul
UNP3 14 (48h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
UNP3 15 (48h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 1 (48h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 2	Azul	Azul	Verde
MANE 3 (24h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 4 (48h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 5 (120h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 6 (24h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 7	Verde	Verde	Verde
MANM 1	Azul	Azul	Azul
MANM 2	Azul	Azul	Azul
MANM 3 (48h)	Azul	Amarelo	Amarelo
MANM 4	Azul	Azul	Azul
MANM 5 (48h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANM 6	Azul	Azul	Azul
MANM 7	Azul	Azul	Azul
MANE 8 (24h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo
MANE 9 (24h)	Amarelo	Amarelo	Amarelo

Controle da acetonitrila: coloração azul; Controle do DEPA: coloração azul; Controle da acetamida: coloração azul; Controle do ácido acético: coloração amarela

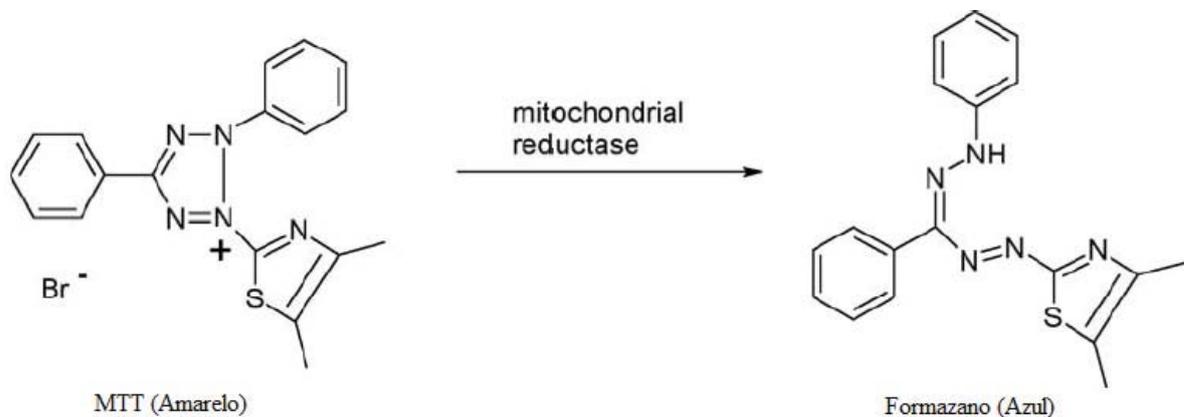
Estes ensaios enzimáticos não foram realizados para os micro-organismos UNP3 1, UNP3 2, UNP3 3, UNP3 4, UNP3 5, UNP3 6, UNP3 7 e UNP3 8 pois estes não demonstraram crescimento quando realizado o processo de ativação dos mesmos. Isto se deve, provavelmente, por terem sido isolados do solo da UNESP – RC sem nenhum tipo de seleção e aclimatação, e portanto não apresentaram nenhuma tolerância a acetonitrila.

Analisando a tabela 7 pode-se concluir que o micro-organismo MANM 3 é positivo para nitrilase, uma vez que os poços do controle microbiano apresentaram coloração azul e os dos dois ensaios amarela. Porém não é possível concluir se há presença de nitrila hidratases

ou não. Este experimento foi investigado por GC-FID subsequentemente e foram detectadas a presença tanto de ácido acético quanto de acetamida indicando a presença dos dois sistemas enzimáticos: nitrilases e nitrila hidratase/amidase. O micro-organismo UNP3 12 apresentou os poços de controle microbiano verde e os dos dois ensaios amarelos. Os micro-organismos UNP3 14, UNP3 15, MANM 5, MANE 1, MANE 3, MANE 4, MANE 5, MANE 6, MANE 8 e MANE 9 apresentaram todos os poços amarelos, inclusive o do controle microbiano. Uma vez que os poços de controle microbiano ficavam esverdeados/amarelados apenas depois de um certo tempo de incubação, pode-se sugerir que o meio esteja mudando de cor devido à volatilização da acetonitrila seguida de sua condensação no poço relativo ao controle microbiano, contaminando os poços do controle ou a produção de algum metabólito ácido pelos micro-organismos que é excretado para o meio. Desta forma o resultado não é conclusivo para estas culturas que não apresentaram o controle microbiano na cor esperada (azul). As outras culturas demonstraram muito pouca ou nenhuma capacidade de degradação da acetonitrila e portanto foram eliminadas das etapas subsequentes.

4.5. Ensaios de MIC – Concentração Mínima Inibitória

O ensaio com MTT é um método colorimétrico utilizado para verificar a respiração celular e conseqüente viabilidade microbiana. Este método avalia a atividade metabólica das células através da redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por enzimas mitocondriais que resulta na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos (azul), no interior das células (Esquema 7 e Figura 5).



Esquema 7. Redução do MTT por redutases mitocondriais.

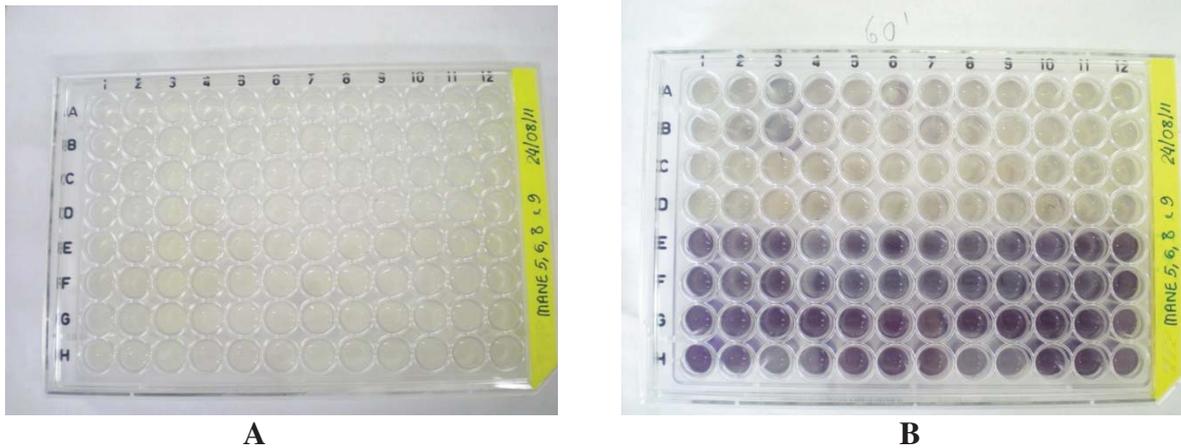


Figura 5. Fotos dos ensaios de MIC. A: tempo = zero; B: Tempo = 60 minutos.

Portanto, através desta etapa é possível analisar a resistência a acetonitrila das culturas pré-selecionadas do ensaio enzimático com azul de bromotimol. Para tanto as culturas microbianas foram submetidas a concentrações crescentes de acetonitrila e, após o tempo de incubação, adicionou-se o MTT para revelar se há a presença ou ausência de respiração mitocondrial. Deste modo foi possível determinar a concentração máxima de acetonitrila que cada micro-organismo suporta. As microplacas foram montadas de forma a comportar a avaliação em duplicata para 4 micro-organismos diferentes. Os poços da coluna 1 são do Controle microbiano, os da coluna 2 são do Controle Positivo 1, os da coluna 3 são do Controle positivo 2 e os das colunas 4 a 7 são os ensaios contendo diferentes concentrações de acetonitrila (D1 a D9). A tabela 11 mostra a configuração da microplaca.

Tabela 11. Montagem da microplaca de 96 poços para os ensaios de MIC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MO 1											
B	MO 1	MO 2	MO 3									
C	MO 2											
D	MO 2											
E	MO 3											
F	MO 3											
G	MO 4	MO 6	MO 4									
H	MO 4	MO 6	MO 4									

MO: Micro-organismo

As concentrações de acetonitrila que foram analisadas podem ser observadas na tabela 12. A escolha dessas concentrações foi em relação ao valor já estabelecido de acetonitrila que os micro-organismos apresentam crescimento, que é o utilizado nas ativações. Este valor é de 0.5% v/v de ACN, calculando em partes por milhão chegou-se a 5.090 ppm de acetonitrila.

Deste modo foi necessário aumentar bastante a concentração de acetonitrila para determinar o MIC.

Tabela 12. Concentrações de acetonitrila (já está considerado o volume final 200 μ L) a partir da solução estoque 783.000 ppm (PA).

Diluição	Coluna na microplaca de 96 poços	Concentração de acetonitrila (ppm)
D1	4	391.500
D2	5	195.750
D3	6	97.875
D4	7	48.937
D5	8	24.468
D6	9	12.234
D7	10	6.117
D8	11	3.058
D9	12	1.529

Os resultados positivos obtidos no ensaios de MIC são apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Ensaios de MIC.

Código do Micro-organismo	Crescimento de Micro-organismos				
	Controle microbiano	Controle positivo 1 - cloranfenicol	Controle positivo 2 - nistatina	MIC (ppm)	Grau de coloração (poços com ACN)
UNP3 12	Sim	Não	Sim	195.750	2
UNP3 14	Sim	Não	Sim	195.750	2
UNP3 15	Sim	Não	Sim	195.750	2
MANM 3	Sim	Não	Sim	109.894	1
MANM 5	Sim	Sim	Sim	109.894	1
MANE 1	Sim	Não	Sim	109.894	1
MANE 3	Sim	Sim	Sim	195.750	4
MANE 4	Sim	Sim	Sim	195.750	4
MANE 5	Sim	Não	Sim	109.894	1
MANE 6	Sim	Não	Sim	109.894	1
MANE 8	Sim	Sim	Sim	195.750	4
MANE 9	Sim	Sim	Sim	195.750	4

Grau de coloração (respectivo a coloração do controle negativo): 1 (ligeiramente roxo) a 4 (roxo forte).

Neste ensaio foi utilizado, na primeira diluição do composto, a adição de acetonitrila PA. Nesta coluna não cresceu nenhum micro-organismo, porém logo na segunda diluição

(195.750 ppm) já cresceram em grande quantidade. Isso demonstra que valores acima deste são tóxicos demais para os micro-organismos analisados. Apesar de conseguirem utilizar acetonitrila como fonte de N, chega um ponto que a toxicidade deste composto acaba por inviabilizar as células dos micro-organismos.

Analisando a tabela 13 pode-se afirmar que estão mais adaptados a concentrações altas de acetonitrila o MANE 3, MANE 4, MANE 8 e MANE 9. As altas resistências apresentadas provavelmente se dá pela origem deles. Como foram coletados da amostra de raiz de mandioca, estão aclimatizados com altas concentrações de nitrilas.

Estes experimentos de MIC também forneceram pistas quanto à identidade dos micro-organismos recém isolados e ainda não identificados: bactérias ou leveduras? Nos experimentos foram utilizados dois controles positivos: um composto por cloranfenicol, um composto com propriedades bactericidas e a nistatina, um composto com propriedades antifúngicas. Desta forma para os micro-organismos que cresceram apenas em cloranfenicol, é possível inferir que se trata de uma levedura e para aqueles que cresceram apenas em nistatina há grande chance de serem bactérias. Analisando a tabela é possível inferir que as culturas UNP3 12, UNP3 14, UNP3 15, MANM 3, MANE 1, MANE 5 e MANE 6 são de bactérias, uma vez que não cresceram em cloranfenicol. As outras culturas apresentaram crescimento nos dois, portanto não é possível inferir sua classificação. Posteriormente, serão realizados testes filogenéticos mais e por espectrometria de massas para a identificação completa e inequívoca dessas culturas.

Para escolher o micro-organismo mais eficiente e que seria utilizado nas etapas seguintes desta investigação levou-se em consideração todos os dados obtidos até o momento. Através da análise dos dados o MANE 4 foi eliminado, pois apenas após 48h que seus poços do ensaio enzimático com azul de bromotimol ficaram amarelos. As outras culturas selecionadas (MANE 3, MANE 8 e MANE 9) apresentaram mudança na coloração em apenas 24h. Analisando outros aspectos para essas três culturas (crescimento, MIC), percebeu-se que todas apresentam características muito semelhantes. Desta forma foi realizada uma escolha aleatória de uma das três e as duas que sobraram ficam para ser usadas em estudos posteriores. A cultura escolhida foi a MANE 8. Esta deve ser a que prosseguirá com os procedimentos subsequentes.

4.6. Avaliação da influência do pH e fonte de C na biodegradação da ACN

O micro-organismo pré-selecionado nos ensaios de seleção e triagem foi cultivado em erlenmeyers contendo meio líquido adequado e mantidos sob agitação orbital onde os parâmetros pH e fonte de C foram avaliados paralelamente frente ao consumo de acetonitrila. Para avaliar o pH ideal para a degradação da acetonitrila foi selecionado um pH ácido (5.8), um neutro (7.2) e um básico (8.0).

Sabe-se que este micro-organismo utiliza a acetonitrila como fonte de N, uma vez que no seu isolamento esta era a única fonte. Nesta etapa foi testado se o micro-organismo consegue utilizar a acetonitrila como fonte de carbono também. Esse procedimento consiste na simples retirada da glicose na composição do meio MM2 e observação se o micro-organismo continua com suas atividades metabólicas (degradação da ACN). Uma vez que o carbono é um elemento necessário para a biossíntese de diversos constituintes celulares (carboidratos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos), se o micro-organismo não conseguir utilizá-lo a partir da acetonitrila, cessará suas atividades enzimáticas. Isto resultará em um meio com alta concentração de acetonitrila.

Os resultados dos ensaios, analisados em GC-FID, se encontram na tabela 14.

Tabela 14. Resultados da investigação da influência do pH e fonte de carbono na biodegradação de acetonitrila (porcentagem de composto detectada por GC-FID).

		pH		
		5.8	7.2	8.0
Fonte de Carbono	Glicose	ACN – 0% ACA – 56,4% AA – 43,6%	ACN – 0% ACA – 54,8% AA – 45,2%	ACN – 35,5% ACA – 36% AA – 28,5%
	Acetonitrila	ACN – 15,4% ACA – 46,5% AA – 38,1%	ACN – 96,6% ACA – 2,6% AA – 1,8%	ACN – 97,6% ACA – 1,5% AA – 0,9%

ACN: Acetonitrila; ACA: Acetamida; AA: Ácido Acético

No geral os ensaios contendo glicose como fonte de C e acetonitrila como fonte de N apresentaram melhores resultados do que os contendo acetonitrila como fonte de C e N. Isto pode ser observado na tabela 14 pela quantidade restante de ACN e produção de ACA e AA. Em todos os pH's amostrados houve maior produção de ACA e AA no meio com glicose.

Provavelmente isto se deve a ativação desse micro-organismo ter sido realizada em meio contendo glicose e acetonitrila. Portanto o maquinário enzimático deste está melhor adaptado a funcionar utilizando a glicose como fonte de C ao invés da acetonitrila, sendo a acetonitrila utilizada apenas como fonte de N.

De todos os ensaios contendo ACN como única fonte de carbono e nitrogênio, apenas em pH 5.8 foi observado a degradação da acetonitrila pelo micro-organismo. Em pH 7.2 e 8.0 não houve praticamente nenhuma degradação, visto que restou no meio 96,6% e 97,6% de ACN, respectivamente. A degradação apresentada em pH 5.8 sem glicose foi maior do que a apresentada em pH 8.0 com glicose, restando no meio 15,4% e 35,5% de ACN, respectivamente. Isto mostra que as enzimas para utilização de acetonitrila como fonte de carbono devem funcionar melhor em pH ácido. Necessita-se mais estudos para comprovar esta hipótese.

Analisando a tabela 14 percebe-se que a degradação da ACN foi bastante menor no pH 8.0, foi o único, de todos os ensaios com glicose, que não apresentou consumo completo desta no meio (35,5 % de acetonitrila remanescente). Nos ensaios em pH, 5.8 e 7.2, houve total degradação da ACN e produção de quantidades praticamente iguais de ACA (56,4% e 54,8% respectivamente) e de AA (43,6% e 45,2%). Neste caso, com as informações obtidas até o momento, é difícil definir qual das duas condições é a melhor, para isso é preciso mais estudos. Para tanto pode-se começar tentando diferentes formas de ativação do micro-organismo antes do ensaio e deixar um período maior de tempo de reação, uma vez que neste estudo foi de 24h, deixar 48h ou 72h. Deste modo é possível analisar se a ACA é consumida, havendo maior produção de AA ou se a reação pára.

Dos dados obtidos é possível afirmar, através da análise da tabela 14, que a cultura MANE 8 tem melhor atividade de biodegração de acetonitrila com glicose como fonte de C e acetonitrila como fonte de N e pH 5.8 ou 7.2. Na literatura foram encontrados valores parecidos de pH ideal para a degradação da acetonitrila (de 6.0 a 7.5) e queda brusca na degradação da mesma em pH acima deste valor (LI et al, 2007; SANTOSHKUMAR et al, 2010; BANERJEE et al, 2003; FENG et al, 2009).

5. CONCLUSÃO

Em média, são gerados 72 L de resíduos contendo acetonitrila por ano pelo IB-UNESP-RC. Este é um valor alto e que tende a aumentar nos próximos anos, tornando interessante o desenvolvimento de metodologias sustentáveis e ambientalmente amigáveis para o tratamento adequado para estes resíduos e ainda, que possam ser conduzidos no Laboratório de Resíduos Químicos do IB tornando esta Unidade autossuficiente no que se refere ao manejo de seus resíduos contendo acetonitrila.

No presente estudo foi comprovada a importância escolha para a fonte de coleta de micro-organismos, uma vez que os melhores resultados foram observados para as culturas isoladas que já haviam sido aclimatizadas a concentrações altas de compostos nitrilados (da amostra de mandioca). Os ensaios enzimáticos com azul de bromotimol são eficazes e devem ser realizados nas etapas iniciais da investigação pois reduz o número de reações a serem realizadas posteriormente, porém geram dados qualitativos, sendo necessário quantificá-los através de outras metodologias, como a Cromatografia Gasosa. As seleções e triagens realizadas demonstraram grande sucesso visto a alta taxa de sobrevivência dos micro-organismos selecionados a altíssimas concentrações de ACN. Dos 31 micro-organismos isolados foram selecionados 3 candidatos altamente promissores. Destes um foi escolhido (MANE 8), aleatoriamente, para a avaliação das condições ideais do meio para a implementação de um processo de biodegradação e ainda permanecem outras duas culturas para serem utilizadas em estudos posteriores. Com a cultura MANE 8 verificou-se que as melhores condições reacionais são a utilização de glicose como fonte de C e pH 5.8 ou 7.2.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, A.; DESAI, A. J. Studies on utilization of acetonitrile by *Rhodococcus erythropolis* A10. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 13, p. 175–178, 1997.

AKCIL, A. Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. Biotechnology Advances, New York, v. 21, p. 501 -511, 2003.

ATSDR (Agency for toxic Substances and Disease Registry) Priority List of hazardous substances, 2007, disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html> , acessado em: 12 de fevereiro de 2011.

BABU, G. R. V.; WOLFRAM, J. H.; MARIAN, J. M.; CHAPATWALA, K. D. *Pseudomonas marginalis*: its degradative capability on organic nitriles and amides. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 43, p. 739–745, 1995.

BANERJEE, A.; KAUL, P.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. A high-throughput amenable colorimetric assay for enantioselective screening of nitrilase-producing microorganisms using pH sensitive indicators. Journal of Biomolecular Screening, California, USA, v. 8(5), p. 559-565, 2003.

BAXTER, J.; CUMMINGS, S. P. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. Antonie van Leeuwenhoek, Netherlands, v. 90, p. 1-17, 2006.

BHALLA, T. C.; MIURA, A.; WAKAMOTO, A.; OHBA, Y.; FURUHASHI, K. Asymmetric hydrolysis of alpha aminonitriles to optically active amino acids by a nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 37, p. 184–190, 1992.

BRADY, D.; BEETON, A.; ZEEVAART, J.; KGAJE, C.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, v. 64(1), p. 76-85, 2004.

CHAUHAN, A.; JAIN, R. K. Biodegradation: gaining insight through proteomics. Biodegradation, Dordrecht, v. 21 (6), p. 861-879, 2010.

COHEN, M. Environmental toxins and health—the health impact of pesticides. Australian Family Physician, Sydney, v. 36(12), p. 1002–1014, 2007.

Convenção sobre Diversidade Biológica (Artigo 2. Uso do Termo). Organização das Nações Unidas. 1992, disponível em: <http://www.biodiv.org/convention/convention.shtml> , acessado em: 6 de fevereiro de 2011.

DIAS J. C. T.; REZENDE, R. P.; LINARDI, V. R. Bioconversion of nitriles by *Candida guilliermondii* CCT 7202 cells immobilized in barium alginate. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 56, p. 757–761, 2001.

DIAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. International Microbiology, Barcelona, v. 7(3), p. 173–180, 2004.

DIGERONIMO, M. J.; ANTOINE, A.D. Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL 100-21. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 31, p. 900–906, 1976.

ENDO, I.; WATANABE, I. Nitrile hydratase of *Rhodococcus* sp. N-774: purification and characterization. FEBS Letters, Amsterdam, v. 243, p. 61–64, 1989.

FENG, Y.-S.; CHEN, P.-C.; WEN, F.-S.; HSIAO, W.-Y.; LEE, C.-M. Nitrile hydratase from *Mesorhizobium* sp F28 and its potential for nitrile biotransformation. Process Biochemistry, London, v. 43 (12), p. 1391-1397, 2008.

FENG, Y.-S.; LEE, C.-M. The potential of the acetonitrile biodegradation by *Mesorhizobium* sp F28. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, v. 164 (2-3), p. 646-650, 2009.

FENG, Y.-S.; LEE, C.-M.; WANG, C. C. Methods for increasing nitrile biotransformation into amides using *Mesorhizobium* sp. Applied Biochemistry and Microbiology, New York, v. 44 (3), p. 271-275, 2008.

FURTADO, J. L. B.; BEZERRA, C. W. B.; MARQUES, E. P.; . MARQUES, A. L. B. Cianeto em tiquiras: riscos e metodologia analítica. Ciências e Tecnolia de Alimentos, Campinas, v. 27, n. 4, 2007.

GUPTA, N.; BALOMAJUMDER, C.; AGARWAL, V.K. Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, v. 176 (1-3), p. 1-13, 2010.

HENAHAN, J. F.; IDOL, J. D. Setting the world of nitrile chemistry afire. Chemical and Engineering News, Washington, v. 49, p. 16-18, 1971.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. Current Opinion in Chemical Biology, London, v. 9, p. 174-180, 2005.

JIN, L-Q.; LIU, Z-Q.; ZHENG, Y-G.; SHEN, Y-C. Identification and characterization of *Serratia marcescens* ZJB-09104, a nitrile-converting bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 26, p. 817–823, 2010.

KABAIVANOVA, L.; DIMITROV, P.; BOYADZHIEVA, I.; ENGIBAROV, S.; DOBREVA, E.; EMANUILOVA, E. Nitrile degradation by free and immobilized cells of the thermophile *Bacillus* sp UG-5B, isolated from polluted industrial waters. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 24 (11), p. 2383-2388, 2008.

KAMBLE, A. L.; MEENA, V. S.; BANERJEE, U. C. Effect of agitation and aeration on the production of nitrile hydratase by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 1526 in a stirred tank reactor. Letters in Applied Microbiology, Oxford, v. 51 (4), p. 413-420, 2010.

KAO C. M.; CHEN K. F.; LIU J. K.; CHOU S. M.; CHEN S.C. Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 71, p. 228–233, 2006.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, S.; Versatile nitrilases: Nitrile-hydrolysing enzymes. FEMS Microbiology. Letters, Amsterdam, v. 120, p. 217-224, 1994.

KOHYAMA, E.; DOHI, M.; YOSHIMURA, A.; YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. Remaining acetamide in acetonitrile degradation using nitrile hydratase- and amidase-producing microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 74 (4), p. 829-835, 2007.

KOHYAMA, E.; YOSHIMURA, A.; AOSHIMA, D.; YOSHIDA, T.; KAWAMOTO, H.; NAGASAWA, T. Convenient treatment of acetonitrile-containing wastes using the tandem combination of nitrile hydratase and amidase-producing microorganism. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 72, p. 600–606, 2006.

LANGDANHL, B. R.; BISP, P.; INGVORSE K. Nitrile hydrolysis by *Rhodococcus erythropolis* BL1, an acetonitrile-tolerant stain isolated from a marine sediment. Microbiology, New York, v. 142, p. 145–154, 1996.

LAYH, N.; HIRRLINGER, B.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.-J. Enrichment strategies for nitrilehydrolysing bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 47, p.668–674, 1997.

LAYH, N.; STOLZ, A.; BÖHME, J.; EFFENBERGER, F.; KNACKMUSS, H.-J. Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen nitrile and naproxen amide to S-naproxen by new bacterial isolates. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 33, p. 175–182, 1994.

LAYH, N.; STOLZ, A.; FÖRSTER, S.; EFFENBERGER, F.; KNACKMUSS, H.-J. Enantioselective hydrolysis of O-acetylmandelonitrile to O-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. Archives Of Microbiology, Berlin, v. 158, p. 405–411, 1992.

LI, T. G.; BAI, R. B.; OHANDJA, D. G.; LIU, J. Biodegradation of acetonitrile by adapted biofilm in a membrane-aerated biofilm reactor. Biodegradation, Dordrecht, v. 20 (4), p. 569-580, 2009.

LI, T.; LIU, J.; BAI, R.; OHANDJA, D .G.; WONG, F. S. Biodegradation of organonitriles by adapted activated sludge consortium with acetonitrile-degrading microorganisms. Water Research, New York, v.41, p. 3465–3473, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINKOVA, L.; UHNAKOVA, B.; PATEK, M.; NESVERA, J.; KREN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environment International, New York, v. 35 (1), p. 162-177, 2009.

NAGASAWA, T.; YAMADA, H. Microbial transformations of nitriles. Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 7 (6), p. 153-158, 1989.

NAWAZ, M. S.; CHAPATWALA, K. D.; WOLFRAM, J. H. Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 55, p. 2267–2274, 1989.

OGAWA, N.; MIYASHITA, K.; CHAKRABARTY, A. M. Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds. Chemical Record, New York, v. 3(3), p. 158–171, 2003.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. Química Nova, São Paulo, vol. 32, v. 3, p. 742-756, 2009.

OTTEN, L. G.; VAN PELT, S.; SOMERS, R. F.; et al. New nitrile hydratases for enantioselective biocatalysis. New Biotechnology, Amsterdam, v. 25, p. S55-S56 Suppl. 1, 2009.

PATEK, M.; KNOPPOVA, M.; VOLKOVA, O.; et al. Organization, regulation and expression of nitrile degradation genes of *Rhodococcus erythropolis*. New Biotechnology, Amsterdam, v. 25, p. S104-S104 Suppl. 1, 2009.

PRASAD, S.; BHALLA, T. C. Nitrile hydratases (NHases): At the interface of academia and

industry. Biotechnology Advances, New York, v. 28 (6), p. 725-741, 2010.

RAN, N.; ZHAO, L.; CHEN, Z; TAO, J. Recent Applications of Biocatalysis in Developing Green Chemistry for Chemical Synthesis at the Industrial Scale. Green Chemistry, Cambridge, v. 10, p. 361-372, 2008.

RIEGER, P. G.; MEIER, H. M.; GERLE, M.; VOGT, U.; GROTH, T.; KNACKMUSS, H. J. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 94(1), p. 101–123, 2002.

SANTOSHKUMAR, M.; NAYAK, A. S.; ANJANEYA, O.; KAREGOUDAR, T. B. A plate method for screening of bacteria capable of degrading aliphatic nitriles. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Hampshire, Inglaterra, v. 37(1), p. 111-115, 2010.

SYMONS, Z. C.; BRUCE N. C. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. Natural Products Report, London, v. 23(6), p. 845–850, 2006.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) Priority Pollutant List Fed. 1, Reg. 40, Part 423, Appendix A. 1996.

VELANKAR, H.; CLARKE, K.G.; DU PREEZ, R.; COWAN, D.A.; BURTON, S.G. Developments in nitrile and amide biotransformation processes. Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 28 (11), p. 561-569, 2010.

WACKETT, L. P.; HERSHBERGUER, C. D.; Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2001.

WANG, C. C.; LEE, C. M.; CHEN, L. J. Removal of nitriles from synthetic wastewater by acrylonitrile utilizing bacteria. Journal of Environmental Science and Health. Part A. Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, Philadelphia, v. 39, p. 1767–1779, 2004.

WATANABE, K.; BAKER, P. W. Environmentally relevant microorganisms. Journal of Bioscience and Bioengineering, Osaka, v. 89(1), p. 1–11, 2000.

WOHLGEMUTH, R. The locks and keys to industrial biotechnology. New Biotechnology, Amsterdam, v. 25, p. 204-213, 2009.

ZARZYCKI, P. K.; ZARZYCKA, M. B.; SLACZKA, M. M.; CLIFTON, V. L. Acetonitrile, the polarity chameleon. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Heidelberg, v. 397 (3), p. 905-908, 2010.

ZHONG, M.; ZHOU, Q. Molecular-ecological technology of microorganisms and its application to research on environmental pollution. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, China, v. 13(2), p. 247–251, 2002.

ZHOU, X.K.; OLESZKIEWICZ, J. A. Biodegradation of oestrogens in nitrifying activated sludge Environmental Technology, London, v. 31 (11), p. 1263-1269, 2010.

7. ANEXOS

Anexo 1. Questionário sobre a utilização de ACN e produção de resíduos contendo a mesma.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
 INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - DEPARTAMENTO
 DE BIOQUÍMICA E MICROBIOLOGIA - RIO CLARO



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)

Nome do aluno: Lucas de Freitas Coli Rocco RA: 101010637

Curso: Ciências Biológicas - Integral

Orientadora: Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Questionário

Laboratório: _____

Docente Responsável: _____

Entrevistado: _____

1) Seu grupo de pesquisa utiliza acetonitrila (CH_3CN), também conhecida como cianeto de metila, cianometano ou etanometila? Se sim, para quais processos?

R: _____

2) Qual a quantidade de acetonitrila utilizada?

R: _____

3) Qual a quantidade de resíduos contendo acetonitrila gerados?

R: _____

4) Como este resíduo é armazenado?

R: _____

5) Que tipo de tratamento este resíduo recebe?

R: _____

