

Estudo da atividade catalítica de enzimas de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes à via de degradação do benzeno

Raphael Dupin Vieira Fonseca

Graduando do 4.º período do Curso de Medicina do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM e Bolsista do programa PIBIC.

Kádima Nayara Teixeira

Professora doutora do Centro Universitário de Patos de Minas.

Resumo: *Pseudomonas aeruginosa* cultivada na presença de benzeno mostrou ser capaz de utilizar este composto como fonte de carbono. Logo, esta bactéria expressa as enzimas necessárias para a sua metabolização. Essas enzimas foram fracionadas e serão analisadas quanto à capacidade de degradação de benzeno *in vitro*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, benzeno, degradação.

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa*, cultivated in the presence of benzene, showed to be able to use this composite as a source of carbone. This way, this bacteria expresses the enzymes necessary for its metabolism. These enzymes were fractionized and will analyzed according to its capacity of benzene degradation *in vitro*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, benzene, degradation.

Introdução

A toxicidade do benzeno, um conhecido carcinógeno, independe da via de introdução, sendo que a principal via de intoxicação ocorre pela inalação dos seus vapores. A absorção via contato dérmico do benzeno na forma gasosa contribui muito pouco para o total da exposição; no entanto, a absorção do benzeno na forma líquida é considerada uma importante rota de exposição (WHO, 1996). Acredita-se que esta alta toxicidade do benzeno está associada à sua ação direta sobre o organismo, bem como a de seus produtos derivados da biotransformação, como, por exemplo, o benzeno epóxido, uma substância altamente reativa e instável, e a 1,4-benzoquinona, prováveis responsáveis pela mielotoxicidade do benzeno (SALGADO e PEZZAGNO, 1991).

A contaminação do solo, ar e recursos hídricos por compostos tóxicos, como o benzeno, constitui um severo impacto no meio ambiente e representa risco à saúde humana e de vários animais. Uma das técnicas mais recomendadas e adequadas para a descontaminação desses ambientes é a biorremediação.

A biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas, transformando-as em substâncias menos ou não-tóxicas. É um mecanismo de estimulação de situações naturais de biodegradação para a limpeza de derramamentos de óleos e tratamento de ambientes terrestres e aquáticos contaminados com compostos xenobióticos (BERGMANN et al., 1989).

Existem vários relatos e publicações a respeito da acumulação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por bactérias, embora a maioria dos estudos esteja limitada a um único substrato e a poucas espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Desta forma há uma falta de conhecimento na diversidade das espécies de *Pseudomonas* que têm habilidade de acumular e degradar tais compostos.

Baseando-se nos dados da literatura e na necessidade de estudos para o desenvolvimento de estratégias visando à diminuição ou mesmo prevenção da contaminação do meio ambiente, e conseqüentemente de seres humanos, por compostos hidrocarbonados, este trabalho se propôs a analisar frações enzimáticas de *Pseudomonas aeruginosa*, pertencentes à via de degradação de benzeno, um hidrocarboneto monoaromático de alta toxicidade.

Revisão teórica

Hidrocarbonetos aromáticos e o benzeno

Hidrocarbonetos são compostos orgânicos que contém apenas os elementos carbono e hidrogênio, podendo ser classificados em alifáticos e aromáticos. Compostos aromáticos são o benzeno e os compostos que se assemelham ao benzeno em comportamento químico. Os hidrocarbonetos aromáticos se caracterizam por uma tendência para sofrer substituição heterolítica. Estas reações de substituição são características dos anéis 14 aromáticos, independentemente de outros grupos funcionais que a molécula possa conter (MORRISON e BOYD, 1993).

Os hidrocarbonetos aromáticos têm sido extensivamente estudados, também, devido à sua presença ubíqua no ambiente marinho e sua toxicidade para os organismos deste ambiente e também para a saúde humana (LATIMER e ZHENG, 2003). Na atmosfera esses compostos são emitidos por várias fontes (FERNANDES e BROOKS, 2003) ou liberados por meio de descargas de atividades humanas, como o esgoto industrial ou doméstico (BURGESS et al., 2003).

Existem mais de 100 compostos desse tipo, e a maioria persiste no ecossistema por vários anos devido à sua baixa solubilidade em água e adsorção em partículas sólidas (BOSMA et al., 1997). Os hidrocarbonetos aromáticos são lipossolúveis; portanto, podem atravessar a membrana e serem prontamente absorvidos no organismo humano via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo (NETTO et al., 2000).

Esses compostos são conhecidos por seus efeitos carcinogênicos, enquanto seus efeitos ecotoxicológicos são menos enfatizados. O metabolismo dos hidrocarbonetos

aromáticos gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido à presença desses compostos (CHAKRADEO et al., 1993).

O benzeno, o hidrocarboneto aromático mais simples, mostra os aspectos estruturais característicos dos compostos aromáticos. A fórmula do benzeno, C_6H_6 , indica que o composto é muito insaturado (RICHARDS et al., 1971).

À temperatura ambiente, o benzeno é um líquido volátil, estável e incolor. Tem um cheiro característico e um ponto de ebulição relativamente baixo ($80,1^\circ C$), evaporando-se rapidamente. É altamente inflamável, pouco solúvel em água, mas miscível com a maior parte dos solventes orgânicos (ASTM, 1996).

A elevada taxa de mortalidade (cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente) e o fato de que os tratamentos para essas doenças são dispendiosos, demorados e normalmente trazem muito sofrimento aos doentes, expõem claramente os benefícios potenciais que o entendimento, a avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer; particularmente quando sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes (PERERA, 1997).

A exposição humana aos hidrocarbonetos aromáticos se dá principalmente por meio da contaminação ambiental. Estudos realizados na Inglaterra estimam que cerca de 54.000 toneladas destas substâncias contaminam atualmente o ambiente no território do Reino Unido. Processos de combustão de matéria orgânica seriam responsáveis pela introdução de cerca de 1000 toneladas/ano, das quais os veículos motorizados responderiam por cerca de 80 toneladas/ano. Esta contribuição é mais significativa ($> 35\%$) nas grandes cidades (HARVEY, 1985).

Dentre suas inúmeras fontes, podem ser também citados os processos de combustão de material orgânico (particularmente a exaustão de motores a diesel ou a gasolina), a queima de carvão, as fotocopiadoras, a exaustão de plantas de incineração de rejeitos, a fumaça de cigarro, além de vários processos industriais como, por exemplo, a produção de alumínio e a gaseificação do coque (FIEDLER, 1991).

Porém, deveria ser notado que eles são achados em todos os lugares no ambiente, e não só em locais contaminados por causa de combustão incompleta de combustíveis fósseis, embora normalmente em muito baixas concentrações. Para isto foi mostrado que o nível de fundo em terra agrícola normal aumentou por muitos anos (JONES et al. 1989), e é esperado que seu aumento avance no futuro. Isto porque muitas das combinações de PHA são mesmo bastante persistentes no ambiente, sob condições aeróbias.

Biorremediação

A biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. Estratégias de biorremediação incluem a utilização de microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, sem qualquer interferência de tec-

nologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural), a adição de agentes estimulantes, como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação), e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (BENTO et al., 2003).

O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa. De acordo com Kataoka (2001), Mulligan et al. (2001) e Rahman et al. (2003), a inoculação de bactérias com habilidade em biodegradar hidrocarbonetos pode reduzir o tempo de tratamento.

Esta biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

Microrganismos biorremediadores

A tecnologia de biorremediação tornou-se um importante método de restauração de ambientes contaminados por resíduos de petróleo, pois utilizam a capacidade dos microrganismos em biodegradar ou biotransformar as mais diversas substâncias. A biodegradação ou biotransformação de compostos orgânicos contaminantes é uma das principais medidas de recuperação de ecossistemas contaminados, e requer a interação de muitos grupos de organismos vivos diferentes que trabalhem juntos ou sequencialmente na degradação dos compostos (KATAOKA, 2001). Os mais eficientes biodegradadores são os microrganismos, devido à abundância, grande diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica, bem como a capacidade de adaptação às condições adversas do meio (TEIXEIRA & LIMA, 1991 *apud* KATAOKA, 2001).

Microrganismos que degradam hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos no solo e em ambientes aquáticos. Populações desses microrganismos normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando hidrocarbonetos estão presentes, essas populações aumentam em 10% da comunidade (ATLAS, 1991). A biorremediação teve um papel muito importante na limpeza do derramamento de 41 milhões de litros de petróleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989, dando início ao desenvolvimento dessa técnica; e há boas razões para se acreditar que este método terá um papel importante no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias apropriadas (PRINCE, 1993).

Devido ao grande número de enzimas envolvidas na degradação destes compostos, a maioria dos microrganismos do solo não tem a capacidade de degradar os hidrocarbonetos aromáticos, justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores, visando a sua utilização na biorremediação de solos contaminados (ALEXANDER, 1999).

Desde a década de 1950, vêm sendo isoladas bactérias degradadoras destes compostos, pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros (MUTNURI et al., 2005; JACQUES et al., 2005a; JACQUES et al., 2005b; JACQUES et al., 2007), e vários

fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium* (CERNIGLIA, 1997; JACQUES et al., 2005a).

Metodologia

Preparo do pré-inóculo, inóculo bacteriano e estoques de reserva

Os pré-inóculo e inóculo de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* de referência da ATCC (*American type culture collection*) foram feitos em meio líquido (caldo) YEFG (Extrato de levedura 0,2%, Peptona de caseína 0,2%, Glicose 0,1%, Nitrato de amônio 0,02%), contendo ou não benzeno 0,02%. O crescimento das culturas bacterianas foi realizado durante 48 h a 25 °C, sob agitação constante de 150 rpm.

A partir da cultura bacteriana crescida foram realizados os experimentos posteriores, e também foram feitos estoques de reserva com glicerol 15%. Alíquotas de estoque foram congeladas a -20 °C.

Crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na presença e ausência de benzeno

O inóculo bacteriano deste trabalho foi crescido em meio de cultura líquido YEFG a partir dos pré-inóculo anterior. Foram preparados duas culturas de 100 mL cada uma na proporção de 1:100 de volume (cultura bacteriana: meio de cultura). Toda a manipulação foi realizada na presença de chama (bico de Bunsen) para evitar contaminações, sendo todos os materiais de manuseio previamente esterilizados em autoclave (calor úmido).

Em uma das culturas foi acrescentado benzeno 0,02% (PHA) como fonte de carbono; na outra, nenhum PHA foi acrescentado. As culturas bacterianas foram incubadas durante 48h a 25° C, sob agitação de 150 rpm. Durante o tempo de incubação o crescimento bacteriano foi monitorado para observar a eficiência da utilização do benzeno como fonte de carbono pelas bactérias.

Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 10000 rpm para decantar as células bacterianas. O sobrenadante foi descartado, e as células bacterianas (*pellet*) foram congeladas a -20°C até o próximo passo experimental.

Lise bacteriana

Os *pellets* de bactérias crescidas na presença de benzeno anteriormente congelados foram solubilizados em PBS (*Phosphate buffered saline*) contendo inibidores de protease (EDTA 5 mM e Iodoacetamida 200 µM).

A lise foi realizada por choque térmico, e o material solubilizado foi congelado e descongelado em água fervente. Esse ciclo de congelamento/ descongelamento foi realizado 6 vezes. Em seguida ao ciclo de choques térmicos o material foi passado por diversas vezes em uma seringa com uma agulha extremamente fina para diminuir a

viscosidade (para quebrar o DNA, que causa a viscosidade). Após, o material lisado foi centrifugado por 20 min a 10.000 rpm para coleta do sobrenadante, onde se encontravam as proteínas de interesse. Passamos a chamar esse material de extrato bacteriano.

Fracionamento do extrato bacteriano por cromatografia de filtração molecular

O método cromatográfico utilizado foi o de filtração molecular clássica ou de bancada. A resina Sephadex G100 (Pharmacia/ Amersham) foi reconstituída no interior de uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro e 30 cm de altura. A solução tampão utilizada foi Tris-HCl 0,1M/ NaCl 0,2M em pH 7,5 à temperatura de 25° C.

A coluna cromatográfica foi equilibrada utilizando 2 volumes do tampão citado, e foi aplicado um volume de extrato que não ultrapassou 5% do volume da coluna. O fluxo cromatográfico foi de 0,1 mL/min, e as frações coletadas foram de 1,5 mL.

Perfil cromatográfico

As frações coletadas foram analisadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm para detectar a presença de proteínas. Esses dados foram utilizados para construir o perfil cromatográfico do experimento (cromatograma).

Análise da atividade catalítica das frações cromatográficas por espectrofotometria

As frações coletadas foram utilizadas para montar reações com volume final de 1,0 mL nas quais benzeno 0,01% foi utilizado como substrato. A cinética de reação foi monitorada a 255 nm (comprimento de onda absorvido pelo benzeno) durante 30 minutos. O decaimento dos valores de absorção em 255 nm indica a degradação do benzeno, e consequentemente a presença de atividade catalítica *in vitro*. Uma reação controle (sem fração cromatográfica) foi feita para observar se haveria degradação (oxidação) do benzeno por outros compostos ou elementos, que não fossem as enzimas. Todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente.

Resultados e discussão

Crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na presença de benzeno como fonte de carbono e sem o benzeno

Durante o monitoramento das culturas observou-se crescimento em ambas. A cultura incubada com benzeno inicialmente apresentou um crescimento um pouco mais lento em relação à cultura sem o benzeno. O crescimento mais lento na presença pode ser explicado por uma lenta expressão protéica das enzimas responsáveis pela oxidação do benzeno. O crescimento adequado de *Pseudomonas aeruginosa* na presença de benzeno indica que a mesma utiliza esse composto químico como fonte de carbono,

logo esse composto foi metabolizado pelas bactérias, as quais para tanto produziram as enzimas necessárias para esse fim.

Nos experimentos descritos a seguir apenas as bactérias inoculadas na presença de benzeno foram utilizadas.

Cromatografia de filtração

Foram coletadas 21 frações cromatográficas de 1,5 mL; todas foram monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm e os valores de densidade óptica foram utilizados na construção do cromatograma que além do perfil protéico, infere a quantidade de proteínas por fração coletada.

A análise do cromatograma (Figura 1) mostra que a resina utilizada foi capaz de separar as proteínas, por massa (tamanho), em 3 picos: pico 1 (tubos 3 e 4), pico 2 (tubos 6 e 7) e pico 3 (tubos 10 e 11), sendo que os dois primeiros picos (ordem de acordo com o tempo de coleta) concentram a maioria das proteínas da bactéria. Os dois picos saíram logo no início do processo cromatográfico; isso indica que a maioria das proteínas possui massa molecular alta. No primeiro pico, como a absorção em 280 nm foi maior que no segundo, é possível inferir que este pico concentra a maior parte das proteínas da bactéria.

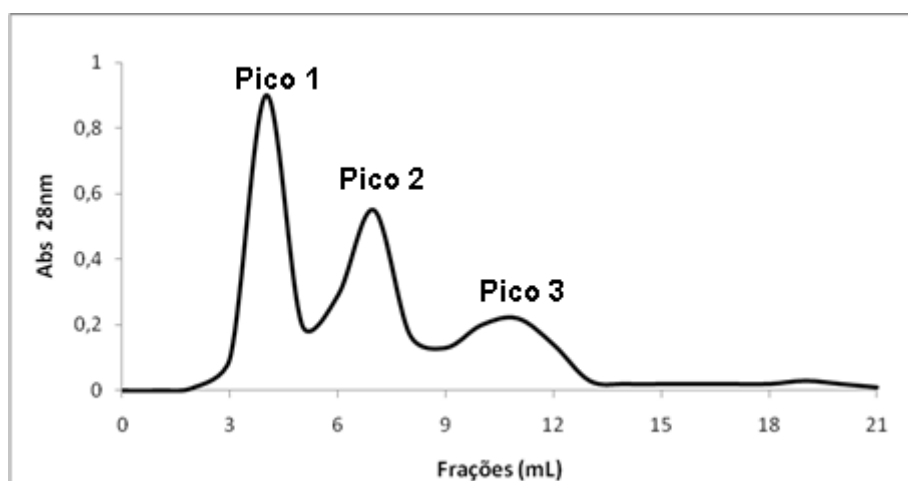


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato bacteriano após fracionamento por cromatografia de filtração molecular.

Análise da atividade catalítica

Antes de serem iniciados os testes de catálise (cinética de reações), foi realizado um teste controle para garantir que o benzeno não se oxidaria durante o período do teste (30 min) por fatores não-enzimáticos, como temperatura, pH, presença de sais do tampão etc. O benzeno incubado em tampão Tris-HCl 0,1M/ NaCl 0,2M em pH 7,5

(mesmo tampão usado na cromatografia) não apresentou degradação, uma vez que não foi observado decaimento significativo no valor inicial de sua absorção a 255 nm – Figura 2).

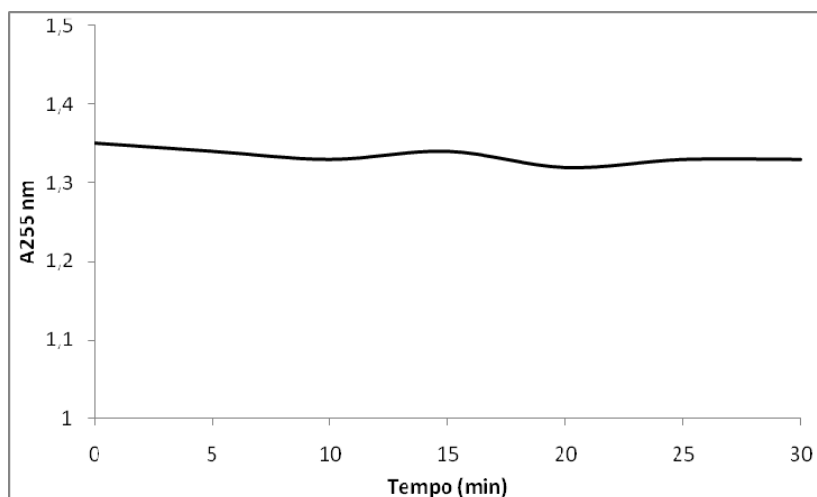


Figura 2. Reação controle da cinética de degradação do benzeno.

Em seguida, as 21 frações cromatográficas obtidas por filtração molecular foram submetidas ao teste de degradação de benzeno. Das frações testadas apenas as frações 6 e 7 apresentaram decaimento nos valores de absorção do benzeno a 255 nm (Figuras 3 e 4).

As frações 6 e 7 formam o pico 2 do perfil cromatográfico; esse pico concentra proteínas de tamanho (massa molecular) intermediário em relação aos demais picos do cromatograma.

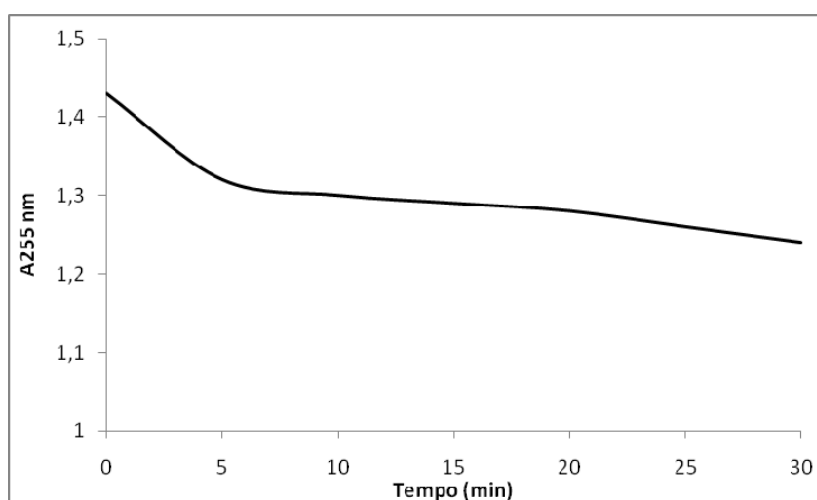


Figura 3. Cinética de reação da degradação do benzeno pela fração cromatográfica 6.



Figura 4. Cinética de reação da degradação do benzeno pela fração cromatográfica 7.

O decaimento da absorção da fração cromatográfica 6 foi de 0,190, enquanto a da fração cromatográfica 7 foi ligeiramente menor, 0,160. Isso indica que nas frações 6 e 7 se concentram as enzimas que constituem a via metabólica de degradação desse hidrocarboneto, sendo que a atividade catalítica foi conservada e se mostrou satisfatória nos parâmetros de temperatura e pH utilizados.

Conclusão

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* cultivada na presença de benzeno mostrou ser capaz de utilizar este composto como fonte de carbono. Logo, ela expressa as enzimas necessárias para a sua metabolização. Tais enzimas têm massa molecular de valor intermediário em relação às demais proteínas bacterianas analisadas, e se mostraram capazes de degradar moléculas de benzeno *in vitro*. Deste modo, essas enzimas apresentam um potencial que pode ser explorado para o possível desenvolvimento de biorremediadores.

Referências

ALEXANDER, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2 ed. New York: Academic, 1999, 453p.

ASTM: American Society for Testing Materials. E 1463-Standard Guide for Conducting Static and Flow-Through Acute Toxicity Tests with Mysids from the West Coast of the United States, 1992, 22p.

ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation: bioremediation of oil spill. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 52, p. 149-156, 1991.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 34 , p. 65-68, 2003.

BERGMANN, H.; ENGELHARDT, D.; MARTIN, D.; MENGES, H.J.; ONO, D.; RITCHER, R.; SCHOKNECHT; WALLNOFER, P.R. Degradation of pesticides, dessiccation and defoliation, Ach-receptors a-targets. *Chemistry of Plants Protection*. 2. ed. Berlin: Heidelberg, 1989, 115 p.

BOSMA, T.N.P; MIDDELDORP, P.J.M; SCHRA, A, G & ZENDER, A.J.B. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environment Sciences Technology*. v. 31, p. 248–252, 1997.

BURGESS, R.M., AHRENS, M.J., HICKEY, C.W. Geochemistry of PAHs in aquatic environments: source, persistence and distribution. In: DOUBEN, P.E.T. PAHs: An Ecotoxicological Perspective. *John Wiley and Sons*. p. 35-46, 2003.

CERNIGLIA, C.E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire*. v. 19, n. 5-6, p. 324–333, 1997.

CHAKRADEO, P.P. Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. *Cellular Biology International*. v. 17, n. 7, p. 671-676, 1993.

COSTA, A.H.R.; NUNES, C.C.; CORSEUIL, H.X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. *Engenharia Sanitária Ambiental*. v. 14, n. 2, p. 265-274, 2009.

DOMSCH, K.H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, I.H. An ecological concept for the assessment of the side effects agrochemicals on soil microorganisms. *Residue Reviews*. v. 86, p. 65-105, 1983.

FERNANDES, M.B; BROOKS, P. Characterization of carbonaceous combustion residues: II. Non-polar organic compounds. *Chemosphere*. v. 53, p. 447-458, 2003.

FIEDLER, H.; MUCKE, W. In: HUTZINGER, O. *The Handbook of Environmental Chemistry*. Berlin: Springer Verlag, 1991.

HARVEY, R.G. In: HARVEY, R.G. *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*. Washington: American Chemical Society, 1985.

JACQUES, R.J.S. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 56, n. 3, p. 150-156, 2005b.

Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. 2005a. 170 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation Journal*. v. 11, n. 1, p. 1-11, 2007.

JONES, K.C.; STRATFORD, J.A.; WATERHOUSE, K.S.; Furlong, E.T.; GIGER, W.; HITES, R.A.; SCHAFFNER, C.; JOHNSTON, A.E. Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environment Science Technology*. v. 23, p. 95-101, 1989.

KATAOKA, A. P. A. G. *Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de "landfarming"*. 2001. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680–685, 1970.

LATIMER, J.S., ZHENG, J. The sources, transport and fate of PAHs in the marine environment. In: DOUBEN, P.E.T. PAHs: An Ecotoxicological Perspective. *John Wiley and Sons*. p. 9-34, 2003.

MORENO, C.M.; BECERRA, A.G.; SANTOS, M.J.B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología*. v. 21, p. 103-120, 2004.

MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. *Química Orgânica*. 10. ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993, 1639p.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. v. 60, p. 371-380, 2001.

MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 67, n. 4, p. 569-576, 2005.

NETTO, A.D.P. . Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. *Química Nova*. v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

PERERA, F.P. Environment and Cancer: Who Are Susceptible? *Science*. v. 278, n. 5340, p. 1068-1073, 1997.

PRINCE, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology*. v. 19, n. 4, p. 217-242, 1993.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*. v. 90, p. 159-168, 2003.

RICHARDS, J.H.; CRAM, D.J.; HAMMOND, G.S. *Elementos de Química Orgánica*. Mexico: Libros McGraw-Hill, 1971, 476p.

RIEGLER, E. Eine kolorimetrische Bestimmungsmethode des Eiweisses. *Z. Anal Chem*, vol. 52, p. 242-254, 1914.

SALGADO, P.; PEZZAGNO, G. Indicadores biológicos de exposição ao benzeno. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. v. 19. p. 25-31, 1991.

WHO: World Health Organization. *Occupational Health for all Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace*. Geneva, 1996, 292p.