

## **Investigações enzimológicas e proteômicas de *Penicillium cerradense* no consumo de petróleo e óleo diesel para biorremediação**

Gonçalves, MJ<sup>1</sup>; Paranhos, CJ<sup>1</sup>, Souto, AL<sup>1</sup>; Casimiro, AC<sup>1</sup>; Silva, LC<sup>1</sup>; Ferreira Filho<sup>2</sup>, EX; Vale, LH<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

O petróleo bruto é um material altamente poluente. Sua extração, transporte e refino frequentemente resultam em incidentes de derramamento que culminam na contaminação da água, do solo e do ar, impactando ecossistemas, seres humanos e comunidades dependentes desses ambientes. Assim, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos de remediação eficientes, economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis. A biorremediação surge como uma alternativa promissora, uma vez que microrganismos são capazes de metabolizar compostos tóxicos, transformando-os em substâncias simples. Dentre esses microrganismos, os fungos destacam-se pela robustez fisiológica e pela produção de enzimas extracelulares envolvidas na degradação de compostos recalcitrantes. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial do fungo *Penicillium cerradense*, isolado de solo do Distrito Federal (DF), para biodegradação de petróleo bruto e óleo diesel S10, além de estabelecer e otimizar protocolos experimentais para análise de seu secretoma e proteoma. Suspensão de esporos em solução salina ( $10^7$  esporos/mL) foram utilizadas para inóculo em meio mínimo mineral (sem adição de carbono) suplementado com 1% (v/v) de petróleo ou óleo diesel, por períodos de 7, 14 e 45 dias. O micélio foi separado por filtração e centrifugação, obtendo-se o extrato bruto (EB), armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análises subsequentes. Foram conduzidas etapas de padronização e aprimoramento metodológico para a recuperação e análise das proteínas extracelulares. Diferentes estratégias foram testadas, incluindo precipitações (acetona, TCA/Acetona e metanol/clorofórmio), diálise em diferentes membranas, concentração por liofilização, solubilização em diferentes tampões (SDS 4%, ureia, SDS + DTT) e utilizando diferentes métodos (banho ultrassônico, banho-maria, termoagitação), evidenciando desafios relacionados à baixa concentração proteica, formação de agregados e dificuldade de solubilização. A partir dessas observações, novas abordagens estão sendo implementadas. Glicose foi adicionado ao meio de cultura (20 g/L), atuando como um co-substrato. A presença de glicose favoreceu o metabolismo fúngico, estimulando o crescimento micelial, resultando em aumento do consumo de sais minerais, maior degradação e solubilização dos compostos derivados do petróleo. Como resultado, foi possível eliminar etapas de purificação *downstream*,

como a diálise e a super-concentração, uma vez que o EB obtido apresentou maior pureza e rendimento proteico. Nessa nova condição, a precipitação com acetona e solubilização com SDS 2% mostrou-se eficiente e reprodutível, dispensando a necessidade de testes adicionais com outros agentes precipitantes. Atualmente, o fungo vem sendo cultivado sob essas condições otimizadas, e as amostras obtidas serão submetidas às etapas subsequentes. Apesar das condições adversas, o fungo apresentou crescimento nos meios contendo exclusivamente hidrocarbonetos, demonstrando potencial como microrganismo biorremediador. As análises futuras permitirão compreender em maior profundidade a maquinaria metabólica e o arsenal enzimático envolvidos, contribuindo para o desenvolvimento de sistemas biotecnológicos de remediação e para a valorização científica e industrial de *P. cerradense*. O potencial biorremediador será avaliado por ensaios com o corante DCPIP e pelas atividades enzimáticas de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. As enzimas de interesse presentes no EB serão purificadas, caracterizadas e imobilizadas, e as proteínas avaliadas por eletroforeses nativa e desnaturante, seguidas de identificação por espectrometria de massas Nano-HPLC acoplado ao LTQ-Orbitrap Elite.

Palavras-chave: Fungo; Hidrocarbonetos; Enzimas; Proteínas; Imobilização.

## Referências

ARAÚJO, Maria E.; RAMALHO, Cristiano WN; de MELO, PW. Pescadores artesanais, consumidores e meio ambiente: consequências imediatas do vazamento de petróleo no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Cad. Saúde Pública. n. 36, v. 1. 2020.

AZUBUIKE, Christopher C; CHIKERE, Chioma B; OKPOKWASILI, Gideon C. Bioremediation techniques- classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World J Microbiology Biotechnology. v. 32, n. 180. 2016.

KUMAR, Adarsh; TRIPTI; PRASAD, Majeti; MAITI, Subodh; FAVAS, Paulo. Mycoremediation for mine site rehabilitation. Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation. P. 233-260. 2018.

MALLAH, Manthar; CHANGXING, Li; MALLAH, Mukhtiar; NOREEN, Sobia; LIU, Yang; SAEED, Muhammad et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: an overview. Chemosphere. v. 296. 2022.

OSSAI, Innocent C., AHMED, Aziz.; HASSAN, Auwalu.; HAMID, Fauziah.; Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. Environmental Technology & Innovation. v. 17. 2020.