

## IV-010 – DEGRADAÇÃO DE BISFENOL - A POR AÇÃO DE LACASE FÚNGICA

**Valéria de Lima Jardim<sup>(1)</sup>**

Bióloga, mestre em Engenharia do Meio Ambiente pela Universidade Federal de Goiás. Doutoranda em Engenharia Civil – Saneamento e Ambiente pela Universidade Estadual de Campinas – SP – FEC/UNICAMP.

**Adilson Sartoratto**

Doutor em Química pela Universidade Estadual de Campinas – SP – IQ/UNICAMP. Químico do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP.

**Alexandre Nunes Ponezi**

Doutor em Engenharia Civil – Saneamento e Ambiente pela Universidade Estadual de Campinas – SP – FEC/UNICAMP. Pesquisador do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Alexandre Cazelatto, 999 – Vila Betel 13081-970 – Paulínia – SP, Brasil. Telefones: +55 (19) 2139-2850 e + 55 (19) 98108-9152. E-mail: valjardim,jardim@gmail.com

### RESUMO

A contaminação das águas naturais pelos Interferentes Endócrinos é uma crescente preocupação da comunidade científica devido à capacidade desses poluentes provocarem interferências no sistema endócrino de seres vivos. Dentre os principais Interferentes Endócrinos (IE), o Bisfenol - A é largamente utilizado em processos industriais potencialmente poluidores. Os fungos, conhecidos como microrganismos degradadores, se destacam por produzir enzimas capazes de oxidar compostos químicos tóxicos. O estudo tem por objetivo selecionar fungos produtores de enzimas que promovam a degradação do Bisfenol - A. Os experimentos foram divididos em duas etapas: seleção dos microrganismos e tratamento do Interferente Endócrino. Na primeira etapa foram avaliados aspectos pertinentes a adaptação dos fungos em relação à toxicidade oferecida pela substância-teste. Dentre os microrganismos testados, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* se mostraram aptos à segunda etapa, que consistiu em submetê-los ao cultivo em meio líquido acrescido de Bisfenol - A em concentração definida. As concentrações alcançadas após o tratamento foram mensuradas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os resultados mostraram que os fungos selecionados possuem capacidade de degradar totalmente o Bisfenol - A nas condições testadas por meio da ação oxidativa da enzima Lacase.

**PALAVRAS-CHAVE:** Interferentes Endócrinos, Degradação de Micropoluentes, Enzimas, Atividade Estrogênica.

### INTRODUÇÃO

Os compostos químicos tóxicos utilizados nos diversos setores de atividade antropogênica tem como destino, em caráter residual, o meio ambiente. São considerados Interferentes Endócrinos os agentes exógenos capazes de interferir por meio da secreção, síntese, transporte, ligação, ação ou eliminação nos hormônios naturais de um organismo, sendo tais hormônios responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e comportamento dos seres vivos. A preocupação com os Interferentes Endócrinos se fundamenta na elevada e crescente utilização desses compostos (EPA, 1997).

Substâncias com atividade estrogênica têm sido consideradas como possíveis responsáveis por disfunções endócrinas descritas em animais e seres humanos, como: diminuição de número de espermatozoides, aumento da incidência de câncer e de mal formações congênitas no sistema reprodutor masculino (HESS, 2010).

Dentre eles, o Bisfenol - A é considerado como a substância química de maior produção ao redor do mundo: 2,7 milhões de toneladas em 2003 (VOM SAAL & WELSHONS, 2006). Essa grande produção está diretamente relacionada com a exposição dos seres humanos, pois estudos mostraram que a presença de Bisfenol - A em humanos é muito frequente: cerca de 92% do universo amostral (formado por população

americana de diversos grupos sócio-econômicos) apresentou o IE, ainda que em concentrações consideradas baixas (CALAFAT et al., 2008).

As Estações de Tratamento de Água e Esgoto são, para muitos resíduos químicos, pouco eficiente na remoção ou transformação desses compostos tóxicos, sendo esse um problema ambiental de grandes proporções (EPA, 2009). Desta forma, outros processos de tratamento de resíduos em águas têm sido considerados.

Os fungos de decomposição branca são conhecidos pela sua capacidade de degradar compostos lignocelulósicos na natureza, principalmente a madeira. As enzimas fúngicas produzidas extracelularmente podem ser consideradas vantajosas do ponto de vista da manipulação e utilização. Dentre as enzimas fúngicas, a Lacase se destaca por apresentar um largo espectro de substratos, ou seja, possui capacidade oxidativa mais ampla, o que ambientalmente se reflete em uma vantagem (BALDRIAN, 2006).

O uso da biotecnologia enzimática de fungos para reduzir ou tratar os Desreguladores Endócrinos é vista como uma alternativa sustentável, onde a aplicação em escala real deve ser acompanhada de vários estudos que possam responder questões como: (1) a condição ótima de fermentação e metabolismo para tais microrganismos, (2) a propriedade e formulação das enzimas envolvidas, (3) o custo de produção, imobilização e purificação dessas enzimas e (4) o destino ambiental final em longo prazo dos resíduos produzidos (CABANA, JONES e AGATHOS, 2007).

Este estudo tem como objetivo alcançar a degradação do Interferente Endócrino Bisfenol – A, presente em águas naturais, por ação da enzima oxidativa Lacase.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Visando atender o objetivo proposto, a execução desse trabalho foi dividida em duas etapas distintas, sendo: (1) seleção de microrganismos aptos à degradação e (2) tratamento do Bisfenol – A.

As cepas fúngicas são parte integrante do banco de microrganismos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP e seu cultivo realiza-se em placa de *Petri* com meio de cultura *Sabouraud*, mantido a 4°C no escuro após crescimento total a 30°C em estufa.

Os microrganismos utilizados são conhecidos como fungos de decomposição branca pela sua capacidade de degradar substâncias lignocelulíticas. Os fungos do estudo foram: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus* sp., *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Trametes* sp., *Lentinus edodes*, *Lentinus edodes* (Ywri), *Phanerochaete cryosporium* e *Pycnoporus sanguineus*.

## PRIMEIRA ETAPA: SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

Os ensaios da primeira etapa foram feitos em duplicata por um período de 30 dias, onde o grupo controle foi caracterizado pela ausência do Interferente Endócrino. Duas condições distintas de cultivo foram estudadas: (1) condição estática, em estufa de cultivo a 28°C e (2) condição de agitação, em agitador orbital (*Shaker*) a 120rpm, 30°C.

Foram utilizados frascos *Erlenmeyers* de 50mL, onde foram introduzidos três inóculos fúngicos padronizados de 7mm juntamente com meio de cultura PDB (Potato Dextrose Broth) previamente autoclavado e solução estéril de Bisfenol - A.

A concentração de Bisfenol – A estipulada para o ensaio foi de 35mg.L<sup>-1</sup>, escolhida conforme dados bibliográficos de pesquisas com degradação desses compostos por enzimas, sendo, portanto, uma quantidade superestimada em relação ao que ocorre no meio ambiente. O uso de elevadas concentrações de Bisfenol - A busca proporcionar subsídios aos microrganismos, considerando o seu potencial máximo de degradação. Os ensaios visam também avaliar a influência das concentrações ao comportamento enzimático e morfofisiológico dos microrganismos. Todo procedimento microbiológico foi realizado em capela de fluxo laminar exclusiva para fungos, precedida de esterilização com luz ultravioleta por 15 minutos.

As análises enzimáticas de Manganês Peroxidase (Kuwahara et al., 1984), Lignina Peroxidase (Tien & Kirk, 1984) e Lacase (Szklarz et al., 1989-modificado) foram realizadas em intervalos de 10 dias, totalizando três análises das enzimas para cada amostra, que foi devidamente filtrada por bomba a vácuo em conjunto *Kitassato* e funil de *Büchner* com filtro de papel. Para a leitura da atividade enzimática foi utilizado espectrofotômetro em comprimento de onda pertinente a cada metodologia analítica.

O crescimento e desenvolvimento micelial foi observado durante todo tempo de cultivo e classificado em S (satisfatório) e I (insatisfatório). Tal classificação se baseou em análise sensorial comparativa com o seu grupo controle e levou em conta fatores como: robustez, coloração, tempo de desenvolvimento, odor e aspecto micelial. A análise morfológica juntamente com a análise enzimática possibilitou considerar o microrganismo em AP (apto) ou IN (Inapto).

## SEGUNDA ETAPA: DEGRADAÇÃO DO BISFENOL – A

Para a segunda etapa, foram utilizados os fungos que tiveram os melhores resultados de produção enzimática e desenvolvimento na presença do Bisfenol - A.

O experimento foi realizado em meio de meio de cultura PDB, em triplicata na condição de cultivo pré-determinadas na primeira etapa. O inóculo para esse ensaio foi produzido a partir do cultivo da cepa em meio de cultura sólido *Sabouraud*, onde foram retirados de três discos da zona de crescimento dos fungos da placa de *Petri* e transferidos para *Erlenmeyer* de 50mL contendo meio de cultura líquido acrescido das concentrações de Bisfenol - A mencionada, ambos estéreis. O grupo controle foi considerado aquele em que o Bisfenol – A não estava presente.

Para verificar a ocorrência de adsorção micelial pelo fungo durante o seu contato com o Interferente Endócrino, foi realizado o teste de Adsorção. Tal teste consiste em adicionar uma concentração conhecida da substância ao fungo robusto (10 dias de crescimento), morto por processo de autoclavagem (121°C por 30 minutos) e manter os frascos na mesma condição do experimento teste. Foram coletadas alíquotas do tempo inicial e final para serem submetidas às análises cromatográficas. O teste de adsorção foi realizado em triplicata.

Os ensaios de tratamento do Interferente Endócrino foram separados em dois grupos distintos: (1) longa duração \_ acima de 60 horas de cultivo e (2) curta duração \_ até 60 horas de cultivo. Essa metodologia foi desenvolvida para proporcionar maior contato entre as enzimas oxidativas e o Bisfenol – A. Testes preliminares apontaram a necessidade dessa adequação, já que cada microrganismo possui características particulares em relação ao seu complexo enzimático.

As análises enzimáticas de Lacase e coletas de alíquotas foram realizadas a cada três dias. As amostras para os ensaios cromatográficas foram filtradas em membranas filtrantes 0,45µm e conservadas congeladas a – 4°C.

As análises cromatográficas foram utilizadas para quantificar a degradação de Bisfenol – A. A técnica cromatográfica empregada foi a denominada CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Na quantificação do Interferente Endócrino foi utilizado o sistema cromatográfico LC-DAD Alliance Waters, composto por bomba Waters 2695, detector de arranjo de diodos (Waters 2996) e coluna C-18 (150mm x 3,9mm x 5µm). A fase móvel utilizada foi composta por solução de água e metanol (50:50), com vazão igual a 0,6mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção foi de aproximadamente 6,5 minutos e a detecção UV ocorreu a 225nm (TANAKA et al., 2000-modificado). Toda a análise ocorre a 30°C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa de experimentos teve como objetivo selecionar os fungos com melhor desempenho da produção enzimática na presença do Bisfenol - A. A seleção de cepas direcionadas à substância-teste tem o intuito de promover maior degradação desses compostos considerando a relação adaptação/toxicidade. Desta forma, os três principais critérios de seleção foram: (1) maior produção enzimática na presença do IE; (2) melhor condição de cultivo, visando a economia de recursos e (3) desenvolvimento e adaptação do microrganismo ao IE.

Dentre os fungos testados, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* foram considerados aptos para a segunda etapa, pois tiveram resultados positivos quanto à produção de enzimas. Dentre as quais, a Lacase (Lcc) se sobressaiu em comparação com as Peroxidases Manganês (MnP) e Lignina (LiP). Desta forma, a Lacase foi considerada como a possível responsável pelo processo de degradação do Bisfenol – A.

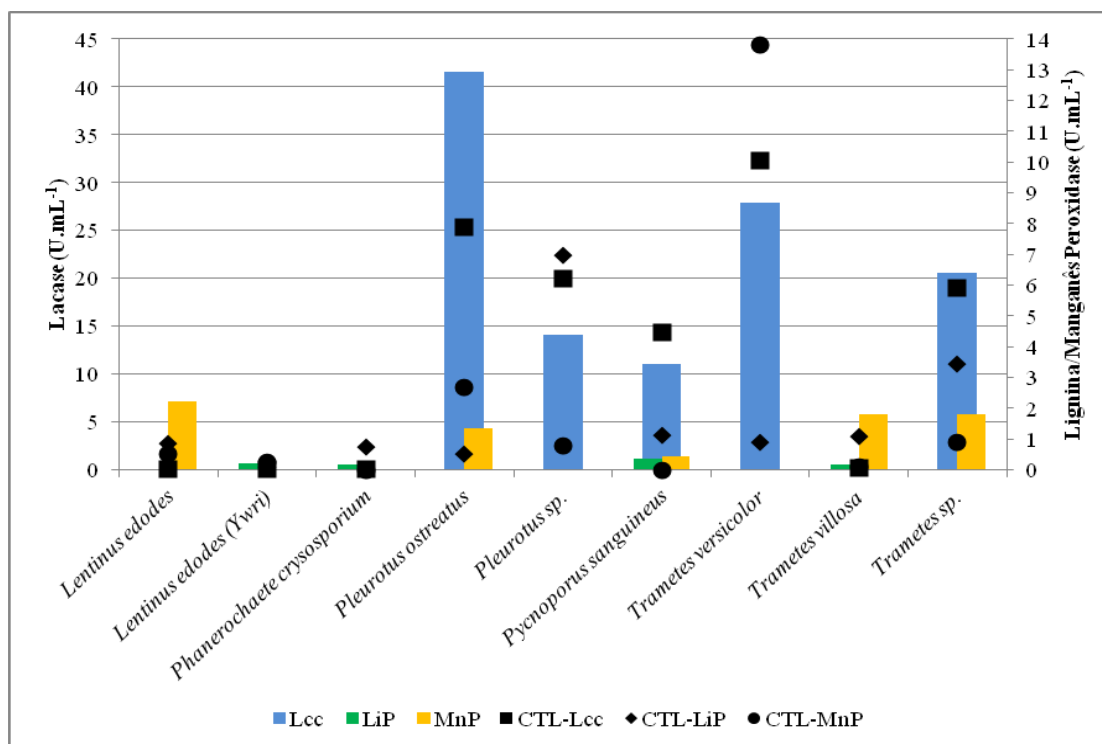
A Tabela 01 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de seleção de microrganismos, no que diz respeito aos picos enzimáticos e crescimento micelial em comparação com o grupo controle.

**Tabela 01: Resultado da seleção dos microrganismos.**

Fungo	Condição de cultivo	IE <sup>1</sup>	Picos Enzimáticos (U.mL <sup>-1</sup> )			Crescimento Micelial	Situação
			Lcc <sup>4</sup>	MnP <sup>5</sup>	LiP <sup>6</sup>		
<i>Lentinus edodes</i>	Agitação	B-A <sup>2</sup>	AE <sup>10</sup>	AE	AE	S <sup>7</sup>	IN <sup>9</sup>
		CTL <sup>3</sup>	AE	3,94	0,84	S	-
	Estático	B-A	0,03	2,24	AE	S	IN
		CTL	0,09	0,53	0,84	S	-
<i>Lentinus edodes</i> (Ywri)	Agitação	B-A	0,19	AE	AE	S	IN
		CTL	9,45	0,10	AE	S	-
	Estático	B-A	0,10	AE	0,23	S	IN
		CTL	0,09	0,26	0,10	S	-
<i>Phanerochaete cryosporium</i>	Agitação	B-A	AE	AE	0,67	S	IN
		CTL	AE	1,12	0,44	S	-
	Estático	B-A	AE	AE	0,17	S	IN
		CTL	0,04	AE	0,73	S	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Agitação	B-A	8,22	AE	1,77	S	AP <sup>8</sup>
		CTL	9,99	1,79	0,32	S	-
	Estático	B-A	41,60	1,34	AE	S	AP
		CTL	25,30	2,69	0,53	S	-
<i>Pleurotus</i> sp.	Agitação	B-A	2,54	1,21	0,84	S	IN
		CTL	3,61	15,65	0,91	S	-
	Estático	B-A	14,10	AE	AE	S	AP
		CTL	20,00	0,76	6,98	S	-
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Agitação	B-A	9,44	AE	0,32	S	AP
		CTL	10,34	0,17	1,11	S	-
	Estático	B-A	11,11	0,44	0,35	S	AP
		CTL	14,37	AE	1,11	S	-
<i>Trametes versicolor</i>	Agitação	B-A	30,07	1,65	0,91	S	AP
		CTL	56,93	6,23	2,49	S	-
	Estático	B-A	27,88	AE	AE	S	AP
		CTL	32,24	13,81	0,91	S	-
<i>Trametes villosa</i>	Agitação	B-A	0,59	0,26	0,69	S	IN
		CTL	2,54	0,67	2,50	S	-
	Estático	B-A	0,03	1,79	0,17	S	IN
		CTL	0,144	0,09	1,07	S	-
<i>Trametes</i> sp.	Agitação	B-A	7,81	1,52	6,84	S	AP
		CTL	20,42	7,80	0,91	S	-
	Estático	B-A	20,62	1,79	AE	S	AP
		CTL	18,94	0,89	3,45	S	-

<sup>1</sup>Interferente Endócrino; <sup>2</sup>Bisfenol – A; <sup>3</sup>Grupo Controle; <sup>4</sup>Lacase; <sup>5</sup>Manganês Peroxidase; <sup>6</sup>Lignina Peroxidase; <sup>7</sup>Satisfatório; <sup>8</sup>Apto; <sup>9</sup>Inapto; <sup>10</sup>Ausência da enzima.

Por meio dessa etapa, também foi possível constatar que a condição estática se mostrou mais vantajosa em relação à condição de agitação, pois apresentou produção enzimática satisfatória e utiliza de menos recursos energéticos. A produção enzimática da Lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus* na presença de Bisfenol – A foi 68% maior que seu grupo controle, sugerindo que a substância pode ter exercido papel de indutor do complexo enzimático (Figura 01).



**Figura 01:** Gráfico da produção de enzimas na presença de Bisfenol – A na condição estática, sendo Lcc: Lacase; LiP: Lignina Peroxidase; MnP: Manganes Peroxidase; CTL: grupo controle.

Em relação ao crescimento e desenvolvimento micelial, não foram observadas diferenças significativas entre o cultivo controle e o cultivo na presença do Interferente Endócrino Bisfenol – A. A substância não causou retardo no crescimento micelial, tampouco coloração anormal ou dano visível ao fungo, conforme mostra as imagens da Figura 02.



**Figura 02:** Crescimento dos fungos na presença de Bisfenol - A (direita) e seu grupo controle (esquerda).

Na segunda etapa, as análises cromatográficas comprovaram a redução do Bisfenol – A em mais de 90% da concentração inicial. A redução da substância-teste foi alcançada pelos dois fungos selecionados em diferentes tempos de cultivo. A Tabela 02 apresenta os resultados cromatográficos alcançados após o tratamento. Observa-se que a produção enzimática máxima teve grande diferença entre os microrganismos, sendo o *T. versicolor* produziu quase quatro vezes mais enzima que *P. ostreatus*. No entanto, *P. ostreatus* alcançou a degradação total em 27 dias, ao passo que o tratamento com *T. versicolor* resultou em concentração residual ao final do processo de 60 horas. O poder oxidativo da lacase é característico de cada microrganismo, resultando em processos distintos de degradação para uma mesma substância.



Tabela 02: Tratamento do Bisfenol – A por Lacase Fúngica.

Fungo	Tempo de Cultivo	Concentração Inicial (mg.l <sup>-1</sup> )	Concentração Final (mg.l <sup>-1</sup> )	Lacase Máxima (U.mL.min <sup>-1</sup> )	Adsorção Micelial (%)
<i>P. ostreatus</i>	27 dias	18,30	0,0	14,074	0
<i>P. ostreatus</i>	18 dias	32,85	0,0	13,95	9
<i>T. versicolor</i>	60 horas	30,96	0,29	52,510	0

Para o *Pleurotus ostreatus* o cultivo na presença de Bisfenol – A foi realizado em 27 dias e em 18 dias, conforme Figuras 03 e 04, respectivamente. A degradação total da substância-teste foi alcançada em 15 dias para o primeiro ensaio e em 18 dias na repetição.

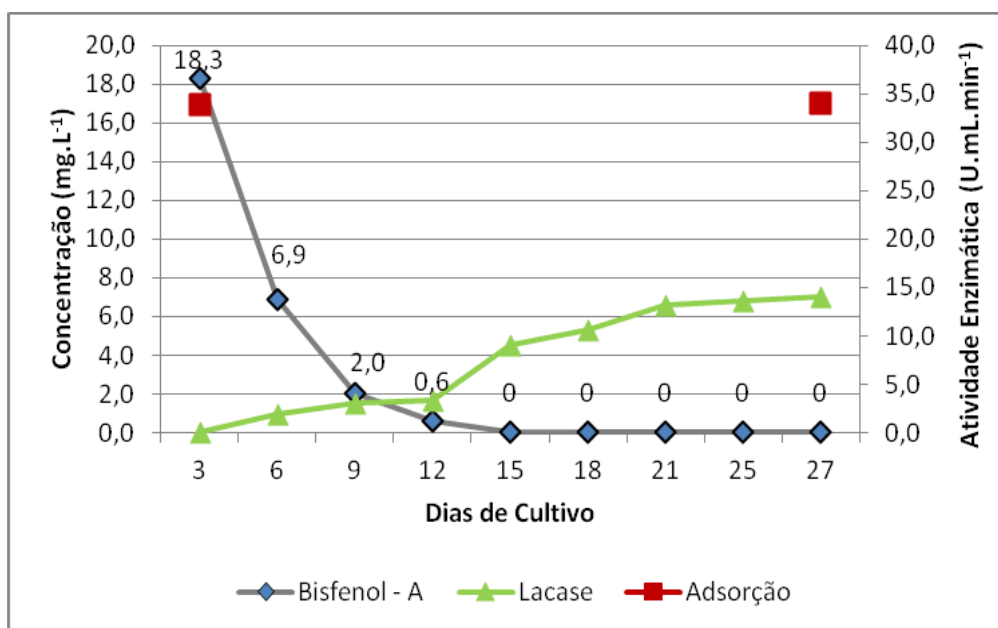


Figura 03: Gráfico da relação entre a degradação do Bisfenol – A e produção de Lacase em 27 dias de tratamento com *Pleurotus ostreatus*.

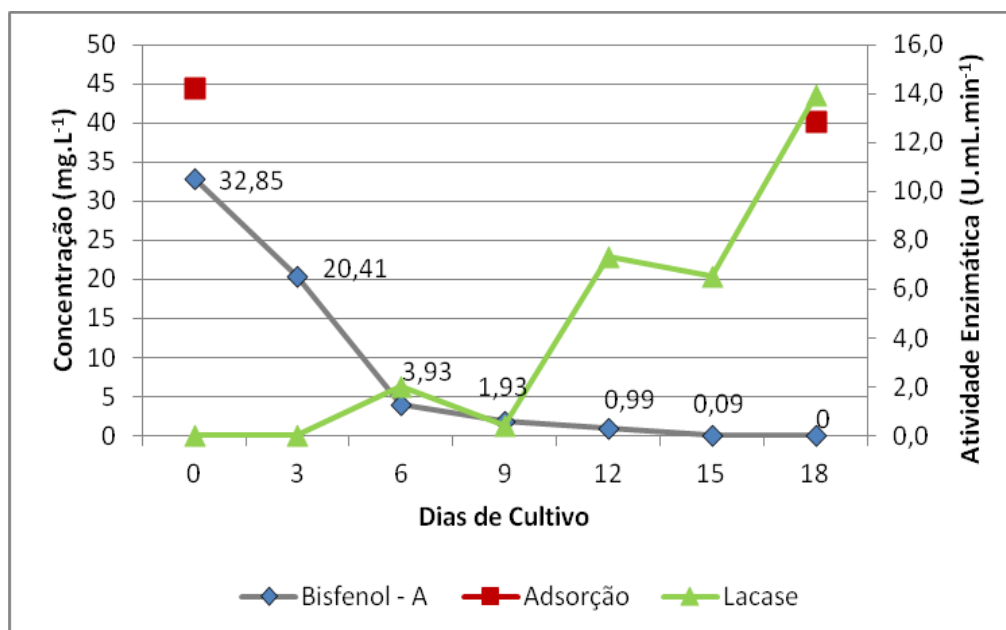


Figura 04: Gráfico da relação entre degradação do Bisfenol – A e produção de Lacase em 18 dias de tratamento com *Pleurotus ostreatus*.

O teste de adsorção evidenciou que pouco se perdeu do Bisfenol – A por ação física entre a substância e o corpo micelial. No ensaio de 18 dias *P. ostreatus* adsorveu cerca 9% da concentração inicial (Figura 04). No entanto não houve adsorção no ensaio de maior duração (Figura 03).

O ensaio com *Trametes versicolor* apresentou resultados ainda mais satisfatórios de degradação do Interferente Endócrino, pois foi alcançado em menos de 24 horas de tratamento. O microrganismo produziu Lacase ainda nas primeiras horas de cultivo na presença do Bisfenol – A, que pode ter funcionado como indutor de seu complexo enzimático. A Figura 05 mostra o desempenho enzimático ao longo das 56 horas de cultivo e a redução das concentrações de Bisfenol – A. O ensaio de adsorção não evidenciou perda física pelo micélio fúngico da substância.

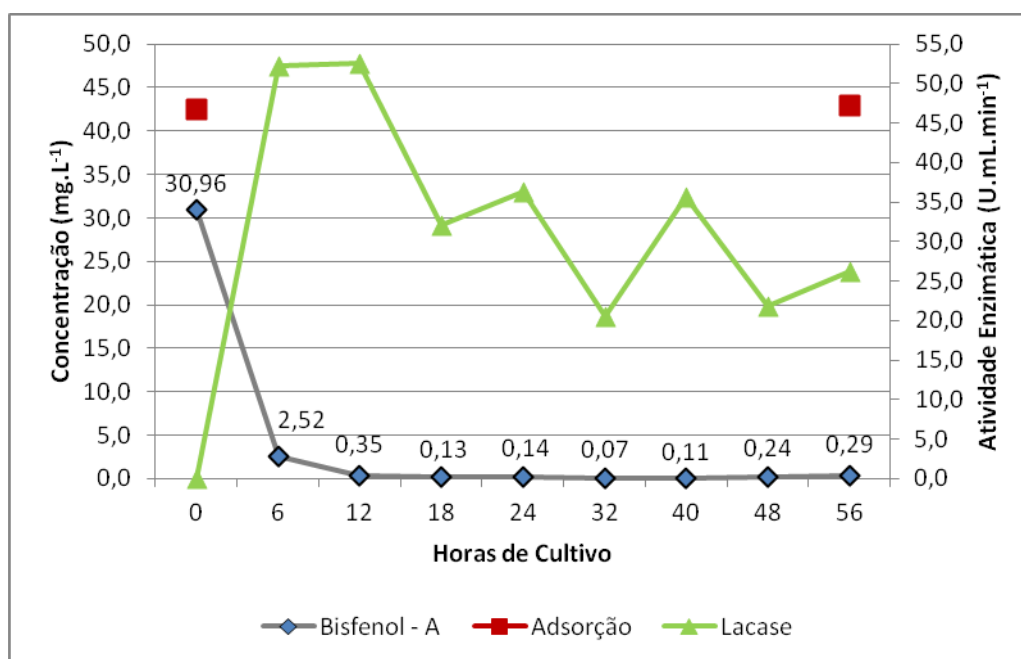


Figura 05: Gráfico da relação entre a degradação de Bisfenol – A e produção de Lacase em 56 horas de cultivos com *Trametes versicolor*.

## CONCLUSÕES

Os experimentos realizados mostraram que os fungos de decomposição branca testados apresentam potencial de degradação do Interferente Endócrino Bisfenol – A. Outras conclusões pontuais foram:

- *Pleurotus ostreatus* foi capaz de degradar totalmente o Bisfenol – A, por meio da ação oxidativa da enzima Lacase;
- O Bisfenol – A pode exercer papel indutor do complexo enzimático para o microrganismo *Pleurotus ostreatus*;
- A Lacase de *Trametes versicolor* não alcançou a degradação total do Interferente Endócrino, apesar de se apresentar em altas concentrações;
- Não houve alteração morfológica e sensorial significativa do micélio na presença do Bisfenol – A.

O tratamento com recursos enzimáticos pode ser uma solução para vários compostos tóxicos recalcitrantes e substâncias com potencial estrogênico. Desta forma, o uso de Lacase na redução de Bisfenol – A das águas naturais pode ser uma ferramenta biotecnológica eficiente e sustentável. Fazem-se necessários estudos aprofundados para aumentar a viabilidade e aplicabilidade dessa ferramenta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALDRIAN, P. **Fungal Laccases – Occurrence and Properties**. FEMS Microbiol. Rev. Vol. 30, 215-242. 2006.
2. CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. **Elimination of Endocrine Disruption Chemicals using White Rot Fungi and their Lignin Modifying Enzymes: A Review**. Eng. Life Sci. 7, nº5, 429 – 456. 2007.
3. CALAFAT, A.; YE, X.; WONG, L-Y; REIDY, J. A.; NEEDHAM, L. **Exposure of the U. S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003-2004**. Environmental Health Perspectives. Vol. 116, nº1. January – 2008.
4. EPA – Environmental Protect Agency. **816-F-09-0004, May 2009**. Acessado em 01 janeiro de 2011. Disponível em: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#Disinfectants>
5. EPA – U. S. **Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis**. Report Nº EPA/630/R-96/012, Washington D. C, 1997.
6. HESS, S. C. **INTERFERENTES HORMONAIS NO AMBIENTE: UM RISCO À SAÚDE PÚBLICA**. Engenharia Ambiental – Espírito Santo do Pinhal, v. 7, n. 3, p. 311-329, jul ./set . 2010.
7. KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A., GOLD, M. H. **Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Lett. 169, 247-250. 1984.
8. SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. **Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi**. Mycology, vol. 81, pp. 234-240. 1989.
9. TANAKA, T.; YAMADA, K.; TONOSAKI, T.; KONISHI, T.; GOTO, H.; TANIGUCHI, M. **Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester**. Water Science and Technology. Vol. 42 NOS 7 – 8pp 89-95. 2000.
10. TIEN, M. & KIRK, K. **Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – requiring oxygenase**. PNAS Microbiology, Vol. 81, N.º 08, 2280-2284. 1984.
11. VOM SAAL, F. S.; WELSHONS, W. V. **Large effects from small exposures. Part 2. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A**. Environ. Res., v. 100, p. 50-76, 2006.