

IV-189 - REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ATRAZINA EM MEIO LÍQUIDO UTILIZANDO ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUZIDAS PELO FUNGO *PLEUROTUS OSTREATUS*

Keyle Borges e Silva Monteiro⁽¹⁾

Graduação em Farmácia-Bioquímica/(UFG)/1995, Especialização: Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos e Correlatos _UFG/2003 e em Auditoria, Perícia e Gestão Ambiental – IPOG/2008. Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente - PPGEMA – UFG/2013. Responsável técnica pelo laboratório Central de Análise de Água da Empresa SANEAGO.

Aline Vieira Peixoto⁽²⁾

Graduação em Farmácia-Bioquímica. Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente - PPGEMA – UFG/2013. Responsável técnica pelo laboratório Bacteriológico do Central de Análise de Água da Empresa SANEAGO

Mariângela Fontes Santiago⁽³⁾

Doutora em Química pela Universidade Estadual de Campinas (11/1999) e mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (2/1993). Atualmente é professor associado III da Universidade Federal de Goiás. Membro permanente do programa de pós-graduação da Engenharia do Meio Ambiente (UFG). End.: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Tecnologia Farmacêutica

Maura Francisca da Silva⁽⁴⁾

Graduação em Biologia pela Universidade Federal de Goiás, Especialização em Saúde Pública pela Universidade de Ribeirão Preto, Brasil(1991). Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente - PPGEMA – UFG/2013 e Bióloga do Saneamento de Goiás S/A

Patrícia Pereira Ribeiro Keller⁽⁵⁾

Graduação em Farmácia-Bioquímica. Mestranda em Engenharia do Meio Ambiente - PPGEMA – UFG/2013. Bioquímica com atuação no Controle de Qualidade do Produto da Empresa SANEAGO.

Endereço⁽¹⁾: Av Vereador José Monteiro nº 1953 Setor Negrão de Lima Goiânia-Goiás. CEP 74.650.300. Tel (62) 3269 98 20 . keyle@saneago.com.br.

RESUMO

Diante da deterioração dos recursos hídricos e da crescente necessidade de atender aos padrões de qualidade da água, são necessárias alternativas para a remoção de micropoluentes de ambientes aquáticos. Dentre os micropoluentes, destaca-se a atrazina (ATZ), herbicida da classe dos triazínicos, classificado como medianamente tóxico para o ser humano e altamente tóxico para organismos aquáticos, além de ser um potente disruptor endócrino e possível agente carcinogênico. Processos biotecnológicos têm sido utilizados para minimizar os efeitos tóxicos dos poluentes para o ser humano e meio ambiente, cuja finalidade é interação entre os micro-organismos e os produtos produzidos por eles, como enzimas. O presente estudo descreve de forma experimental, a remoção da ATZ na concentração de 100 mg.L⁻¹ em meio líquido contendo caldo de batata e dextrose 40%, utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*, com vistas a futuras aplicações em tratamento de águas residuárias ou de abastecimento. O índice de remoção da atrazina foi de 87,5%. A redução da concentração da atrazina foi obtida pela atividade enzimática, com destaque para a lacase e manganês peroxidase, e pelo mecanismo de adsorção na biomassa dos micro-organismos. A concentração da atrazina foi determinada por meio do cromatógrafo gasoso com detector de massa. Os resultados dos estudos com a espécie *Pleurotus ostreatus*, sob duas condições (agitação e estática), apresentaram grande potencial para serem utilizados na biorremediação de meios líquidos contaminados com atrazina.

PALAVRAS-CHAVE: Biorremediação, atrazina, enzimas ligninolíticas, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUÇÃO

Devido aos crescimentos demográfico e socioeconômico ocorridos nas últimas décadas, os índices de poluição dos recursos hídricos têm aumentado, ocasionando perda da qualidade da água no que tange aos parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos (MINILLO et al., 2009; PEREIRA; FREITAS, 2012).

Os principais poluentes encontrados nos corpos hídricos são provenientes de ações antrópicas na agricultura, indústria e pecuária, os quais podem restringir o uso múltiplo, principalmente como matéria-prima na

produção de água para consumo humano, manutenção da vida aquática, dessedentação de animais e lazer (PHILIPPI JR, 2005).

Entre as atividades responsáveis pela poluição destacam-se as práticas agrícolas, pela aplicação intensiva de agrotóxicos e fertilizantes (PALMA et al., 2009). Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos, informam que nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos aumentou 93% e o mercado brasileiro em 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que, dos produtos comercializados, cerca de 45% são herbicidas (ANVISA; UFPr, 2012).

Inúmeros estudos têm identificado problemas de poluição dos corpos hídricos decorrentes a lixiviação dos herbicidas, entre eles a atrazina, frequentemente detectada como principal poluente orgânico das águas superficiais, subterrâneas e de abastecimento público de diversos países (OLIVEIRA; KOSKINEN; FERREIRA, 2000; CORREIA; LANGENBACH, 2006; ROCHA, 2011).

A atrazina faz parte da família das triazinas, amplamente utilizada há mais de 45 anos em vários países, como Argentina, Estados Unidos e Brasil para controle de plantas daninhas em lavouras de milho, sorgo e cana-de-açúcar. A escolha para sua utilização se dá a sua efetividade, ação prolongada, amplo espectro de ação e baixo custo (LIMA et al., 2012). Este herbicida é altamente tóxico para organismos aquáticos, atua como um potente disruptor endócrino e possível agente carcinogênico (HAYES et al., 2010), por isso é exigência legal do Ministério da Saúde e do Meio Ambiente o monitoramento da quantidade de atrazina na água bruta e tratada, por meio da Portaria nº 2914/MS (12/12/ 2011) e pelas Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA nº 357 (17/03/e 2005) e CONAMA nº 396(03/04/2008).

Segundo Tundisi e Tundisi (2006), há uma necessidade de reversão do quadro atual de poluição dos corpos de água para níveis compatíveis com a sustentabilidade, em curto, médio e longo prazos, e esta ação deve ser urgente, tanto para os grandes centros urbanos como para o meio rural, tendo em vista o uso intensivo e desordenado de insumos químicos na agricultura e a expansão urbana e industrial.

A busca de soluções para remoção dos micropoluentes é um desafio atual e para futuras gerações, uma vez que os tratamentos convencionais utilizados para obter água dentro dos padrões de potabilidade nem sempre são eficientes na remoção de compostos orgânicos (BATALHA, 2009). Muitas vezes é necessário o uso de tratamentos avançados do ponto de vista tecnológico, aplicação de novos produtos químicos ou novas dosagens para obter resultados satisfatórios, tornando o processo produtivo oneroso e impraticável. Nesse contexto, é necessário encontrar alternativas simples, ecologicamente mais adequadas e eficazes para o tratamento de águas contaminadas com moléculas orgânicas de difícil degradação (PEREIRA; FREITAS, 2012).

A utilização de fungos para fins biotecnológicos oferece bons resultados, por serem decompositores por excelência e serem considerados principais micro-organismos degradadores da matéria orgânica na natureza (GUIMARÃES, 2009; JARDIM, 2010). Dentre os fungos, os basidiomicetos, principalmente os fungos de decomposição branca, tem-se tornado um grupo interessante para utilização em biorremediação de compostos recalcitrantes em função da capacidade de produzir quantidades significativas de enzimas ligninolíticas, responsáveis na degradação da lignina, bem como na biorremediação de xenobióticos (GIMENES, 2011). O objetivo deste trabalho foi o estudo da remoção da atrazina (ATZ) do meio líquido, utilizando as enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, avaliando a eficiência na redução da concentração do herbicida, com vistas a futuras aplicações em tratamento de águas residuárias ou de abastecimento.

METODOLOGIA UTILIZADA

Cultivo e manutenção do *Pleurotus ostreatus*

O cultivo e a manutenção do fungo foi realizado em placas de petri contendo meio de cultura sólido (Agar, Batata e Dextrose- BDA), incubadas em estufa microbiológica a 28°C \pm 2°C, por 8 dias.

Experimentos em meio de cultura líquido em condição estática e sob agitação

Foram retirados sete discos da cultura de *Pleurotus ostreatus*, cultivados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio de cultura sólido (BDA) e transferidos para os Erlenmeyers de 250 mL, contendo 200 mL do meio de cultura líquido BD (dextrose e batata a 40%, sendo 20 g de dextrose e 1,6 g de caldo de batata. L^{-1}), com adição da atrazina na concentração de 100 mg.L^{-1} (ATZ 100). Os experimentos foram realizados em condição estática e com agitação. Os ensaios foram feitos em duplicata por um período de 21 dias, mantidos a temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em estufa bacteriológica (condição estática) e em misturador automático em rotação de 120 rpm (sob agitação).

Para cada experimento foram utilizados dois grupos de controle: um grupo denominado Controle do Experimento (CE), sem a presença da atrazina, contendo apenas o meio de cultura e o fungo, que serviu para o monitorar a atividade enzimática. O outro grupo foi nomeado de Controle de Toxicidade (CT), contendo o meio de cultura e o herbicida, mantido nas mesmas condições apresentadas, mas sem receber o fungo, este grupo serviu para monitorar a concentração da atrazina durante os ensaios.

Quantificação das enzimas ligninolíticas

Foi quantificado as seguintes enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignino peroxidase) por meio da metodologia espectrofotométrica, utilizando o espectrofotômetro UV/VIS, marca HACH modelo DR 5000. A atividade da Lacase (Lcc) foi determinada de acordo com Szklarz et al. (1989) modificado. O método utilizado para determinação da enzima Manganês Peroxidase (MnP) foi de Kuwahara et al. (1984). A determinação da atividade da Lignina Peroxidase (LiP) foi feita segundo Tien e Kirk (1984). As atividades das enzimas foram determinadas, a partir do cálculo da média das leituras de absorbância, conforme descrito por Menezes (2009). Os resultados foram expressos em U.L.min^{-1} ($\mu\text{moles produto/min.L}$). Os cálculos foram realizados a partir da Equação 1. As análises foram realizadas em triplicata, utilizando o sobrenadante do meio de cultura, obtido por centrifugação, com força centrífuga relativa de 257,5 g por 20 minutos.

$$\text{U/L} = \Delta E \times 10^6 / \epsilon \times R \times \Delta t \quad \text{equação(1)}$$

Em que:

ΔE = Absorbância no comprimento de onda específico;

ϵ = Coeficiente de extinção molar para cada enzima;

R = Quantidade de caldo enzimático em mL;

Δt = Tempo de reação em minutos.

Determinação da concentração da atrazina

Foi empregada a técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizando-se cartuchos C18 em tubo de polietileno com capacidade para 3 mL. No processo de extração foi utilizado 1 mL da amostra retirada do experimento no meio líquido, acidificada com ácido clorídrico 1:1 para pH final $\leq 2,0$ e transferida para o cartucho de extração. Logo após este processo, os cartuchos foram eluídos com 3 mL de acetato de etila e 3 mL de diclorometano, passando pelo suporte contendo sulfato de sódio PA, com o objetivo de retirar umidade e impurezas presentes na amostra e posteriormente a amostra foi concentrada utilizando o equipamento marca TECNAL com auxílio do gás nitrogênio analítico.

Para determinação da concentração da atrazina foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS) marca Varian, modelo Saturn 2100 T, com amostrador automático tipo combi-PAL, com limite de detecção $0,20\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ e limite de quantificação $0,62\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$. Coluna CPSil8CB-MS.

Teste de adsorção

Foram transferidos 7 discos para o meio de cultura líquido e incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 14 dias e em seguida a este período esterilizados a 121°C por 20 minutos. Foi adicionada atrazina na concentração de 100 mg.L^{-1} e retirados 5 mL de amostra para avaliar a concentração da ATZ no dia da adição, tempo inicial (T_0). Os frascos foram incubados por 21 dias e ao final deste período foram retirados 5 mL da amostra para análise da concentração final da atrazina. Os resultados do teste de adsorção foram expressos em porcentagem de redução, pela diferença da média da concentração inicial da atrazina pela média da concentração final.

RESULTADOS OBTIDOS

A Figura 01 mostra o perfil da produtividade das enzimas no grupo-controle e no grupo experimental, nas duas condições avaliadas (estático e com agitação), onde pode ser observado o predomínio da enzima lacase durante todo o período de estudo, sendo mais relevantes no grupo-controle. Na condição estática os maiores picos foram observados no 15º dia, sendo 10,04 U.mL⁻¹ no grupo-controle e 7,32 U.mL⁻¹ no grupo contendo o herbicida, já na condição sob agitação é possível observar o pico da lacase no grupo-controle no 6º dia 10,6 U.mL⁻¹, nos demais dias avaliados percebe-se uma redução gradativa da produção desta enzima até o 15º dia e no final do experimento nota-se uma tendência do aumento da produção. Os maiores picos da lacase no grupo com ATZ 100 sob agitação foram observados nos seis primeiros dias de cultivo, 8,0 U.mL⁻¹ e 8,2 U.mL⁻¹ e a partir no 9º dia praticamente não foi detectada a presença desta enzima. A enzima lignina peroxidase apresentou valores muito pequenos, considerado inexistente, com resultados abaixo de 0,55 U.mL⁻¹, tanto no grupo-controle como grupo contendo atrazina

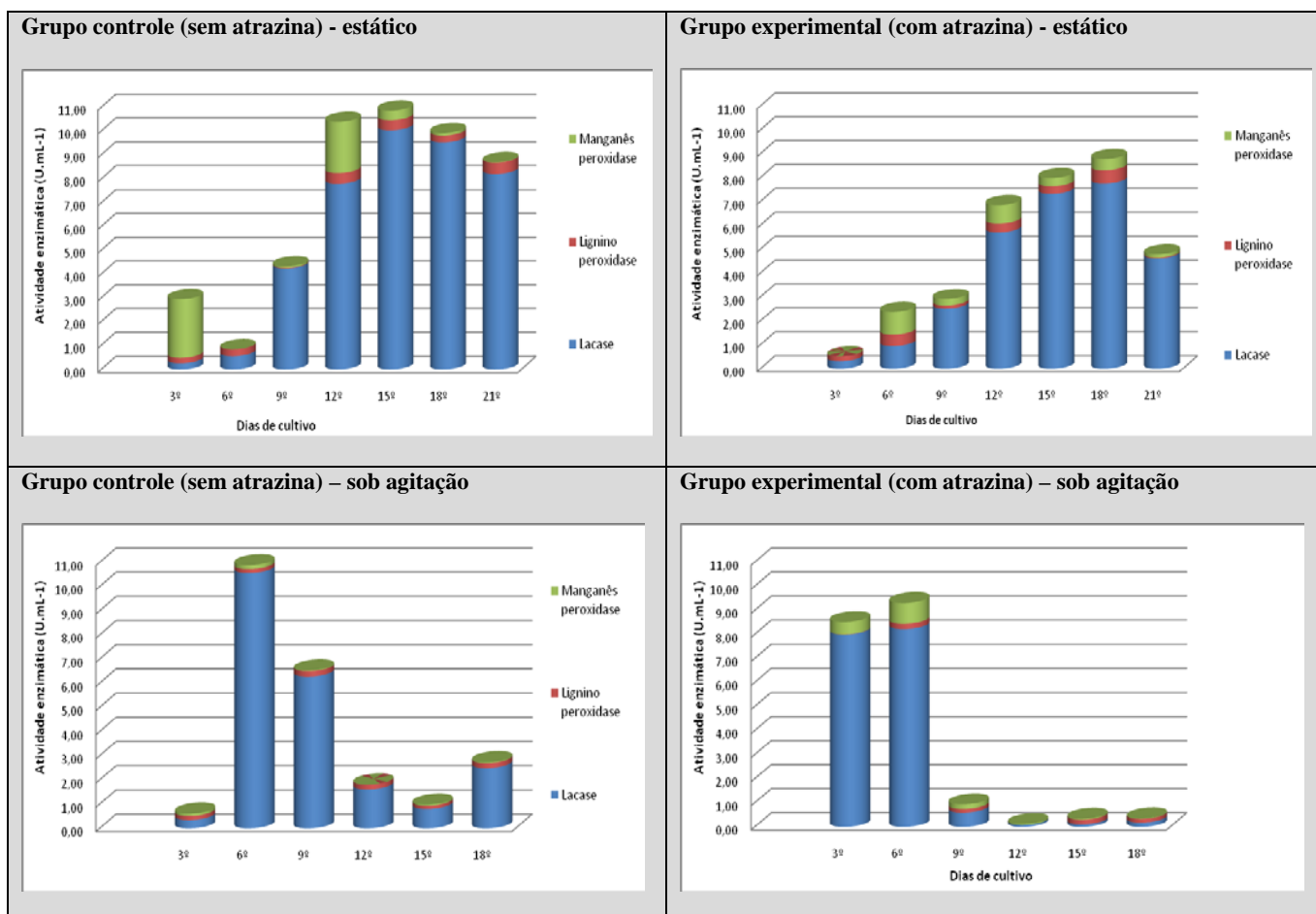


Figura 01 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% em condição estática e sob agitação dos grupos de controle e dos grupos contendo ATZ 100

A média da concentração da atrazina do grupo CT, no meio de cultivo BD 40% foi 110,4 mg.L⁻¹, na condição estática e 107,4 mg.L⁻¹ sob agitação. Estes valores foram utilizados como referência para comparação dos demais valores encontrados durante o período de cultivo. Houve diminuição da concentração da atrazina de forma gradativa durante o período do experimento. A média do valor encontrado no final do experimento foi de 12,9 mg.L⁻¹ que correspondente a 87,5% de redução na condição estática e 15,6 mg.L⁻¹ sob agitação tendo uma redução 84,8%, conforme Figura 02 e cromatogramas das Figuras 03 e 04.

A concentração inicial da ATZ no início de teste de adsorção na condição estática foi 109,0 mg.L⁻¹ e no final 81,0 mg.L⁻¹, ocorreu uma diminuição de 25,7% e sob agitação houve uma redução de 49%, logo pode-se inferir que o principal mecanismo envolvido na redução da quantidade atrazina, nestas condições, foi o

enzimático, principalmente pela atividade da lacase que esteve presente em maior quantidade durante os experimentos.

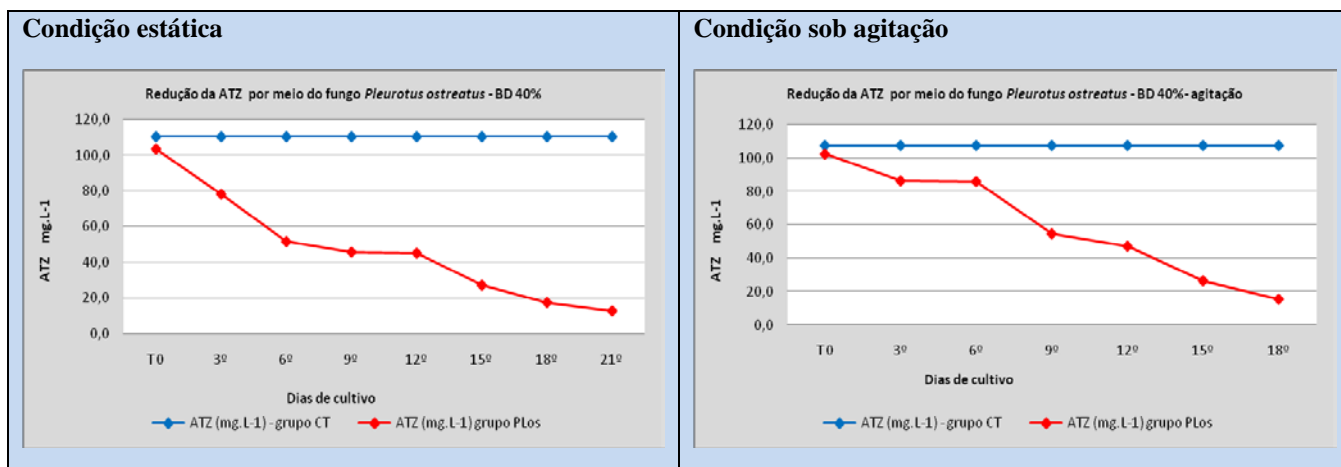


Figura 02 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% na condição estática e sob agitação.

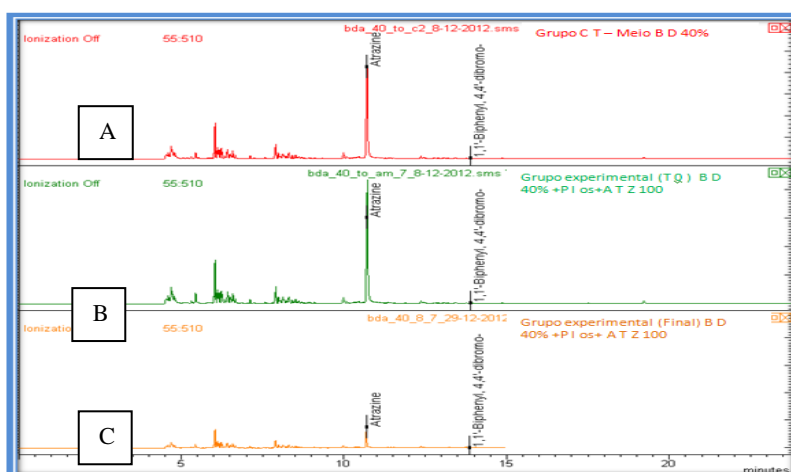


Figura 031- Cromatograma da atrazina no tempo (T0) do grupo CTe grupo experimental e no final do período de incubação no meio BD 40% em condição estática com o fungo *Pleurotus ostreatus*.

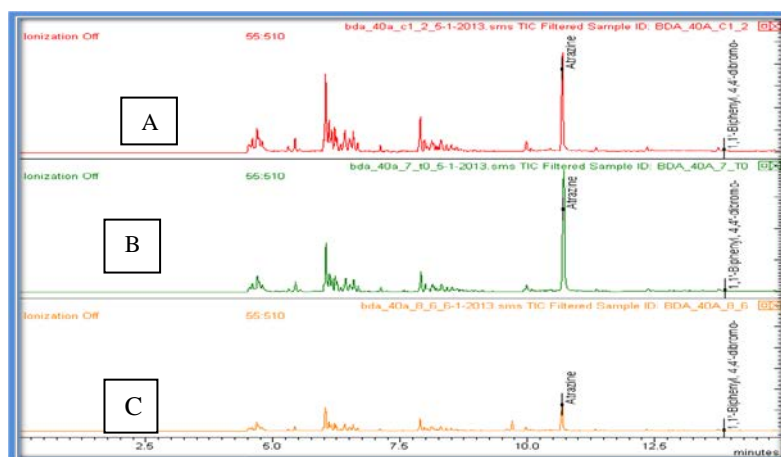


Figura 04- Cromatograma da atrazina no tempo (T0) do grupo CTe grupo experimental e no final do período de incubação no meio BD 40% sob agitação com o fungo *Pleurotus ostreatus*.
Legenda: A (Grupo controle de toxicidade no tempo T0); B (Meio de cultura+PLOS+ATZ no tempo T0); C (Meio de cultura+PLOS+ATZ após 21 dias de cultivo)

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O fungo *Pleurotus ostreatus* foi capaz de reduzir em 84,8 a 87,5% a concentração de atrazina em meio líquido, pela atividade enzimática e pelo mecanismo de adsorção na biomassa. Os melhores índices de remoção da atrazina foram obtidos nos experimentos em condição estática, proporcionando em vantagem econômica por consumir menos energia e ser mais fácil quanto a aplicabilidade.

Os melhores resultados enzimáticos foi pela lacase, enzima predominante nos experimentos e a menor quantidade observada foi a manganês peroxidase, sendo que a lignina peroxidase foi considerado ausente devido a quantidade insignificante detectada.

Os resultados sob agitação podem ter sido menores devido ao crescimento excessivo de biomassa que pode comprometer o transporte de nutrientes acarretando prejuízos à produção de enzimas catabólicas.

Os índices de remoção da atrazina demonstraram que a pesquisa se tornou viável no estudo de degradação de ATZ por meio dos fungos de decomposição branca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade, J.A.; Augusto, F.; Jardim, I.C.S.F. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e seus Derivados. *Eclética Química*, vol. 35, nº3, 2010.
2. Finotti, A.R.; Finkler, R.; Silva, M.D.A.; Cemin, G. Monitoramento de Recursos Hídricos em Áreas Urbanas. Editora EDUCS, p.46, 2009.
3. Galvín, R.M.; Montoya, M.R.; Higuera, M.J.; Pérez, R.; Mellado, J.M.R. Possibility of Reductive Deactivation of S-Triazines and Parent Compounds Waters and Sediments. *Springer Science*, p. 347-364, 2005.
4. González, V.G.; Govantes, F.; Shaw, L.J.; Burns, R.G.; Santero, E. Nitrogen Control of Atrazine Utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *American Society for Microbiology*, setembro 2003.
5. Guimarães, M.S.O. Coleta, Isolamento e Identificação de Fungos Presentes em Sistemas de Tratamento de Efluentes de Indústria Petroquímica para Utilização em Processos de Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.
6. Jardim, V.L. Seleção de Fungos de Decomposição Branca Produtores de Enzimas Oxidativas na Presença de Acefato para Redução da sua Toxicidade. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) – Universidade Federal de Goiás, 2010.
7. Minillo, A.; Isique, W.D.; Prado, H.F.A.; Tangerino, E.P. Biodegradação de Fármacos na Água por Microrganismos Associados em Filtros Biológicos de Carvão. *SABESP Revista DAE* 179, 2009.
8. Oliveira, S.D.; Lemos, J.L.S.; Barros, C.A.; Leite, S.G.F. Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte. *Série Tecnologia Ambiental – STA* 45, CETEM/MCT, 2008.
9. Pereira, A.R.; Freitas, D.A.F. Uso de Microorganismos para Biorremediação de Ambientes Impactados. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, vol. nº6, p. 975-1006, 2012.
10. Rodrigues, K.A. Uso de Reatores Biológicos com Fungos para Remoção de Fenol de Água Residuária Sintética. Tese: Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.
11. Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L.; Linkins, A.E. Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. *Mycologia*, New York, p. 234-240, 1989.
12. Tien, M.; Kirk, T.K. Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase. *Biochemistry* vol. 81, p. 2280-2284, 1994.