

# QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DE ORIGEM FÚNGICA LACASE e MANGANÊS PEROXIDASE, NO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

**SALES**, Paulo de Tarso Ferreira <sup>1</sup>; **SOUSA**, Alessandro Ribeiro de <sup>1</sup>; **WATANABE**, Renata Alberto <sup>2</sup>; **BARBOSA**, Daniele Rocha <sup>2</sup>; **PEREIRA**, Tereza Luiza de Souza; **BÁRBARA**, Vinício Fagundes <sup>1</sup>; **MEIRA**, José Carlos Rodrigues <sup>3</sup>; **SANTIAGO**, Mariângela Fontes <sup>2</sup>

<sup>1</sup> - PPGEMA - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Meio Ambiente - PPGEMA - Universidade Federal de Goiás - UFG - (paulogyn8@hotmail.com).

<sup>2</sup> - Laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás.

<sup>3</sup> - Departamento de Química CEFET-GO

**RESUMO:** O presente trabalho tem por objetivo quantificar as enzimas lacase e manganês peroxidase produzidas no tratamento de efluente de indústria farmacêutica, utilizando fungos de podridão branca: *Pycnoporus sangüineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, e *Ganoderma applanatum*. Foi usado o meio de cultura ágar batata (BGA) para o crescimento dos fungos (cinco dias); contudo, houve uma variação: a substituição da água destilada pelo efluente *in natura*. A maior produção de lacase foi quando se usou o indutor (efluente) no preparo do meio de cultura sólido com *Trametes versicolor* (em 96 horas de tratamento); para a manganês peroxidase, a produção mais elevada foi quando se utilizou o meio BGA simples, sendo que o fungo que apresentou maior produção, em 96 horas de tratamento, foi o *Trametes villosa*.

Palavras-chave: *lacase, manganês peroxidase, fungos, biorremediação.*

**INTRODUÇÃO:** A Química é um importante instrumento para o desenvolvimento sócio-econômico de um país e, partindo desse pressuposto, a síntese de novos produtos que atendam à demanda industrial foi incrementada com a finalidade de suprir as necessidades da indústria moderna. Mas, com a industrialização, a geração de rejeitos tomou outra conotação no meio ambiente. Por exemplo, para que a indústria farmacêutica especializada em síntese orgânica produza 1 Kg de produto final, são gerados de 25 a 100 kg de lixo químico (CORREIA et al., 2002). Mais recentemente, compostos farmacêuticos têm sido detectados no solo e na água potável, mas pouco se conhece sobre o risco imposto aos seres humanos por esta contaminação (KÜMMERER, 2000). Diante destas constatações, o monitoramento de resíduos de drogas no ambiente aquático tem ganhado muito interesse (HIRSCH et al., 1999).

O uso de fungos capazes de degradar compostos orgânicos parece ser um método bastante promissor para o tratamento dos efluentes de origem farmacêutica, em particular, os fungos de decomposição branca que possuem um sistema enzimático extracelular capaz de tolerar altas concentrações de poluentes tóxicos (BARR; AUST, 1994), tais como: *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Trametes villosa*, *Phanerochaete chrysosporium* (YOUNG ; YU, 1996; KNAPP ; NEWBY, 1999; KAPDAN et al., 2000; FU ; VIRARAGHAVAN, 2001; STOLZ, 2001; NOVOTNÝ et al., 2001; ROBINSON et al., 2001 ). Enzimas como lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase são produzidas por estes microrganismos.

O presente projeto visa quantificar as enzimas lacase, manganês peroxidase durante o tratamento do efluente de uma indústria farmacêutica, através da inoculação dos fungos: *Pycnoporus sangüineus*, *Trametes versicolor*, *Trametes*

*villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochates chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, e *Ganoderma applanatum*.

**METODOLOGIA: Coleta de Efluente:** Foi coletada uma amostra (amostragem simples) de 20 L do efluente proveniente de uma indústria farmacêutica da região de Goiânia (GO), sendo conservada a 4° C.

**Microrganismos:** *Pycnoporus sanguineus* (PS), *Trametes versicolor* (Tve), *Trametes villosa* (TVi), *Lentinus edodes*(LE), *Phanerochates chrysosporium*(PC), *Schizophyllum commune* (SC) e *Ganoderma applanatum*(GA). Os cinco primeiros fungos foram cedidos pela Fundação Tropical André Tosello (Campinas, SP), e os dois últimos pelo IBAMA (Brasília, DF). Foram mantidos em meio de extrato de malte 2% (P/V), a 4°C.

**Meio de Cultura Meio Ágar Batata (BGA):** 50,00 mL de caldo de batata, 5,00 g de glicose, 3,75 g de ágar e água destilada ou efluente completado para 250,00 mL.

**Condições de crescimento da cultura:** O meio sólido foi colocado em placas de petri (10 cm de diâmetro) contendo 15,00 ( $\pm$  1) mL de meio BGA. Cada placa foi inoculada com disco (5 mm de diâmetro) de fungo, de idade de crescimento de 5 dias em meio BGA à temperatura ambiente ( em torno de 28° C), exceto o *Pycnoporus sanguineus*, que cresceu em temperatura constante de 37° C (em estufa).

**Determinação das Atividades Enzimáticas antes e após o Tratamento do Efluente com Fungos:**

a) Lacase (Szklarz et al., 1989 - modificado): A atividade de lacase foi determinada utilizando seringaldazina como substrato enzimático ( $\epsilon_{525nm} = 65.000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). A mistura de reação continha 0,6 mL do caldo filtrado, 0,2 mL do tampão acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 5,0) e 0,1 mL de seringaldazina  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  preparada em etanol. A velocidade de oxidação desta foi acompanhada durante 10 minutos a 525 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{moles}$  de substrato oxidado durante um minuto, por mL de caldo filtrado ( $\text{U.mL}^{-1}$ ).

b) Manganês-peroxidase (Kumahara et al., 1984): A mistura de reação (1,0 mL) continha 0,5 mL de caldo filtrado, 0,1 mL de lactato de sódio  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ , 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$   $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ , 0,05 mL de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  preparada em tampão succinato de sódio  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada a 30°C durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de NaOH  $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A absorvância foi lida a 610 nm e a atividade de MnP expressa como  $\Delta\text{Abs mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ .

**Realização dos Tratamentos:** Foram colocados 100,00 mL de efluente *in natura* que, posteriormente, foram autoclavados em erlenmeyers de 250 mL, onde, em capela de fluxo laminar, foram colocados os conteúdos das placas (meio de cultura + fungo) nos erlenmeyers, que totalizaram dez unidades, sendo que todo o experimento foi feito em duplicata e que foram para controle, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Foram colocados no shaker (New Brunswick Scientific) a 28° C e 180 rpm (rotações por minuto). Após os respectivos períodos de tratamento, o efluente foi filtrado em membrana milipore 0,45  $\mu\text{m}$  e o caldo filtrado foi guardado sob refrigeração. Para controle, foram adicionadas culturas dos fungos (sob as mesmas condições descritas acima), procedendo-se com o autoclave das mesmas a uma temperatura de 121°C por 15 minutos; em seguida, elas foram colocadas sob agitação em um Shaker a uma temperatura de 28°C e 180 rpm (teste de adsorção).

**Métodos Analíticos e Biológicos de caracterização do efluente:** Para avaliação do efluente *in natura* e do efluente tratado de indústria farmacêutica foram empregados os seguintes parâmetros: pH, Turbidez, Cor, Acidez, Alcalinidade, Dureza, Ferro, Manganês, Cloro, Oxigênio Consumido, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Fenol e Fosfatos. Todas as análises foram efetuadas de acordo como o Standard Methods, Water and Wastewater 20<sup>th</sup> Edition, 1998. Os outros métodos de análises são relativos ao processo de tratamento envolvendo fungos e são necessários para a avaliação da eficiência do tratamento. Os equipamentos utilizados foram Turbidímetro Tecnal modelo D-20, Espectrofotômetro marca Micronal modelo B-582, Potenciômetro marca Tecnal modelo Tec-3-MP com eletrodo de Ag/AgCl, Colorímetro marca

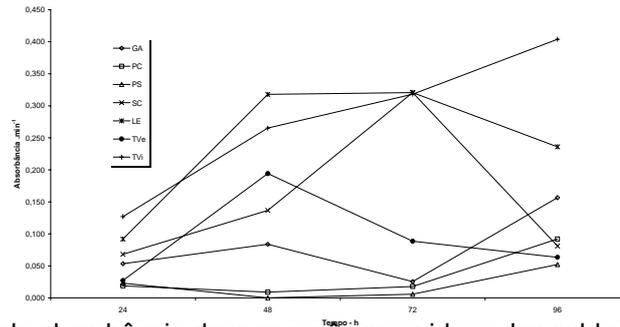
Orbeco modelo DR-850 e Shaker New Brunswick Scientific, modelo C24KC. O Digestor para realização de DQO foi o da marca Hach (COD Reactor). Estufa para cultura de microrganismos Marca Alfa. A Tabela 1 relaciona as características físico-químicas analisadas, especificando o tipo de análise efetuada, bem como especificando os agentes complexantes, tipo de eletrodo, indicadores, equipamentos e métodos.

**Tabela 3-** Características e tipos de análises realizadas

Característica	Tipo de análise	Resultados
Turbidez	Análise em turbidímetro	59,0 FAU
Cor	Análise em colorímetro	403,0 mg.L <sup>-1</sup> de Pt/Co
pH	Análise potenciométrica direta (eletrodo de Ag/AgCl)	2,7
Absorbância	Análise espectrofotométrica (400nm)	0,077 em 400 nm
Acidez	Análise titrimétrica (indicador de fenolftaleína)	188 mg de acidez
Alcalinidade	Análise titrimétrica (indicador de fenolftaleína para carbonatos e de metil orange para carbonatos totais)	Não detectável por este método
Cálcio e Magnésio (Dureza)	Análise titrimétrica (indicador de eriocromo T para dureza total e de murexida para magnésio)	Não detectável por este método
Ferro	Análise colorimétrica (1,10 fenantrolina) (550 nm)	1,15 mg.L <sup>-1</sup>
Manganês	Análise colorimétrica (método do persulfato) (545 nm)	1,10 mg.L <sup>-1</sup>
Fenol	Método de Folin-Ciocalteu (700 nm)	3,10 mg de O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup>
OD	Análise titrimétrica (Método de Winkler)	10,00 mg.L <sup>-1</sup>
DQO	Análise colorimétrica (método de digestão com dicromato)	263,00 mg de O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup>
DBO	Análise titrimétrica (método de Winkler)	1,50 mg de O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup>

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Foram efetuadas três formas de tratamento, sendo elas: a) com o uso do meio de cultura BGA; b) com o meio BGA (em que se substituiu a água destilada por efluente); e c) utilizando-se o efluente autoclavado (que foi uma maneira de certificar que as enzimas eram de origem fúngica). Na tentativa de aumentar a produção enzimática, principalmente fenoloxidasas, foi efetuada a troca da água usada para a preparação do meio de cultura sólido pelo efluente puro. Como o efluente *in natura* continha fenol, que é um substrato dessas enzimas, viabilizou-se tal troca, pois compostos fenólicos são considerados agentes indutores sintéticos (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984). Quando se usou o efluente no lugar da água no meio de cultura sólido, nas placas que continham *Pycnoporus sanguineus*, verificou-se a coloração amarronzada característica, indicando que a produção do corante está ligada à presença de compostos fenólicos, pois, em condições anteriores, o aparecimento do mesmo só foi percebido após o contato do fungo com tal contaminante, em diferentes tempos de tratamento. A maior produção enzimática de manganês peroxidase foi observada quando se usou o efluente *in natura*, com meio de cultura sólido BGA, de acordo com os tempos de tratamento, (Figura 1). Os valores da absorbância são referentes a 5 minutos de ação da enzima sobre o substrato (vermelho de fenol). O fungo que apresentou maior produção desta enzima foi o *Trametes villosa* em 96 horas de tratamento do efluente, e o que apresentou menor produção foi o *Pycnoporus sanguineus*, podendo-se concluir que

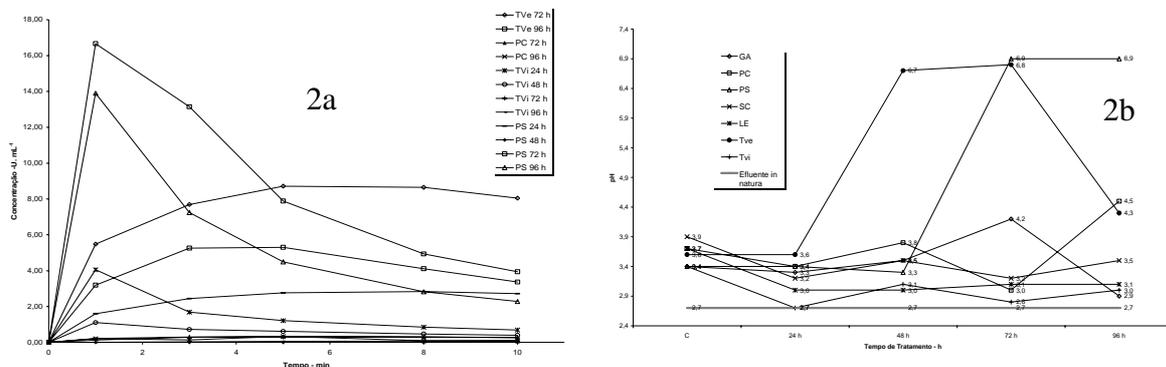
a produção desta enzima depende completamente das condições em que o fungo se encontra.



**Figura 1:** Variação da absorvância de manganês peroxidase dos caldos filtrados, após 5 min. de incubação.

Estudos mostram que existe uma relação entre a atividade de manganês peroxidase e a concentração de peróxido de hidrogênio, sendo essa relação um fator limitante do processo enzimático. O oxigênio dissolvido (OD) também tem demonstrado que a reação do  $Mn^{3+}$  e  $H_2O_2$  gera oxigênio que se acumula no caldo filtrado, atingindo valores de até  $12,0 \text{ mg de } O_2.L^{-1}$ . Também foi constatado que em baixos níveis de oxigênio dissolvido, a enzima apresentou maior atividade, possivelmente devido à relação ideal entre o peróxido e a enzima (LÓPEZ et al., 2004). Tal constatação pôde ser comprovada pela baixa concentração de OD do efluente ( $3,10 \text{ mg de } O_2.L^{-1}$ ).

O ensaio de atividade enzimática da lacase indicou que mesmo cinco minutos de observação da reação de oxidação da seringaldazina foi excessivo para o *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* e para o *Phanerochaete cryosporium* quando esses apresentaram a maior produção da enzima, mas para fungos que apresentaram concentrações mais baixas, o tempo de dez minutos foi o ideal para a observação da oxidação.



**Figura 2:** a) Variação da atividade enzimática da lacase nos caldos filtrados, usando-se indutor em meio sólido, em relação ao tempo de reação; b) Variação do pH durante o tratamento com os fungos, usando indutor em meio sólido. O pH do efluente *in natura* é 2,7.

Um dos fatores que também podem contribuir para a interferência na cinética química é a concentração do substrato, mas estudos mais criteriosos podem ser efetuados, a fim de se averiguar tal influência. A Figura 2 a mostra a reação de oxidação da seringaldazina. Estudos mostram que em pH ácido, as fenoloxidasas se mostram muito ativas, contudo, altamente instáveis (PALMIEREI et al., 1993), o que pode ser explicado pela pequena variação do pH (Figura 2 b). Garcia (2006) demonstrou que *Pycnoporus sanguineus* tem maior produção quando se utiliza indutor. Dong e colaboradores (2005) demonstraram que o a fonte de nitrogênio orgânico é um importante incrementador da produção de lacase, bem como o tipo de

incubação (estático ou agitado), que influenciam no gene de expressão dessa enzima.

**CONCLUSÃO:** A partir dos resultados apresentados, para a MnP, a forma de tratamento que apresentou maior produção é quando se utiliza o efluente *in natura* com fungos crescidos em meio sólido BGA, sendo que *Trametes villosa* em 96 h de tratamento apresentou a maior produção enzimática (0,325 abs.min<sup>-1</sup>). Para a lacase, a forma de tratamento que apresenta maior produção é quando se utilizou o efluente *in natura* com fungos crescidos em meio sólido BGA e indutor (efluente). O *Trametes versicolor* apresentou maior produção de lacase em 96 h de tratamento (16,5 U.mL<sup>-1</sup>).

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 17. ed. APHA. Washington, DC, 1992.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental science & technology**, 28(2), 79A-87A.
- BOLLAG, J-M; LEONOWICZ, A. 1984. Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. **Applied Environmental Microbiology**, 48, 849-854.
- CORREIA, C. R. D. , COSTA, P. R. R., FERREIRA, V. F. 2002. Vinte e cinco anos de reações e estratégias em química orgânica. **Química Nova**, 25, 74-80.
- DONG, J. L.; ZHANG, W.; ZHANG, R.; HUAI, H.; WEI, Z. 2005. Influence of Culture Condition on Laccase Production and Isoenzyme Patterns in the White-rot Fungus *Trametes gallica*. **Journal of Basic Microbiology**, 45, 3, 190-198.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource technology**; 79: 251-262, 2001.
- GARCIA, T. A. 2006. Produção e caracterização de duas lacases do Fungo *Pycnoporus sanguineus*, **Tese de doutorado**, Universidade de Brasília.
- HIRSCH, R. et al. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Rev. Science Total Environment**; 225: 109-118, .
- KAPDAN, I. K. et al. 2000. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *T. versicolor*. **Enzyme and microbial technology**; 26: 381-387.
- KNAPP, J. S. ; NEWBY, P. S. 1995. The microbiological decolorization of an industrial effluent containing a diazo-linked chromophore. **Water research**; 29(7): 1807-1809.
- KUMAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. 1984. 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, 242-247.
- KÜMMERER, K. 2000. Drugs, diagnostic agents and disinfectants in wastewater and water-a review. **Rev. Schiftenr Ver Wasser Boden Luftthyg**; 105, 59-71.
- LÓPEZ, C., MOREIRA, M. T., FEIJOO G., LEMA, J. M. 2004. Dye Decolorization by Manganese Peroxidase in an Enzymatic Membrane Bioreactor, **Biotechnol. Prog**, 20, 74-81.
- NOVOTNÝ, C. et al. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes, **Journal of Biotechnology**; 89, 113-122.
- PALMIERI, G.; GIARINA, P; MARZULLO, L; DESIDERIO, B., NITTI, G.; CANNIO, R.Ç SANNIA, G. 1993. Stability and activity of phenol oxidase from Lignolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology & Biotechnology**, 39, 632-636.
- ROBINSON, T. et al. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource technology**, 77, 247-255.
- STOLZ, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes – mine review. **Applied Microbial Biotechnology**; 56: 69-80.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L; LINKINS, A.E. 1989. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycology** , 81, 234-240.
- YOUNG, L.; YU, J. 1997. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water research**, 31(5), 1187-1193.

**AGRADECIMENTOS:** Edital MCT/CNPq/CT-Hidro nº 14/2005 e International Foundation of Science (IFS).