

Tratabilidade Fúngica de Hormônios Sintéticos

Ruiter Lima MORAIS^a, Mariângela Fontes SANTIAGO^b

Escola de Engenharia Civil – Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente, Universidade Federal de Goiás, 74605-220, Brasil
E-mail: donic13gyn@hotmail.com; mariangelafs@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: enzimas fúngicas; degradação; hormônios sintéticos.

1 INTRODUÇÃO

Um dos campos mais proeminentes da área ambiental é o estudo de micropoluentes orgânicos presentes em ambientes aquáticos. Recentemente, estudos mostraram mudanças na reprodução de animais e humanos, possivelmente devido à presença de alguns micropoluentes (conhecidos como desreguladores endócrinos) em águas superficiais e subterrâneas (FERREIRA, 2008).

Substâncias sintéticas com ação desreguladora são geralmente persistentes no ambiente, acumulam-se no solo e nos sedimentos, são transportadas para outras regiões pela atmosfera e podem acumular-se ao longo da cadeia trófica, expondo os animais superiores a maiores riscos. Várias destas substâncias podem ser excretadas por meio do leite materno, constituindo-se, assim, uma fonte de contaminação para recém-nascidos (Meyer *et al.*, 1999).

Processos como a oxidação por complexo enzimático, produzido por fungos, têm se mostrado bastante promissor na degradação de micropoluentes presentes em amostras ambientais. Essas enzimas lignolíticas são capazes de hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos, podendo oxidar também uma série de compostos fenólicos relacionados à lignina. Com uso de mediadores adequados pode possibilitar a oxidação de compostos não-fenólicos (JARDIM, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 1997; BORBONNAIS & PAICE, 1990).

^a Orientando

^b Orientadora; professora da Faculdade de Farmácia da UFG

2 OBJETIVO

Avaliar a eficiência do complexo enzimático Lacase (Lcc), Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP), produzido pelos fungos de decomposição branca *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa*, na tratabilidade dos hormônios sintéticos: Acetato de Ciproterona, Etinilestradiol e Gestodeno, para futuras aplicações de descontaminação de águas e efluentes.

3 MATERIAL DE MÉTODOS

3.1 Hormônios Sintéticos e Preparo da Solução Estoque

A pesquisa será realizada com padrões primários e hormônios sintéticos, gentilmente cedidos pela indústria farmacêutica Cifarma Científica Farmacêutica, e possivelmente serão: Acetato de 6-cloro-3,20-dioxo-1 β ,2 β -diidro-3'H-ciclopropa[1,2] prena-1,4,6-trien-17-yl (Acetato de Ciproterona), (17 α)-19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol (Etinilestradiol) e (17 α)-13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinorpregna-4 (Gestodeno), pois estes hormônios estão entre os mais utilizados para fabricação de medicamentos de contracepção e regulação hormonal.

A concentração de hormônios sintéticos para o preparo da solução estoque será previamente estabelecida, de forma a obedecer ao limite de detecção validado pela empresa Cifarma Científica Farmacêutica, para análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE). O Quadro 01 mostra quais as concentrações finais das soluções de hormônios sintéticos que serão utilizadas durante o tratamento.

Quadro 01: Hormônios sintéticos e concentrações das soluções estoque a serem utilizadas.

HORMÔNIO SINTÉTICO	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (mg.mL ⁻¹)
Acetato de Ciproterona	2,000
Etinilestradiol	0,035
Gestodeno	0,075

A solução estoque será preparada com água ultrapurificada e álcool etílico para solubilizar os hormônios, uma vez que de acordo com Valeriano *et al.* (2007), o álcool etílico

é comprovadamente um indutor de produção enzimática em certas espécies de fungos, como o *Pycnoporus sanguineus*, é economicamente viável, de fácil acesso e também porque os outros compostos como acetonitrila, acetona e metanol, utilizados na solubilização de hormônios sintéticos, são tóxicos para a maioria dos microrganismos, inclusive fungos.

3.2 Microrganismos e Cultivo

Os microrganismos a serem utilizados na pesquisa, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa*, fazem parte da coleção do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Goiás – UFG, e foram obtidos juntos à Fundação André Tosello, Campinas/SP.

Para manutenção das cepas e utilização dos fungos nos experimentos, o cultivo será realizado em placas de *Petri* contendo meio de cultura sólido. Os fungos serão replicados trimestralmente conforme metodologia de Castellani (1967) descrita a seguir.

O meio de cultura será autoclavado para torná-lo estéril, a 120 °C durante 20 minutos. Em seguida, cerca 15 a 20mL de meio serão transferidos para as placas de *Petri*. Em capela de fluxo laminar, um disco de tamanho referente à abertura maior de uma ponteira de 1mL, será inoculado em cada placa, que serão armazenadas em condições ambiente durante 10 dias para crescimento satisfatório dos fungos.

O meio de cultura do tipo BGA (Batata, Glicose, Ágar) será utilizado como meio basal para o desenvolvimento dos cultivos fúngicos, tanto na manutenção das cepas quanto nos experimentos. Os reagentes que compõem os meios, sólido e líquido, encontram-se no Quadro 02.

Quadro 02: Meios de cultura a serem utilizados.

REAGENTES	MEIO SÓLIDO	MEIO LÍQUIDO
Glicose	5g	20g
Caldo de Batata	50mL	200mL
Ágar	3,750g	Ausente
Água Destilada	para 250mL	para 1000mL

O caldo de batata será feito a partir do cozimento de 1kg de batata inglesa, adquirida comercialmente, em 1L de água estéril.

3.3 Tratamento dos Hormônios Sintéticos em Batelada: Experimentos em Meio de Cultura Líquido

Os experimentos em meio de cultura líquido serão realizados sob duas condições: agitação e estático. Serão retirados quatro discos de cada espécie fúngica com 10 dias de crescimento e transferidos para *Erlenmeyers* de 250mL contendo meio de cultura do tipo BGA e solução estoque de cada hormônio sintético separadamente e um branco.

O procedimento microbiológico de inoculação, assim como a adição das soluções dos hormônios sintéticos serão realizados dentro de uma capela de fluxo laminar, a fim de manter as condições estéreis, de acordo com metodologia de Castellani (1967).

No ensaio sob condição estática, os *Erlenmeyers* serão mantidos em incubadora por 20 dias a 26 °C. Para o ensaio sob agitação, os *Erlenmeyers* serão mantidos em misturador automático (*Shaker*) em rotação de 120 rpm por 20 dias a 26 °C.

3.4 Determinação da Atividade Enzimática

A determinação da atividade enzimática é um importante indicador de adaptabilidade e reprodução dos fungos no meio líquido selecionado.

A atividade enzimática da Lacase será determinada segundo metodologia de Szklarz *et al.*, (1989-modificado): a oxidação da seringaldazina é conduzida em uma mistura de reação que contenha 0,6mL do sobrenadante dos *Erlenmeyers*, 0,2mL do tampão acetato de sódio 50mmol.L⁻¹ (pH 5,0) e 0,1mL de seringaldazina 1,0mmol.L⁻¹ preparada em etanol. A reação é iniciada pela adição da seringaldazina e a velocidade desta reação deve ser acompanhada por 05 minutos. As leituras da atividade enzimática são realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 525nm, sendo $\epsilon = 65000 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Para Manganês Peroxidase a metodologia utilizada será de Kuwahara *et al.* (1984). Os componentes da mistura são: 0,5mL de sobrenadante dos *Erlenmeyers*, 0,1mL de lactato de sódio, 0,2mL de albumina bovina 0,5%, 0,05mL de MnSO₄ 2,0mmol.L⁻¹, 0,05mL de solução de H₂O₂ 2,0mmol.L⁻¹ em tampão de succinato de sódio 0,2mol.L⁻¹ e 0,1mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura é incubada por 5 minutos a 30°C. A leitura da atividade enzimática é realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 610nm, sendo $\epsilon = 4460 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

A atividade enzimática de Lignina Peroxidase será determinada segundo metodologia de Tien & Kirk (1984), onde os componentes para a mistura da reação são: 0,6mL do sobrenadante dos *Erlenmeyers*, 0,2mL de H₂O₂ 2,0mmol.L⁻¹ de solução de álcool 2,0mmol.L⁻¹ em tampão de tartarato de sódio 0,4mol.L⁻¹. A reação é determinada pela oxidação do álcool veratrílico. Em espectrofotômetro com comprimento de onda de 310nm, é realizada a leitura do aldeído formado dessa reação, sendo $\epsilon = 9300 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

3.5 Análise dos Hormônios Sintéticos após Tratamento

Para verificar a eficiência da técnica de tratamento com os fungos, será utilizado o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme metodologias desenvolvidas e validas pela indústria Cifarma Científica Farmacêutica. A eficiência será a diferença entre a concentração inicial e a concentração final dos hormônios sintéticos nas soluções.

As coletas das amostras serão feitas no 5º, 10º e 20º dia de cultivo no laboratório de Enzimologia da Faculdade e Farmácia da Universidade Federal de Goiás - UFG, para realização da análise de determinação enzimática, que será realizada no próprio laboratório de Enzimologia da Faculdade e Farmácia e para serem encaminhadas, em tubos de ensaio protegidos de luz e calor, para o laboratório de controle de qualidade físico-químico da indústria Cifarma, onde serão realizadas as análises de concentração dos hormônios sintéticos em CLAE. No 15º dia serão coletadas amostras para realização da análise de determinação enzimática, no laboratório de Enzimologia da Faculdade de Farmácia - UFG.

4 RESULTADOS ESPERADOS

É esperado:

- Que pelo menos uma das duas espécies de fungos de decomposição branca selecionadas seja eficiente na tratabilidade dos hormônios sintéticos estudados, na condição de cultivo em meio líquido estipulada;
- Que o complexo enzimático Lacase (Lcc), Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP), produzido pelos fungos de decomposição branca, seja eficiente na tratabilidade dos hormônios sintéticos estudados;
- A determinação da atividade enzimática de Lacase (Lcc), Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP) dos fungos selecionados na presença de cada um dos hormônios sintéticos estudados;
- A determinação das concentrações finais e durante o tratamento com os fungos de decomposição branca selecionados, dos hormônios sintéticos estudados.

5 REFERÊNCIAS

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, 267: 99 – 102, 1990.

CASTELLANI, A. **Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic Fungi of Man in Sterile Distilled Water.** Futher Researcher. Journal Trop. Med. Hyg. V.70, p. 181-184, 1967.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂.** Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

JARDIM, V. L. **Seleção de fungos de decomposição branca para a redução da toxicidade do acefato.** 134 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Engenharia Civil, 2010.

KUWAHARA, M.; KIMURA, Y.; ASADA, Y. **Screening of Basidiomycetes for Lignin Peroxidase Genes Using a DNA Probe.** Applie Microbiology and Biotechnology. Vol. 32, nº. 04, 1989.

MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. **Estarão Alguns Grupos Populacionais Brasileiros Sujeitos à Ação de Disruptores Endócrinos?.** Caderno Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 15, nº. 4, pp. 845-850, 1999.

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.

TEIXEIRA, D. E.; COSTA, A. F.; SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. **Scientia Forestalis**. 52: 29-34, 1997.

TIEN, M.; KIRK, K. **Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ – requiring oxygenase.** PNAS Microbiology, v. 81, n. 08, 2280-2284, 1984.

VALERIANO, V. S.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. **Análise de Contaminação dos Sistemas Hídricos por Agrotóxicos numa Pequena Comunidade Rural do Sudeste do Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22 (11): 2391-2399, 2006.