

## **AÇÃO DA LACASE DE *TRAMETES SP.* NA BIODEGRADAÇÃO DO PARACETAMOL *IN VIVO E IN VITRO***

Gabriela Thais Cavaleiro dos Reis (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Priscila Ayumi Sybuia, Cristina Giatti Marques de Souza (Orientador), e-mail: [ra101837@uem.br](mailto:ra101837@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

### **Ciências Biológicas – Bioquímica de Micro-organismos**

**Palavras-chave:** biorremediação, enzimas, acetaminofeno.

#### **Resumo:**

Fungos da podridão branca da madeira produzem enzimas que atuam principalmente sobre a lignina tornando a madeira sobre a qual crescem de aparência amorfa e esbranquiçada. São produtores de duas principais classes de enzimas, as lacases e as manganês peroxidases. O consumo de fármacos tem aumentado no mundo todo e entre eles os analgésicos e antibióticos são os mais utilizados. Os mesmos têm sido encontrados nas águas superficiais, mostrando que os tratamentos de esgoto não são suficientes para removê-los. O paracetamol é um dos fármacos mais utilizados no mundo. A biodegradação tem sido considerada uma alternativa mais barata e mais amiga do meio ambiente. O isolado *Trametes sp.* C3 foi cultivado em meio de sais suplementado com glicose em condições estáticas na presença e na ausência de paracetamol. A enzima lacase foi encontrada em maior quantidade (158 U/L) no cultivo contendo paracetamol. A enzima manganês peroxidase não foi encontrada nas condições estudadas. Na remoção *in vitro* o extrato bruto enzimático foi capaz de remover o fármaco em 76% após 90 minutos. Os dados mostram que a lacase de *Trametes sp.* C3 tem potencial de remoção do fármaco avaliado.

#### **Introdução**

Os fungos da podridão branca recebem este nome devido à degradação da lignina, promovida pela ação de suas enzimas sobre a madeira em decomposição, fazendo com que esta adquira um aspecto esbranquiçado. As enzimas modificadoras de lignina compreendem as fenoloxidasas e as peroxidases (JANUSZ et al., 2017). Lacases têm merecido destaque quanto à sua aplicação na biorremediação de pesticidas, corantes, hormônios e fármacos. Estes últimos são substâncias de estrutura química conhecida que possuem ação farmacológica e que têm a função de prevenir, curar e tratar

doenças (JELIC et al., 2010). Entre os mais consumidos estão os analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos. O paracetamol é o analgésico e antipirético mais prescrito no mundo todo, mas sua venda não tem necessidade de receituário médico sendo considerado a principal causa de intoxicação por fármacos. Uma superdosagem pode apresentar efeitos adversos já que metabólitos tóxicos são gerados quando ele é oxidado por espécies reativas de oxigênio (EROS) (ABDULLAH et al., 2016; ZAVALA; ESTRADA, 2016). Diversas substâncias químicas são encontradas em águas residuais e a principal forma de tratamento é a oxidação química, porém, o alto custo e a formação de produtos secundários tóxicos indicam que métodos de biodegradação podem ser uma alternativa para diminuição dos custos operacionais e desenvolvimento de metodologias mais adequadas ao meio ambiente (WU et al., 2012). Este estudo teve como objetivo, avaliar o envolvimento da lacase de *Trametes* sp. C3 na degradação do paracetamol *in vivo* e *in vitro*.

## Materiais e métodos

**Fungo:** *Trametes* sp. C3, da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos da UEM.

**Fármaco:** adquirido em uma farmácia da cidade de Maringá – PR.

**Condições de cultivo:** o fungo foi cultivado em meio mineral com glicose a 1%. Três discos de micélio ( $\varnothing$  2 cm) foram inoculados em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio. Todos os materiais utilizados passaram por esterilização a 121 °C e 1 atm por 20 minutos antes do uso. Os cultivos foram deixados em condição estática, a  $28 \pm 2$  °C por no máximo 10 dias. Após o período de crescimento, os cultivos foram filtrados. A biomassa foi seca em estufa a 50 °C, pesada até peso constante e o filtrado armazenado em congelador para a análise da atividade enzimática e paracetamol residual. Os cultivos foram realizados em duplicata, acompanhados de controle abiótico. Foram realizados cultivos sem e com paracetamol (35 µg/mL) nas condições descritas acima.

**Atividade enzimática:** a atividade de lacase (EC 1.10.3.2) foi medida com ABTS em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5) a 40 °C (PELÁEZ et al., 1995). A oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento na absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de produto por minuto e expressa como U/L.

**Biodegradação *in vitro*:** extrato bruto de lacase foi utilizado (40 U/L). O fármaco foi diluído em água destilada para alcançar a concentração final de 60 µg/mL, e volume final de 5 mL. A mistura foi incubada a 37 °C no escuro e, em intervalos, alíquotas foram coletadas e inativadas por fervura. Para o controle negativo a enzima foi inativada por fervura. O valor do paracetamol residual foi obtido por subtração da concentração inicial.

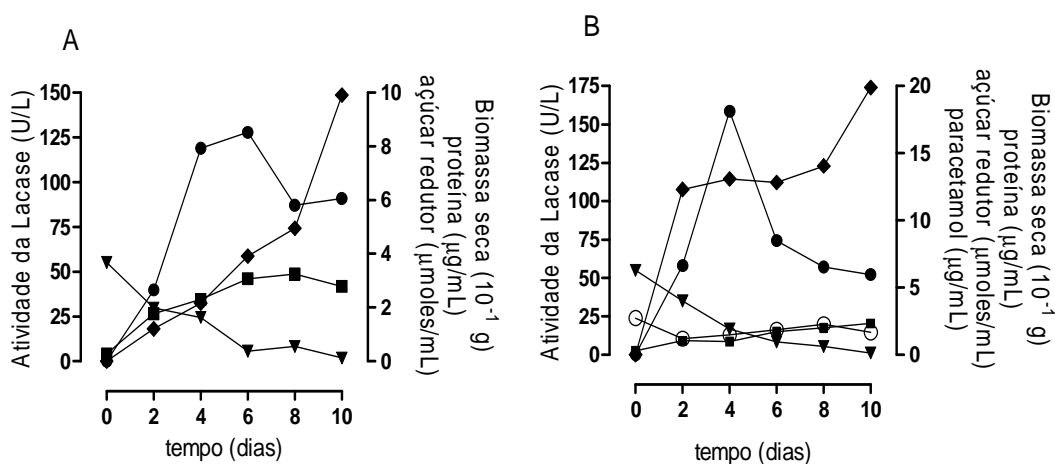
**Paracetamol residual:** uma curva padrão do paracetamol foi realizada em concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. HCl (0,008M), nitrito de

sódio (0,07M) e NaOH (8M) foram acrescentados ao padrão. As absorvâncias foram lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm.

*Açúcares redutores e proteínas totais:* foram avaliados pelo método do 3,5 dinitrosalicílico (DNS) e de Bradford, utilizando glicose e albumina como padrão, respectivamente.

## Resultados e Discussão

*Biodegradação do paracetamol in vivo:* A atividade da lacase foi encontrada ao longo do tempo de crescimento (figura 1). Nos cultivos sem paracetamol a atividade da lacase foi um pouco menor (127,7 U/L) que nos cultivos contendo o fármaco (158 U/mL) e o pico foi atingido entre o quarto e o sexto dia de cultivo no experimento com paracetamol e no quarto dia no experimento sem paracetamol. A maior quantidade de proteína foi encontrada ao final do cultivo em ambas as condições, sendo maior no cultivo com paracetamol. Não houve prejuízo à produção da biomassa nos cultivos com o fármaco, mas o fungo cresceu mais no cultivo sem paracetamol. A lacase foi secretada principalmente quando a fonte de carbono diminuiu em ambos os cultivos. A concentração de paracetamol encontrada no meio de cultura foi menor que a inicial, representando uma redução de 38,6% do fármaco em solução.



**Figura 1** - Curva de crescimento do *Trametes sp. (C3)* sem (A) e com paracetamol (B): lacase (●); proteína solúvel (◆); biomassa (■); paracetamol (○); açúcar redutor (▼).

*Biodegradação do paracetamol in vitro:* os resultados de remoção do paracetamol de uma solução aquosa podem ser vistos na tabela 1. Lacase foi capaz de diminuir em 76% a concentração do fármaco após 90 minutos.

**Tabela 1** – Ação da lacase na remoção do paracetamol *in vitro*

Tempo (minutos)	Concentração de paracetamol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Taxa de remoção (%)
Controle	62,86 $\pm$ 0,56	-
0	64,11 $\pm$ 0,16	0
30	30,47 $\pm$ 1,37	52
60	23,33 $\pm$ 0,50	63
90	15,65 $\pm$ 0,00	76

## Conclusões

Os dados mostram que a lacase de *Trametes* sp. C3 tem grande potencial de remoção do paracetamol, tanto *in vitro* como *in vivo*, podendo ser utilizado em processos de biorremediação de águas residuais.

## Agradecimentos

CNPq; PPG/UEM/FA;

## Referências

ABDULLAH, N. et al. Assessing the treatment of acetaminophen-contaminated brewery wastewater by an anaerobic packed-bed reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 168, p. 273-279, 2016.

JANUSZ, G. et al. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved genomes analysis and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017.

JELIC, A., et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. **Water research**, v. 45, n. 3, p. 1165-1176, 2011.

WU, S. et al. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 875–884, 2012.

ZAVALA, M. A. L.; ESTRADA, E. E. Degradation of acetaminophen and its transformation products in aqueous solutions by using an electrochemical

29º Encontro Anual de Iniciação Científica  
9º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



29 a 31 de outubro de 2020

oxidation cell with stainless steel electrodes. **Water**, v.8, n.9, p. 383-395, 2016.