

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA LACASE DE *TRAMETES* SP.

Paloma Ribeiro Lopes de Sá (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Brenda Zaquia (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anna Beatriz Juliane Beinke, Rafael Castoldi (Co-orientador), Cristina Giatti Marques de Souza (Orientadora), e-mail: ra114923@uem.br

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

Ciências Biológicas - 20800002

Bioquímica dos Micro-organismos - 20802005

Palavras-chave: lacase, *Trametes*, imobilização

Resumo:

Lacases são polifenoloxidasas encontradas em animais, vegetais e fungos. Nos fungos da podridão branca fazem parte do sistema enzimático que degrada a lignina da parede celular de vegetais. A lacase também atua em diferentes tipos de estrutura e pode ser utilizada para diferentes propósitos: clareamento de sucos e vinhos, descoloração de efluentes têxteis, biorremediação de pesticidas, hormônios e fármacos. Vários são os fatores que desencorajam o uso de lacases solúveis na biodegradação de compostos xenobióticos em soluções aquosas para aplicação em grande escala, porém foi demonstrado que a imobilização da enzima para este fim pode ser de grande utilidade para processos de biorremediação. *Trametes* sp. C3 é um isolado de crescimento rápido que já foi testado em nosso laboratório para a produção e degradação do fármaco Paracetamol. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lacase em meio sólido, testar a imobilização da lacase utilizando a técnica de reticulação (CLEA) e verificar a ação da lacase imobilizada em uma solução de paracetamol.

Introdução

Lacases são polifenoloxidasas cuja atividade está relacionada a vários mecanismos nos organismos que as produzem. Nos fungos da podridão branca aparecem, principalmente, ligadas ao sistema enzimático que degrada a lignina da parede celular de vegetais. Por fazer parte de um sistema enzimático de ação inespecífica, a lacase atua em diferentes tipos de estrutura e pode ser utilizada para diferentes propósitos: clareamento de sucos e vinhos, descoloração de efluentes têxteis, biorremediação de pesticidas, hormônios e fármacos (ARAÚJO et. al, 2017). As lacases são enzimas capazes de oxidar um amplo espectro de substratos: orto- e para-difenóis, polifenóis, aminofenóis e aromáticos ou aminas alifáticas. Vários são os exemplares de Basidiomicetes que produzem a lacase e entre eles

os do gênero *Trametes* se destaca. Recentemente trabalhos em nosso laboratório mostraram que um isolado de *Trametes* sp. produz grandes quantidades de lacase em meio líquido. Sua lacase foi capaz de degradar o fármaco paracetamol *in vivo* em *in vitro*. Vários são os fatores que desencorajam o uso de lacases solúveis na biodegradação de compostos xenobióticos em soluções aquosas para aplicação em grande escala e foi demonstrado que a imobilização da enzima para este fim pode ser de grande utilidade para processos de biorremediação com menor custo (BRUGNARI et. al, 2018). Diferentes técnicas são empregadas para a imobilização de enzimas. A “auto-imobilização” é uma técnica com poucos passos que compreende a precipitação e agregação para a formação de CLEAs (“Cross-Linked Enzyme Aggregates”) e que tem sido estudada para as lacases em processos de biorremediação (YANG,2017). Este trabalho teve como objetivos: avaliar a produção de lacase de *Trametes* sp. C3 em meio sólido e a imobilização da enzima através da técnica de reticulação usando acetona como agente precipitante e estudar a aplicação da enzima imobilizada na degradação do paracetamol.

Materiais e métodos

Fungo: *Trametes* sp. (C3), da coleção de culturas do LBM/DBQ/UEM.

Manutenção: o fungo foi mantido em meio sólido MEA (*malt extract agar*).

Condições de cultivo por FES e obtenção de extrato bruto da lacase: o fungo foi cultivado em meio de farelo de trigo (2g) + sabugo de milho (0,5g) umedecido com meio mineral a 85 %. Três discos de micélio (Ø 1cm), foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo o meio. Todos os materiais utilizados foram esterilizados (121 °C e 1 atm) por 20 minutos antes do uso. Os frascos foram deixados em condição estática, a 28 ± 2 °C. Os cultivos foram interrompidos com 20 mL de água destilada gelada e filtrados em gaze.

Atividade enzimática: a atividade de lacase foi medida com ABTS em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5) a 40 °C (PELÁEZ et al., 1995).

Imobilização das lacases por reticulação (CLEA): a enzima foi imobilizada de acordo com Cabana et al. (2007), com algumas modificações. O agente precipitante, acetona, foi usado na proporção de 1:3(v/v). O glutaraldeído 25% foi acrescentado como agente de reticulação. A solução foi homogeneizada e armazenada a 4 °C por 24 h. Após centrifugação os CLEAs foram lavados com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 até que não se observasse atividade no sobrenadante (3-4 vezes). Os CLEAs ressuspensos no mesmo tampão, foram armazenados a 4 °C para uso.

Degradação do paracetamol com a lacase imobilizada (EI): uma solução de paracetamol foi preparada para dar a concentração final de 100 µg/mL. A CLEAs foram diluídas adequadamente em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 para obter a atividade final de 40U/L. Essa mistura permaneceu incubada a 40 °C por 90 minutos e depois a lacase foi inativada em banho-maria fervente por 5 minutos. A mistura foi centrifugada e os espectros de absorção obtidos em espectrofotômetro UV-vis no intervalo de comprimento

de onda de 200 a 300nm. Controles foram realizados fervendo-se a mistura no tempo zero. Controle negativo: paracetamol em tampão, fervido e sem ferver. As avaliações foram feitas em duplicata.

Resultados e Discussão

Produção de lacase: o isolado *Trametes* sp. C3 ainda não havia sido cultivado em fermentação em estado sólido (FES) para a produção de lacase em nosso laboratório. O aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas por Basidiomicetos é bastante comum uma vez que estes fungos utilizam material lignocelulósico como substrato para seu desenvolvimento. A composição do meio favoreceu o crescimento. A figura 1A mostra o resultado da produção da enzima lacase nas condições citadas. A atividade mostrou-se alta desde o 4º dia de cultura ocorrendo uma queda entre o 6º e 8º dias com aumento de produção no 10º dia. Para a precipitação e imobilização as amostras de maior atividade foram reunidas. A atividade total foi de 2.377,731 U/L.

Imobilização: resultados prévios usando outros agentes precipitantes, etanol, PEG e sulfato de amônio (dados não mostrados) indicaram que a acetona é o melhor agente para formar as CLEAs da lacase de *Trametes* sp. C3. O rendimento obtido no processo foi de quase 99%.

Ação da lacase imobilizada (EI) sobre o paracetamol: o FDA sugere a espectrometria UV no comprimento de onda de 245 nm como referência para quantificação do paracetamol (EI-KEMARY et al., 2011). Desta forma o espectro de varredura foi realizado entre os comprimentos de onda de 200 a 300m. Houve diminuição nas absorbâncias após o tempo de incubação do fármaco na presença da enzima imobilizada (figura 1 B), porém não foi possível encontrar o pico específico do paracetamol. Devido ao elevado teor de compostos linocelulósicos do farelo de trigo, as amostras apresentaram uma leve coloração amarela, mesmo depois de precipitadas e reticuladas. A centrifugação das amostras, após os testes, não foi capaz de remover a cor da mistura e portanto as absorbâncias foram mais elevadas. A diminuição nas absorbâncias das amostras observadas nos espectros comparadas aos controles, sugerem a ação da lacase. Não houve diferença nas absorbâncias dos controles negativos (paracetamol em tampão) fervido e não fervido.

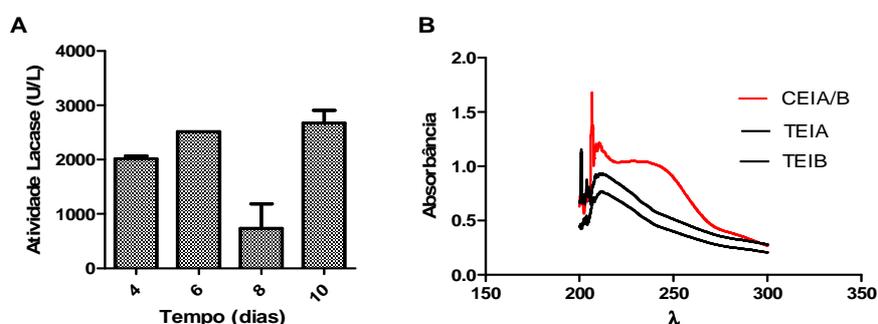


Figura 1 – A: produção de lacase em FES. B: Espectro de absorção das amostras de EI após incubação com paracetamol. CEIA/B(duplicatas) – controle. TEIA e TEIB – testes.

Conclusões

O dados mostram que o cultivo sólido pode ser utilizado para a produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. C3 com bastante eficiência. A acetona proporcionou uma elevada produtividade da enzima imobilizada indicando que esta lacase mantém estabilidade frente a precipitação e imobilização com este agente. Embora os espectros de absorção tenham indicado uma ação sobre o paracetamol, outros estudos precisam ser realizados com a enzima produzida em um meio ausente de cor e também com a enzima livre para comparação.

Agradecimentos

Ao CNPq, a PPG – UEM e ao Departamento de Bioquímica, nossos agradecimentos.

Referências

ARAUJO, C. A. V. et al. Simultaneous removal of the antimicrobial activity and toxicity of sulfamethoxazole and trimethoprim by white rot fungi. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 9, p. 341, 2017.

BRUGNARI, T. et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1346-1351, 2018.

CABANA, H., JONES, J.P., AGATHOS, S.N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **J. Biotechnol.**, v.132, p. 23-31, 2007.

EI-KEMARY M, SOBHY S, EI-DALY S, ABDEL-SHAFI A. Inclusion of Paracetamol into β -cyclodextrin nanocavities in solution and in the solid state. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 79, n 5, p.1904–8, 2011.

PELÁEZ, F., MARTÍNEZ, M. J., MARTINEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological Research**, v. 99, n. 1, p. 37-42, 1995.

YANG, J. et al. Immobilized *Cerrena* sp. laccase: Preparation, thermal inactivation, and operational stability in malachite green decolorization. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.