

APLICAÇÃO DE FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA E WETLAND CONSTRUÍDO NA BIODEGRADAÇÃO DO TAMOXIFENO

Priscilla Miyori Suenaga (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Rafael Castoldi (Orientador). E-mail: pri25miyori@gmail.com

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

Ciências Biológicas - Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: fármacos; biorremediação; fungos da podridão branca.

RESUMO

Com a crescente demanda de fármacos ao longo dos anos, concentrações dessas substâncias têm sido detectadas em recursos hídricos resultando em uma exposição contínua no meio ambiente, podendo ocasionar a sua bioacumulação devido a ineficiência das estações de tratamento de águas para degradá-las totalmente. Sendo assim, a biorremediação vem se mostrando uma forma bastante promissora para a eliminação de poluentes. Desta forma, o objetivo deste projeto foi de realizar tratamentos biológicos alternativos baseado no uso de fungos da podridão branca para a degradação do tamoxifeno (TAM) e compará-lo com o tratamento de fitorremediação em wetland construído. O fungo *T. versicolor* apresentou melhor desempenho no cultivo em meio sólido contendo TAM, e foi utilizado nos cultivos em meio líquido com diferentes concentrações do fármaco. A atividade elevada da lacase e a depleção da fonte de açúcar foram obtidas no quarto dia de incubação nos cultivos com menores concentrações de TAM. A degradação do fármaco em ambos os tratamentos foi analisada pela técnica de ATR-FTIR.

INTRODUÇÃO

Os fármacos entram em estações de tratamento de águas residuais (ETAR) através de efluentes hospitalares e industriais e, a partir de esgotos domésticos, no entanto, essas ETAR não são eficazes para a remoção completa dos resíduos desses medicamentos, e em razão disso, são encontrados em águas de superfície, ambientes marinhos e águas de consumo. O tamoxifeno (TAM), indicado para o tratamento de câncer de mama, não possui uma fácil eliminação nas ETAR, a presença deste fármaco na natureza é algo preocupante devido a sua toxicidade, seus efeitos de desregulação endócrina e seu potencial de bioacumulação (FERRANDO-CLIMENT et al., 2015), sendo necessário estudar meios para remover esses poluentes da natureza ou, até mesmo, inativar sua função biológica. Um procedimento muito visado para o tratamento ambiental, atualmente, é a biorremediação, pois é uma técnica mais sustentável e de baixo custo, que consiste no uso de agentes biológicos, geralmente plantas, microrganismos ou enzimas microbianas, com a finalidade de eliminar ou neutralizar os efeitos nocivos dos contaminantes (SAEED et al., 2022). Um dos métodos de biorremediação consiste

no uso de fungos para metabolizar os resíduos tóxicos presentes em ambientes contaminados, em especial os fungos da podridão branca (FPB) que possuem uma capacidade única de degradar moléculas complexas devido a produção de enzimas extracelulares não específicas, como a lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase (AUST, BENSON, 1993). Outro método consiste na utilização de plantas para a remediação, assim, uma tecnologia que tem mostrado eficiência para o tratamento de efluentes é o sistema wetland construído (WC), que busca imitar a natureza, composto por lagoas ou canais artificiais rasos com leito filtrante, onde são povoadas plantas aquáticas capazes de promover a diminuição ou remoção dos contaminantes dos efluentes industriais que são injetados para dentro desse sistema (SILVA et al., 2022). Assim, devido a importância e à complexidade da descontaminação de fármacos por apresentarem resistência a degradação, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial da utilização de fungos da podridão branca e plantas da espécie *Typha domingensis* em WCs para a degradação do tamoxifeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os fungos foram obtidos na coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos da UEM e o citrato de tamoxifeno em uma farmácia local.

Para os testes preliminares foram selecionados 3 fungos da podridão branca, sendo eles *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Ganoderma lucidum*, os quais foram cultivados em meio BDA preparado com batata, ágar bacteriológico a 1,8%, suplementado com glicose e extrato de levedura a 1%. Todos os materiais utilizados passaram por esterilização a 121 °C e 1 atm por 20 minutos antes do uso. O teste foi feito em duplicata e discos miceliais (Ø 2 cm) foram inoculados nas placas com BDA contendo 0 (controle) e 200 µg/mL de TAM para comparar o desempenho dos fungos na presença e na ausência do fármaco, e todos os cultivos foram incubados a 28 °C por 10 dias.

O fungo que apresentou melhor resultado foi utilizado para o cultivo em meio líquido, preparado com meio mineral suplementado com glicose a 0,5% e extrato de levedura a 0,2%, em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio. Foram feitos com diferentes concentrações 0 (controle), 20, 110 e 200 µg/mL de TAM. Dois discos miceliais foram inoculados nos frascos e deixados em condições agitadas a 110 rpm e 28 °C por 7 dias, sendo coletadas amostras diariamente para análises posteriores. A atividade da lacase (EC 1.10.3.2) foi medida com ABTS em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5) a 40 °C. A leitura das absorbâncias foi feita a 420 nm para verificar a atividade enzimática.

A dosagem de açúcares redutores foi realizada pelo método do 3,5-dinitrosalicílico (DNS), onde a glicose foi utilizada como padrão.

Amostras com 20 e 200 µg/mL foram preparadas para o tratamento de fitorremediação utilizando o sistema Wetland Construído com *Typha domingensis*, em parceria com o Laboratório de Genética Molecular e Citogenética de Peixes da Universidade Estadual de Maringá. Para avaliar e comparar a degradação do tamoxifeno nos dois tipos de tratamentos foi utilizada a técnica de ATR-FTIR para

determinar os diferentes picos de absorbância, realizada em parceria com o Departamento de Ciências da Universidade Estadual de Maringá.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 10 dias de incubação nos cultivos em meio sólido BDA, o fungo *T. versicolor* apresentou melhor desempenho frente a uma alta concentração de tamoxifeno (200 µg/mL), enquanto que *P. ostreatus* e *G. lucidum* apresentaram maiores dificuldades para seu crescimento. Com isso, *T. versicolor* foi selecionado para o cultivo em meio líquido.

A partir das amostras coletadas do meio líquido, a atividade da lacase foi encontrada ao longo do tempo de incubação nos cultivos de *T. versicolor* (Figura 1). O pico da atividade da lacase foi atingido no quarto dia nos cultivos contendo 20 e 110 µg/mL de TAM, e quanto ao cultivo com 200 µg/mL, devido a uma alta concentração do fármaco, o fungo pode ter tido um tempo maior para se adaptar ao meio e conseguir produzir lacase comparado com a sua atuação em concentrações menores.

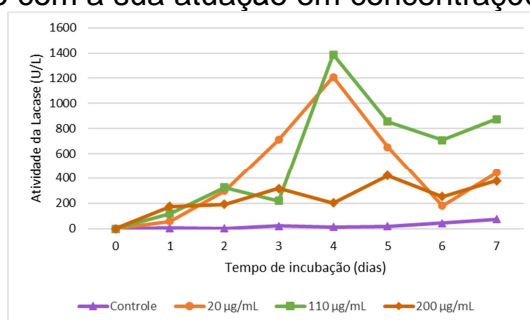


Figura 1 – Atividade da lacase do *T. versicolor* em diferentes concentrações de tamoxifeno.

Com base na análise de açúcares redutores (Figura 2), os cultivos contendo 20 e 110 µg/mL de TAM apresentaram uma redução considerável na quantidade de açúcar quando houve um aumento na atividade da lacase no quarto dia de incubação, enquanto que no cultivo contendo 200 µg/mL, o fungo apresentou um consumo significativo somente no sétimo dia.

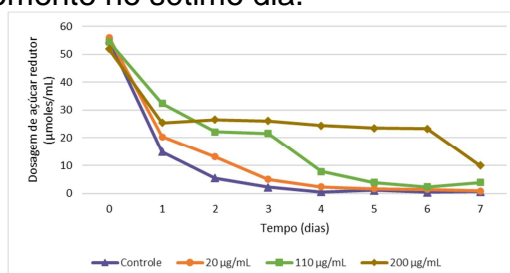


Figura 2 – Dosagem de açúcares redutores no cultivo em meio líquido do *T. versicolor*

Os espectros de ATR-FTIR para analisar degradação do TAM em ambos os tratamentos (Tabela 1) mostram que houve modificações da área da banda de alguns grupamentos químicos dos cultivos tratados e não tratados, indicando que ocorreu degradação do TAM. Nos espectros do tratamento em wetland construído foi

encontrado uma mudança no grupamento C-H em 2350 cm^{-1} , o que não foi observado no tratamento com *T. versicolor*.

Tabela 1 – Comparação realizada com tamoxifeno puro e a alteração baseada na área da banda

Número de onda (cm^{-1})	Grupo químico	<i>T. versicolor</i>		Wetland Construído	
		TAM 20 $\mu\text{g/mL}$	TAM 200 $\mu\text{g/mL}$	TAM 20 $\mu\text{g/mL}$	TAM 200 $\mu\text{g/mL}$
1095	NH	60%	10%	20%	70%
1660	CO	10%	0*	30%	20%
1910	CO	60%	15%	20%	0*
1925	COC	70%	0*	15%	0*
2045	CO	20%	15%	30%	0*
2135	CO	40%	0*	20%	30%
2350	CH	-	-	70%	50%

*não houve alteração

CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram que o fungo *T. versicolor* foi capaz de degradar parcialmente o tamoxifeno, no entanto, é necessário realizar mais pesquisas para analisar se realmente houve uma diminuição da toxicidade. E em relação ao tratamento de fitorremediação em wetland construído, a alteração química ocorreu em menor quantidade comparado ao tratamento com fungo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro. Ao meu orientador Rafael Castoldi e ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos (DBQ) - UEM.

REFERÊNCIAS

AUST, S.D., BENSON, J.T. The Fungus among Us: Use of White Rot Fungi to Biodegrade **Environmental Pollutants**. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 3, p. 232-233, 1993.

FERRANDO-CLIMENT, L. et al. Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. **Chemosphere**. v. 136, p. 9-19, 2015.

SAEED, M.U. et al. Microbial bioremediation strategies with wastewater treatment potentialities - A review. **Sci Total Environ.**, v. 818, 2022.

SILVA, J. R. R. et al. Wetlands construídas para tratamento de efluentes industriais: revisão. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 13, n. 4, 2022.