

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação do Papel de Enzimas Extracelulares e Intracelulares Produzidas por *P. ostreatus* INCQS 40310 na Degradação do Herbicida Propazina

Aline Ramalho Brandão Pereira^{1,2}, João Henrique de Oliveira Rangel¹, Anahi Costa de Carvalho e Silva¹, Leonardo Vitor Belo Pazutti¹, Manuela Da-Silva³, Richard Hemmi Valente⁴, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{1,2}

¹Instituto Nacional de Tecnologia/MCTI, Laboratório de Biocatálise (DCAP), Av. Venezuela, 82/302, Rio de Janeiro, RJ, Brasil - E-mail: aline.pereira@int.gov.br

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

⁴Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Laboratório de Toxinologia, Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

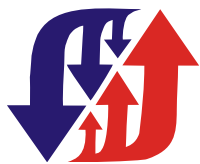
*O herbicida propazina é mundialmente utilizado em culturas de relevância econômica, e seu uso indiscriminado pode acarretar a contaminação dos corpos d'água. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de degradação de propazina por *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310, bem como investigar o papel de suas enzimas extracelulares e intracelulares no processo de degradação. Foram obtidos 85,0 % de degradação de propazina pelo cultivo fúngico após 22 dias; 37,5 % de degradação pela biomassa fúngica lavada e 26,5 % de degradação pelo sobrenadante fúngico bruto. Detectou-se a presença de proteínas no meio após o cultivo do fungo, para uma concentração de cerca de 0,83 µg/mL. Já para o tampão, após o teste de degradação de propazina pela biomassa lavada, a concentração proteica foi cerca de 10 vezes menor. Estes resultados indicam a atuação conjunta de enzimas intracelulares e extracelulares produzidas por *P. ostreatus* INCQS 40310 no processo de degradação de propazina.*

Palavras-chave: herbicidas triazínicos, propazina, biodegradação, fungo, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, principalmente devido ao fato do processo produtivo agrícola brasileiro ser dependente do uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos. Anualmente são despejados nas lavouras brasileiras o equivalente a 5,2 litros de agrotóxicos *per capita*. Dentre os agrotóxicos utilizados no país, os herbicidas são os mais empregados (CARNEIRO et al., 2015). O herbicida propazina (2-cloro-4,6-diisopropilamina-1,3,5-triazina) é utilizado em todo mundo, principalmente nas culturas de sorgo. Este herbicida é relativamente recalcitrante à degradação biológica, em virtude da presença do cloro e do anel triazínico em sua estrutura química. Estas características, aliadas aos fatos de ser descrito como potencial disruptor endócrino, neurotóxico e possivelmente carcinogênico, torna este composto um risco ao meio ambiente e à saúde humana (GHOLIVAND et al., 2012).

Os tratamentos de água convencionais não removem ou apenas degradam parcialmente compostos de difícil degradação ou presentes em baixas concentrações, como os pesticidas, dentre estes, o herbicida propazina. Assim, uma maior atenção tem sido dispensada



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

à utilização de tratamentos alternativos, como o tratamento biológico de águas e efluentes (MARINHO et al, 2009). Os fungos basidiomicetos ligninolíticos têm sido descritos como eficientes na degradação de herbicidas triazínicos (FAN e SONG, 2014), entretanto poucos relatam a degradação do herbicida triazínico propazina. Adicionalmente, ainda não há um consenso na literatura a respeito de quais enzimas são responsáveis pela degradação de herbicidas triazínicos (NGUYEN et al., 2014; CHENG et al., 2012). Dentro deste contexto, o presente projeto tem como objetivo estudar a degradação do herbicida propazina e entender o papel das enzimas intracelulares e extracelulares produzidas pelo fungo *P. ostreatus* INCQS 40310.

MATERIAL E MÉTODOS

P. ostreatus INCQS 40310 foi inoculado em meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA) e incubado por 7 dias (30 °C). Após este período, 3 discos obtidos da margem da colônia do fungo (5 mm), foram inoculados em frascos contendo 300 mL de meio de cultura PMP 12, desenvolvido por Pereira et al. (2013), e os mesmos foram incubados a 30 °C, 200 rpm. Em seguida, foi avaliada a degradação de propazina pelo cultivo, biomassa lavada e sobrenadante bruto de *P. ostreatus* INCQS 40310, e quantificadas/avaliadas as proteínas secretadas pelo fungo, conforme metodologia descrita a seguir:

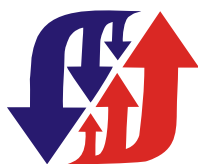
- **Degradação de propazina pelo cultivo de *P. ostreatus* INCQS 40310:** Após 7 dias de cultivo foi adicionado ao meio 10 mg/L de propazina. Após 17, 22, 27 e 32 dias de cultivo, alíquotas do meio foram retiradas e a degradação de propazina avaliada. Como controle foi utilizado o meio PMP 12 acrescido de 10 mg/L de propazina sem o inóculo fúngico.

- **Degradação de propazina pela biomassa lavada de *P. ostreatus* INCQS 40310:** Após 20 dias de cultivo a biomassa fúngica produzida foi filtrada, lavada três vezes com 100 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM pH 6,5, e incubada em frascos contendo o mesmo tampão acrescido de 10 mg/L de propazina (30 °C, 200 rpm). Após 7 dias, alíquotas do tampão foram retiradas, e a degradação de propazina avaliada. Como controle foi utilizado o tampão acrescido de 10 mg/L de propazina sem o inóculo fúngico.

- **Degradação de propazina pelo sobrenadante bruto de *P. ostreatus* INCQS 40310:** Após 20 dias de cultivo a biomassa produzida foi filtrada, e separada do sobrenadante bruto. A este último foi adicionada 10 mg/L de propazina, e após 24 horas de incubação (30 °C, 100 rpm), foram retiradas alíquotas do meio e a degradação de propazina foi avaliada.

- **Análises cromatográficas:** As alíquotas foram processadas em fase sólida e a degradação de propazina foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia descrita por Balesteros e colaboradores (2014).

- **Avaliação das proteínas secretadas por *P. ostreatus* INCQS 40310:** As proteínas presentes nos meios após o teste de degradação de propazina pelo cultivo e pela biomassa lavada de *P. ostreatus* INCQS 40310 foram concentradas 33 vezes em AMICON®, e “trocadas” contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, para um fator de diluição de 1089 vezes. Em seguida as proteínas foram quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA) e avaliadas por eletroforese SDS-PAGE sob condições desnaturantes e redutoras. A revelação dos géis foi feita por Coomassie coloidal (G-250). A Figura 1 apresenta um esquema contendo todos os ensaios descritos acima.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

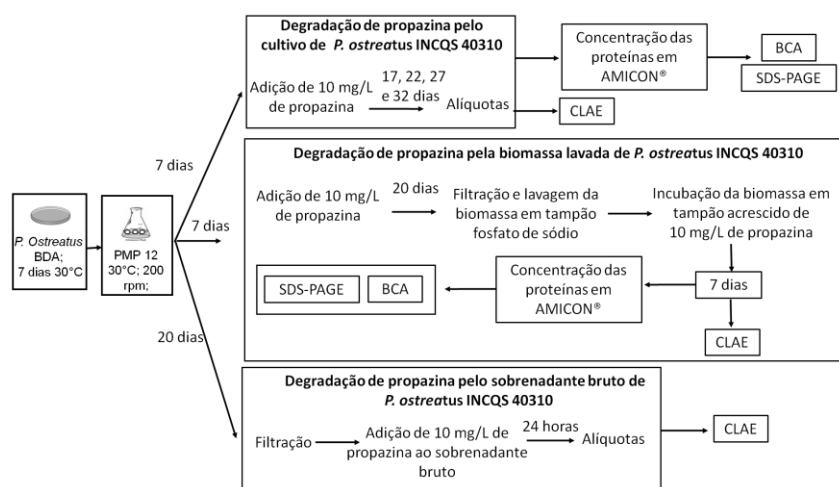


Figura 1: Esquema dos ensaios realizados para a avaliação da degradação de propazina por *P. ostreatus* INCQS 40310, bem como para a avaliação do papel das enzimas extracelulares e intracelulares no processo de degradação.

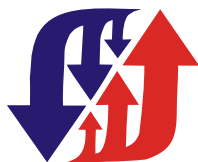
RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **Degradação de propazina pelo cultivo de *P. ostreatus* INCQS 40310:** Foram obtidos $66,0 \pm 2,3$; $85,0 \pm 1,1$; $87,0 \pm 1,9$ e $89,0 \pm 2,8$ % de degradação após 17, 22, 27 e 32 dias de cultivo, respectivamente. Entretanto, após 22 dias de cultivo, mais de 80% de propazina foi degradada (Pereira et al., 2016).

- **Degradação de propazina pela biomassa lavada de *P. ostreatus* INCQS 40310:** Foram obtidos $37,5 \pm 0,9$ % de degradação de propazina pela biomassa lavada de *P. ostreatus* INCQS 40310, após 7 dias de incubação. Vale ressaltar que a biomassa foi previamente cultivada no meio PMP 12 por 20 dias (propazina adicionada ao meio após o 7º dia de cultivo) (Pereira et al., 2016). Este resultado pode indicar a atuação de enzimas intracelulares no processo de degradação, uma vez que o meio de cultivo, juntamente com grande parte das enzimas extracelulares produzidas por *P. ostreatus* INCQS 40310 foram removidos após a lavagem da biomassa. Adicionalmente, a degradação de herbicidas triazínicos também é relacionada à atuação das enzimas intracelulares do complexo citocromo P450 (DONG et al., 2010).

- **Degradação de propazina pelo sobrenadante bruto de *P. ostreatus* INCQS 40310:** Obteve-se 26,5 % de degradação de propazina pelo sobrenadante bruto de *P. ostreatus* INCQS 40310, produzido após 20 dias de cultivo do fungo no meio PMP 12 (Pereira et al., 2016). Este resultado mostra que as enzimas extracelulares produzidas por *P. ostreatus* INCQS 40310 também são responsáveis pela degradação de propazina. Entretanto, outros estudos são necessários para o conhecimento acerca de quais enzimas extracelulares estão atuando neste processo.

- **Quantificação e avaliação das proteínas secretadas por *P. ostreatus* INCQS 40310:** Os secretados (após concentração de cerca de 33 vezes e “trocas” contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, para um fator de diluição de 1089 vezes), das amostras de degradação de propazina pelo cultivo e da biomassa lavada de *P. ostreatus* INCQS 40310, apresentaram concentrações proteicas de $0,83 \pm 0,05$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $0,05 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

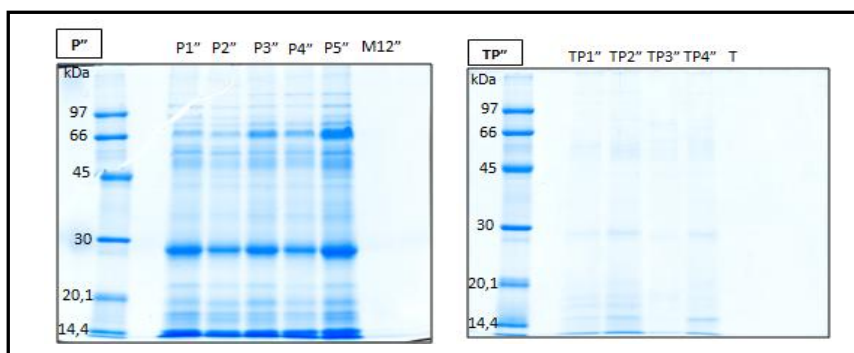


Figura 2: Géis SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras das amostras de degradação de propazina após o cultivo de *P. ostreatus* INCQS 40310 (P'': quintuplicata P1'' a P5'') e após o teste de degradação de propazina pela biomassa lavada de *P. ostreatus* INCQS 40310 (TP'': quadruplicata TP1'' a TP4''). As amostras foram concentradas 33 vezes em AMICON® e “troçadas” contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 para um fator de diluição de 1089 vezes. Revelação por Coomassie coloidal (G-250). Nota: A primeira raia do gel é correspondente aos padrões de massa molecular (kDa).

As análises das amostras, após concentração de 33 vezes, relativas à quantificação de proteínas e padrão eletroforético (Figura 2) mostram a presença de uma quantidade significativa de proteína após o teste de degradação de propazina pelo cultivo de *P. ostreatus* INCQS 40310 (0,83 µg/µL e Figura 2, inserto P''). Dentre as proteínas detectadas, podem estar presentes algumas enzimas extracelulares responsáveis pela degradação de propazina. Entretanto, uma quantidade bem menor de proteína foi detectada no tampão, após o teste de degradação de propazina pela biomassa fúngica lavada (0,05 µg/µL e Figura 2, inserto TP''). Este resultado pode indicar a atuação de enzimas intracelulares na degradação de propazina promovida pela biomassa fúngica lavada.

CONCLUSÕES

Estes resultados mostram a atuação de enzimas intracelulares e extracelulares no processo de degradação da propazina. Adicionalmente, os resultados obtidos reforçam o potencial do fungo *P. ostreatus* INCQS 40310 para ser utilizado em biocatálise ambiental na degradação do herbicida propazina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balesteros MR, De Sá LRV, Pereira PM, Da Silva M, De Oliveira MAL, Ferreira-Leitão VS. 2014. Monitoring of atrazine biodegradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310 through the simultaneous analysis of atrazine and its derivatives by HPLC. *Biotransformation and Biotransformation*. 32:1:23-33.
- Carneiro FF, Da-Silva ALG, Rigotto R. M.; Friedrich, K.; Búrigo, A. C. 2015. Dossiê abrasco Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular.
- Cheng KE, Bi Yun-Feng, Shen, Ming-Hao. 2012. Research on the Optimum Degradation Conditions of Atrazine by White Rot Fungi *Laccase*. *Agrochemicals*, 04:261-263.
- Dong T, Wu GW, Wang XN, Gao JM, Chen JG, Lee SS. 2010. Microbiological transformation of diosgenin by resting cells of filamentous fungus, *Cunninghamella echinulata* CGMCC 3.2716. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67:251-256.
- Fan X, Song F. 2014. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. *Journal of Soils and Sediments*, 14:10:1727-1737.
- Gholivand MB, Malekzadeh G. 2012. Computational design and synthesis of a high selective molecularly imprinted polymer for voltammetric sensing of propazine in food samples. *Talanta*, 89:513-520.
- Marinho R, Nobre G, Bezerra Z, Rodrigues K, Marinho G. 2009. Resumos do 4º Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, Belém.
- Nguyen LN, Hai FL, Kang J, Leusch FDL, Roddick F, Magram SF, Price WE, Nghiem LD. 2014. Enhancement of trace organic contaminant degradation by crude enzyme extract from *Trametes versicolor* culture: Effect of mediator type and concentration. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 45:1855-1862.
- Pereira PM, Teixeira RSS, De-Oliveira MAL, Da-Silva M, Ferreira-Leitão VS. 2013. Optimized Atrazine Degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310: an Alternative for Impact Reduction of Herbicides Used in Sugarcane Crops. *J Microb Biochem Technol*, 01:6-13.
- Pereira ARB, Pereira PM, De-França AF, Da-Silva M, Ferreira-Leitão, VS. 2016. Propazine degradation by intra- and extracellular enzymes from *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. *Biocatál Biotransfor (IMPRESS study)*.