

Biodegradação da Benzofenona-3

Biodegradation of Benzophenone-3

RESUMO

Gabriel França Flizikowski
Gabriel.f.1997@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Marlene Soares
Marlenesoares_br@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal
Do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do fungo da podridão branca *Pleurotus ostreatus*, e do extrato bruto de lacase, produzido pelo *Trametes* sp. realizarem a degradação da Benzofenona-3 (BP3), um filtro ultravioleta amplamente utilizado. Os experimentos foram conduzidos em condição submersa (erlenmeyer), 28°C, com concentração inicial de 10 mg/L. A biodegradação foi avaliada pelo cultivo do fungo, em um meio composto por 8 g de glicose e 1,9 g de cloreto de amônio. Os fungos foram inoculados na forma de pellets e foi avaliado, também, o efeito da adição de indutores ao meio. O melhor resultado obtido foi a remoção de 100% da BP3 do meio, sendo, aproximadamente, 60% via biodegradação. O estudo realizado com extrato bruto de cultivo de *Trametes* sp., foi conduzido com BP3 à concentração de 5 e 10 mg/L e extrato bruto a 100, 600 e 1000 unidades de lacase por litro, obtendo uma degradação de 24,4 % para a última condição. Os resultados permitiram observar que, sob as condições estudadas, a biodegradação da BP3 pode ser obtida tanto pela inoculação da biomassa fúngica quanto pelo extrato bruto de lacase.

PALAVRAS-CHAVE: Filtro ultravioleta. Fungos da podridão branca. Biodegradação.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate capacity of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* and the crude laccase extract produced by *Trametes* sp. perform the degradation of Benzophenone-3 (BP3), a widely used ultraviolet filter. The experiments were conducted under a submerged(erlenmeyer) condition, 28°C, with an initial concentration of 10 mg/L. Biodegradation was evaluated by fungus cultivation in a medium composed by 8 g of glucose and 1.9 g of ammonium chloride. The fungi were inoculated in the form of pellets and the effect of adding inducers to the medium was also evaluated. The best result obtained was the removal of 100% of BP3 from the medium, being approximately 60% via biodegradation. The study with *Trametes* sp. Crude extract was conducted with BP3 at a concentration of 5 and 10 mg/L and crude extract at 100, 600 and 1000 laccase units per liter, resulting in a 24,4% degradation to last condition. The results allowed to conclude that, under the studied conditions, the biodegradation of BP3 can be obtained by inoculating the fungal biomass as well as the crude laccase extract.

KEYWORDS: UV filter. White-rot fungi. Biodegradation

1 INTRODUÇÃO

Filtros ultravioleta (UV-Fs – uv filters) são substâncias utilizadas por indústrias farmacêuticas e cosméticas na composição de produtos que apresentam a capacidade de reduzir os danos causados pela radiação ultravioleta à pele e ao cabelo. Estas substâncias são utilizadas, também, por indústrias químicas, na formulação de produtos como tintas, plásticos e pigmentos a fim de melhorar a resistência à degradação pela incidência de luz solar (GAGO-FERRERO et al., 2013)

O fotoprotetor estudado neste trabalho foi a Benzofenona-3 sendo este um UV-F amplamente utilizado na indústria de cosméticos em produtos como protetores solares, e química, por exemplo, em corantes, a fim de conferir maior resistência dos produtos à radiação.

A preocupação em relação à contaminação por fotoprotetores está relacionada aos conhecidos efeitos negativos que estes podem ter sobre os ecossistemas aquáticos e a saúde humana, no caso da BP3, Ye e colaboradores (2019) verificaram que esta pode causar alterações no sistema endócrino e possuir atividade carcinogênica

Um dos métodos estudados para realizar a remoção destes compostos do meio ambiente é a biodegradação, que pode ser definida como a redução biologicamente catalisada da complexidade de compostos químicos, ou seja, a quebra de substâncias orgânicas através da ação de microrganismos (GHACHTOULI, 2013).

Esse processo pode ser realizado por fungos, leveduras e bactérias (GHACHTOULI, 2013). Neste caso, os organismos estudados foram os basidiomicetos ou fungos da podridão branca, tendo em vista sua conhecida capacidade para degradação de contaminantes. Os basidiomicetos, em geral, utilizam a madeira como substrato para o crescimento, degradando a lignina presente e consumindo a celulose (BADIA-FABREGAT et al., 2014). Essa degradação ocorre pela ação de seu sistema enzimático, que libera as enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase capazes de degradar grupos fenólicos e não fenólicos (BADIA-FABREGAT et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi estudar a biodegradação da Benzofenona-3 pela exposição ao fungo *Pleurotus ostreatus*, pertencente ao filo Basidiomycota. Também foi avaliada a capacidade de degradar a BP3 do extrato bruto de lacase produzido pelo fungo *Trametes* sp. As respostas obtidas foram quantificadas através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PREPARO DOS INÓCULOS

O preparo dos inóculos foi feito seguindo os procedimentos descrito por Font e colaboradores (2003). Inicialmente, foi feito o repique simples em placas de Petri (contendo meio Ágar Batata Dextrose), sendo inoculados em estufa a 28°C por sete dias.

Em seguida, para produzir os primeiros pellets, adicionou-se dois plugs, discos de 10mm de diâmetro cortados da zona de crescimento dos fungos, em um Erlenmeyer contendo 150 ml de meio extrato de malte 2% e colocado em agitador rotativo orbital (shaker) a 120 rpm e 23°C, durante cinco dias. Resultando em pellets de tamanho considerável, impróprios para a inoculação dos experimentos.

Posteriormente, transferiu-se parte dos inóculos para um tubo contendo água e desagregou-se as biomassas fazendo uso de um sonicador tipo haste, sendo então novamente inoculados em meio extrato de malte 2% a 120 rpm e 28 °C durante cinco dias. Obtendo, desta vez, pellets de tamanho menor, já próprios para a inoculação. Transferiu-se, então, os inóculos, com auxílio de uma espátula com colher, para Erlenmeyers contendo solução salina (0,85% de NaCl), os quais foram armazenados em geladeira.

2.2 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA BP3 PELO FUNGO *Pleurotus ostreatus*

O estudo teve como objetivo determinar a capacidade do fungo *Pleurotus ostreatus* realizar a degradação da Bp3. A inoculação foi realizada utilizando o *Pleurotus ostreatus*, na forma de pellet, cultivado em estufa a 28°C por sete dias. Foi utilizado um meio composto apenas por 8 g de glicose e 1,9 g de cloreto de amônio, criado modificando o descrito por Badia-Fabregat e colaboradores (2014).

A concentração inicial de fotoprotetor foi de 10 mg/L e a do fungo 5 g/L em peso seco. Com o objetivo de maximizar a degradação pelo fungo foram feitas inoculações contendo substâncias com potencial para aumentar a produção de lacase e conseqüentemente o potencial de biodegradação. No caso as substâncias escolhidas foram o Tween 80, na concentração de 0,1%, e o sulfato de cobre na concentração de 1 mmol/L.

Os microrganismos foram cultivados em triplicata, utilizando Erlenmeyers de 125 ml (cobertos com papel alumínio), com 30 ml de meio de cultivo e adicionado 300 µL de solução estoque de BP3 a 1 g/L, colocados em estufa durante 7 dias a 28°C (BADIA-FABREGAT et al., 2012; GAGO-FERRERO et al., 2012). Após o período de incubação, o meio foi separado das biomassas por filtração a vácuo em membrana de fibra de vidro, estes foram armazenados em frascos âmbar e mantidos congelados, a temperatura de aproximadamente - 10°C, para posterior análise.

Ao final do processo, foi feito o acompanhamento da degradação dos filtros através de análise em espectrofotômetro da marca Shimadzu para as três amostras de cada uma das três diferentes condições. A BP3 removida do meio foi calculada considerando tanto a quantidade removida por adsorção ao micélio quanto por biodegradação. A quantificação do fotoprotetor presente no meio de cultivo ao final do experimento foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.3 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PELO EXTRATO BRUTO DE LACASE PRODUZIDO PELO FUNGO *Trametes* sp.

Foram conduzidos experimentos para avaliar também a degradação quando da inoculação direta de um extrato enzimático rico em lacase, produzida a partir do fungo *Trametes* sp..

Para o preparo do extrato enzimático de lacase foram inoculados dois plugs, em Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de um meio otimizado para produção de lacase, preparado modificando o descrito por Hermann (2015). Os fungos foram incubados por sete dias a 28°C, em condição estática.

Posterior ao período de incubação o conteúdo dos Erlenmeyers foi filtrado em papel filtro Whatman n°1 e centrifugado a 10000 rpm (força gravitacional = 6720 g) por 10 minutos para obtenção do extrato enzimático bruto.

O ensaio foi realizado modificando o descrito por Hermann (2015). Adicionou-se BP3, na concentração de 5 mg/L ou 10 mg/L, extrato bruto enzimático rico em lacase, com atividades de 100, 600 ou 1000 U/L, completando 5 ml com tampão de acetato de sódio 50 mmol e pH 5. Os tubos foram colocados em estufa a 37°C durante 24 h e após uma hora de reação foi retirado uma alíquota de 0,2 ml para a realização da quantificação da lacase inoculada utilizando um espectrofotômetro da marca *Shimadzu*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DA BP3 PELO FUNGO *Pleurotus ostreatus*

A maior taxa de biodegradação foi observada no meio contendo sulfato de cobre (63,4%), neste estudo, no experimento em que estava presente foi verificado uma taxa de biodegradação 5,5% superior a observada no meio sem este composto. No caso do Tween, o aumento foi menor, 2,9%, mostrando que o sulfato de cobre foi um indutor mais eficiente.

Os resultados obtidos nesta etapa estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da remoção de BP3 do meio no experimento com *Pleurotus ostreatus* na concentração de 5 g/L de biomassa seca, utilizando meio simples, pellets e cultivo estático

Amostra	Remoção por biodegradação (%)		Remoção por adsorção (%)		Remoção total (%)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Bp3	57,99	3,96	42,01	3,96	100	0
Bp3 + Tween	60,80	4,01	39,20	4,01	100	0
Bp3 + CuSO ₄	63,42	8,28	36,58	10,11	100	0

No estudo de Badia-Fabregat e colaboradores (2014) a autora obteve, também, uma remoção de 100% do meio, entretanto a taxa de adsorção ao meio foi de apenas 19,6%, confirmado por experimentos com o fungo morto através do uso de autoclave. Este efeito pode estar relacionado com a diferença entre o cultivo agitado e estático, mostrando que a agitação pode não ter efeito direto sobre as taxas de biodegradação, mas sim sobre as de adsorção e relacionado com

o uso da autoclave para inativar os fungos, que também causa a modificação dos grupos funcionais presentes na parede celular.

3.2 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PELO EXTRATO BRUTO DE LACASE PRODUZIDO PELO FUNGO *Trametes* sp.

O estudo envolvendo o extrato bruto de lacase produzido pelo *Trametes* sp. apresentou resultados positivos, sendo a maior taxa de biodegradação de 24,4%. Comparando-se as duas técnicas de inoculação avaliadas neste trabalho, o menor tempo de inoculação, a simplicidade de se trabalhar com o extrato bruto de lacase em comparação a biomassa fúngica, a eliminação da necessidade de se desenvolver procedimentos para tratar a BP3 adsorvida à biomassa, conclui-se que a utilização do extrato bruto de lacase é uma forma promissora de remoção de fotoprotetores do meio aquoso.

Os resultados obtidos nesta etapa estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados de degradação de BP3 do meio, nas concentrações de 5 e 10 mg/L e extrato bruto de lacase após 24 horas de cultivo

Unidades	Atividade da lacase após 1 hora(U/L)	BP3 inicial		BP3 final		Remoção total (%)
		Média	DP	Média	DP	
100	34	4,0	0,4	4,3	0,2	0
	41,3	10,1	0,8	10	0,6	0,1
600	239,5	9,1	0	7,6	0	1,5
	381,7	12,7	0,4	9,6	0	3,1
1000	1254,3	6,1	0,2	4,2	0,6	1,9
	1577,8	11,5	0	9,6	0,3	1,9

4 CONCLUSÃO

A avaliação dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho permite concluir que a biomassa do fungo *Pleurotus ostreatus*, inoculada na forma de pellets, possui a capacidade de remover a BP3 presente no meio estudado.

AGRADECIMENTOS

Aos laboratórios de Microbiologia, Biotecnologia, Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLIEC), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS

BADIA-FABREGAT, M. et al. Degradation of uv filters in sewage sludge and 4-mbc in liquid medium by the ligninolytic fungus *trametes versicolor*. *Journal of Environmental Management*, v. 104, p. 114 – 120, 2012. ISSN 0301 4797. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712001582>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

BADIA-FABREGAT, M. et al. Use of stable isotope probing to assess the fate of emerging contaminants degraded by white-rot fungus. *Chemosphere*, v. 103, p. 336-342, 2014. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653513016949>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

FONT, X. et al. Black liquor detoxification by laccase of *trametes versicolor* pellets. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 78, n. 5, p. 548–554, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.834>>. Acesso em: 08 mar. 2019.

GAGO-FERRERO, P. et al. Evaluation of fungal and photo-degradation as potential treatments for the removal of sunscreens bp3 and bp1. *Science of The Total Environment*, v. 427-428, p. 355 – 363, 2012. ISSN 0048-9697. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712004949>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GHACHTOULI, N. E. Biodegradation: Involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. In: CHAMY, R. (Ed.). *Biodegradation*. Rijeka: InTech, 2013. cap. 11. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/56194>>. Acesso em: 6 abr. 2019.

HERMANN, A. C. *Biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas lignolíticas de basidiomicetos*. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) — Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Curitiba, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/9042s>>. Acesso em: 17 mai. 2019

YE, Z. et al. Photoelectro-fenton as post-treatment for electrocoagulated benzophenone- 3-loaded synthetic and urban wastewater. *Journal of Cleaner Production*, v. 208, p. 1393-1402, 2019. ISSN 0959-6526. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652618331974>>. Acesso em: 20 jun. 2019.