

**Avaliação da remoção de 17 β -Estradiol por caldo enzimático de *Pleurotus sajor-caju*
CCB019**

Evaluation of 17 β -Estradiol removal by *Pleurotus sajor-caju* CCB019 enzymatic breath

Maycon Eduardo Matias¹, Suellen Zucco Bez¹, Julia Carolina Soares², Luciano Henrique
Pinto³

¹Universidade da Região de Joinville, Acadêmico do Curso de Farmácia, Joinville, Santa Catarina, Brasil

²Farmacêutica Residente, Maternidade Darcy Vargas, Joinville, Santa Catarina, Brasil

³Universidade da Região de Joinville, Departamento de Farmácia, Joinville, Santa Catarina, Brasil

Autor para correspondência: Luciano Henrique Pinto

Universidade da Região de Joinville, Departamento de Farmácia

Rua Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Distrito Industrial, CEP 89219-710

Joinville, Santa Catarina, Brasil

Tel: +55 47 3461-9091

E-mail: lucianoefar@gmail.com

Submetido em 02/12/2020

Aceito em 06/01/2021

DOI: <https://doi.org/10.47456/hb.v2i1.33523>

RESUMO

O meio ambiente está cada vez mais contaminado por substâncias químicas não naturais, a maioria delas produzidas por humanos. Alguns desses poluentes têm a capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio na célula dos mamíferos, causando efeitos estrogênicos indesejáveis. Estudos anteriores avaliaram a capacidade de remoção de sistemas enzimáticos, mas a relação custo-benefício é um problema destes, uma vez que deve ser aplicada em maior escala. Portanto, alternativas de baixo custo podem ser benéficas, e usar uma enzima não purificada diretamente do caldo enzimático produzido por fungos ligninolíticos é uma delas. Assim, este estudo utilizou o caldo enzimático de *Pleurotus sajor-caju* CCB019 contendo lacase para remover o 17 β -estradiol de uma amostra. Após 1h de tratamento a análise da solução contendo 17 β -estradiol e caldo enzimático (pH 6,5, temperatura ambiente) por Cromatografia Gasosa, com detector de ionização de chama, mostrou remoção de 5,81% da concentração inicial e 7,13%, após 2h. O processo catalisado por lacase usando o caldo enzimático mostrou muito pouco potencial para remoção de 17 β -estradiol sob essas condições.

Palavras-chave: Estrogênio. Lacase. Remoção Enzimática. Estradiol.

ABSTRACT

The environment is gradually getting more contaminated by unnatural chemical substances, most of them produced by humans. Some of these pollutants have the ability to bind to estrogen receptors in the mammalian cell causing undesirable estrogenic effects. Previous studies have evaluated the removal capacity of enzymatic systems, but cost-efficiency is a problem with these once it has to be applied to a bigger scale. Therefore, low-cost alternatives could be beneficial and using an unpurified enzyme directly from the enzymatic broth produced by ligninolytic fungi is one of them. Thus, this study used the enzymatic broth from *Pleurotus sajor-caju* CCB019 containing laccase to remove 17 β -estradiol from a sample. After a 1h treatment, the analysis of the solution containing 17 β -estradiol and enzymatic broth (pH 6.5, ambient temperature) by Gas Chromatography with flame ionization detector showed removal of 5.81 % of the starting concentration and 7.13 % after 2 h. The laccase-catalyzed process using the enzymatic broth showed very little potential for removal of 17 β -estradiol under these conditions.

Keywords: Estrogen. Laccase. Enzymatic Removal. Estradiol.

INTRODUÇÃO

O meio ambiente como um todo vem sendo gradativamente contaminado com substâncias advindas do uso e da produção humana. Entre estas substâncias destacam-se os interferentes endócrinos (IEs), substâncias químicas que se assemelham estruturalmente a hormônios e que agem mimetizando a suas ações (YUNJUNG et al., 2008). O 17 β -Estradiol, um derivado do estrógeno, é capaz de interferir no sistema endócrino tanto de animais quanto de seres humanos e é diariamente produzido e excretado por humanos e animais diretamente no esgoto doméstico, na forma de conjugados polares inativos.

Existem diversos relatos a respeito da presença de derivados de estrogênios que são encontrados nas estações de tratamentos de efluentes (ETEs) na forma livre, sugerindo que ocorrem reações de transformação dessas substâncias durante o processo de tratamento na ETE, no qual não há técnicas efetivas para a remoção destes compostos (BILA et al., 2003).

O estrogênio natural 17 β -estradiol é formado por 18 carbonos com um anel fenólico, que é o componente farmacofórico responsável pela alta afinidade em se ligar ao receptor de estrogênio e promover a resposta estrogênica. Sua estrutura ainda conta com uma hidroxila ligada ao anel de cinco membros, responsável pelas ligações adicionais ao receptor, porém quando ocorre a alteração do anel fenólico, a afinidade pelo receptor estrogênico é suprimida (FERREIRA, 2008).

Existem, atualmente, estudos que investigam os sistemas de remoção química e enzimática sendo aplicados a diversos IEs, incluindo o 17 β -Estradiol, com sua aplicabilidade ao tratamento nas ETEs ainda a ser avaliado. Os Processos Químicos Avançados (POA) são tecnologia promissora e economicamente atraentes na remoção destes micropoluentes em sistemas aquosos, como o uso isolado ou combinado de peróxido de hidrogênio, ozônio e emissão UV (BILA et al., 2003; PINTO et al., 2014), no qual se promove a oxidação da hidroxila fenólica levando a uma redução da atividade farmacofórica desta região, não a levando a interagir com o receptor biológico. Entretanto, riscos de efeitos antagonistas ou outros efeitos biológicos podem ocorrer e a toxicidade residual precisa ser melhor estudada nesses casos (PINTO et al., 2016).

O uso de fungos lignolíticos e enzimas isoladas também demonstra grande potencial, com principal atenção voltada a lacases e tirosinases, com sua capacidade de remover IEs já estabelecida em alguns trabalhos. Trata-se de um processo que também envolve a remoção da hidroxila fenólica, além de outras reações no qual acredita-se que os subprodutos gerados sejam não-tóxicos ou facilmente removíveis por processos secundários. Acredita-se, ainda, nesse

processo, que existe a possibilidade da formação de um sistema com enzimas imobilizadas que permitiria a reutilização do mesmo, diminuindo a geração de subprodutos e de custos de produção e manutenção dos reagentes envolvidos (CABANA et al., 2007; MACELLARO et al., 2014). Entretanto, o preço comercial das enzimas purificadas apresenta-se como um limitante quanto ao uso desse processo.

Existem diversas isoformas das enzimas capazes de degradar IEs, sendo que em cada uma delas há variação das condições ótimas para que se obtenha a ação desejada (MADHAVI et al., 2009).

As espécies do gênero *Pleurotus*, pertencentes à classe dos basidiomicetos, compõem um grupo de cogumelos dispersos mundialmente, que apresentam grande agressividade, produtividade e adaptabilidade e seu complexo enzimático inclui as enzimas ligninases e lacase (BERTTIN et al., 2011). Deste gênero, pouco se sabe sobre a isoforma produzida pela espécie *Pleurotus sajor-caju*, não havendo sequer a forma isolada da mesma disponível comercialmente, e se sua atividade de remoção de IEs é comparável a outros métodos.

Desta maneira, o propósito deste estudo é avaliar a eficácia na remoção de 17 β -Estradiol usando-se caldo de cultivo bruto de *Pleurotus sajor-caju* CCB019 comparando-se com outros processos químicos e enzimáticos já presentes na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

Este estudo foi realizado nos Laboratório de Biotecnologia, Fotobiologia e Fotoquímica e Análise Instrumental da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). Tratou-se de um estudo experimental, envolvendo o uso de Lacase contida no caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* CCB019 (BETTIN et al., 2011; SILVA, 2014) no qual foi avaliada a capacidade de remoção do Interferente Endócrino 17 β -Estradiol.

Preparo das amostras

Preparou-se uma solução estoque de 17 β -Estradiol (6mg ml⁻¹) preparada a partir de um padrão (Sigma Aldrich ®). Devido a sua baixa solubilidade em água, a solução foi preparada utilizando-se acetona PA (Alphatec®), conforme Bila e Dezotti, 2003.

Processo de Remoção

Amostras de 20ml contendo 0,6g L⁻¹ (2,2 nM) de 17 β -Estradiol foram submetidas, em

duplicata, a reação com solução aquosa de caldo de cultivo bruto de *Pleurotus sajor-caju* CCB019 (atividade padronizada em 110 U L⁻¹) sob agitação constante por um período de 2h. Foi utilizada a proporção de 50:1 (U L⁻¹: nM de 17β-Estradiol), sem ajuste de pH (medido em 6,5) para reduzir o conteúdo aquoso do sistema, evitando problemas de solubilidade (Figura 1). Alíquotas para análise de remoção foram coletadas imediatamente após o início da reação (T0), no intervalo de 1 h (T1) e após o término (2 h, T2) - tempos estes utilizados na maioria dos estudos que visam avaliar o perfil de remoção (TAMAGAWA et al., 2006; AURIOL et al., 2008; SCHULTER et al., 2013).

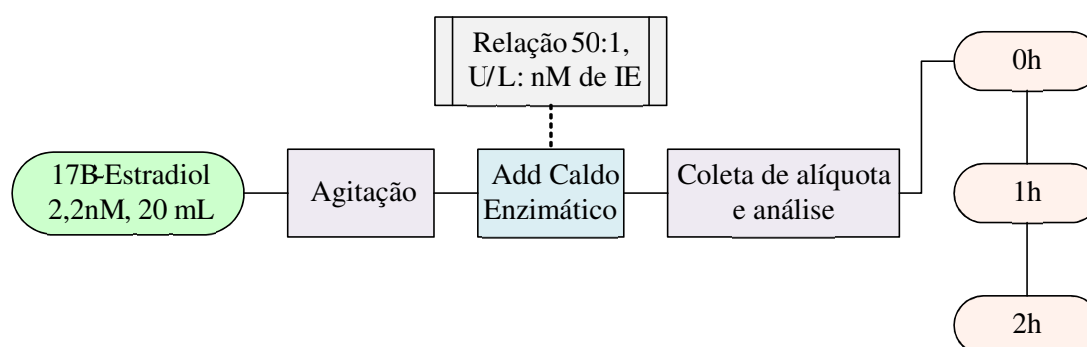


Figura 1. Esquema de análises de investigação proposta. Fonte: os autores.

De posse da quantidade removida nesse processo estudado, fez-se as médias e pode-se então conhecer a quantidade de 17β-Estradiol eliminada em cada um dos tempos em estudo, para efeitos de comparações com outros métodos que utilizaram lacases e comparação a um método anteriormente proposto utilizando Processos Oxidativos Avançados a base de Ozônio e H₂O₂ (BILA et al., 2003).

Avaliação da Atividade de Lacase e detecção de hormônio residual

A atividade de lacase foi determinada medindo-se a oxidação de 5 mM de 2,2-azino-bis-(3-ethyliazolino-6-sulfonato) (ABTS) ao seu radical catiônico (ABTS⁺) a 420nm em tampão acetato de sódio a 30° C pelo caldo de *Pleurotus sajor-caju* (proporção de caldo para solução de ABTS 1:9). Com o resultado obtido, imediatamente solubilizou-se o caldo para obter-se 110 U L⁻¹. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol do substrato ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 36000 M⁻¹ cm⁻¹; de acordo com a equação 1.

$$U L^{-1} = \frac{\Delta abs \times 10^6}{\epsilon \times R \times t}$$

Equação 1. Determinação de Unidade de atividade enzimática

Para a detecção do hormônio foi usada análise a Cromatografia Gasosa pareada com detector por ionização de chama (Agilent Technology 7890A ®). Foi utilizado uma coluna C18, Zorbax Eclipse plus (5µm, 4,6x250 mm) Agilent Technologies. Foram injetados padrões de 17β-Estradiol para obter o tempo de retenção e avaliação da sensibilidade do detector. Os parâmetros cromatográficos fluxo (1,2 mL.min⁻¹), volume de injeção (100 µL), tempo de retenção (8,6 minutos), pressão (100 bar), temperatura (26° C) e fase móvel (acetona) foram ajustados de forma a melhorar as condições de análise. A seleção do comprimento de onda de emissão e excitação foi adotada com base em Pinto et al. (2014), assim como os solventes utilizados e água ultrapura acidificada com HCl (0,01 N) a pH 3.

As análises foram feitas imediatamente após a coleta da alíquota, a fim de se evitar que a reação se processasse e não se obtivesse a concentração real esperada no tempo estipulado para a análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias obtidas da análise em Cromatografia Gasosa para as concentrações de 17β-Estradiol estão expressos na figura 2. No gráfico nota-se uma redução da concentração em T0 (0,589g L⁻¹, 2,16 nM) devido a adição do volume de caldo (proporção de 1:200 num volume de 20 mL) sendo, portanto, previsível esta redução de concentração. Ao analisar a concentração no tempo correspondente a 1 h, (T1), observou-se uma redução na concentração de 17β-Estradiol, passando da concentração inicial citada de 0,589g L⁻¹ para 0,555g L⁻¹ (2,03 nM).

Mantendo-se a exposição do hormônio ao caldo contendo lacase notou-se uma nova redução de T1 para T2, porém sendo de apenas 0,008g L⁻¹, o que fez um total de 0,547g L⁻¹ (2,00 nM) durante todo o tempo estipulado. Em termos de porcentagem, em relação a concentração inicial houve remoção parcial de 5,81 % do conteúdo inicial de 17β-Estradiol em T1 que aumentou para 7,13 % em T2, sendo a diferença entre os tempos de apenas 1,32 %.

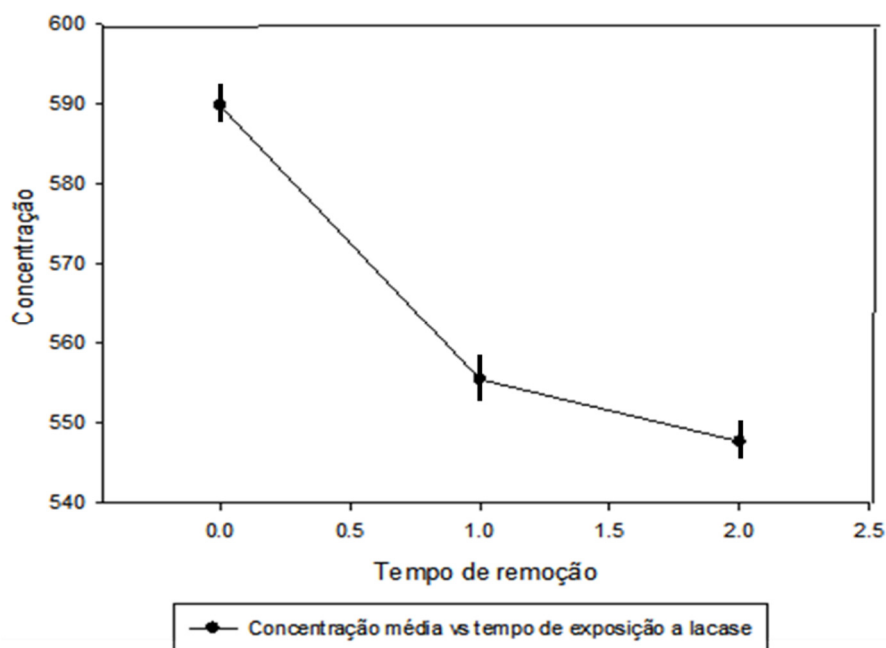


Figura 2. Redução média entre as duplicatas realizadas no teste, com seus desvios padrões.

O uso de meios alternativos que busquem a remoção de poluentes emergentes como os interferentes endócrinos (IE) tem sido a tônica de vários trabalhos acadêmicos. Enzimas redutoras de grupos fenólicos vêm sendo utilizadas a um bom tempo (AURIOL et al., 2008; SILVA, 2014; TAMAGAWA et al., 2006), entretanto, questões como a otimização do meio para a remoção do IE (pH, temperatura e tempo principalmente) esbarram na questão do custo, no qual a possibilidade de se usar enzimas em caldo bruto acarretaria redução substancial no custo do processo. Lacases estão presentes em caldos brutos advindos de cultivos diversos e podem ter perfis diferentes de ação, seja pela concentração obtida, seja pela ação sinérgica de outras substâncias presentes. Ou pelo contrário, ter ação comprometida pelos mesmos motivos citados anteriormente.

Os resultados encontrados na figura 2 apresentam-se bem discrepantes quando comparado com outros estudos que utilizaram lacase purificada de outros organismos (*Phanerochaete sordida* e *Trametes versicolor*), conforme podemos verificar na tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre estudos envolvendo lacase.

Concentração (nM)	Enzima (Lacase)		Remoção de Atividade Estrogênica (%)	Tempo de remoção (h)	Referência	
	17β-Estradiol	Origem				Atividade (U ml ⁻¹)
1		<i>P. sordida</i> ^{PP}	0,6	97	1	Tamagawa et al. (2006)
1		<i>P. sordida</i> ^{PP}	0,6	100	2	Tamagawa et al. (2006)
0,4 x 10 ⁻³		<i>T. versicolor</i> ^P	20	100	1	Auriol et al (2008)
2,2		<i>P. sajor-caju</i> [*]	0,11	5,81	1	Este estudo
2,2		<i>P. sajor-caju</i> [*]	0,11	7,13	2	Este estudo

^P Lacase purificada disponível comercialmente; ^{PP} Lacase parcialmente purificada a partir de cultivo; ^{*} Lacase em caldo não purificada

No trabalho desenvolvido por Tamagawa et al. (2006) nota-se uma remoção quase que completa já no tempo de 1 hora, chegando a sua totalidade em 2 horas com o acréscimo de apenas 3 %. Isto significa que a maior atividade de remoção acontece em um prazo inicial, sendo a hora seguinte pouco significativa em termos de eficiência na remoção. Os resultados encontrados nesse trabalho apresentaram um perfil de remoção semelhante quanto ao tempo de atividade, sendo a primeira hora a mais ativa da enzima. Todavia, a quantidade removida ficou aquém do considerado satisfatório quando comparado a lacase pura.

Ainda em Tamagawa et al. (2006), bem como outros trabalhos do grupo, foi utilizada suspensão de micélio do fungo (*P. sordida*) e medida sua capacidade de remoção de IE, obtendo-se resultados que se assemelham aos de Libardi-Júnior et al. (2010), onde a remoção só foi significativa após períodos muito mais longos (24 h neste, 48 h naquele), que corroboraram com o pico de atividade de lacase nos experimentos citados. Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados esperados, uma vez que a enzima não purificada começaria a ter seu pico de atividade em tempos maiores (TAMAGAWA et al., 2006).

A proporção de Unidades por litro (U L⁻¹) de atividade enzimática para nanomolares (nM) de hormônio usada nos experimentos também pode contribuir para a discrepância de resultados. Neste trabalho foi usada a proporção de 50:1, quando a menor proporção utilizada por outros autores foi de 600:1 (TAMAGAWA et al., 2006), podendo chegar a valores ainda maiores (AURIOL et al., 2008).

Comparando-se os dados do presente trabalho com os de remoção por POA de PINTO et al. (2014), como demonstra-se na tabela 2, nos mesmos tempos, observa-se uma clara

dissonância entre os resultados obtidos, havendo remoção completa já com 1h de reação (PINTO et al., 2014), sendo que em outro experimento constatou-se que o uso de POA gera remoção completa já com 20 minutos de reação (PINTO et al., 2014), indicando que o método seria mais eficaz inclusive que os outros processos usando enzimas purificadas já citados neste trabalho.

Tabela 2. Comparação entre estudos envolvendo lacase e Processos Oxidativos Avançados.

Processo de Remoção		Remoção de Atividade Estrogênica (%)	Tempo de remoção (h)	Referência
Concentração (nM)	Tipo			
1,83	Ozônio/H ₂ O ₂	100	1	Shulter et al. (2013)
1,83	Ozônio/H ₂ O ₂	100	2	Shulter et al. (2013)
1	Lacase ^{PP}	97	1	Tamagawa et al. (2006)
1	Lacase ^{PP}	100	2	Tamagawa et al. (2006)
0,4 x 10 ⁻³	Lacase ^P	100	1	Auriol et al. (2008)
2,2	Lacase*	5,81	1	Este estudo
2,2	Lacase*	7,13	2	Este estudo

^P Lacase purificada disponível comercialmente; ^{PP} Lacase parcialmente purificada a partir de cultivo; * Lacase em caldo não purificada

Os dados obtidos neste trabalho revelam que o uso do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* tem eficácia reduzida na remoção de 17 β -Estradiol, quando comparado a outros métodos presentes na literatura e o perfil de ação dos métodos oxidativos catalisados por lacase tem um comportamento comum em todos os trabalhos avaliados, incluindo este, tendo a maior parte de sua ação em um período curto, que tende a diminuir ao longo do tempo (TAMAGAWA et al., 2006; AURIOL et al., 2008; SCHULTER et al., 2013).

O uso de lacase não purificada foi avaliado em dois outros trabalhos e a remoção só foi observada após períodos muito mais longos (TAMAGAWA et al., 2006; LIBARDI-JÚNIOR, 2010), porém, o pequeno aumento após a primeira hora de experimento (1,31 %) aqui demonstrado, denota que o potencial de remoção da enzima no caldo de cultivo pode ter seu potencial catalizador esgotado antes do tempo utilizado naquelas publicações (mais de 24 h).

Por fim, para uma melhor avaliação um estudo mais longo avaliando a remoção após 2h de reação seria necessário, ainda que não seja usual na literatura. Outras condições das soluções (pH e temperatura) e presença de interferentes no caldo também poderiam ser melhor avaliados em trabalhos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AURIOL M, MEKNASSI-FILALI Y, ADAMS CD, TYAGI RD, NOGUEROL T, PIÑA B. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70(3): 445-452, 2008.
2. BETTIN F, ROSA LO, MONTANARI Q, CALLONI R, GAIO TA, MALVESSI E, SILVEIRA MM, DILLON AJP. Growth kinetics, production and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process biochem* 46(3): 758-764, 2011.
3. BILA DM, DEZOTTI M. Fármacos no Meio Ambiente. *Quim. nova* 26(4): 523-530, 2003.
4. CABANA H, JONES P, AGATHOS S. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J. biotechnol* 132(1): 23-31, 2007.
5. CASTRO ALA, PAIVA PCA, DIAS ES, SANTOS J. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor-caju*. *Ciênc. agrotec* 28(3): 608-613, 2004.
6. FERREIRA MGM. Remoção da Atividade Estrogênica de 17 β -Estradiol e de 17 α -Etinilestradiol pelos Processos de Ozonização e O₃/H₂O₂. Tese (Doutorado em Ciências - Engenharia Química), COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008, 192f.
7. LIBARDI-JÚNIOR N. Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010, 140f.
8. MACELLARO G, PEZZELLA C, CICATIELLO P, SANNIA G, PISCITELLI A. Fungal Laccases Degradation of Endocrine Disrupting Compounds. *BioMed res. int. (Online)* (2014): n. pag., 2014.
9. MADHAVI V, LELE SS. Laccase: Properties and applications. *BioResources* 4(4): 1694-1717, 2009.
10. PINTO LH, STEINBACH H, KRÜGER VM, SCHULTER LS, SIERTH R, CIAMPO LD, ERZINGER GS. Avaliação do risco de potencial ecotoxicológico de resíduos de 17 β -Estradiol obtidos pós-processo oxidativo a base de peróxido de hidrogênio destinados a remoção deste hormônio. *Rev. ciênc. farm. básica apl* 35(3): 435-441, 2014.
11. PINTO LH, CARDOZO G, SOARES JC, ERZINGER GS, Toxicidade ambiental de

- efluentes advindo de diferentes laboratórios de uma farmácia magistral. *Rev. Ambient. Água [online]* 11(4): 819-832, 2016.
12. SCHULTER LS, VIEIRA AC, PINTO LH. Avaliação do risco de potencial ecotoxicológico de resíduos de 17β -estradiol obtidos pós-processo oxidativo a base de Ozônio/H₂O₂. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia), Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2013, 76f.
 13. SILVA GM. Expressão de enzimas de *Pleurotus spp.* e descoloração do corante azul índigo. Dissertação (Mestrado em Ciências - Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014, 121f.
 14. TAMAGAWA Y, YAMAKI R, HIRAI H, KAWAI S, NISHIDA T. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65(1): 97-101, 2006.
 15. YUNJUNG K, YEO S, KIM MK, CHOI HT. Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa*. *FEMS microbiol. Let* 284(2): 172-175, 2008.