

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLIFOSATO POR PEROXIDASE IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA DE Fe_3O_4

KEMUEL SILVA FRANÇA¹; JOSÉ FÁBIO FRANÇA ORLANDA¹

AFILIAÇÃO

¹Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas (CCENT), Rua Godofredo Viana, 1300 - Centro, Imperatriz – MA, 65.901-480.

RESUMO

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é um herbicida de amplo espectro, não-seletivo, sistêmico, pós-emergente muito usado para eliminar várias plantas de ciclos anuais e perenes. O uso excessivo causa graves desequilíbrios ao meio ambiente, tornando esta atividade a principal fonte de contaminantes tóxicos. Vários são os métodos convencionais de tratamento disponíveis para a remoção de agrotóxicos no meio ambiente, que nem sempre são eficientes e geralmente apresentam custo elevado e geração de resíduos sólidos, necessitando assim uma nova etapa de tratamento. A pesquisa por enzimas oxiredutases associadas a suportes de nanopartículas magnéticas (MNPs) encontram-se em acelerado esforço de investigação como possível alternativa a alguns processos convencionais. Com isso, o presente trabalho visa avaliar a degradação de glifosato empregando a enzima peroxidase imobilizada em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 . Os resultados mostraram que a atividade máxima da enzima PDO do extrato enzimático de buriti foi observada em pH 5,0 com $2,7 \text{ U mL}^{-1}$. O tratamento térmico nas temperaturas de 45 a 75°C durante o período de 5 a 20 minutos, não foi capaz de inativar atividade enzimática, observando-se máxima inativação ($60,01 \pm 0,11\%$) da atividade com 5 minutos de tratamento, a 75°C . O teor proteico da polpa do buriti apresentou 2,91% de proteína ($727,50 \text{ mg/5 g}$), em sua composição. A síntese de Fe_3O_4 apresentou rendimento de 62,11%. A imobilização com a enzima POD foi de 34,6%. Os ensaios de degradação enzimática com POD imobilizada em nanopartícula magnética, foram de 42,70 a $62,10 \pm 0,102\%$, nas concentrações de 4,0 a $14,0 \text{ mg L}^{-1}$, durante 30 min. Após 120 min., a degradação foi de 100% e a partir desse tempo a enzima perde gradativamente a sua ação catalítica.

PALAVRAS-CHAVE: Glifosato; Peroxidase- Fe_3O_4 ; Degradação.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento acelerado da agricultura tem aumentado à necessidade do uso de herbicidas para controle de diversas pragas e doenças. Nas últimas décadas, os herbicidas formulados a base de glifosato têm ganhado expressão e importância, em virtude do

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

crescimento na área semeada com grandes monoculturas, facilidade de manuseio, eficácia de controle, ganhos de produtividade, entre outros (ZHANG et al., 2022).

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, possibilitando um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas. Atua como um potente inibidor da atividade da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indol acético (IAA). Sendo classificado como potencial contaminante ambiental, visto que é altamente hidrossolúvel (YAN et al., 2018).

A busca por tecnologias viáveis para remediar a poluição ambiental por agrotóxicos motiva o desenvolvimento de pesquisas com enzimas livres ou imobilizadas, que promova a capacidade de degradar com enfoque sustentável. As principais vantagens do tratamento enzimático quando comparadas a tratamentos convencionais incluem: aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil processo de controle, entre outros (CARVALHO; ORLANDA, 2017).

Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pela catálise enzimática e dos avanços alcançados em relação à eficiência das oxirredutases, o seu elevado custo ainda limita sua aplicação. Neste cenário, a imobilização em suportes sólidos tem se mostrado uma excelente alternativa, uma vez que a enzima pode ser reutilizada e sua estabilidade melhorada, diminuindo o custo final do processo (KALSOOM et al., 2022).

Dentre os diferentes suportes utilizados, as nanopartículas magnéticas vêm ganhando grande destaque por apresentarem características ideais para imobilização de enzimas, incluindo elevada área superficial, eficiente retenção de atividade, além de permitir que os biocatalisadores imobilizados sejam recuperados de forma rápida e simples (MOHAMED et al., 2017).

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

METODOLOGIA

Coletas de amostras de buriti

As amostras dos frutos maduros de buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) foram coletadas na zona rural do município de Imperatriz (Maranhão) e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC) da UEMASUL. Após a coleta, os melhores frutos foram separados, lavadas em água corrente, água destilada e separação da polpa.

Extração da enzima peroxidase bruta

A extração da enzima peroxidase (POD) da polpa de buriti foi obtida de 25 g da amostra com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0). Em seguida, esse material foi filtrado, centrifugado (18000 rpm) a 4 °C durante 5 minutos e o sobrenadante (fonte enzimática) foi armazenada a 4 °C para posterior análise, conforme metodologia descrita por Carvalho e Orlanda (2017).

Caracterização da peroxidase nos extratos enzimáticos brutos

A atividade da enzima peroxidase foi determinada utilizando o substrato guaiacol e peróxido de hidrogênio, como descrito por Khan e Robinson (1994). A mistura de 1,5 mL de solução 1% de guaiacol em tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,5) e 1,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,5), foi previamente incubado em cubeta a temperatura ambiente durante 10 minutos em espectrofotômetro Femto 800 XI. Em seguida foi adicionada 0,4 mL de solução 0,33% de H₂O₂ em tampão citrato fosfato 0,05 M (pH 5,5) e 0,1 mL da enzima bruta. A reação foi acompanhada registrando-se o aumento na absorbância a 470 nm durante 5 minutos a 35 °C contra o branco. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto.

O efeito do pH (2,6 a 10) e faixa de temperatura (10 a 100 °C) na atividade da enzima peroxidase no extrato bruto foi avaliada conforme Khan e Robinson (1994). A enzima peroxidase do extrato bruto foi precipitada utilizando acetona resfriada a 4 °C, na proporção de 2:1 (acetona:extrato) em banho de gelo por aproximadamente 3 minutos, e em seguida centrifugada a 11.000 xg por 15 minutos a 5 °C. O precipitado contendo as enzimas, foram

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

submetidas à secagem em placas de vidros ao ar livre em ambiente refrigerado, pulverizado e estocado a 5 °C.

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972), pelo método do biureto empregando albumina de soro bovino como padrão de proteína.

Síntese e imobilização da enzima peroxidase em nanopartículas magnéticas

A síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 foi baseada no método de co-precipitação proposta por Feuser et al. (2015). A eficiência de imobilização foi calculada

pela equação:
$$Y = \frac{AE_R}{AE_0} \times 100$$
. Em que: Y corresponde à eficiência de imobilização (%); AE_R corresponde à atividade enzimática retida no suporte (U mL^{-1}); AE_0 corresponde à atividade enzimática antes do processo de imobilização (U mL^{-1}).

A caracterização das nanopartículas magnéticas e imobilizada com a enzima peroxidase foi realizada por meio das técnicas de termogravimetria (TGA) e espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (ATR-FTIR), em parceria com os Laboratórios de Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST) e Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, Campus de Imperatriz.

Estudo da degradação enzimática de glifosato

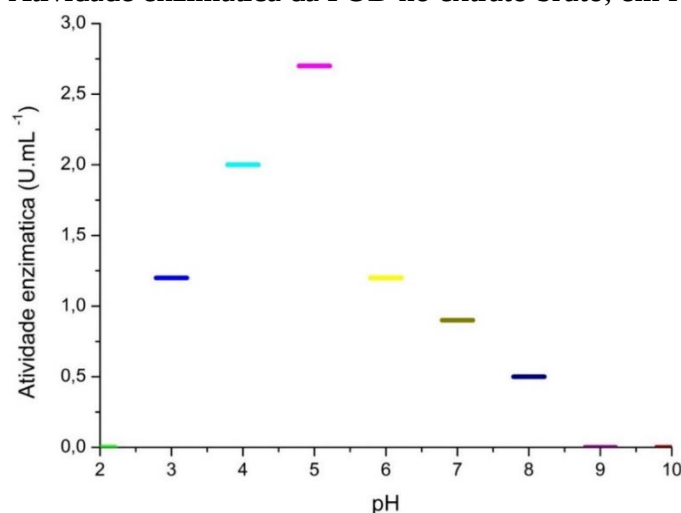
Os ensaios de degradação enzimática foram realizados com pH 5,0 do meio reacional, concentração de glifosato (3 a 14 mg L^{-1}) e $1,0 \text{ g}$ de peroxidase-nanopartícula magnética de Fe_3O_4 a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, em triplicatas. A cada 5 minutos, uma alíquota foi retirada análise da concentração remanescente do glifosato por metodologia espectrofotométrica proposta por Sharma et al. (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH ideal para extração da enzima POD foi estimado realizando experimentos com a variação de pH 2-10, usando guaiacol como substrato. A atividade máxima da enzima POD da polpa de buriti observada em pH 5,0 foi de $2,7 \text{ U mL}^{-1}$ (Gráfico 1).

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

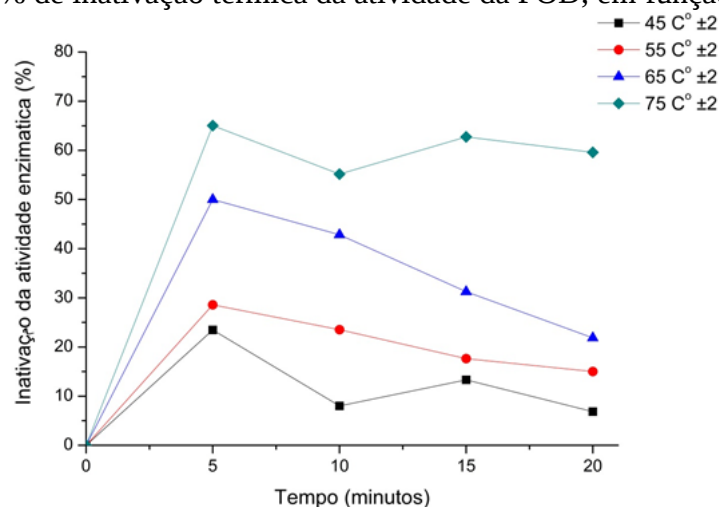
Gráfico 01. Atividade enzimática da POD no extrato bruto, em função do pH.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O estudo do efeito térmico nos extratos concentrados nas temperaturas de 45 a 75 °C por períodos de 5, 10, 15 e 20 minutos, estão apresentados no Gráfico 2. Analisando as variações da atividade da PDO no tratamento térmico, temos um máximo de inativação de $60,01 \pm 0,11\%$ a 75 °C, após 05 minutos. Estes resultados demonstram que a enzima tem estabilidade térmica a temperaturas mais altas.

Gráfico 2. % de inativação térmica da atividade da POD, em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O extrato enzimático bruto de buriti apresentou concentração proteica de 2,91% (727,50 mg em 25 g) em sua composição. Sendo que o fruto *in natura* apresenta quantidades

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

superior ao observado.

Na síntese da nanopartícula magnética de Fe_3O_4 foi possível obter um rendimento de 62,11 %, a partir da metodologia proposta por Feuser et al. (2015) e confirmação por Difração de raios-X (DRXP). A síntese das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 apresentou rendimento de 3,69%, com cor e propriedades magnéticas características. A confirmação da formação de óxido de ferro ocorreu mediante a observação do difratograma. A análise experimental apresentou picos em $18,4^\circ 2\theta$, $30,3^\circ 2\theta$, $35,6^\circ 2\theta$, $37,34^\circ 2\theta$ e $43,25^\circ 2\theta$. A magnetita cristaliza no sistema cúbico, com grupo espacial $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$, com arestas de 8,3941 Å.

A análise de DSC das nanopartículas apresentou evento exotérmico largo em $426,51^\circ\text{C}$, que pode estar relacionado ao cristalização de nanopartículas de óxido de ferro (temperaturas acima de $680,4^\circ\text{C}$). Na temperatura de $720,2^\circ\text{C}$ houve uma transformação de fase de $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ (cúbica) para $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$ (robomédrica).

A quantificação do glifosato foi realizada por meio da curva padrão, através de regressão linear, com medidas de absorbâncias realizadas em 570 nm. Na faixa de concentração entre 4,0 a $14,0 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato e $n = 10$, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9969, desvio padrão de 0,06 e limite de detecção estimado de $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$. Obtendo a equação: $Y = 0,0509x + 0,1107$.

No estudo da degradação do glifosato foram utilizadas 25,0 mL de solução de glifosato ($3,0$ a $14,0 \text{ mg L}^{-1}$), 4,0 mL de peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 1,0 g das microesferas de alginato-quitosana-peroxidase e tempo de reação de 30 min., como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Percentual de degradação do herbicida glifosato com enzimas acopladas a nanopartículas magnéticas.

Concentração do glifosato (mg L^{-1})	Porcentagem de degradação (%)
3,0	61,50
5,0	62,10
7,0	50,80
11,0	49,90
14,0	42,70

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A maior taxa de degradação enzimática foi obtida para o experimento utilizando $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de glifosato, o qual apresentou redução de $62,10 \pm 0,10\%$ da concentração inicial, em 30 minutos de reação (Tabela 1). No entanto, com o aumento da concentração de glifosato

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

de 6,0 a 14,0 mg L⁻¹, a taxa de degradação apresentou redução de 50,80 ± 0,129 a 62,10 ± 0,09%, comprovando a relação entre as variáveis percentual de degradação enzimática e as concentrações do herbicida.

Após 120 minutos do início do processo reacional, os percentuais de degradação apresentaram 100% em todas as concentrações testadas, indicando excelente eficiência em termos de quebra das ligações químicas da molécula.

Com isso, os resultados obtidos nestes experimentos podem ser otimizados para se obter um tempo menor de reação e melhorar a eficiência do processo de degradação do herbicida glifosato.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificamos que a atividade máxima da enzima PDO do extrato enzimático de buriti foi observada em pH 5,0 com 2,7 U mL⁻¹. O estudo do tratamento térmico nas temperaturas de 45 a 75 ° C durante o período de 5 a 20 minutos, permitiu verificar que o tratamento térmico utilizado não foi capaz de inativar atividade enzimática, observando-se máxima inativação (60,01 ± 0,11%) da atividade com 5 minutos de tratamento, a 75 °C. O teor proteico da polpa do buriti apresentou 2,91% de proteína (727,50 mg/5 g), em sua composição. A síntese da nanopartícula magnética de Fe₃O₄ apresentou rendimento de 62,11%. A imobilização com a enzima POD foi de 34,6%. Os ensaios de degradação enzimática com POD imobilizada em nanopartícula magnética, verificou-se uma remoção de 42,70 a 62,10 ± 0,102% nas concentrações de 4,0 a 14,0 mg L⁻¹, durante 30 min. Após 120 min., a degradação foi de 100% e a partir desse tempo a enzima perde gradativamente a sua ação catalítica.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, Jhonatam de Oliveira; ORLANDA, José Fábio França. Heat stability and effect of pH on enzyme activity of polyphenol oxidase in buriti (*Mauritia flexuosa* Linnaeus f.) fruit extract. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 233, n. 1, p. 159-163, 2017.

FEUSER, Paulo Emílio; BUBNIAK, Lorena dos Santos; SILVA, Maria Claudia dos Santos;

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

VIEGAS, Alexandre da Cas; Fernandes, Andrielle Castilho; RICCI-JUNIOR, Eduardo; NELE, Marcio; TEDESCO, Antônio Claudio; SAYER, Claudia; ARAÚJO, Pedro Henrique Hermes de. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **European Polymer Journal**, United Kingdom, v. 68, n. 1, p. 355-365, 2015.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

KALSOOM, Umme; AHSAN, Zainab; BHATTI, Haq Nawaz; AMIN, Faiza; NADEEM, Raziya; AFTAB, Kiran; BILAL, Muhammad. Iron oxide nanoparticles immobilized *Aspergillus flavus* manganese peroxidase with improved biocatalytic, kinetic, thermodynamic, and dye degradation potentialities. **Process Biochemistry**, United Kingdom, v. 117, n. 1, p. 117-133, 2022.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

MOHAMED, Saleh A.; AL-HARBI, Majed H.; ALMULAİK, Yaaser Q.; IBRAHIM, Ibrahim H.; EL-SHISHTAWY, Reda M. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2017.

SHARMA, D. K.; GUPTA, Atul; KASHYAP, Rajinde; KUMAR, Naresh. Spectrophotometric method for the determination of glyphosate in relation to its environmental and toxicological analysis. **Archives of Environmental Science**, [s.l.], v. 6, n.1, p. 42-49, 2012.

YAN, Shu-feng; MUHAMMAD, Sher; LIU, Hai-fang; TIE, Shuang-gui; SUN, Shu-ku. Identifying glyphosate tolerant maize by soaking seeds in glyphosate solution. **Journal of Integrative Agriculture**, Netherlands, v. 17, n. 10, p. 2302-2309, 2018.

ZHANG, Yang; DONG, Zhaomin; PENG, Zheng; ZHU, Jingquan; ZHUO, Fuyan; LI, Yang; MA, Zhihong. A nation wide survey on the endosulfan residues in Chinese cotton field soil: Occurrence, trend, and ecological risk. **Environmental Pollution**, United Kingdom, v. 309, n. 15, 2022.