

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Extração da enzima peroxidase obtida por *Cucurbita pepo* para potencial utilização em nanobiossensores

Daniela Kunkel Muenchen<sup>1</sup>, Janine Martinazzo<sup>1</sup>, Alana Marie de Cezaro<sup>1</sup>, Aline Rigo<sup>1</sup>,  
Alexandra Nava Brezolin<sup>1</sup>, Mateus Nava Mezaroba<sup>1</sup>, Lucélia Hoehne<sup>2</sup>, Fábio de Lima  
Leite<sup>3</sup>, Rosicler Colet<sup>1</sup>, Clarice Steffens<sup>1</sup> e Juliana Steffens<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos – URI Erechim  
Av. Sete de setembro, 1621– 99709-910 Erechim – RS - E-mail: [rosicler.colet@yahoo.com.br](mailto:rosicler.colet@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UNIVATES  
Rua Avelino Tallini, 171 - 95900-000 Lajeado – RS

<sup>3</sup>Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba  
Rodovia João Leme dos Santos, km 110 (SP 264) – 18052780 Sorocaba – SP

### RESUMO

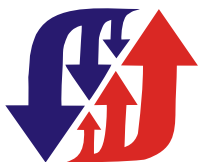
*A enzima peroxidase foi extraída da abobrinha (Cucurbita pepo) através de um método rápido, de baixo custo e eficiente, em diferentes condições: presença e ausência de agente protetor e a diferentes pHs de solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O estudo de estabilidade mostrou que, nas condições estudadas, sob armazenamento refrigerado a 4°C, a peroxidase extraída em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 foi a que apresentou a melhor estabilidade ao longo de 70 dias, mantendo-se, durante este período, com cerca de 80% de atividade residual. O comportamento do glifosato na inibição enzimática da peroxidase também foi avaliado pela técnica de espectrofotometria no UV/Vis, onde a inibição ficou em torno de 40%. Devido a esse comportamento, a peroxidase extraída de tecido vegetal tem potencial para ser utilizada como elemento de reconhecimento biológico em nanobiossensores de cantilever para detecção de glifosato em águas.*

Palavras-chave: peroxidase; extração enzimática; biossensor.

### INTRODUÇÃO

As peroxidases (EC 1.11.1.x) são enzimas oxirredutases que podem ser isoladas a partir de tecidos vegetais (rabanete, abobrinha, batata doce, etc.) animais ou microrganismos (Damodaran et al., 2008). O procedimento para sua extração de tecidos vegetais é fácil, rápido e de custo reduzido (Fatibello Filho e Vieira, 2002). Entre as espécies do gênero *Cucurbita*, a *Cucurbita pepo*, de nome usual abobrinha, representa uma das mais importantes culturas vegetais em todo o mundo em termos de consumo de alimentos (Vicente-Dólera et al., 2014). A abobrinha é um fruto não-climatérico colhido em um estágio imaturo (Carvajal et al., 2015).

No caso do glifosato, herbicida mais consumido mundialmente (Dun et al., 2014), na literatura são encontrados trabalhos que utilizam a enzima peroxidase como elemento de reconhecimento biológico para sua detecção em nanobiossensores, onde esta é baseada no efeito inibitório da atividade enzimática pelo pesticida (Oliveira, 2012). Desta forma, o presente estudo tem como objetivo realizar a extração da enzima peroxidase obtida por *Cucurbita pepo*, avaliando sua estabilidade e interação com o herbicida glifosato, para



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

posterior utilização em nanobiossensores de cantilever na detecção do herbicida glifosato em águas.

### MATERIAL E MÉTODOS

As abobrinhas (*Cucurbita pepo*), tipo Itália, utilizadas como fonte vegetal de peroxidase, foram adquiridas em um supermercado de Erechim. A solução de glifosato 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foi preparada a partir de uma solução de glifosato 50  $\text{mg.L}^{-1}$ , em solução tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  (pH 6,5), no momento da sua utilização. No experimento, foi utilizado o herbicida comercial Rond Up WG, da MONSANTO.

#### *Extração Enzimática*

Os extratos vegetais contendo peroxidase foram obtidos segundo o método descrito por Oliveira et al. (2012) e Fatibello-Filho e Vieira (2002) com modificações. Foram realizados ensaios na presença e ausência de agente protetor (2,5g de polivinilpirrolidonas) a diferentes pHs de solução tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  (7,0; 6,5 e 6,0).

A atividade da peroxidase foi determinada pela técnica de espectrofotometria no UV/Vis, baseada na reação entre o guaiacol e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a qual é catalisada pela peroxidase, formando como produto o tetraguaiacol, de coloração alaranjada (Zeraik et al., 2008). Mediu-se a absorbância em  $\lambda=470$  nm, imediatamente após a mistura dos reagentes (2,7mL de guaiacol 0,05M, 0,1mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,01M e 0,2mL de extrato enzimático) até um tempo reacional de 2min (Fatibello-Filho e Vieira, 2002). Uma unidade de atividade (unidades. $\text{mL}^{-1}$ ) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, nas condições mencionadas, sendo calculada pela Equação 1 (Oliveira et al., 2012). A atividade foi avaliada de 5 em 5 dias, do dia inicial até o 30º dia, e após esse período foram feitas análises no 40º e no 70º dia, em função de um tempo de armazenamento maior.

$$\text{Atividade enzimática (Unidades/mL)} = (\Delta \text{Absorbância} \times 1000) / (\Delta t \times V) \quad (\text{Eq. 1})$$

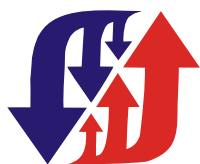
Onde:  $\Delta$ Absorbância = variação de absorbância;  $\Delta t$  = variação do tempo reacional, em min (2 min); V = volume do extrato enzimático utilizado no ensaio, em mL (0,2 mL).

#### *Inibição da peroxidase pelo herbicida glifosato*

Para avaliar o comportamento do glifosato na inibição da atividade enzimática da peroxidase foi utilizada a técnica de UV/Vis, onde realizou-se ensaios conforme Tabela 1. A concentração de 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de glifosato foi usada neste estudo em razão de ser a concentração máxima permitida em águas, segundo a Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005). As análises foram realizadas em triplicata, utilizando tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$  (pH 6,5).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos no estudo da estabilidade da atividade enzimática da peroxidase extraída de abobrinha são apresentados na Figura 1. A peroxidase extraída em tampão fosfato pH 7,0 sem agente protetor foi a que apresentou a melhor estabilidade ao longo de 70 dias, mantendo-se, durante este período, com cerca de 80% de atividade. Já a extração realizada em



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

pH 6,5 na presença de agente protetor apresentou uma boa estabilidade. As extrações realizadas em pH 6,0 foram as que apresentaram as maiores oscilações durante o período de armazenamento.

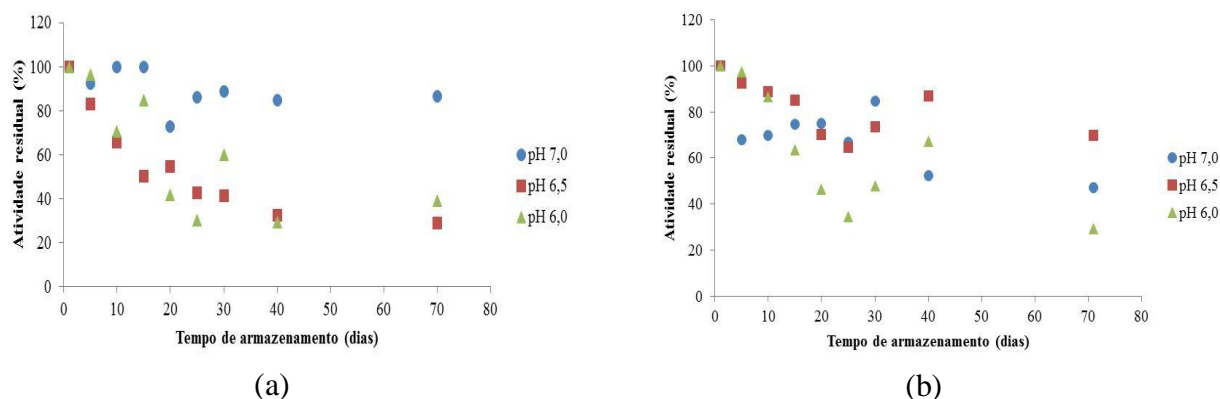


Figura 1: Estabilidade da enzima peroxidase obtida de abobrinha a) na ausência e b) na presença de agente protetor.

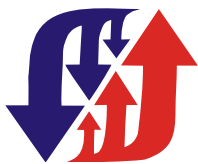
Vieira, Lupetti e Fatibello-Filho (2003) ao avaliar a estabilidade da peroxidase obtida de abobrinha (extração com pH 6,0 na presença de agente protetor) observaram uma boa estabilidade ao longo de 80 dias de armazenamento, sendo que a atividade residual apresentou oscilações de cerca de 10%. Oliveira (2007) avaliou a estabilidade da peroxidase de jiló utilizando-se três procedimentos para a extração da enzima: água a 4°C, tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0), tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e Polyclar SB-100. Até 25 dias de armazenamento, não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima para os três processos de extração. Porém, após 25 dias, comprovou-se a necessidade do tampão fosfato para manter a estabilidade da enzima, mas não houve diferença significativa entre os processos de extração somente com tampão, e com tampão e Polyclar.

Em vista da posterior aplicação da enzima em um nanobiossensor, e para eliminar possíveis interferentes, definiu-se como a melhor condição, a extração da enzima peroxidase em solução tampão fosfato pH 7,0 na ausência de agente protetor.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados de inibição da peroxidase pelo glifosato.

**Tabela 1:** Ensaios realizados para avaliar a inibição da peroxidase pelo glifosato.

Ensaios	Descrição	Inibição (%)
Controle	2,7 mL de guaiacol + 0,1 mL de peróxido de hidrogênio + 0,2 mL de extrato enzimático	1330 U/mL
1	0,2 mL de extrato enzimático + 1,7 mL de guaiacol + 1 mL de glifosato + 0,1 mL de peróxido de hidrogênio	27%
2	0,2 mL de extrato enzimático + 1 mL de glifosato + 1,7 mL de guaiacol (2 min) + 0,1 mL de peróxido de hidrogênio	40%
3	0,2 mL de extrato enzimático + 1 mL de glifosato (2 min) + 1,7 mL de guaiacol + 0,1 mL de peróxido de hidrogênio	42%



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na Tabela 1 pode-se observar que houve menor inibição da peroxidase pelo glifosato no ensaio 1 (27%). Nos ensaios 2 e 3, houve uma maior inibição, sendo os valores muito próximos (40 e 42%, respectivamente), pois nestes ensaios o glifosato ficou em contato com a enzima por dois minutos antes da determinação da atividade enzimática. Esses experimentos servirão como embasamento para as análises no microscópio de força atômica que serão realizadas com o microcantilever funcionalizado com a peroxidase (sensor de cantilever) a fim de detectar a presença de glifosato em águas.

### CONCLUSÕES

A partir de um método rápido e de baixo custo, realizou-se eficientemente a extração da peroxidase de abobrinha, sendo que, entre as condições de extrações testadas, a realizada com tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 na ausência de agente protetor, manteve-se com 80% de atividade residual durante o armazenamento. Foi observada uma inibição de cerca de 40% da atividade enzimática nos ensaios realizados na presença de glifosato, o que evidencia que esse herbicida inibe a atividade da peroxidase. Devido a isso, estudos posteriores serão realizados utilizando a enzima, extraída na melhor condição de estabilidade, como elemento de reconhecimento biológico em nanobiossensores de cantilever para detecção de glifosato em águas, sendo a detecção baseada no efeito inibitório da atividade enzimática pelo herbicida.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Capes, CNPq e Finep pelo auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL.2005. Resolução CONAMA nº 357 - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
- Carvajal F, Palma F, Jamilena M, Garrido D.2015. Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit. *Postharvest Biol Tec*, 108: 68-77.
- Damodaran S, Parkin KL, Fenema OR.2008. *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Dun B, Wang X, Lu W, Chen M, Zhang W, Ping S, Wang Z, Zhang B, Lin M.2014. Development of highly glyphosate-tolerant tobacco by coexpression of glyphosate acetyltransferase and EPSPS G2-aroA genes. *The Crop Journal*, 2:164-169.
- Fatibello-Filho O, Vieira IC.2002. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quim. Nova*, v. 25: 455-464.
- Oliveira GC, Mocolini SK, Castilho M, Terezo AJ, Possavatz J, Magalhães MRL, Dores, EFGC.2012. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta*, 98: 130-136.
- Oliveira IRWZ.2007. Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos. Tese em Química, Florianópolis/SC.
- Vicente-Dólera N, Troadec C, Moya M, Río-Celestino M, Pomares-Viciano T, Bendahmane A, Pico B, Román B, Gómez P.2014. First tilling Platform in Cucurbita pepo: A New Mutant Resource for Gene Function and Crop Improvement. *PLOS ONE*, 9: 1-8.
- Vieira IC, Lupetti O, Fatibello-Filho O.2003. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). *Quim. Nova*, 26: 39-43.
- Zeraik AE, Souza FS, Fatibello-Filho O, Leite OD.2008. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Quim. Nova*, 31: 731-734.