

BIOSSENSOR PARA GLIFOSATO: MODELOS DE SORÇÃO PARA AVALIAÇÃO AMBIENTAL EM TERRAS INDÍGENAS TEKOHA OCO'Y – PR

BIOSSENSOR FOR GLYPHOSATE: SORTION MODELS FOR ENVIRONMENTAL EVALUATION IN TEKHA OCO'Y - PR INDIGENOUS LANDS

Mônica Santana Vianna¹
João Paulo Machado Torres²
Antônio J. Silva Neto³

Resumo: O glifosato [n-(fosfonometil)glicina] é o herbicida mais vendido no mundo, com ação pós-emergente e não seletiva. Apenas plantas geneticamente modificadas apresentam seletividade à molécula. Uma das bases para esclarecer os reais efeitos tóxicos do glifosato está relacionada à sua mobilidade. A avaliação precisa do risco deste agrotóxico passa pelos estudos físico-químicos e biológicos sob as condições específicas dos locais de aplicação e dispersão. Entretanto, apesar da relevância e urgência no entendimento de sua dinâmica ambiental, este herbicida conta com metodologias analíticas de difícil reprodução. Este trabalho pretendeu aplicar estudos multivariados do perfil de fertilidade dos solos para avaliação do risco de contaminação do glifosato em áreas de monocultura de soja. Foi desenvolvido um biossensor fluorimétrico, baseado na albumina bovina sérica (*Bovine Serum Albumin* - BSA) para a determinação da concentração de glifosato em ensaios de sorção nos solos das Terras indígenas Tekoha Oco'y (PR). As condições do ensaio de sorção foram determinadas por modelo empírico formulado através de método estatístico de superfície de resposta (planejamento experimental). O biossensor utilizado atendeu à necessidade analítica dos testes de sorção onde a curva analítica (modelo de Stern-Volmer) apresentou faixa de trabalho de $5,0 \times 10^{-1} \text{ ng L}^{-1}$ a $3,0 \text{ ngL}^{-1}$ de glifosato. As condições de força iônica alteram as medidas de fluorescência para este complexo indicando a existência de interações eletrostáticas entre as cargas de albumina e do glifosato. Os testes de sorção mostram que o teor de P, Zn e Cu nos solos determina a sorção deste agrotóxico e por isso deve ser considerado nas avaliações de risco de contaminação ambiental e humana.

Palavras-chave: Biossensor. Glifosato. Modelos de Sorção. Solo. Fluorescência.

Abstract: Glyphosate [n- (phosphonomethyl) glycine] is the best-selling herbicide in the world, with post-emergence and non-selective action. Only genetically modified plants have selectivity to the molecule. One of the bases for clarifying the true toxic effects of glyphosate is related to its mobility. The precise evaluation of the risk of this pesticide passes through physical-chemical and biological studies under the specific conditions of the application and dispersion sites. However, despite the relevance and urgency of understanding its environmental dynamics, this herbicide has analytical methodologies difficult to reproduce. This work intends to apply multivariate studies of the soil fertility profile to evaluate the risk of contamination of glyphosate in soybean monoculture areas. A fluorimetric biosensor based on serum bovine serum albumin

¹ Doutor, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Pós-Doutorado – Faculdade de Engenharia e Instituto Politécnico, monicaviann@gmail.com.

² Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, jptorres@biof.ufrj.br

³ Doutor, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Politécnico, ajsneto@iprj.uerj.br

(BSA) was used to determine the concentration of glyphosate in sorption tests on soils of Tekoha Oco'y indigenous lands (PR). The conditions of the sorption test were determined by an empirical model formulated using a statistical response surface method (experimental design). The biosensor used met the analytical requirements of the sorption tests where the analytical curve (Stern-Volmer model) showed a working range of $5,0 \times 10^{-1} \text{ ng L}^{-1}$ to $3,0 \text{ ng L}^{-1}$ glyphosate. The ionic strength conditions alter the fluorescence measurements for this complex indicating the existence of electrostatic interactions between the albumin and glyphosate charges. Sorption tests show that the content of P, Zn and Cu in the soils determines the sorption of this pesticide and should therefore be considered in the risk assessments of environmental and human contamination.

Keywords: Biosensor. Glyphosate. Models Sorption. Soil. Fluorescence.

1 INTRODUÇÃO

O glifosato [n-(fosfonometil)glicina] é o herbicida mais vendido no mundo, com ação pós-emergente e não seletiva. De modo geral, apenas plantas geneticamente alteradas apresentam resistência à essa molécula. Considerando-se que este agrotóxico apresenta baixo custo relativo e excelente eficiência agrônômica, a introdução de variedades resistentes acelerou o aumento das taxas de aplicação deste produto. É registrado para ampla variedade de culturas, envolvendo tanto as atividades de agronegócio quanto da Agricultura Familiar. Na maioria dos casos este herbicida não é metabolizado pelas plantas. Desta forma, praticamente toda a concentração do ingrediente ativo chega ao solo na sua forma original.

A literatura mostra que a dissipação do glifosato, expressa através do valor de meia-vida ($t_{1/2}$), varia bastante com o tipo de solo. Normalmente, a meia-vida do glifosato no solo é de cerca de 50 dias, embora sua meia-vida de mineralização possa chegar a valores de até mais de 20 anos. Os métodos para avaliação de seu potencial de contaminação de águas se baseia em suas propriedades físico-químicas (DAI et al., 1998). Dessa forma, desconsidera-se os efeitos de interação com os constituintes das matrizes ambientais.

A avaliação precisa do risco deste agrotóxico passa pelos estudos físico-químicos e biológicos sob as condições específicas dos locais de sua aplicação e dispersão. A literatura é controversa a respeito do seu potencial de toxicidade e a elucidação dessas questões passa pela capacidade analítica dos laboratórios isentos em determinar a sua forma química original e seus principais metabólitos. Entretanto, apesar da relevância e urgência no entendimento de sua dinâmica ambiental, este herbicida conta com metodologias analíticas de difícil reprodução (procedimentos envolvendo etapas de extração, *clean up*, derivatização e detecção por espectrofluorimetria ou espectrometria de massas – equipamento de alto custo de aquisição, operação e manutenção).

A base para esclarecer os reais efeitos tóxicos do glifosato está, em parte, relacionada à sua mobilidade ambiental. O comportamento do glifosato no solo tem sido tema de inúmeras pesquisas. De forma geral, essas pesquisas caracterizam o herbicida pela sua elevada capacidade de sorção, a **Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão**. Paranaguá, PR, v.3, n.2, maio de 2018.

qual impede sua degradação na solução do solo (CHENG,1990). Isso faz com que o glifosato permaneça neste sistema como resíduo-ligado. Entretanto, a maior parte desses trabalhos foi realizada sob condições de solo e clima marcadamente diferentes do Brasil. Com isso, é de fundamental importância que o comportamento do glifosato no solo, em condições de clima tropical, seja avaliado sob condições da agricultura brasileira (manejo intenso de adubos e fertilizantes).

A Reserva Indígena do Oco'y está localizada na região Oeste do Paraná, município de São Miguel do Iguaçu. A área de 256 hectares abriga atualmente 115 famílias, totalizando cerca de 520 índios. Ela está localizada nas margens do Lago de Itaipu fazendo limite com áreas de monocultura de soja. O município de São Miguel do Iguaçu aparece em 34º lugar no país com 579,2 toneladas de agrotóxicos comercializadas em 2015. Verifica-se o manejo de herbicidas consumindo 36 % do total dos agrotóxicos comercializados no Estado do Paraná, seguidos dos inseticidas e fungicidas (SIAGRO, 2015). Ao todo, trinta e cinco rios, córregos e arroios banham o município. A presença de atividades agrícolas em unidades integradas, como as microbacias locais, exige cuidado com os recursos naturais. Este cuidado se deve não somente pela preservação de áreas florestais, rios e mananciais, mas também para manter o equilíbrio fundamental à manutenção da produtividade das áreas agrícolas.

O objetivo deste trabalho é desenvolver um biossensor, baseado na fluorescência da proteína albumina bovina sérica (*Bovine Serum Albumin* - "BSA"), para a determinação de glifosato (molécula não fluorescente) em ensaios de sorção em solos na presença de elementos de reconhecida influência em seu comportamento sortivo (P, Cu e Zn). Este biossensor pretende atender às exigências analíticas com menor custo e tempo de análise, permitindo avaliações de seu potencial de contaminação sob condições ambientais específicas.

A metodologia adotada para os ensaios de sorção de glifosato em solos introduziu o planejamento experimental, para a identificação dos níveis químicos de fertilidade de solos relevantes, visando a avaliação da sorção do herbicida. Dessa forma, foram definidas matrizes de sorção características das

Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão. Paranaguá, PR, v.3, n.2, maio de 2018.

condições encontradas na área de São Miguel do Iguazu e críticas para a dinâmica sortiva deste agrotóxico.

2 DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR

O desenvolvimento do biossensor para a determinação de glifosato está baseado nas propriedades fluorescentes da proteína albumina bovina sérica (*Bovine Serum Albumin*- “BSA”) e a sua capacidade de formação de complexos com moléculas de glifosato. O princípio espectroscópico de supressão de fluorescência foi utilizado para a detecção e quantificação do agrotóxico. Considerou-se os efeitos eletrostáticos para a estabilidade do complexo BSA-Glifosato.

2.1 Princípio de Supressão de Fluorescência

A intensidade de fluorescência de uma molécula pode diminuir em decorrência da formação de complexos estáveis não fluorescentes entre esta e uma segunda estrutura química. Este fenômeno de diminuição de emissão de fluorescência, por formação de complexos estáveis com outras moléculas não fluorescentes (supressoras), é chamado de supressão de fluorescência (“*Fluorescence quenching*”) (LAKOWICZ.,2006).

Neste caso, a relação entre a intensidade de fluorescência da molécula e a concentração da molécula supressora é facilmente determinada pelo cálculo da constante de associação, K_{SV} , para a formação do complexo conforme descrito pela Eq. (1).

$$K_{SV} = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (1)$$

onde $[F - Q]$ é a concentração do complexo, $[F]_0$ é a concentração do fluoróforo não-complexado, e $[Q]$ é a concentração do supressor (neste caso o

analito). Considerando que a concentração total de fluoróforo $[F]_0$ é dada pela Eq. (2), substituída na Eq. 1

$$[F]_0 = [F] + [F - Q] \quad (2)$$

Substituída na Eq. (1) leva à Eq. (3):

$$K_{SV} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{[F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (3)$$

Se o complexo formado não emite fluorescência, então a fração de sinal de fluorescência remanescente é dada por F_0/F : razão da fluorescência inicial do fluoróforo antes da formação do complexo (F_0) pela fluorescência não suprimida após a complexação (F). Ao substituir a concentração do fluoróforo pela intensidade de fluorescência, pode-se reorganizar a Eq.(3), de modo a se obter a Eq. (4), que é a Equação de Stern-Volmer (LAKOWICZ.,2006)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4)$$

A relação entre a razão F_0/F e a concentração do supressor $[Q]$ é linear, sendo a constante de supressão a própria constante de associação dos complexos.

2.2. Efeito Eletrostático na Estabilidade dos Complexos não Fluorescentes

As interações hidrofóbicas e eletrostáticas desempenham um papel importante na estabilização do complexo. A albumina bovina sérica é uma proteína que apresenta estados estruturais determinados pelas condições do

meio como pH e força iônica. A molécula de albumina possui ponto isoelétrico em torno de 5,5 (HARMSSEN, et al.;1971) com constantes de formação de complexos variando em função de suas cargas internas em posições de interação eletrostática.

As cargas das moléculas supressoras de fluorescência podem influenciar a estabilidade do complexo não fluorescente formado pela atuação de forças eletrostáticas na interação com a molécula proteica. O potencial elétrico em uma determinada posição dentro de uma proteína é determinado pela configuração de resíduos de aminoácidos carregados negativamente e positivamente ao longo de sua estrutura. Para o caso do complexo BSA-glifosato (BSA-Gli), a molécula do herbicida apresenta caráter zwitteriônico, com quatro pKs ($pK_1= 0,8$; $pK_2= 2,16$; $pK_3= 5,46$; $pK_4= 10,14$). Dessa forma, há possíveis interações de carga que podem influenciar a formação e estabilidade de tais complexos.

Determina-se então, o potencial eletrostático próximo às moléculas supressoras em sua interação com moléculas de proteínas (BSA), através do cálculo da constante de formação do complexo não fluorescente K_q , para uma molécula supressora de carga Z_q , como uma função da força iônica e Z_M , a carga próxima do grupamento fluoróforo (ou resíduo de aminoácido fluorescente) (LAKOWICZ, J.R.,1994.)

$$\log K_q = \log K_0 + 0,434 \frac{Z_q Z_M e_0^2}{\kappa_B T R_0} \left(1 - \frac{1}{D}\right) + C Z_q Z_M \sqrt{\mu} \quad (5)$$

onde K_0 é o potencial na ausência de efeitos eletrostáticos, Z_q e Z_M são a carga da molécula do supressor e da proteína (próximo ao fluoróforo), respectivamente, e_0 é a carga elementar, D é a constante dielétrica, R_0 é a menor distância entre o supressor e o fluoróforo, C é uma constante, igual a 1,02 para solução aquosa a 25 °C, μ é força iônica, onde κ_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura do sistema.

A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) do fenômeno de supressão entre uma molécula supressora e a proteína (formação do complexo BSA-Gli) é influenciada pela exposição dos grupos carregados do fluoróforo (BSA) ao meio reacional e às moléculas do seu supressor. Quando a molécula

Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão. Paranaguá, PR, v.3, n.2, maio de 2018.

supressora (Gli) está carregada (i.e. $Z_q e_0 = 0$), a constante também é influenciada pelo produto de $Z_q e_0$ e pelo potencial elétrico (ψ) na posição onde o fluoróforo está localizado na molécula.

Entretanto, apesar da maior dificuldade para esta determinação do potencial elétrico, o seu sinal (potencial elétrico), que identifica efeitos atrativos e repulsivos entre os grupos carregados de supressor e fluoróforo, pode ser determinado pela dependência de $\frac{K_{SV}}{\phi}$ à força iônica da solução (μ). No evento de supressão estática como descrito para BSA-Gli não há variação do rendimento quântico (ϕ).

3 METODOLOGIA

O biossensor foi aplicado na determinação de glifosato em experimentos de sorção em solos nas condições do perfil de fertilidade agrícola (adição de calcário, teor de fósforo inorgânico, cobre e zinco). Os experimentos foram realizados com amostras de solo coletadas nas Terras indígenas de Oco'y a uma profundidade de 10 cm e secas e peneiradas com malha de 2 mm. As isotermas de sorção foram construídas com experimentos em lotes realizados com solos tratados com diferentes doses de fosfato utilizadas como fertilizantes, além de sulfato de zinco e sulfato de cobre. O *software Statistica*® foi utilizado para realizar o planejamento experimental e todos os testes estatísticos.

2.1 Planejamento Experimental

Para definir as condições de fertilidade da matriz de solo para os estudos de sorção do glifosato, aplicou-se a técnica estatística de Planejamento Experimental. Esta ferramenta é de extrema importância para estudos multivariados, nos quais se definem condições nas quais os resultados obtidos de sorção sejam relevantes, com a abrangência adequada aos objetivos do estudo e número reduzido de experimentos. O planejamento experimental 2^5 composto central foi realizado para obter as medidas de

concentração de glifosato [Gli] sorvida pela matriz de solo empregada após o tempo de equilíbrio.

Cada parâmetro foi avaliado em níveis que correspondem à faixa dos valores experimentais. Para o planejamento 2^5 (com pontos centrais e axiais) os valores ou níveis de cada variável estão apresentados na Tabela 1. Neste trabalho foi adotado o planejamento Composto Central “*CCD - Central Composite Design*”. Este planejamento inclui a medição de réplicas no centro do desenho (valor médio dos níveis de todas as variáveis) que permite avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes. Na última etapa do planejamento, utilizou-se o tratamento estatístico de otimização por restrição para sobrepor as superfícies de resposta aplicando a função “desejabilidade” (“*desirability*”).

Tabela 1 – Variáveis originais e codificadas e seus respectivos níveis para o desenho experimental 2^5 .

Variáveis originais	Variáveis codificadas		Variáveis axiais		
	-1	1	Centro	$\alpha=2,0$	$\alpha = -2$
pH	4	8	6	10	2
P (mg kg ⁻¹)	15	30	22,5	37,5	7,5
Zn (mg kg ⁻¹)	2,5	6	4,25	7,75	0,75
Cu (mg kg ⁻¹)	2,5	6	4,25	7,75	0,75
GLIFOSATO (mg kg ⁻¹)	1,5	4	2,75	5,25	0,25

3.2 Ensaios de Equilíbrio em Lote

As suspensões foram agitadas durante 20 a 24 horas à temperatura ambiente (em torno de 25 °C) e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos. Para cada solução foi medido o pH de equilíbrio após a agitação. Foram utilizadas seis soluções de glifosato: 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹; 4,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹. As soluções foram preparadas em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, misturando-se o produto técnico (Roun up®- Monsanto). Amostras de 2 g de solo e alíquotas de 10 mL, de solução foram acondicionados em tubos de centrífuga de 50 mL (em triplicata), os quais foram agitados a 200 rpm durante 6 horas. Subsequentemente, o conteúdo suspenso nos tubos foi centrifugado (300 rpm) por 10 minutos retirando-se então uma alíquota de 20 µL do

sobrenadante para determinar a concentração de glifosato na solução de equilíbrio. A concentração sorvida no solo foi determinada por diferença entre a concentração inicial aplicada e a concentração de equilíbrio.

3.3 Determinação de Glifosato por Biossensor Fluorimétrico

As determinações de glifosato na fração não adsorvida foi realizada através dos biossensores fluorimétricos baseados na albumina bovina sérica (BSA). As medidas de fluorescência da molécula de albumina (Sigma-Aldrich, fração V na concentração de 15 nmol L⁻¹) foram medidas após adições da fração do sobrenadante do ensaio de sorção. O valor da intensidade de emissão de fluorescência foi medido em 280 nm (excitação) e 340 nm (emissão). Essas medidas foram realizadas em fluorímetro Jasco modelo FP-8000. A curva analítica foi construída a partir do modelo linear do fenômeno de supressão de fluorescência (gráfico de Stern-Volmer).

Para as medidas do efeito do potencial eletrostático sobre as moléculas formadoras do complexo, a supressão de fluorescência foi monitorada à temperatura constante de 25 °C em soluções contendo molaridades crescentes de tampão fosfato de sódio. Foi verificado se a interação da molécula de glifosato (carregada) introduz algum potencial elétrico à molécula de albumina. O sinal do potencial elétrico foi determinado a partir da dependência dos valores da constante de Stern-Volmer sobre a força iônica das soluções.

4. RESULTADOS

Este fenômeno de supressão pode ser adequadamente expresso pelo gráfico de Stern-Volmer (Figura. 1). Para a determinação de glifosato foi utilizada o gráfico de Stern-Volmer como curva analítica. A faixa de concentração para as quantificações de glifosato nos ensaios de sorção foram de 5,0x10⁻¹ µg L⁻¹ até 3,0 ng L⁻¹

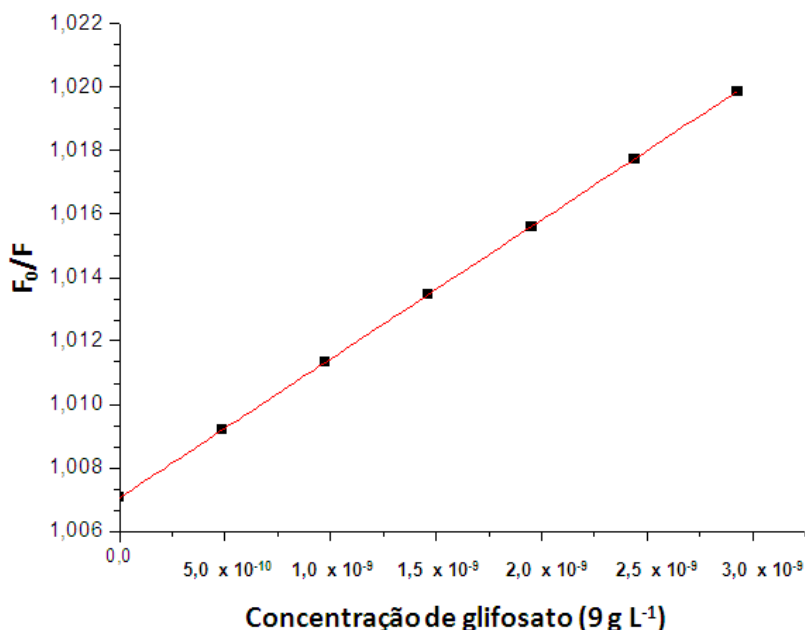


Figura 1 – Gráfico de Stern-Volmer demonstrando o fenômeno de supressão de fluorescência da albumina pelo glifosato. Equação ajustada: $f(x) = 4,377 \cdot 10^{+6} x + 1,007$ com $R^2 = 1,00$

As medidas de fluorescência da albumina e seu efeito de supressão por diferentes concentrações de glifosato pode ser visto na Figura 2. O espectro de maior intensidade (em preto) corresponde à solução de proteína sem glifosato. Todas as medidas de fluorescência para a determinação de glifosato foram realizadas em 280 nm (excitação) e 340 nm (emissão).

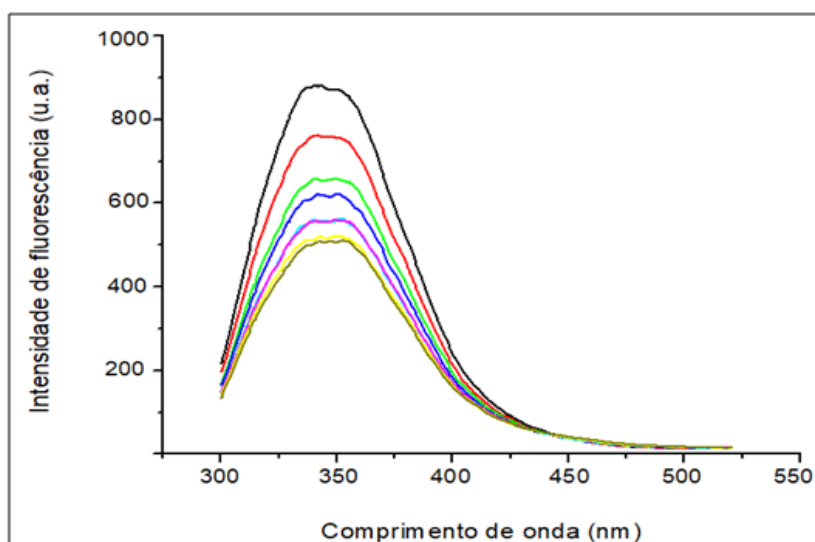


Figura 2 – Espectro de fluorescência da albumina sérica bovina (BSA) na presença de diferentes concentrações de glifosato. (— BSA sem glifosato; — 0,5 x 10⁻¹⁰ mg L⁻¹; — 1,0 x 10⁻⁹ mg L⁻¹; — 1,5 x 10⁻⁹ mg L⁻¹; — 2,0 x 10⁻⁹ mg L⁻¹; — 2,5 x 10⁻⁹ mg L⁻¹; — 3,0 x 10⁻⁹ mg L⁻¹).

Na figura 2 observa-se o comportamento de supressão de fluorescência do espectro da albumina expresso no gráfico do Stern-Volmer (Figura 1). As diminuições sucessivas da intensidade de fluorescência do espectro da albumina por adições de solução de glifosato, em condições espectroscopicamente controladas, caracteriza a formação de complexos entre as duas moléculas.

O aumento da força iônica altera o valor da constante de Stern-Volmer indicando uma mudança na interação eletrostática entre as moléculas de fluoróforo e supressor considerando as constantes de ionização do glifosato.

4.1. Planejamento Experimental

O objetivo do planejamento experimental foi gerar modelos matemáticos que permitissem identificar as melhores condições experimentais para a resposta de sorção de glifosato em matriz de solo da área em estudo. Os coeficientes foram obtidos utilizando o método dos mínimos quadrados e o modelo foi avaliado empregando a análise de variância. A estimativa dos erros foi alcançada através de medições de réplicas do ponto central do planejamento.

Estudo das interações

A Figura 3 apresenta o gráfico de Pareto que indica a análise da significância de cada variável para a resposta em percentual de glifosato adsorvido expresso por %[Gli] adsorvido.

Este gráfico mostra cada um dos efeitos calculados, em ordem decrescente de magnitude. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado (calculado dividindo o efeito pelo desvio padrão). A linha vertical pode ser usada para julgar quais efeitos são estatisticamente significativos. A barra que se estenda além da linha vertical ($p = 0,05$), corresponde a um efeito significativo ao nível de 95%.

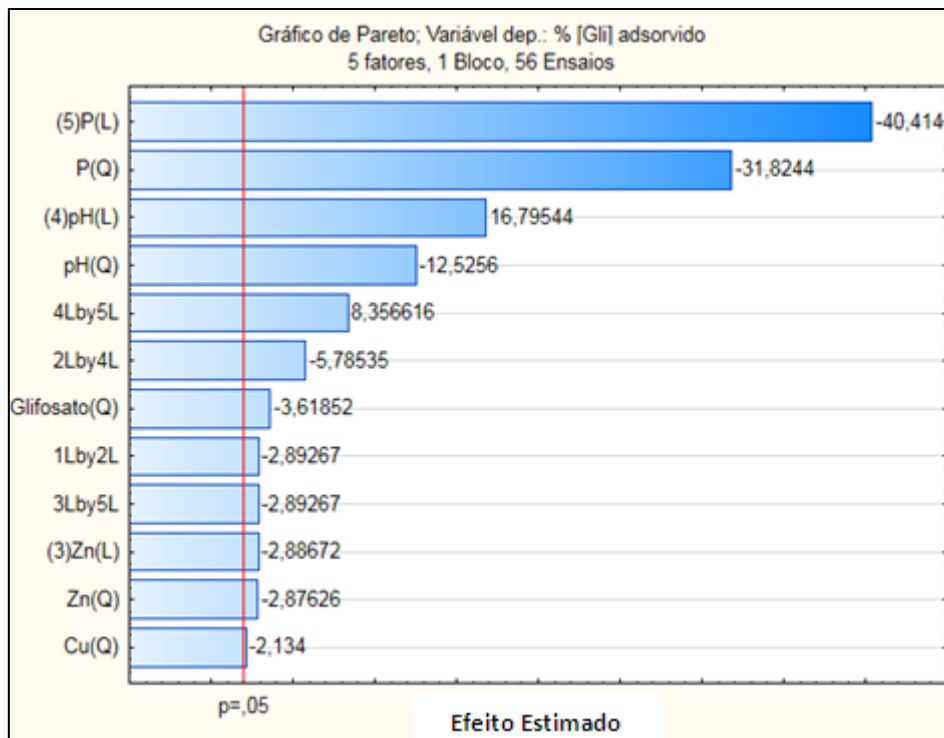


Figura 3 - Gráfico de Pareto indicando os efeitos estatisticamente significativos para o desenho experimental

Para a porcentagem adsorvida de glifosato, todos os fatores relacionados no planejamento foram efeitos principais (de dimensão quadrática). As interações entre os fatores que tiveram efeito importante para a sorção do herbicida relacionam o teor de P e Cu, e pH. Os valores positivos dos efeitos indicam que um aumento das variáveis implicará em aumento do sinal da resposta (para a faixa experimental compreendida nos níveis do planejamento).

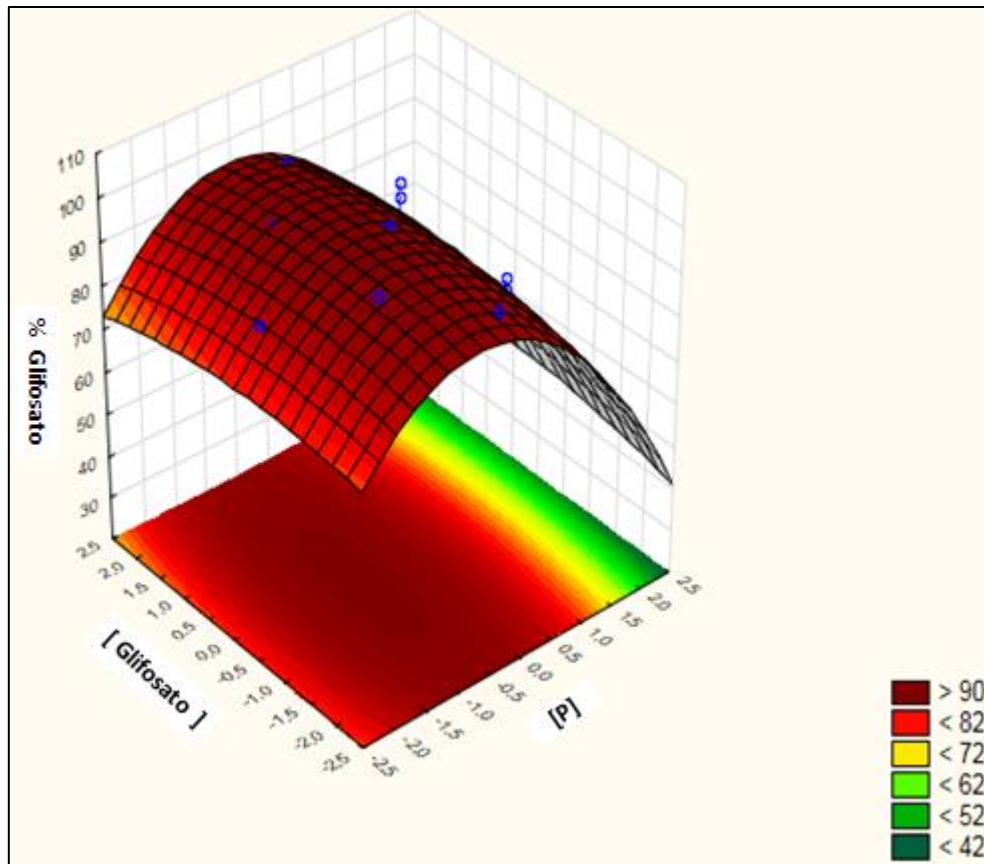


Figura 4 – Superfície de resposta gerada pelo modelo com os valores de %[gli] adsorvido em função dos concentração de fósforo (P) dada em mg kg^{-1} e concentração de glifosato inicial (mg kg^{-1}).

A Figura 4 mostra a superfície de resposta gerada, que expressa o modelo e relaciona os valores de fósforo e a concentração de glifosato adicionados ao solo e no seu percentual de adsorção após o equilíbrio. Observa-se uma acentuada queda no percentual de glifosato adsorvido ao solo com teores mais altos de P inorgânico.

Avaliação do modelo (ajuste)

Para este caso, os dados da análise de ANOVA mostram que a fração da variação dos dados explicável é de 99,99 %. Dessa variação explicável, o modelo de regressão proposto explica uma importante porção da variação dos dados: 99,64%.

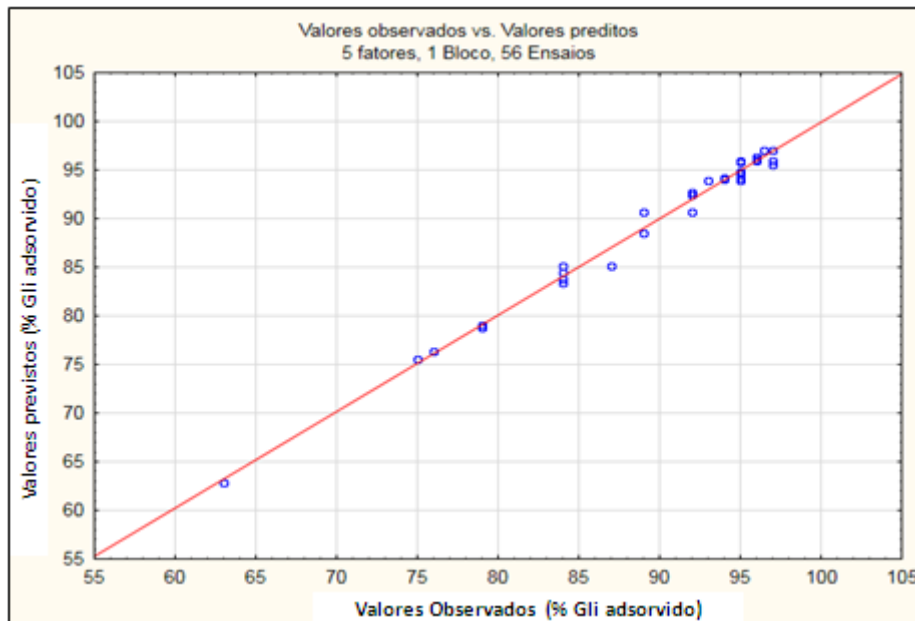


Figura 5 - Gráfico indicando a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais (observados).

A falta de ajuste indicada pela análise estatística utilizando um teste F não invalida o modelo. Além de ser uma pequena falta de ajuste (pequena diferença entre o valor de $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado}), observa-se pelo gráfico dos valores (Figura 5) uma adequada correlação dos dados experimentais com os previstos pelo modelo. O valor de F é calculado a partir dos graus de liberdade da regressão e do resíduo do modelo).

4.2. Aplicação da Otimização com Restrição

Tendo obtido todos os modelos de regressão graficamente para o sinal de fluorescência do sistema F_0/F (fração protéica-analito), realizou-se a sobreposição das superfícies de resposta do percentual de glifosato adsorvido, em diferentes condições, através da função “desejabilidade”. Neste tratamento as respostas de percentual de glifosato adsorvido (Y_i) são convertidas em outra grandeza individual d_i que varia em uma faixa de $0 \leq d_i \leq 1$. Para a resposta desejada, $d_i = 1$ e se as condições experimentais alcançarem respostas fora da região desejada, $d_i = 0$ (BARROS NETO et al., 2001). As variáveis independentes são definidas de modo a maximizar determinadas respostas

pelo modelo experimental. Assim, pode-se comparar e escolher as respostas encontradas nas condições do modelo experimental.

Para este caso, as respostas de interesse para definir as condições de maior e menor adsorção de glifosato em solos, nas concentrações deste trabalho, foram: pH = 10; [P] = 340 mg Kg⁻¹; [Cu]=[Zn]=7,7 mg Kg⁻¹.

4.3. Isoterma de Sorção

A isoterma para o glifosato em solo da região das Terras indígenas de Oco'y foi ajustada ao modelo de sorção de Freundlich ($R^2 = 0,97$), apresentado na Figura 6. É um modelo aplicável a superfícies heterogêneas e que representa bem os dados experimentais de equilíbrio de adsorção em soluções de concentrações altas. O modelo assume que a adsorção ocorre em multicamadas, podendo ocorrer adsorção de mais de uma molécula do adsorvato em um sítio, sendo que esses sítios possuem diferentes energias de adsorção. A isoterma de Freundlich possui duas constantes empíricas:

$$X = K_F C^{1/n} \quad (6)$$

onde X é a massa da substância sorvida por unidade do sorvente ($\mu\text{g g}^{-1}$), K_F e n são as constantes empíricas e C é a concentração do sorbato na solução após o equilíbrio ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Aplicando-se logaritmos a ambos os membros temos:

$$\log x = \log K_F + \frac{1}{n} \times \log C \quad (7)$$

em que $\log x$ é a incógnita y (variável independente), $\log K_F$ é o coeficiente linear, $\frac{1}{n}$ é o coeficiente angular e $\log C$ é a incógnita x (variável dependente).

A partir da obtenção das isotermas foi possível determinar os parâmetros de adsorção K ((mg/g).(L/mg)^{1/n}) e n , onde K indica a capacidade

de adsorção do solo (distribuição dos sítios ativos) e n indica a intensidade de adsorção entre o solo e o glifosato.

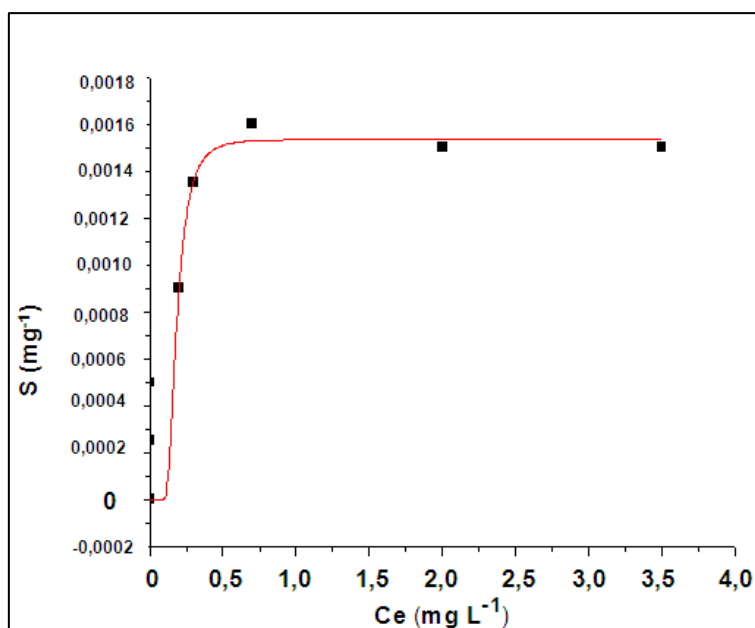


Figura 6 – Gráfico dos dados experimentais de adsorção de glifosato em solo, com ajuste ao modelo de isoterma de Freundlich.

A Figura 6 apresenta os dados experimentais ajustado à isoterma de Freundlich onde: S é a massa de soluto adsorvida por massa de solo; C_e , a concentração de equilíbrio no final do ensaio e R^2 o coeficiente de correlação para o modelo adotado. Os valores dos parâmetros de adsorção são: K em $(\text{mg/g}) \cdot (\text{L/mg})^{\frac{1}{n}} = 1,53 \times 10^{-3}$ e $n = 2,93$.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os modelos de supressão de fluorescência obtidos para o fenômeno envolvendo a albumina (sensor) e sua supressão pelo glifosato permitiram a aplicação deste fenômeno para fins analíticos e não somente para estudos de caracterização de complexos. A sensibilidade das curvas analíticas confirmam a albumina bovina sérica (BSA) como sensor eficiente no método e aplicação propostos. O biossensor desenvolvido atende adequadamente a aplicação

proposta, para determinar o glifosato em amostras de solo em ensaios de sorção. A pequena dimensão da molécula de glifosato pode explicar o efeito eletrostático verificado em sua interação com a molécula de albumina. Observou-se que as medidas espectroscópicas (absorção molecular e fluorescência) são indicadores/parâmetros adequados para esta avaliação considerando comparações com dados experimentais.

Neste trabalho, o biossensor foi aplicado em ensaios de sorção com teores críticos de fósforo (P), cobre (Cu) e zinco (Zn), mostrando a influência desses compostos no desempenho de sorção do herbicida. A sorção do glifosato no solo estudado foi influenciada pelo nível de P disponível no solo, sendo que a quantidade sorvida de glifosato começou a ser reduzida substancialmente a partir de níveis de 260 mg dm^{-3} de P. Acrescenta-se que estes resultados vêm confirmar que a extensão das forças de ligação do glifosato é proporcional a capacidade do solo em adsorver fosfato inorgânico, como já confirmado por outros autores (PRATA F., 2002) sugerindo a importância dessas ligações entre o grupo metilfosfônico do glifosato e os metais dos óxidos do solo.

Este trabalho mostra que é imprescindível e possível, através do uso do biossensor proposto, estudos do comportamento do glifosato em solos em cenários específicos. Para o contexto ambiental onde se situa a Reserva Indígena do Oco'y, as características de alta capacidade de sorção de íons no solo indicariam alta sorção e imobilidade do glifosato (menor potencial de contaminação hídrica e exposição à população humana). Entretanto, a inclusão dos teores de insumos agrícolas determinam maior mobilidade a este agrotóxico alterando, de forma relevante, a interpretação do seu potencial de contaminação ambiental e humana. As avaliações ambientais de contaminantes devem ser realizadas segundo plataformas multivariadas pois os estudos univariados não permitem a melhor aproximação de cenários reais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, do CNPq – Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e da FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Os autores agradecem também ao Comitê Editorial da Revista Mundi ETG pelo convite para a publicação deste artigo, que foi originalmente apresentado e publicado nos anais do XX Encontro Nacional de Modelagem Computacional, 2017.

REFERÊNCIAS

ADDISCOT, T.M.; WAGENET, R.T. “Concepts of Solute Leaching in Soil: a Review of Modeling Approaches”. **Soil Science**, V.36, p.411-424, 1985.

BARROS NETO, B. et al. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria** - Campinas, SP : Editora da Unicamp. Editora Bookman. 2001. 414 p.

Cheng, H.H. **Pesticide in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling**. 2 ed. Madison, Soil Science Society of America, 1990.530p.

CHEN X. et al., 2007. In vitro study on the binding of herbicide glyphosate to human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling. **The Journal of Photochemistry and Photobiology B**. Vol. 90. N° 1. p 26-32, 2008.

DAI, J.Y.; JIN,L.J.; WANG, L.S.;ZANG , L. Determination and Estimation os Water Solubilities and Octanol/Water Partition Coefficients from Derivates of Benzanilides. **Chemosphere**, V.37,p.1419-1426, 1998.

HARMSSEN B. J. et al. Pk Change of Imidazole Groups in Bovine Serum Albumin Due to the Conformational Change at Neutral pH. **Biochemistry** , V. 10, N°. 17, p 3217–3221. 1971.

LAKOWICZ, J.R. **Topics in Fluorescence Spectroscopy - Probe Design and Chemical Sensing**. Volume 4, 1994.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Third Edition, 2006. 954 pp.

PRATA, F. **Comportamento do Glifosato no Solo e Deslocamento Miscível da Atrazina**. 2002. 149 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2002.

SIAGRO. Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná –, Programa da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) SIAGRO, 2015. Disponível em:

Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão. Paranaguá, PR, v.3, n.2, maio de 2018.

<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=105>.
Acesso em: 30 de set de 2016.

Edição especial - XX ENMC (Encontro Nacional de Modelagem Computacional) e VIII ECTM (Encontro de Ciência e Tecnologia dos Materiais), realizado entre 16 e 19 de outubro de 2017 na cidade de Nova Friburgo – RJ.

Editor – Mateus das Neves Gomes