



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO *LATO SENSU* EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

HIGOR JOSÉ FREITAS ALVES DA SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA POR ENZIMAS PRESENTES
NO TAMARINDO (*tamarindus indica*).**

IMPERATRIZ
2023

HIGOR JOSÉ FREITAS ALVES DA SILVA

**BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA POR ENZIMAS PRESENTES
NO TAMARINDO (*tamarindus indica*).**

Trabalho de conclusão de curso de pós –
graduação *Lato Sensu* em Ciências Ambientais
da Universidade Estadual da Região Tocantina
do Maranhão - UEMASUL, como requisito
para obtenção do grau de Especialista em
Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. DSc. José Fábio França
Orlanda

IMPERATRIZ
2023

RESUMO

Dado o desenvolvimento populacional nas últimas décadas e as necessidades de aumento na produtividade agrícola, o uso de herbicidas para o controle de pragas nas grandes áreas culturas agrícolas, tem elevado os níveis de contaminação com resíduos de defensivos agrícolas no meio ambiente. Dentre os defensivos agrícolas mais utilizados para este controle agrícola, temos a atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina), um sintético que está disponível no mercado há mais de 50 anos e é muito utilizada para controlar plantas daninhas nas culturas do milho, cana de açúcar e sorgo. É classificado como um herbicida do grupo das triazinas, utilizado em pré e pós-emergente, apresenta função sistêmica e seletiva. As enzimas, por outro lado, aparecem na atualidade como uma medida sustentável e rentável na biotecnologia e uma ótima opção de pesquisa para degradação de moléculas. Assim, este projeto visa avaliar a degradação enzimática da atrazina empregando as enzimas oxirredutases peroxidase (POD) e polifenoxidase (PFO) extraídas do fruto tamarindo (*tamarindus indica*) e imobilizadas em matriz magnética de nanopartículas (NMP'S).

Palavras-chave: Tamarindo; Oxirredutases; Enzimas; Nanopartículas Magnéticas; Atrazina.

ABSTRACT

Given the population development in recent decades and the need for increased agricultural productivity, the use of herbicides to control pests in large agricultural areas has raised the levels of contamination with pesticide residues in the environment. Among the most widely used pesticides for this agricultural control is atrazine (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine), a synthetic that has been available on the market for more than 50 years and is widely used to control weeds in corn, sugarcane and sorghum crops. Classified as a herbicide from the triazine group, used pre- and post-emergent, has systemic and selective function. Enzymes, on the other hand, appear nowadays as a sustainable and profitable measure in biotechnology and a great research option for molecule degradation. Thus, this project aims to evaluate the enzymatic degradation of atrazine using the enzymes oxireductases peroxidase (POD) and polyphenoxidase (PFO) extracted from the tamarind fruit (*tamarindus indica*) and immobilized in magnetic nanoparticles matrix (NMP'S).

Keywords: Tamarind; Oxireductases; Enzymes; Magnetic Nanoparticles; Atrazine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estrutura química da atrazina.

Figura 02 - Principal via de biodegradação da atrazina.

LISTA DE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LABITEC - Laboratório de Biotecnologia Ambiental

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

NMP'S - Nanopartículas de Ferro

OMS - Organização Mundial da Saúde

PARA - Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PFO - Enzima Polifenoxidase

pH - Potencial Hidrogênionico

POA's - Processos Oxidativos Avançados

POD - Enzima Peroxidase

UEMASUL - Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
2.1 Herbicida	9
2.2 Atrazina	11
2.3 Enzimas	13
2.4 Imobilização enzimática	14
2.5 Nanopartículas magnéticas	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 Coletas de amostras de tamarindo	18
4.2 Extração das enzimas peroxidase e polifenoloxidase	18
4.3 Caracterização enzimática do extrato bruto e purificado	18
4.4 Síntese e imobilização das enzimas oxirredutases em nanopartículas magnéticas	19
4.5 Estudo da degradação enzimática da atrazina em meio aquoso	21
4.6 Análises estatísticas	21
5 REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas, são defensivos agrícolas com maior volume de aplicação nos sistemas de produção vegetal e considerados a principal ferramenta para suprimir o desenvolvimento de espécies de plantas invasoras devido seu baixo custo, rendimento operacional e alta seletividade (MANCUSO et al., 2011).

O desenvolvimento acelerado da agricultura, tem gerado aumento do uso de herbicidas. Na última década, os herbicidas formulados a base de atrazina têm ganhado importância, em virtude do crescimento na área semeada com grandes culturas. Aspectos relacionados à toxicologia, ecotoxicologia, facilidade de manuseio, eficácia de controle, ganhos de produtividade, entre outros, tornaram a atrazina, um dos líderes vendas (HARTZLER, 2020).

A busca por tecnologias que reduzam poluição ambiental por defensivos agrícolas, motiva o desenvolvimento de pesquisas com enzimas livres ou imobilizadas, que promova a capacidade de degradar com enfoque sustentável. Dentre as principais vantagens do tratamento enzimático, a aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em variadas concentrações de contaminantes, amplo espectro de pH, temperatura, salinidade, necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil controle (WILBERG, 2013).

Apesar das inúmeras vantagens, as enzimas oxirredutases tem elevado custo e, ainda, limitada aplicação. Contudo, a imobilização em suportes sólidos tem se mostrado uma excelente alternativa, já que apresentam estabilidade melhorada e podem ser reutilizadas diminuindo o custo da enzima (LIU, 2013).

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 (ALTUN et al., 2015).

Acelerar a degradação do herbicida, torna o solo apto a receber culturas subsequentes em menos tempo, otimiza a capacidade de produzir alimentos e fibras de forma mais sustentável e alinha o aumento da produtividade ao longo dos anos com enfoque preservacionista (PROCÓPIO et al., 2009).

Assim, o presente projeto visa avaliar a aplicação de enzimas oxirredase extraída do fruto de tamarindo (*Tamarindus indica*) e imobilizadas em suporte magnético para degradação da atrazina.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Herbicida

Dada a necessidade de uma maior produtividade em culturas agrícolas, os defensivos agrícolas fazem parte da vida moderna desde 1940, quando inseticidas organoclorados foram utilizados pela primeira vez para controlar pragas em lavouras. Atualmente, os defensivos são utilizados para proteger culturas agrícolas, o armazenamento de grãos e a erradicação de pragas (GILL; GARG, 2014).

O termo defensivo agrícola é definido, de acordo com a Lei 7.802/1989, como “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

Os defensivos abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo dividido em três grandes classes: inseticidas, fungicidas e herbicidas. Há ainda os rodenticidas, moluscicidas e acaricidas. E podem ser divididos em dois grupos principais: sistêmicos e não-sistêmicos (SILVA; FAY, 2004).

Os herbicidas são substâncias químicas sintéticas que promovem o controle e a morte de pragas indesejáveis, como as ervas daninhas. Esses compostos, atuam de maneiras diferentes para atingir o objetivo de inibir a fotossíntese e a síntese de pigmentos em pragas, inibindo assim a formação de aminoácidos e a síntese de lipídios, bloqueando a divisão celular e inibindo o crescimento das plantas (HERRERA-HERRERA et al., 2016).

São classificados de diferentes maneiras, de acordo com suas próprias características, permitindo, assim, estabelecer grupos afins: com base na seletividade, época de aplicação, translocação, estrutura química e mecanismo de ação (WELLER, 2000).

O uso intensivo e às vezes inadequados de herbicidas, fez com que as pragas desenvolvessem resistência ao produto químico; por este motivo, o desenvolvimento e a aplicação de novos herbicidas são continuamente necessários (MOSS et al., 2019; GHANIZADEH; HARRINGTON, 2017).

Embora os herbicidas facilitem o manejo das plantas daninhas em culturas como soja, milho e feijão e contribuam de maneira substancial para a expansão e desenvolvimento da agricultura no Brasil, o efeito carryover e o surgimento de biótipos resistentes torna este controle químico uma técnica cada vez mais complexa (ARTUZI; CONTIERO, 2006).

Esse tipo de agrotóxico não afeta apenas os organismos-alvo, eles afetam todo o meio ambiente, incluindo a atmosfera, o solo, as águas subterrâneas e as águas superficiais por fluxo, lixiviação e processos de pulverização (MANDAL; SINGH; PURAKAYASTHA, 2017; NSIBANDE; FORBES, 2016).

No solo, uma das preocupações é devido a interferência de seus ingredientes ativos nos processos biológicos responsáveis pela ciclagem de nutrientes. Visto que, a inativação e morte de microrganismos e invertebrados que se desenvolvem no solo, inibem a ação destes seres e suas respectivas funções na ciclagem da matéria nos ecossistemas (CARLOS et al., 2013). Os impactos ambientais causados pelo uso desses compostos, podem ocorrer em decorrência da permanência de seus resíduos por mais tempo que o necessário para exercer sua atividade (PAPINI; ANDREA; LUCHINI, 2014).

Uma das principais dúvidas sobre a recomendação e aplicação de herbicidas, é sobre a dinâmica dos produtos no solo, e os fatores que afetam esta dinâmica (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2005). O processo de dissipação de herbicidas no ambiente, está relacionado com as propriedades físico-químicas do herbicida e do solo, com as condições climáticas, com o manejo e com o sistema de cultivo utilizado (NIEKAMP; JOHNSON, 2001). E para escolher uma técnica de tratamento adequada, é necessário compreender as características e aspectos do contaminante a ser removido (RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017).

A persistência de um herbicida no solo, é dependente de características físico-químicas da molécula, como a constante de equilíbrio de ionização do ácido (pK_a), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), a solubilidade em água (S_w), a pressão de vapor (PV). Além disso, características inerentes ao solo, como a granulometria, o pH, a capacidade tampão, a mineralogia, o teor de matéria orgânica, a atividade microbiana, e condições climáticas também interferem nesta persistência (MANCUSO et al., 2011).

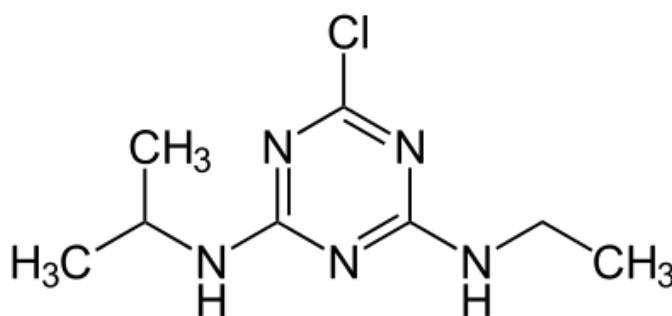
Apesar da importância do uso de herbicidas no aumento da produtividade agrícola, os efeitos negativos em organismos não alvos, incluindo micro-organismos, precisam ser considerados. Esses efeitos podem ser diretos ou indiretos, como redução da abundância de plantas e a diminuição na abundância de organismos em resposta à degradação do habitat, respectivamente (PROSSER et al., 2016).

O herbicida ideal, seria aquele que efetuasse o controle de plantas daninhas com a maior eficiência possível e logo depois se dissipasse sem deixar vestígios e sem ocasionar nenhum dano ao ambiente, cumprindo assim também o seu segundo objetivo (OLIVEIRA JR., 2002).

2.2 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina), é classificada como um herbicida do grupo das triazinas, pré e pós-emergente, sistêmico e seletivo, pois atua apenas no controle das ervas de folhas largas com pouco ou nenhum dano à cultura (Figura 01). O mecanismo de ação deste defensivo, é bloquear a fotossíntese pela interrupção da reação de Hill da planta no estágio fotoquímico, causando clorose e necrose foliar (MARCHESAN, 2016; DUTTA; SINGH, 2013).

Figura 01 - Estrutura química da atrazina.



Fonte: (MERCK 2021)

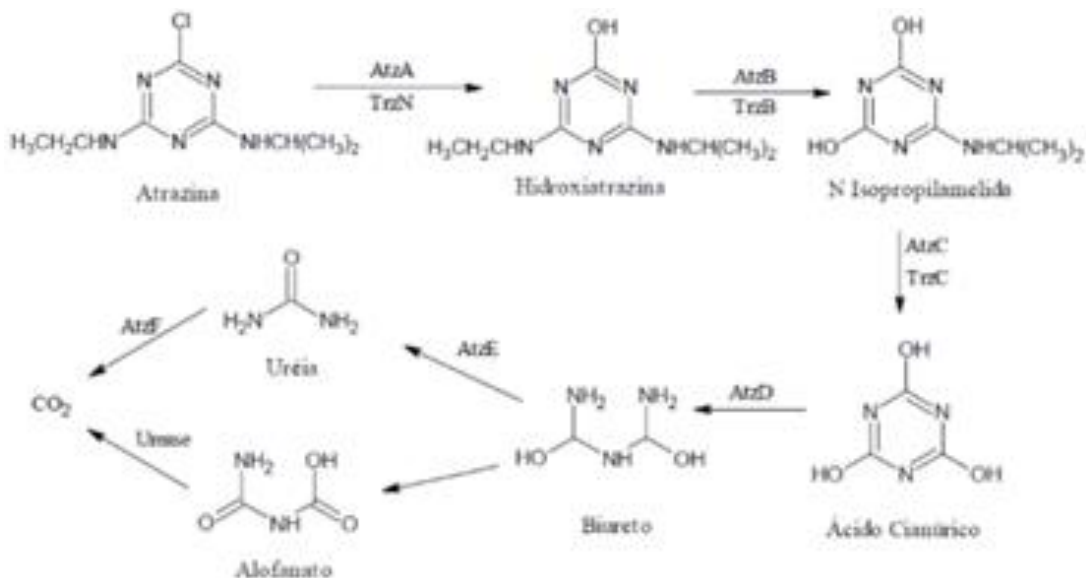
Apresenta caráter básico ($pK_a = 1,7$), solubilidade em água de $0,033 \text{ g L}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\log K_{ow}$ igual a 2,34. Ambas as moléculas apresentam baixo potencial de sorção e, portanto, elevado risco de contaminação dos recursos hídricos (CARVALHO et al., 2013). As propriedades da atrazina resultam em moderada mobilidade e persistência mediana (meia-vida de 60 dias), contribuindo para o acúmulo de contaminantes tanto na superfície como em profundidade nos solos águas superficiais e subterrâneas (PROSEN, 2012).

Os riscos causados pela atrazina à vida aquática, são acentuados devido à persistência deste contaminante e seus efeitos nas gerações subsequentes de animais ao longo do tempo (CLEARY et al., 2019). Portanto, devido ao potencial tóxico da atrazina, seu uso é proibido na União Europeia desde 2003 (MONTIEL-LEÓN et al., 2019). Segundo Glinski et al. (2018) e Velisek et al. (2018), os metabólitos da atrazina podem ser mais tóxicos do que o composto original e costumam ser detectados em águas contaminadas.

A biodegradação da atrazina, pode variar de acordo com o tipo de solo, microbiota presente e disponibilidade de nutrientes como carbono e nitrogênio (HUNTER; SHANER, 2010). Uma das dificuldades para a remoção de resíduos, é o fato de que a persistência do pesticida no solo depende das características do solo, como: umidade, temperatura, aeração, pH e quantidade de matéria orgânica, que afetam o grau da degradação, e dos fatores climáticos tais como radiação, temperatura, umidade e oxigenação, em virtude da direta influência desses fatores sobre o crescimento e atividade microbianos (CARMO et al., 2013).

A biodegradação da atrazina (Figura 02), leva a formação de dióxido de carbono e amônia é composta por seis hidrólises sucessivas, iniciando pela descloração, duas desalquilações, uma clivagem do anel, uma desaminação do biureto e uma hidrólise do alofanato (UDIKOVIČKOLIĆ; SCOTT; MARTIN-LAURENT, 2012).

Figura 02 - Principal via de biodegradação da atrazina.



Fonte: Javaroni, Landgraf e Rezende (1999); Sene et al. (2010).

Atualmente, esforços estão sendo envidados no desenvolvimento de novas alternativas de remediação de ambientes contaminados por defensivos agrícolas. Isto se deve, ao fato das

tecnologias de remediação aplicadas ao tratamento de solos contaminados encontrarem na heterogeneidade desse material um grande desafio, principalmente comparado com a menor complexidade no tratamento de efluentes líquidos industriais. Diante disso, no tratamento contaminados por compostos orgânicos, como agroquímicos, pode ser exigida a utilização de uma combinação de tecnologias biológicas, físicas e químicas para reduzir a contaminação a um nível seguro e aceitável (KHAN; HUSAIN; HEJAZI, 2004).

Diversos são os processos de tratamento desenvolvidos para reduzir a concentração de herbicidas no ambiente. As técnicas tradicionais como coagulação, absorção em carvão ativado, osmose reversa e outras podem ser utilizadas para remover esses contaminantes, porém esses métodos possuem um custo elevado para retirar contaminantes no pós-tratamento (ARANHA; RIBEIRO, 2016).

O tratamento enzimático, tem mostrado redução de compostos orgânicos em testes de laboratório e tentativas em escala piloto, e nos últimos anos, tem crescido o interesse no estudo de enzimas aplicadas ao tratamento de agroquímicos (PARMAR; SINGH; WARD, 2011).

2.3 Enzimas

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, ou seja, aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no processo, devido às suas especificidade e poder catalítico (TALENS-PERALES; MARÍN-NAVARRO; POLAINA, 2016).

São catalizadores eficientes, e desde a sua descoberta vêm sendo aplicadas na medicina, química e agricultura, além de ser bastante empregadas em áreas como a biocatálise industrial, na síntese de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e antibióticos, na tecnologia farmacêutica e de alimentos, estética e em aplicações em diagnósticos clínicos, devido sua especificidade analítica (TIBOLLA, PELISSARI e MENEGALLI, 2014).

A peroxidase (POD) e a polifenoxidase (PPO), têm sido consideradas as principais enzimas responsáveis pela deterioração da qualidade em muitos frutos. Estas enzimas podem participar de um grande número de reações oxidativas e de biodegradação (VALDERAMA et al., 2001).

A polifenoxidase (PPO), também chamada de tirosinase, catecolase ou catecol oxidase, pertence à classe das oxidoredutases, tem o íon Cu^{+2} como cofator e é responsável pela melanização em animais e escurecimento das plantas (GAWLIK-DZIKI et al., 2008). As diferenças entre PPOs podem ser identificadas por suas propriedades físicas, químicas ou enzimáticas, como mobilidade eletroforética, temperatura e pH ideais, especificidade de substrato e pI (LU et al., 2006; WANG et al., 2007; YORUK; MARSHALL, 2003).

Na presença de oxigênio molecular e vários substratos fenólicos, o PPO catalisa duas reações diferentes, a oiidroxilação de monofenóis em o-difenóis (ou seja, atividade de monofenolase ou cresolase) e a oxidação subsequente dos o-difenóis em o-quinonas (ou seja, difenolase ou atividade de catecolase) (FALGUERA et al., 2012).

Essas quinonas, são moléculas eletrofílicas altamente reativas que podem polimerizar e/ou reagir com aminoácidos e proteínas endógenos para formar pigmentos marrons complexos, que produzem escurecimento enzimático altamente indesejável durante a fisiologia pós-colheita, armazenamento e processamento de frutas e vegetais (JIANG et al., 2004).

A peroxidase catalisa quatro tipos de reações: peroxidação, oxidação, catalítica e hidroxilação. Para substratos fenólicos, somente as reações de peroxidação são importantes (RANIERI et al., 2001). Além disso, a ação da enzima objetiva principalmente controlar o nível de peróxidos gerados em quase todos os compartimentos celulares e na ausência de um doador de hidrogênio, a peroxidase converte peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 (TIJSKENS et al., 1997).

Técnicas de imobilização melhoram as propriedades do biocatalisador por aumentar a estabilidade e a rigidez da estrutura, causando a modificação química, gerando microambientes hidrofílicos, que podem proteger o biocatalisador, e conseqüentemente reduzir as inibições causadas por inibidores (GUZIK et al., 2014). As enzimas quando imobilizadas possuem uma maior estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura além de poderem ser reutilizadas (DANTAS, 2017).

2.4 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática é definida como um conjunto de métodos que permitem a melhoria do aumento da estabilidade e da possibilidade de reutilização da enzima de interesse durante o processo (BORDINHÃO et al., 2015). Durante a imobilização é indispensável averiguar as diferentes condições necessárias para o bom desempenho da enzima, levando em consideração as propriedades do processo, a extensão da reutilização da enzima, à escolha da enzima e do suporte ou matriz a serem utilizados (KHOSHNEVISAN et al., 2017).

As formas de imobilização incluem floculação, adsorção a superfícies, ligação covalente a carreadores, ligação cruzada entre células, encapsulamento e aprisionamento em matrizes. Dentre os métodos sugeridos, o encapsulamento tem emergido com sucesso, por garantir maior proteção às variações ambientais e viabilidade enzimática. Neste processo, as enzimas ficam aprisionadas no interior de uma matriz polimérica, a qual possui poros de tamanho suficiente

para permitir a difusão do substrato em direção às células, assim como dos produtos gerados para fora da matriz (ZANIN; MORAES, 2014).

Muitos compostos magnéticos têm sido utilizados como suporte para imobilização de enzimas. A magnetização é uma possível solução para materiais que são de difícil remoção do meio de reação (BARBOSA et al. 2012). O uso de suportes magnéticos para imobilização de enzimas é principalmente baseado na propriedade magnética da fase sólida que possibilita atingir uma rápida separação por campo magnético, bem como a diminuição do custo operacional. As separações magnéticas são relativamente rápidas, fáceis e requerem aparelhagem simples. Portanto, técnicas de separação magnética têm atualmente encontrado muitas aplicações em áreas diferentes das ciências biológicas, especialmente em escala de laboratório.

A imobilização de enzimas ou biomoléculas em micropartículas magnéticas normalmente é alcançada através dos grupos reativos existentes na sua superfície. Esses compostos funcionais podem ser produzidos de diversas formas, porém normalmente envolve um revestimento da partícula suscetível magneticamente com um polímero ou biomacromoléculas (TÜZMEN et al. 2012).

2.5 Nanopartículas magnéticas

As partículas magnéticas, em escala nano vem recebendo atenção aumentada em vários campos da biologia, incluindo aplicações biomédicas e ambientais, devido ao seu tamanho reduzido, maior área superficial e baixa toxicidade, além de diminuir a barreira de transferência, e então melhorar a eficiência catalítica. Dentre os materiais magnéticos estudados, a magnetita (Fe_3O_4) é o que tem atraído maior interesse tecnológico, especialmente sob a forma de ferrofluido, devido às excelentes propriedades magnéticas, facilidade de síntese e biodegradabilidade. (FENG et al., 2018; KIM et al., 2016).

Magnetita, é um óxido de ferro e sua estrutura cristalina consiste de uma rede de íons de oxigênio coordenados tanto a íons ferrosos (Fe^{2+}) e íons férricos (Fe^{3+}), nos interstícios octaédricos, quanto a íons Fe^{3+} , em interstícios tetraédricos (TEJA; KOH, 2009). Como os íons Fe^{3+} estão divididos igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas, não existe momento magnético resultante da presença dos mesmos. Assim, o comportamento magnético do material é proveniente apenas dos íons Fe^{2+} , que estão localizados apenas nos interstícios octaédricos (OLIVEIRA et al., 2013).

Apresentam excelentes características, como grande área superficial, mobilidade e alta transferência de massa, que favorecem a imobilização de aminopeptase, lipase, lisozima,

pectinase, fosfatase, glicose, oxidase, glicosidade, celulase, epóxido, hidrolase, esterase, polimerase, entre outras enzimas de interesse biotecnológico (GUON; SUN, 2004).

Para ampliar a utilização em larga escala de enzimas imobilizadas é necessária a resolução de desafios tecnológicos, incluindo a constante busca por novos suportes e protocolos de imobilização que mantenham a atividade catalítica da enzima após o processo de imobilização, suprimam interações deletérias entre as enzimas, ofereçam uma transferência de massa facilitada, apresentem baixo custo de aquisição e potencial para aplicações comerciais diretas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a possibilidade de aplicação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase extraída do fruto de *Tamarindus indica* (tamarindo), imobilizadas em suporte magnético de Fe_3O_4 na degradação enzimática de atrazina.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair, quantificar e caracterizar a enzima peroxidase e polifenoloxidase, a partir de frutos de tamarindo;
- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 ;
- Avaliar os efeitos da imobilização nas características da peroxidase e polifenoloxidase, em relação ao pH, temperatura, estabilidade térmica e agente ativador;
- Analisar o potencial de aplicação da enzima peroxidase e polifenoloxidase imobilizadas na degradação enzimática da atrazina;

4 METODOLOGIA

4.1 Coletas de amostras de tamarindo

As amostras dos frutos de tamarindo (*Tamarindus indica*) serão coletadas em sítios localizados no Cerrado Maranhense em diferentes fases de maturação e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC). Após a coleta, os melhores frutos serão separados, lavadas em água corrente, em seguida, lavadas novamente com água destilada.

Em seguida, será retirado o excesso de água, com separação da polpa, casca e sementes para posterior análise. A polpa e as cascas serão homogeneizadas e depois armazenado em frascos de vidro envolvidos com papel-alumínio, sendo, assim, protegidos da luz direta e mantidos à temperatura de 4 °C.

4.2 Extração das enzimas peroxidase e polifenoloxidase

As extrações enzimáticas das frutas serão obtidas a partir de uma massa de 25g da amostra de fruta em pequenas fatias e homogeneizadas em um liquidificador com 100mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0). Em seguida, esse material será filtrado, centrifugado (18000 g) a 4 °C durante 5 minutos e o sobrenadante (fonte enzimática) será armazenada em refrigerador a 4 °C para posterior análise.

4.3 Caracterização enzimática do extrato bruto e purificado

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

A atividade da polifenoloxidase, será determinada usando-se o substrato catecol, como descrito por Khan e Robinson (1994) com modificações. A mistura de 2,8mL de

solução catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão citrato-fosfato $0,05 \text{ M}$ (pH 5,5) e $1,2 \text{ mL}$ de tampão citrato-fosfato $0,05 \text{ M}$ (pH 5,5), será previamente incubado em cubeta a temperatura ambiente durante 10 minutos em espectrofotômetro Femto 800 XI. Em seguida será adicionada $0,2 \text{ mL}$ da enzima bruta. A reação será acompanhada registrando-se o aumento na absorbância a 410 nm durante 5 minutos a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ contra o branco. Uma unidade de atividade de polifenoloxidase será definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de $0,001$ unidades de absorbância por minuto.

O efeito do pH na atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase no extrato bruto serão determinados de acordo com Khan e Robinson (1994) com modificações, variando a faixa de na pH de 2,6 a 10 usando os sistemas tampão acetato (pH 3,6 a 5,5), tampão fosfato (pH 6,0 a 8,0), tampão citrato-fosfato (pH 2,6 a 7,0) e tampão borato (pH 8,0 a 10,0). A peroxidase e a polifenoloxidase serão analisadas conforme Khan e Robinson (1994) com modificações.

A influência da temperatura na atividade enzimática, será determinado de acordo com Khan e Robinson (1994) com modificações, variando a faixa de 10 a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Em tubos de ensaios contendo $0,5 \text{ mL}$ de solução enzimáticas serão incubadas na faixa de temperatura de 10 a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora em banhos de água termostatizados. Após o tratamento térmico, as amostras serão resfriadas em banho de gelo e a atividade residual das enzimas serão determinadas como descrito nos itens anteriores. A atividade das enzimas sem tratamento térmico será utilizada como controle (100% de atividade).

As enzimas peroxidase e polifenoloxidase do extrato bruto serão precipitadas utilizando acetona resfriada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, na proporção de 2:1 (acetona:extrato) em banho de gelo por aproximadamente 3 minutos, e em seguida centrifugada a 11.00 xg por 15 minutos a $5 \text{ }^\circ\text{C}$. O precipitado contendo as enzimas, será submetido à secagem em placas de vidros ao ar livre em ambiente refrigerado, pulverizado e estocado a $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

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

4.4 Síntese e imobilização das enzimas oxirredutases em nanopartículas magnéticas

A síntese das nanopartículas magnéticas será baseada no método de coprecipitação proposta por Feuser et al. (2015). $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 g) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6 g) serão dissolvidos em água deionizada (240 mL) utilizando agitador mecânico (800 G) e, em seguida, será adicionado NH_4OH (11 mL) rapidamente. Após uma hora, adicionar ácido oleico (20

mL) e a agitação será mantida por trinta minutos. O ácido oleico é utilizado para prevenir a agregação das nanopartículas e modificar a superfície das mesmas para posterior encapsulação. As nanopartículas magnéticas serão separadas através de um campo magnético e lavadas com etanol para remoção do excesso de ácido oleico.

Para encapsular, as nanopartículas magnéticas em poli(metacrilato de metila) será utilizada a técnica de polimerização em miniemulsão via radicais livres, de acordo com a metodologia empregada por Feuser et al. (2015), com modificações. A reação de polimerização será preparada de acordo com a seguinte formulação: H₂O (20 mL); persulfato de potássio 1%; álcool polivinílico 10%; metacrilato de metila 2 g; crodamol GTCC 5% e nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico (30%).

As nanopartículas magnéticas revestidas serão dispersas na fase orgânica através de ultrassom por cinco minutos. A fase aquosa (água, persulfato de potássio e álcool polivinílico), previamente preparada, serão adicionadas à fase orgânica formando uma dispersão, que será sonicada em dispersor ultrassônico (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500) por três minutos em amplitude de 70%. Para evitar a perda de monômero devido ao aumento de temperatura durante a sonicação a dispersão será mantida sob banho de gelo. As nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico encapsuladas em poli(metacrilato de metila) serão separadas através de um campo magnético e ativadas com glutaraldeído a 25 °C, sob agitação branda e teor de sólidos de 5%.

Após doze horas, as nanopartículas serão lavadas com água destilada para remover o glutaraldeído em excesso e serão armazenadas a 4 °C.

A imobilização das enzimas, será realizada empregando solução enzimática em tampão fosfato 0,05mol L⁻¹ e as nanopartículas magnéticas ativadas com glutaraldeído em agitação constante a 25 °C. Após 24 horas, serão recuperadas com um ímã, lavadas exaustivamente para remoção de enzima residual, suspensas em tampão e armazenadas a 4 °C.

A eficiência de imobilização será definida de acordo com a 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); *AE₀* corresponde à atividade enzimática antes do processo de imobilização (U mL⁻¹).

A caracterização das nanopartículas magnéticas será realizada por meio das técnicas de termogravimetria (TGA) e espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), em parceria com os Laboratórios de Pesquisa do Centro de

Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, Campus de Imperatriz.

4.5 Estudo da degradação enzimática da atrazina em meio aquoso

Serão realizadas uma série de experimentos, variando o pH (2 a 9), concentração de herbicida (0 a 100 mg L⁻¹), quantidade de enzima livre ou imobilizada (2,985 a 29,85 U mL⁻¹) e temperatura (20 a 70 °C) em triplicata. Para a correção do pH, será utilizado ácido cítrico, o mesmo empregado para a preparação do tampão citrato–fosfato.

A avaliação da remoção do atrazina em meio aquoso, será empregado um erlenmeyer contendo 100 mL de solução de composto orgânico, a pH 4,0, com adição de 0,5 mL de enzima e 2 x 10⁻³ mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio (100 µL). A degradação será avaliada em temperaturas de 20, 30 e 40 °C. A cada 10 minutos, uma alíquota será retirada para análise dos resíduos de atrazina por espectrofotometria.

Os resultados serão expressos com a média e os respectivos valores de desvio-padrão obtidos. A significância estatística será avaliada usando a análise de variância e o teste t, sendo tomado como significativamente diferente $p < 0,05$.

4.6 Análises estatísticas

Os dados serão submetidos à análise de variância, teste de Tukey e teste de Fisher, com $p < 0,05\%$ para comparação das médias, com o auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2014).

5 REFERÊNCIAS

AKTAR, Md Wasim; SENGUPTA, Dwaipayan; CHOWDHURY, Ashim. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2009.

ALLETTO, Lionel et al. Tillage management effects on pesticide fate in soils. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 30, n. 2, p. 367-400, 2010.

ALTUN, Seher et al. A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 963-970, 2015.

ALTUN, Seher et al. A facile and effective immobilization of glucose oxidase on tannic acid modified CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 963-970, 2015.

ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochemical Journal**, Londres, v. 96, n. 3, p. 595-606, 1965.

ANVISA, Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em: 18 de outubro de 2021.

ARANHA, C. F.; RIBEIRO, M. A. Remoção de glifosato utilizando ozonização fotocatalítica com TiO₂. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental Sanitária) - **Universidade Federal de Goiás**. Goiás, 2016.

ARCHANGELO, ELIANE REGINA et al. Sorção, dessorção e potencial de lixiviação de atrazine em solos brasileiros. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, v. 4, n. 01, 2005.

ARTUZI, Jorge Paulo; CONTIERO, Robinson Luiz. Herbicidas aplicados na soja e produtividade do milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1119-1123, 2006.

BAIRD, Colin.; CANN, Michael. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 11, p.844, 2011

BAMFORTH, Selina M.; SINGLETON, Ian. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 80, n. 7, p. 723-736, 2005.

BAPTISTA, Sandro José; CAMMAROTA, Magali Christe; FREIRE, Denize Dias de Carvalho. Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, p. 249-255, 2005.

Barbosa, E. F.; Molina, F. J.; Lopes, F. M.; García-Ruíz, P. A.; Caramori, S. S., Fernandes, K. F. Immobilization of peroxidase onto magnetite modified polyaniline. **The Scientific World Journal**, 2012.

BARETTA, Dilmar et al. Fauna edáfica avaliada por armadilhas e catação manual afetada pelo manejo do solo na região oeste catarinense. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 2, n. 2, p. 97-106, 2003.

BATISTA, Jael Soares et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, p. 136-141, 2012.

BAUMGARTNER, Jens; FAIVRE, Damien. Iron solubility, colloids and their impact on iron (oxyhydr) oxide formation from solution. **Earth-Science Reviews**, v. 150, p. 520-530, 2015.

BERTICELLI, Ritielli et al. COMPOSTAGEM COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS. **Revista CIATEC-UPF**, v. 8, n. 1, 2016.

BERTICELLI, Ritielli et al. COMPOSTAGEM COMO ALTERNATIVA DE BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS. **Revista CIATEC-UPF**, v. 8, n. 1, 2016.

BEZERRA, Rodrigo dos Santos. Avaliação da adição de PRP no tratamento de solo contaminado por petróleo. 2009.

BHADORIYA, Santosh Singh et al. Tamarindus indica: Extent of explored potential. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 73, 2011.

BHATIA, Saurabh. **Natural polymer drug delivery systems: nanoparticles, plants, and algae**. Springer, 2016.

BORDINHÃO¹, Carolina et al. ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1338-1343, 2015.

BRASIL. Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989. 1989. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm>. Acesso em: 20 setembro 2021.

CABIA, Nathalie Cardoso et al. Fenólicos totais, polifenoloxidação e coloração em abacate'hass' submetido a radiação UV-C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 314-320, 2011.

CAMPOS, Eunice Aparecida et al. Synthesis, characterization and applications of iron oxide nanoparticles-a short review. **Journal of Aerospace Technology and Management**, v. 7, p. 267-276, 2015.

CARLOS, Elenice A. et al. Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1217-1227, 2013.

CARMO, Diego Almeida do et al. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 133-143, 2013.

CARVALHO, Samara Andrade et al. Coeficiente de distribuição do inseticida tiametoxam na fração mineral de solos sob efeito de ácidos orgânicos mono, di e tricarbóxicos. **Química Nova**, v. 36, p. 1323-1331, 2013.

CAVAS, Tolga. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1431-1435, 2011.

CHEN, Ming et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 745-755, 2015.

CHRISTOFFOLETI, PEDRO JACOB et al. Comportamento dos herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar. **Piracicaba: CP**, v. 2, p. 72, 2009.

CLEARY, Jacob A. et al. Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental pollution**, v. 251, p. 639-650, 2019.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. **Ciência Tecnológica Alimentar**, v. 32, n. 2 p. 167- 171, 1998.

COHEN, S. Z. et al. Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses. 1984.

COLLA, Luciane Maria et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 809-813, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em:
<<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 20 de setembro de 2021.

COSTA, Amauri Costa da. Estudo de conservação de pêsego [*Prunus persica* (L.) Batsch] minimamente processado. 2010.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Ecotoxicol e Meio Ambiente**. Curitiba. v. 15. p.65-72. 2005.

DAMODARAN, PARKIN. KL; FENNEMA, OR Química de Alimentos de Fennema, 4ª Edição. **Editora, Artmed SA**, 2010.

DANTAS, J. M. M. Purificação de quitosanas produzidas por *Bacillus cereus* utilizando cromatografia líquida rápida de proteínas. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. 2017.

DE CALUWÉ, Emmy; HALAMOÚÁ, Kateřina; VAN DAMME, Patrick. Tamarindus indica L.—A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Afrika focus**,

v. 23, n. 1, p. 53-83, 2010.

DE OLIVEIRA CARVALHO, Jhonatam; 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**, v. 233, p. 159-163, 2017.

DE ROSSO, Veridiana V.; MERCADANTE, Adriana Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

DEON, Maitê Carla et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.

DEON, Maitê Carla et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.

DIXON, Malcolm. The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochemical journal**, v. 55, n. 1, p. 170-171, 1953.

DURIGAN, J. F.; CASSARO, K. P. Hortaliças minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 159-161, 2000.

DUTTA, Anirban; SINGH, Neera. Degradation of atrazine in mineral salts medium and soil using enrichment culture. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 10, p. 860-868, 2013.

ERDEMOĞLU, Murat; SARIKAYA, Musa. Effects of heavy metals and oxalate on the zeta potential of magnetite. **Journal of colloid and interface science**, v. 300, n. 2, p. 795-804, 2006.

Estrutura química da atrazina. In: Merck. Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/atrazine?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=atrazine&type=product>. Acesso em 18 de outubro de 2021.

Fabaceae in Flora do Brasil 2018. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23201>>. Acesso em: 07 set. 2021

FALGUERA, Víctor et al. Characterization of polyphenol oxidase activity in juices from 12 underutilized tropical fruits with high agroindustrial potential. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, p. 2921-2927, 2012.

FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2010.

FAVET, R.; FRIKART, M. J.; POTIN, J. La valorisation du tamarin. Richesses et potentialités des agroressources dans les PED UE 9–IAAS 3. **Montpellier SupAgro**, 2011.

Feng, J.; Yu, S.; Li, J.; Mo, T.; Li, P. Enhancement of the catalytic activity and stability of immobilized aminoacylase using modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, 286, 2018.

FERNANDES, Maria Tereza Cortez; KAWACHI, Elizabete Yoshie. Influência da quantidade de amônio na síntese de nanopartículas de óxido de ferro por microemulsão. **Química Nova**, v. 33, p. 1242-1246, 2010.

FEUSER, Paulo Emilio et al. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 355-365, 2015.

FRACETO, Leonardo Fernandes; MOSCHINI-CARLOS, Viviane; ROSA, André Henrique. Meio ambiente e sustentabilidade. **São Paulo: Bokman Companhia**, 2012.

FURTUNATO, A. A. Estudo da cinética de inativação térmica da pectina esterase e peroxidase presente na polpa de cajá (*Spondias lútea*). **Rio Grande do Norte**, 74p. 2002.

GARCIA, Elisabeth; BARRETT, Diane M. Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. **Fresh-cut fruits and vegetables**, p. 267-304, 2002.

GASPAR, Thomas et al. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. **Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants.**, 1982.

GAWLIK-DZIKI, Urszula; SZYMANOWSKA, Urszula; BARANIAK, Barbara. Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. **Food chemistry**, v. 105, n. 3, p. 1047-1053, 2007.

GHANIZADEH, Hossein; HARRINGTON, Kerry C. Non-target site mechanisms of resistance to herbicides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 1, p. 24-34, 2017.

GILL, H. K.; GARG, H. Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies, Pesticides–Toxic Aspects, Marcelo L. Larramendy and Sonia Soloneski, **IntechOpen, DOI**, v. 10, p. 57399, 2014.

GINER, J. et al. Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1467-1472, 2002.

GLINSKI, Donna A. et al. Analysis of pesticides in surface water, stemflow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA. **Chemosphere**, v. 209, p. 496-507, 2018.

Guo, Z.; Sun, Y. Characteristics of immobilized lipase on hydrofobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterefication. **Biotechnol. Prog.**, 20(2), 2004.

GUPTA, Ajay Kumar; GUPTA, Mona. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

GUSTAFSON, David I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing

pesticide leachability. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 8, n. 4, p. 339-357, 1989.

GUZIK, Urszula et al. Enhancement of biodegradation potential of catechol 1, 2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 83-88, 2014.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.

HARRIS, Linda Ann. **Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly (propylene oxide) modified styrene-dimethacrylate networks**. Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002.

HARTZLER, B. Which glyphosate product is best?. Disponível em:
HATREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Pesticides and herbicides: Types, uses, and determination of herbicides. 2016.

HOLSCHUH, Heinz Johann et al. Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.). 2000.

HSU, Shih-Yung; KAO, Ching Huei. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 83-90, 2003.

<http://www.weeds.iastate.edu/mgmt/qtr01-1/glyphosateformulations.htm>. Acesso em: 18 de outubro de 2021.

HUNTER, William J.; SHANER, Dale L. Biological remediation of groundwater containing both nitrate and atrazine. **Current microbiology**, v. 60, n. 1, p. 42-46, 2010.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. DE A.; QUEIROZ, S. C. D. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JAVARONI, Rita de Cássia A.; LANDGRAF, Maria Diva; REZENDE, Maria Olímpia O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, p. 58-64, 1999.

JAVARONI, Rita de Cássia A.; LANDGRAF, Maria Diva; REZENDE, Maria Olímpia O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, p. 58-64, 1999.

JIANG, Yueming et al. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 443-446, 2016.

JIANG, Yueming et al. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 443-446, 2004.

JIANLONG, Wang; YI, Qian. Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels. **Chemosphere**, v. 38, n. 13, p. 3109-3117, 1999.

KAUFMAN, Donald D.; EDWARDS, Debra F. Pesticide/microbe interaction effects on persistence of pesticides in soil. In: **Pesticide Chemistry: human welfare and the environment**. Pergamon, 1983. p. 177-182.

KHAIRUNNUUR, F. A. et al. Nutritional Composition, in vitro Antioxidant Activity and Artemia salina L. Lethality of Pulp and Seed of Tamarindus indica L. Extracts. **Malaysian Journal of Nutrition**, v. 15, n. 1, 2009.

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

KHAN, Faisal I.; HUSAIN, Tahir; HEJAZI, Ramzi. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of environmental management**, v. 71, n. 2, p. 95-122, 2004.

KHOSHNEVISAN, Kamyar et al. Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles: Applications and recent advances. **Molecular Catalysis**, v. 442, p. 66-73, 2017.

Kim, S.; Lee, J.; Jang, S.; Lee, H.; Sung, D.; Chang, J. H. High efficient chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase immobilized magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, 105, Part B, 2016.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

KUMAR, Chandini S.; BHATTACHARYA, Sila. Tamarind seed: properties, processing and utilization. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 48, n. 1, p. 1-20, 2008.

LEUN, David; SENGUPTA, Arup K. Preparation and characterization of magnetically active polymeric particles (MAPPs) for complex environmental separations. **Environmental science & technology**, v. 34, n. 15, p. 3276-3282, 2000.

LIING, A. C.; LUND, D. B. DETERMINING KINETIC PARAMETERS FOR THERMAL INACTIVATION OF HEATRESISTANT AND HEAT-LABILE ISOZYMES FROM THERMAL DESTRUCTION CURVES. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 4, p. 1307-1310, 1978.

LIU, Shijie. **Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design**. Elsevier, 2020.

LIU, Shijie. **Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design**. Elsevier, 2020.

- LU, Shengmin et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh-cut Chinese water chestnut. **Journal of food biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 123-137, 2006.
- LU, Shengmin et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh-cut Chinese water chestnut. **Journal of food biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 123-137, 2006.
- MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo (“Carryover”). **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 10. n. 2. p. 151-164. 2011.
- MANDAL, Abhishek; SINGH, Neera; PURAKAYASTHA, T. J. Characterization of pesticide sorption behaviour of slow pyrolysis biochars as low cost adsorbent for atrazine and imidacloprid removal. **Science of the Total Environment**, v. 577, p. 376-385, 2017.
- MARIN-MORALES, Maria Aparecida; VENTURA-CAMARGO, B. d C.; HOSHINA, Márcia Miyuki. Toxicity of herbicides: impact on aquatic and soil biota and human health. **Herbicides—current research and case studies in use**, p. 399-443, 2013.
- MARIN-MORALES, Maria Aparecida; VENTURA-CAMARGO, B. d C.; HOSHINA, Márcia Miyuki. Toxicity of herbicides: impact on aquatic and soil biota and human health. **Herbicides—current research and case studies in use**, p. 399-443, 2013.
- MEKONEN, Seblework et al. Pesticide residues in drinking water and associated risk to consumers in Ethiopia. **Chemosphere**, v. 162, p. 252-260, 2016.
- MOHAMED, H. A. et al. Physicochemical properties of tamarind (*Tamarindus indica*) seed polysaccharides. **Journal of Food Processing and Technology**, v. 6, n. 6, 2015.
- MONTIEL-LEÓN, Juan Manuel et al. Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 29-39, 2019.
- MORAES, Natália V. et al. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Rev. bras. toxicol**, p. 1-8, 2008.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2ª Edição. **Editora da Universidade Federal de Lavras**. 729p, 2006.
- MOSS, Stephen; ULBER, Lena; DEN HOED, Ingrid. A herbicide resistance risk matrix. **Crop protection**, v. 115, p. 13-19, 2019.
- NAVARRO, José L. et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. **Food chemistry**, v. 157, p. 283-289, 2014.
- NIEKAMP, Jason W.; JOHNSON, William G. Weed management with sulfentrazone and flumioxazin in no-tillage soybean (*Glycine max*). **Crop Protection**, v. 20, n. 3, p. 215-220, 2001.
- NSIBANDE, S. A.; FORBES, P. B. C. Fluorescence detection of pesticides using quantum

dot materials—a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 945, p. 9-22, 2016.

OLAGUNJU, Omotola F. et al. Effects of fermentation on proximate composition, mineral profile and antinutrients of tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed in the production of daddawa-type condiment. **LWT**, v. 90, p. 455-459, 2018.

OLIVEIRA JR, R. S. Conceitos importantes no estudo do comportamento de herbicidas no solo. Boletim informativo. **Sociedade Brasileira da Ciência do Solo**, v. 27, p. 9-12, 2002.

OLIVEIRA, Luiz CA; FABRIS, José D.; PEREIRA, Márcio C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 123-130, 2013.

PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M.; LUCHINI, L. C. Segurança ambiental no controle químico de pragas e vetores. **Solange Papini, Mara Mercedes de Andrea, Luiz Carlos Luchini.—1 ed.—São Paulo: Editora Atheneu**, 2014.

PARMAR, N., SINGH, A., WARD, O. P. Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Germany, v. 26, n. 6, p. 383-386, 2011.

PAULO, Mazzafera; VIVIANE, Gonçalves Kátia; MASSAO, Shimizu Milton. Extração e dosagem da atividade da polifenoloxidase do café. **Scientia Agricola**, 2002.

PERES, Frederico; MOREIRA, Josino Costa. É veneno ou é remédio. Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, v. 384, 2003.

PRATT, James Richard et al. Effects of atrazine on freshwater microbial communities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 449-457, 1988.

PROCÓPIO, S. O. et al. Potencial de uso dos herbicidas chlorimuron-ethyl, imazethapyr e cloransulam-methyl na cultura do feijão. **Planta Daninha**, v. 27, p. 327-336, 2009.

PROSEN, H. Fate and determination of triazine herbicides in soil (Cap. 3). In: HASANEEN. M. N. A. E. (Ed.). **Herbicides – Properties. Synthesis and Control of Weeds. Rijeka: Intech**. p. 43-58. 2012.

PROSSER, Ryan S. et al. Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 232, p. 59-72, 2016.

RAMAMURTHY, M. S. et al. Lignin biosynthesis during wound healing of potato tubers in response to gamma irradiation. **Postharvest biology and technology**, v. 18, n. 3, p. 267-272, 2000.

RAMASWAMY, H. S.; VAN DE VOORT, F. R.; GHAZALA, S. An analysis of TDT and Arrhenius methods for handling process and kinetic data. **Journal of Food science**, v. 54, n. 5, p. 1322-1326, 1989.

RANIERI, Annamaria et al. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in

sunflower. **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 354, p. 25-35, 2001.

REBELO, R. M. et al. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. **Brasília: IBAMA**, 2010.

RICE, Pamela J. et al. Advances in pesticide environmental fate and exposure assessments. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5367-5376, 2007.

RODRIGUES, Benedito Noedi.; ALMEIDA, FS de. Guia de herbicidas 5. ed. **Londrina: Edição dos autores**, 2005.

RODRIGUEZ-NARVAEZ, Oscar M. et al. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361-380, 2017.

SANDERSON, J. Thomas et al. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity?. **Toxicological Sciences**, v. 54, n. 1, p. 121-127, 2000.

SANTIAGO, Patrícia de Oliveira et al. Desenvolvimento de biossensor contendo polifenoloxidasas de sementes de jatobá para análise ambiental. 2011.

SCIREA, Renata Fumagali et al. Otimização reológica de suspensões aquosas de óxido de ferro (III). **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 20, p. 185-192, 2015.

SCORZA JÚNIOR, Rômulo P.; RIGITANO, Renê LO. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 564-572, 2012.

SENE, Luciane et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 487-496, 2010.

SILVA, C. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de Agrotóxicos e Biorremediação. Agrotóxicos e Ambiente (1ª Edição),145-193, **Embrapa**, Brasília. 2004.

SILVA, G. G. et al. Caracterização física e química de tamarindo (*Tamarindus indica* L) em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 2, p. 291-293, 2000.

SOARES, Giovana et al. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE POLIFENOLOXIDASE EM COGUMELOS DO GÊNERO PLEUROTUS OSTREATUS. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 8, n. 2, 2016.

SOUSA, Danielle Marie Macedo et al. Caracterização morfológica de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Tamarindus indica* L.-Leguminosae: caesalpinioideae. **Revista Árvore**, v. 34, p. 1009-1015, 2010.

Sousa, Ivanildo; Chaves Lucia Helena Garófalo; Junior Genival Barros. Uso de agrotóxicos impactando a saúde de horticultores familiares na região de Lagoa Seca-Paraíba. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 1, 2011.

- SOUZA, Aline Francieli; LEÃO, Marcelo. Análises dos métodos mais eficientes na inibição do escurecimento enzimático em frutas e hortaliças. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 8, n. 15, 2012.
- TAHA, Sherif M. et al. Adsorption of 15 different pesticides on untreated and phosphoric acid treated biochar and charcoal from water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 2013-2025, 2014.
- TALENS-PERALES, David; POLAINA, Julio; MARÍN-NAVARRO, Julia. Structural dissection of the active site of *Thermotoga maritima* β -Galactosidase identifies key residues for transglycosylating activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 14, p. 2917-2924, 2016.
- TAYEFI-NASRABADI, H. et al. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 751-763, 2011.
- TEJA, Aryn S.; KOH, Pei-Yoong. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in crystal growth and characterization of materials**, v. 55, n. 1-2, p. 22-45, 2009.
- TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI, Franciele Maria; MENEGALLI, Florencia Cecilia. Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1311-1318, 2014.
- TIJSKENS, L. M. M. et al. Activity of peroxidase during blanching of peaches, carrots and potatoes. **Journal of food engineering**, v. 34, n. 4, p. 355-370, 1997.
- TÜZMEN, Nalan; KALBURCU, Tülden; DENIZLI, Adil. α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 16-23, 2012.
- UDIKOVIĆ-KOLIĆ, Nikolina; SCOTT, Colin; MARTIN-LAURENT, Fabrice. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1175-1189, 2012.
- UDIKOVIĆ-KOLIĆ, Nikolina; SCOTT, Colin; MARTIN-LAURENT, Fabrice. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1175-1189, 2012.
- UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE & FOOTPRINT. FOOTPRINT. Pesticides database. **Preparazione di strumenti per la valutazione e la gestione del rischio da antiparassitari in Europa**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/>. Acesso em: agos 2021.
- VALDERRAMA, Patrícia; FABIANE, MARANGONI; CLEMENTE, Edmar. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Food Science and Technology**, v. 21, p. 321-325, 2001.

VELISEK, Josef et al. Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. **Science of the total environment**, v. 643, p. 1456-1463, 2018.

WELLER, S. C. Principles of selective weed control with herbicides. Herbicide action: an intensive course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils. **West Lafayette: Purdue University**, p. 112-134, 2000.

Wilberg, K. Q. Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

Wilberg, Kátia de Quadros. Oxidação de compostos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

WILEY, Robert C.; FERNANDEZ-SALGUERO CARRETERO, J. O. S. E. Frutas e hortaliças minimamente processadas e refrigeradas. 1997.

YANG, Huang-Hao et al. Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations. **Analytical chemistry**, v. 76, n. 5, p. 1316-1321, 2004.

YORUK, Ruhiye; MARSHALL, Maurice R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review 1. **Journal of food biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 361-422, 2003.

ZANATTA, Caroline Lima; ZOTARELLI, Marta Fernanda; CLEMENTE, Edmar. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in guava (*Psidium guajava* R.) pulp. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 705-708, 2006.

ZANIN, Gisella M.; DE MORAES, Flavio F. Enzimas imobilizadas in: Enzimas como agentes biotecnológicos, Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa. 2014.