

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO**

**CAMPUS AVARÉ**

**CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIODISSISTEMAS**

**Jonathan Dias dos Santos**

**EXTRAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE DE NABO (*Raphanus sativus* var.  
*acanthioformis*) PARA SER APLICADA NO TRATAMENTO DE RESÍDUOS DE  
ANÁLISES DE CARBOIDRATOS POR ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO**

**AVARÉ  
2023**

**Jonathan Dias dos Santos**

**EXTRAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE DE NABO (*Raphanus sativus* var. *acanthioformis*) PARA SER APLICADA NO TRATAMENTO DE RESÍDUOS DE ANÁLISES DE CARBOIDRATOS POR ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biosistemas.

Orientador(a): Prof(a).Dr(a). Marcela Pavan Bagagli

AVARÉ  
2023

Catálogo na fonte  
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Santos, Jonathan Dias dos

Extração da enzima peroxidase de nabo (*Raphanus sativus var. acanthioformis*) para ser aplicada no tratamento de de resíduos de análises de carboidratos por ácido 3,5-dinitrosalicílico / Jonathan Dias dos Santos.– Avaré, 2023.  
35 p.

Orientador: Prof(a).Dr(a). Marcela Pavan Bagagli

Monografia (Graduação – Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Avaré, Avaré, 2023.

1. Tratamento de efluentes. 2. Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. 3. Peroxidase. 4. Nabo Japonês. I. Bagabli, Marcela Pavan. II. Título

ATA N.º 16/2023 - CBEB-AVR/DAE-AVR/DRG/AVR/IFSP

### Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação

Na presente data realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **EXTRAÇÃO DA ENZIMA PEROXIDASE DE NABO (*Raphanus sativus* var. *acanthioformis*) PARA SER APLICADA NO TRATAMENTO DE RESÍDUOS DE ANÁLISES DE CARBOIDRATOS POR ÁCIDO 3,5-DINITROSALICÍLICO** apresentado pelo aluno **Jonathan Dias dos Santos (AV3005356)** do Curso **SUPERIOR EM ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS**, (Câmpus Campus Avaré). Os trabalhos foram iniciados às 14:00 pela Professora presidente da banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

Membros	IES	Presença (Sim/Não)	Aprovação/Conceito
Marcela Pavan Bagagli (Presidente/Orientador)	IFSP- Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Rafael Aparecido Ferreira (Examinador 1)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Gustavo Pio Marchesi Krall Ciniato (Examinador 2)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado

#### Observações:

A banca examinadora, tendo terminado a apresentação do conteúdo da monografia, passou à arguição do candidato. Em seguida, os examinadores reuniram-se para avaliação e deram o parecer final sobre o trabalho apresentado pelo aluno, tendo sido atribuído o seguinte resultado:

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Nota Final: 9,1

O segundo examinador é avaliador externo:

Sim  Não

Proclamados os resultados pelo presidente da banca examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, eu lavrei a presente ata que assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Campus Avaré,

23 de novembro de 2023

Documento assinado eletronicamente por:

- **Marcela Pavan Bagagli**, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLÓGICO, em 23/11/2023 08:16:09.
- **Rafael Aparecido Ferreira**, COORDENADOR(A) - FUC1 - CBEB-AVR, em 23/11/2023 12:03:07.
- **Gustavo Pio Marchesi Krall Ciniato**, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLÓGICO, em 25/11/2023 11:42:48.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 22/11/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 651205  
Código de Autenticação: 5787f66cf1



“Trabalhar com sustentabilidade é plantar um presente que garanta a subsistência das novas gerações num planeta que pede socorro e se aquece a cada dia. Pois melhor que plantar árvores, despoluir rios, proteger animais, é semear a consciência de que a garantia da vida é respeitar as fronteiras da natureza.”

(Nildo Lage)

## **AGRADECIMENTOS**

Quero expressar minha sincera gratidão a todos que colaboraram para a realização deste trabalho científico. Em especial, agradeço aos meus familiares pelo apoio incondicional que guiaram minha trajetória educacional e a minha namorada Brenda Coimbra que me apoiou em toda a minha trajetória até o momento atual.

Ao Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica e/ou Tecnológica (PIVICT) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP).

Gostaria de agradecer aos professores que me proporcionaram conhecimentos inestimáveis em todos os ramos da engenharia. Meus sinceros agradecimentos também vão para a minha orientadora Marcela Pavan Bagagli, cuja orientação e sabedoria foram essenciais na construção deste trabalho científico.

Por fim, estendo meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho acadêmico, e espero que esta pesquisa possa contribuir para o desenvolvimento da ciência e da sociedade.

## RESUMO

O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) é um reagente utilizado na determinação de açúcares redutores e o efluente dessas análises contém compostos potencialmente tóxicos e recalcitrantes que não podem ser descartados diretamente na rede de esgoto. Entre estes compostos estão fenóis e nitrofenóis. Uma das formas de tratar o resíduo é através do uso de enzimas oxidativas, como a peroxidase vegetal. Este trabalho teve como objetivo estudar a extração e aplicação da enzima peroxidase de nabo japonês (*Raphanus sativus* var. *acanthioformis*) para tratar o efluente das análises que utilizam DNS, avaliando o pH ideal para a extração e o efeito nos compostos fenólicos do efluente. Para esse fim, foram utilizados reatores enzimáticos incubados a 30°C durante 24 horas, sendo submetidos à análise de absorvância, fenólicos totais, pH e atividade enzimática residual. As análises foram conduzidas considerando a solução extratora utilizada, que incluiu água destilada, tampão fosfato 0,05 M com pH 7,0 e tampão citrato-fosfato 0,05 M com pH 5,0. Em seguida, foi avaliada a estabilidade da atividade enzimática durante estocagem em temperatura ambiente, de refrigeração (5 °C) e de congelamento (-18 °C). Os resultados revelaram que a degradação de fenólicos foi altamente promissora no contexto do presente estudo. A maior atividade enzimática foi obtida para a extração realizada com água destilada, aproximadamente 300 U/mg, no entanto este apresentou elevada higroscopicidade. Em relação aos ensaios de tratamento do efluente, verificou-se uma redução significativa de 28% no ensaio utilizando tampão fosfato pH 7,0, e uma redução de 14% no ensaio com tampão fosfato pH 5,0. Ademais, os resultados mostraram que o ensaio de tratamento do efluente conduzido com tampão fosfato pH 5,0 apresentou a maior queda de atividade enzimática residual ao longo do tempo de reação, alcançando 69% de redução. Em contrapartida, o ensaio com tampão fosfato pH 7,0 mostrou-se mais favorável ao processo, apresentando uma menor queda na atividade residual. O tratamento enzimático do efluente de reações de DNS realizado em pH 7,0 apresentou redução do teor de fenólicos duas vezes superior ao tratamento realizado em pH 5,0.

**Palavras-chave:** Tratamento de efluentes; Ácido 3,5-Dinitrosalicílico; Peroxidase; Nabo Japonês

## ABSTRACT

The 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) is a reagent used in the determination of reducing sugars, and the effluent from these analyses contains potentially toxic and recalcitrant compounds that cannot be directly discharged into the sewage system. Among these compounds are phenols and nitrophenols. One way to treat the waste is through the use of oxidative enzymes, such as plant peroxidase. This study aimed to investigate the extraction and application of peroxidase enzyme from Japanese radish (*Raphanus sativus* var. *acanthioformis*) to treat the effluent from DNS analyses, evaluating the optimal pH for extraction and its effect on the phenolic compounds in the effluent. For this purpose, enzymatic reactors were used, incubated at 30°C for 24 hours, and subjected to analysis of absorbance, total phenolics, pH, and residual enzymatic activity. The analyses were conducted considering the extraction solution used, which included distilled water, 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0, and 0.05 M citrate-phosphate buffer at pH 5.0. The stability of enzymatic activity during storage at room temperature, refrigeration (5°C), and freezing (-18°C) was also evaluated. The results revealed that the degradation of phenolics was highly promising in the context of this study. The highest enzymatic activity was obtained for extraction using distilled water, approximately 300 U/mg, although it exhibited high hygroscopicity. Regarding effluent treatment assays, a significant reduction of 28% was observed in the assay using pH 7.0 phosphate buffer, and a reduction of 14% in the assay with pH 5.0 phosphate buffer. Furthermore, the results showed that the effluent treatment assay conducted with pH 5.0 phosphate buffer exhibited the greatest decline in residual enzymatic activity over the reaction time, reaching a 69% reduction. In contrast, the assay with pH 7.0 phosphate buffer was more favorable to the process, showing a lower decrease in residual activity. The enzymatic treatment of DNS reaction effluent at pH 7.0 resulted in a two-fold greater reduction in phenolic content compared to treatment at pH 5.0.

**Key-words:** wastewater treatment; 3,5-Dinitrosalicylic acid; peroxidase; Japanese turnip;

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reação entre o DNS e um açúcar redutor (AR) em meio básico.....	16
Figura 2 - Materiais utilizados na extração da enzima peroxidase. ....	21
Figura 3 - Preparo da peroxidase de nabo: a) nabo higienizado e fatiado; b) homogeneização com a solução extratora em liquidificador; c) filtrado distribuído em placas de Petri; d) liofilização do extrato enzimático.....	22
Figura 4 - Atividade de peroxidase dos extratos liofilizados de nabo ( <i>Raphanus sativus</i> var. <i>acanthioformis</i> ).....	26
Figura 5 - Absorbância do efluente da análise de DNS de 200 nm a 800 nm.....	27
Figura 6 – Teor de fenólicos totais para as reações e seus respectivos brancos.....	28
Figura 7 – Atividade residual de peroxidase para as reações e seus respectivos brancos. ....	29
Figura 8 - Curva média de absorbância (200 a 800 nm) das amostras dos ensaios de degradação e seus respectivos brancos para o a) ensaio 1, o b) ensaio 2 e o c) ensaio 3. ....	30
Figura 9 – Amostras do ensaio enzimático, coletadas e dispostas em sequência estando os brancos à esquerda de cada teste. a) tempo zero; b) Após 1 hora de incubação; c) Após 2 horas de incubação; d) Fim do teste, com 24 horas de acompanhamento.....	31
Figura 10 - Média da atividade da enzima peroxidase extraída de nabo ao longo do tempo de estocagem em temperatura ambiente, de refrigeração (5°C) e de congelamento (-18°C). ....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ensaio de degradação do efluente de análises de DNS pelas peroxidases extraídas de <i>Raphanus sativus</i> var. <i>acanthioformis</i> . .....	24
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
coord.	Coordenador
ed.	Edição
Ed.	Editor
f.	Folha
IFSP	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
p.	Página
DNS	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
EPA	US Environmental Protection Agency
PODs	Peroxidases
OMW	Lagar de azeite
HPLC	Técnica de cromatografia líquida de alta eficiência
ONU	Organização das Nações Unidas
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
ANOVA	Análise de Variância
HRP	Horseradish peroxidase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1. Peroxidases vegetais.....	14
1.2. Análise de Açúcares Redutores.....	16
1.3. Tratamento de efluentes da análise de açúcares redutores por DNS.....	17
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Extração da peroxidase de nabo ( <i>Raphanus sativus var. acanthioformis</i> ).....	21
3.2 Efluente da análise de AR por DNS.....	24
3.3. Reator enzimático.....	24
3.4 Análise de fenólicos totais.....	25
3.5 Atividade enzimática residual.....	26
3.6 Estudo da estabilidade da peroxidase de nabo.....	26
3.7 Análise estatística.....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>26</b>
4.1 Extração da peroxidase de nabo japonês.....	26
4.2 Caracterização do efluente.....	27
4.3 Reações de Degradação.....	28
4.4 Estudo da estabilidade da enzima peroxidase de Nabo.....	32
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Peroxidases vegetais

As enzimas peroxidases (POD, E.C. 1.11.1.7) são oxirredutases que utilizam hidroperóxidos como receptores de elétrons. Em geral, apresentam no sítio ativo um grupo prostético heme, o qual reagirá com o peróxido através de um mecanismo complexo (Rusgaz *et al.* 1996; Uliana *et al.*, 2008).

Essas reações são fundamentais para a degradação de compostos orgânicos e a remoção de substâncias tóxicas em sistemas biológicos. A atividade da peroxidase tem sido explorada em aplicações biotecnológicas, incluindo o tratamento de efluentes contaminados por compostos recalcitrantes, como fenóis, por meio de sua capacidade de degradar esses compostos tóxicos e transformá-los em produtos menos prejudiciais ao meio ambiente. Sua alta eficiência e ampla aplicabilidade tornam a peroxidase uma enzima valiosa em processos de descontaminação e remediação ambiental (Rodríguez *et al.*, 2008).

As peroxidases são encontradas em vegetais, animais e microrganismos, apresentando boa estabilidade quanto ao pH (entre 5 e 8) e temperaturas do meio reacional (de 20°C a 40°C) (Rusgaz *et al.*, 1996; Uliana *et al.*, 2008).

Diao *et al.*, (2018), em sua análise na caracterização bioquímica da peroxidase do rabanete vermelho (*Raphanus sativus L.*), observou que o pH ótimo da peroxidase purificada foi de 5,6, e 80% de sua atividade foi preservada em valores de pH entre 4,0 e 8,0 após incubação por 2 horas. Adicionalmente, essa enzima demonstrou temperatura ótima de atividade entre 35°C e 40°C.

A extração da enzima peroxidase de nabo (*Raphanus sativus var. acanthioformis*) tem sido objeto de investigações devido à sua potencial aplicação no tratamento de resíduos provenientes de análises de carboidratos por DNS, seus resífuos e águas

residuais de lagares de azeite, devido à sua notável capacidade em degradar compostos fenólicos e recalcitrantes (Uliana *et al.*, 2008; Bilal *et al.*, 2018; Lopes, 2018).

A descontaminação de águas residuais contaminadas com fenóis, cresóis e fenóis clorados pode ser feita com auxílio de peroxidase das raízes de Rábano Silvestre (*Armoracia rusticana*), na forma purificada com a denominação de HRP (*Horseradish Peroxidase*). Recentemente, peroxidases de outras fontes, como melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), nabo (*Brassica rapa* L.) e copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foram sugeridas como alternativas a HRP (Akhtar; Husain, 2006; Maciel *et al.*, 2006).

A análise minuciosa de características específicas do processo de extração e aplicação das peroxidases, tais como o pH ótimo para sua atividade enzimática, a concentração ideal do substrato, o tempo adequado de reação e os efeitos de aditivos no sistema reacional, têm sido conduzidas visando otimizar as condições de atuação da enzima (Hamid *et al.*, 2009).

As PODs desempenham um papel de extrema importância no controle do crescimento e desenvolvimento vegetal, estando intrinsecamente associadas a diversas funções fisiológicas, tais como a biossíntese de lignina (Gross, 2008), a suberização (Bernards *et al.*, 1999), a cicatrização de feridas (Kumar *et al.*, 2007), a maturação de frutas (Huang *et al.*, 2007), o metabolismo de auxinas e a resistência a doenças (Veitch, 2004). Adicionalmente, essas enzimas exibem habilidade de catalisar a polimerização oxidativa de fenóis, anilinas e outros substratos aromáticos, ocasionando a formação de oligômeros insolúveis na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dunford; Stillman, 1976).

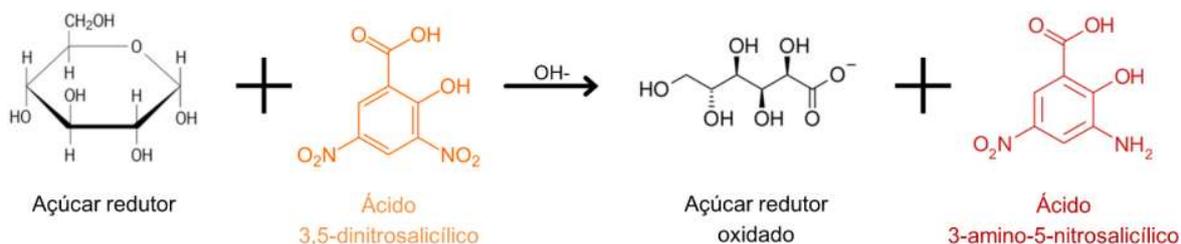
Em virtude do alto potencial redox demandado para a oxidação de compostos fenólicos, as PODs têm sido objeto de considerável interesse como biocatalisadoras. Diversas PODs oriundas de fontes diversas têm sido minuciosamente investigadas para diversas aplicações potenciais nos âmbitos clínico, bioquímico, biotecnológico e industrial, inclusive na síntese de compostos específicos, como produtos químicos aromáticos (Srinivas *et al.*, 2002).

## 1.2. Análise de Açúcares Redutores

A análise de açúcares redutores (AR) é realizada em diversos laboratórios que trabalham com processos fermentativos e enzimáticos, ou mesmo aqueles que realizam análises físico-químicas que contemplem a quantificação desses açúcares. As análises podem ser feitas por métodos titulométricos, cromatográficos ou colorimétricos, sendo esse último mais prático que o titulométrico e mais barato que o cromatográfico (SILVA *et al.*, 2003).

Dentre os métodos colorimétricos para quantificação de AR está o método descrito por Miller (1959) o qual utiliza como reagente o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS ou DNSA) em presença de fenol e meio básico. O DNS é reduzido pelos açúcares redutores formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e ácidos aldônicos, conforme ilustrado na Figura 1.

**Figura 1** - Reação entre o DNS e um açúcar redutor (AR) em meio básico.



Fonte: Silva *et al.*, 2003.

Os compostos fenólicos presentes na reação são recalcitrantes e nocivos ao meio ambiente, não podendo o resíduo da análise ser descartado diretamente na rede de esgoto. Embora a legislação vigente não apresente valores de referência para nitrofenóis, a *US Environmental Protection Agency* (EPA) considera 130 compostos nitroaromáticos como poluentes prioritários, recomendando a concentração de  $20 \cdot 10^{-5}$  g/L para dinitrofenóis e trinitrofenol em água (Martins, 2008).

Muitos esforços têm sido feitos para reduzir o impacto ambiental da análise de AR por DNS, entre eles, a modificação da metodologia proposta por Miller (1959),

removendo o fenol do reagente. De acordo com Vasconcelos *et al.* (2013), a forma mais adequada de se referir à metodologia empregada na determinação de açúcares redutores por meio do método DNS, sem a necessidade de empregar fenol e bissulfito de sódio, é aquela originalmente proposta por Bernfeld (1955), na qual foram introduzidas modificações posteriormente sugeridas por Miller (1959). Outro foco tem sido dado no tratamento dos compostos fenólicos e nitro fenólicos remanescentes no efluente analítico.

### **1.3. Tratamento de efluentes da análise de açúcares redutores por DNS**

Diversos métodos podem ser empregados para o tratamento desses efluentes, com o objetivo de reduzir o teor de matéria orgânica, com destaque para os processos oxidativos avançados (Britto; Rangel, 2008; Lopes, 2018). A aplicação de organismos e seus produtos (como as enzimas) na degradação desses compostos também encontram aplicação de longa data, mas tem ganhado destaque recentemente (López *et al.*, 2002; Abirami, 2013; Chaussonnerie *et al.*, 2016; Bilal *et al.*, 2019). Uliana *et al.* (2008) observou que a peroxidase de rábano silvestre (*Raphanus sativus*) foi capaz de oxidar o peróxido de hidrogênio tendo como mediador o ácido 5-aminossalicílico.

A extração de enzimas a partir de plantas e seu uso na remoção de poluentes em soluções aquosas é um tópico de grande interesse na área de biotecnologia ambiental. A enzima peroxidase tem sido amplamente utilizada em processos de tratamento de água e efluentes, devido à sua alta eficácia em oxidar compostos orgânicos (Uliana *et al.*, 2008; Bilal *et al.*, 2018; Lopes, 2018; Naghibi *et al.*, 2003). O desenvolvimento de pesquisas de base e avançadas dependem de diversas análises químicas, as quais envolvem a geração de efluentes e resíduos que podem prejudicar o meio ambiente se lançados na rede de esgoto ou encaminhados para aterros sanitários sem tratamento (Pagno *et al.*, 2003).

Naghibi *et al.* (2003) apresentou a utilização da enzima peroxidase obtida a partir das sementes do nabo (*Raphanus sativus*) para a remoção de poluentes aromáticos de soluções aquosas. A peroxidase foi isolada, caracterizada e purificada do rabanete (*Raphanus sativus*), e sua atividade para a biotransformação de compostos fenólicos foi

verificada utilizando um efluente sintético tamponado em pH 7,4, contendo 0,9 mM de fenol, que foi tratado com raiz de *Raphanus sativus* cortada e seu extrato. Tanto o corte quanto o extrato da semente do vegetal foram adicionados separadamente como fonte de enzima à solução de fenol. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio. Após três horas de agitação, o teor de fenol nas misturas foi determinado. Os resultados mostraram que o uso de 7 ml de suco de raiz de *Raphanus sativus* causou uma remoção equivalente a 98% do fenol presente na solução.

O estudo conduzido por Chiong *et al.* (2016) teve como escopo a consecução da extração de peroxidase a partir de resíduos agrícola, com o intuito de estabelecer sua aplicabilidade no processo de remoção de fenóis. A peroxidase foi extraída do casca de jicama (*Pachyrhizus erosus*) em diferentes condições de extração de pH, a relação da porcentagem de amostra e tampão (m:v) e a temperatura. Os resultados experimentais mostraram que a abordagem extrativa do processo, conduzida a um pH 10, proporção de 40% em (m/v) e a 25 °C, elucidou um grau de atividade peroxidásica de 0,79 U/mL. De fato, o incremento da temperatura deflagrou um ligeiro avolumar das potencialidades catalíticas da peroxidase. A peroxidase extraída, nas condições ótimas de extração, demonstrou uma eficiência de 87,5%, sendo esse avaliado em pH 7. Além disso, a eficácia de remoção fenólica exibiu uma taxa aproximada de 97%, na faixa de 30 a 40 °C. Merece destaque que a quantificação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) deve ser criteriosamente mantida abaixo de 100 mM, para assegurar eliminação ótima na concentração fenólica avaliada.

O estudo conduzido por Bouslimi *et al.*, 2019 avaliou a degradação dos compostos fenólicos presentes nas águas residuais provenientes do processo de extração de azeite, conhecidas como águas residuárias de lagar de azeite (OMW), por meio da utilização de peroxidases vegetais em sua forma bruta. Concretamente, o OMW foi submetido ao tratamento com peroxidases brutas extraídas das folhas de duas plantas: o rabanete (*Raphanus sativus* L.) e a urtiga (*Urtica urens* L.). Ao longo de um período de sete dias, o OMW foi incubado em conjunto com os extratos brutos de peroxidase. Esse procedimento resultou em uma notável redução superior a 60% na concentração dos fenóis totais presentes no OMW. Os resultados obtidos por meio da técnica de

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) evidenciam que a ação enzimática exerceu um impacto na composição dos polifenóis originalmente presentes no OMW. De fato, a análise revelou uma diminuição significativa nos níveis de alguns ácidos fenólicos, a saber, ácido gálico, ácido p-cumárico e hidroxitirosol. Além disso, observou-se o desaparecimento completo do ácido vanílico, em comparação com o OMW não tratado. Tais observações sinalizam para a capacidade das peroxidases brutas, extraídas de fontes vegetais, de alterar de maneira seletiva a composição dos compostos fenólicos presentes nas águas residuárias de lagar de azeite.

Esses resultados ilustram a viabilidade de aplicar enzimas peroxidases vegetais em processos de tratamento de águas residuárias. A capacidade das peroxidases brutas de direcionar a degradação de compostos fenólicos específicos destaca o potencial dessas enzimas como ferramentas promissoras no desenvolvimento de estratégias sustentáveis para o gerenciamento de resíduos industriais, contribuindo para a redução de impactos ambientais e a valorização de subprodutos vegetais.

A aplicação de análises de carboidratos conduz inevitavelmente à produção de efluentes. Esses efluentes, muitas vezes, contêm compostos que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana, como é o caso da análise de DNS. A falta de tratamento adequado para esses efluentes pode causar impactos ambientais negativos, tais como a contaminação do solo e das águas subterrâneas (Oliveira *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). Portanto, é necessário o desenvolvimento de tecnologias eficientes e sustentáveis para o tratamento desses resíduos, com o objetivo de minimizar o impacto ambiental e que possa ser facilmente utilizado pelos laboratórios que aplicam as análises de açúcares utilizando DNS.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste projeto foi avaliar a extração e condições de armazenamento da enzima peroxidase de nabo japonês (*Raphanus sativus* Var. *acanthioformis*) para aplicação na degradação do ácido 3,5-dinitrosalicílico, seu derivado, o ácido 3-amino-5-

salicílico e fenol presentes no efluente da análise de açúcares redutores pelo método do DNS (Miller, 1959) contribuindo para área de tecnologias para o desenvolvimento sustentável - tratamento de poluição, conforme definição do MCTIC (Portarias nº 1.122, de 19.03.2020 e nº 1.329 de 27.03 de 2020) e tendo aderência aos objetivos de desenvolvimento sustentável da ONU número 6 (água e saneamento) e número 12 (consumo e produção responsáveis).

## 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Avaliar a influência do pH na extração da peroxidase de nabo;
- Avaliar a ação do extrato bruto da enzima peroxidase sobre o efluente da análise de DNS;
- Avaliar a estabilidade da enzima em temperatura ambiente, refrigeração e de congelamento;

## 3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 3.1 Extração da peroxidase de nabo (*Raphanus sativus var. acanthioformis*)

Os nabos foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 200ppm por 15 minutos e, em seguida, descascados e triturados em liquidificador doméstico na presença de solução extratora (água destilada, tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 ou tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0). Uma massa de 500 g de nabo japonês (*Raphanus sativus var. acanthioformis*) foi misturada com 250 mL de solução extratora e triturados por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em tecido de algodão e o filtrado, aqui denominado de extrato enzimático, foi distribuído em placas de Petri, congelado e liofilizado por 48 h. Após homogeneização do material seco, este foi mantido à -18 °C até o momento de seu uso. As Figuras 2 e 3 ilustram as etapas e os materiais utilizados para a extração da enzima.

**Figura 2** - Materiais utilizados na extração da enzima peroxidase.

## Materiais Utilizados para a extração da enzima

### 1 - Nabo Japonês

utilizado para obtenção da enzima



### 2 - Faca de cozinha

As facas serão utilizadas para descascar e preparar a Nabo para a trituração.



### 3- Liquidificador

O liquidificador será utilizado para a trituração do Nabo.



### 4- Tecido de algodão

os tecidos de algodão serão utilizados para filtração da polpa triturada e centrifugada se necessário.



### 5 - Placas de Petri

as Placas de Petri serão utilizadas para a distribuição e o armazenamento da polpa centrifugada



### 6 - Congelador

As placas serão congeladas à -18 °C para posteriormente serem liofilizadas e mantidas no congelador até o momento do seu uso.



### 7- Liofilizador

As placas de Petri passam por um processo de liofilização para desidratação completa sem que as amostras percam suas propriedades.



### 8 - Tubos Falcon

Após a completa desidratação, o sobrenadante será retirado da placa de Petri e armazenado em Tubos Falcon, sendo mantido na geladeira em -18 °C até o momento do seu uso.



Imagens meramente ilustrativas obtidas na internet.

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 3** - Preparo da peroxidase de nabo: a) nabo higienizado e fatiado; b) homogeneização com a solução extratora em liquidificador; c) filtrado distribuído em placas de Petri; d) liofilização do extrato enzimático.



Fonte: Elaborada pelo autor

A atividade enzimática de peroxidase foi determinada nos extratos liofilizados de acordo com o método descrito por Khan e Robinson (1994) com adaptações. De forma sucinta, 1,5 mL de solução guaiacol 1% (v/v) em etanol 50% (v/v) foram adicionados a 0,4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% (v/v) e 1,5 mL da mesma solução utilizada para realizar as extrações. Posteriormente a mistura foi homogeneizada e adicionada de 0,1 mL de extrato enzimático tampão 5 e 7 e água destilada. A reação foi conduzida por 3 minutos a 40 °C sendo monitorada a absorvância da amostra em 420 nm. Um branco foi realizado da mesma forma que as reações, com substituição do extrato enzimático por solução extratora. A atividade enzimática foi calculada pela equação 1, sendo uma unidade de atividade de peroxidase definida como o aumento de 0,01 na absorvância da amostra por minuto de reação e mL de extrato.

$$\text{Atividade Peroxidase } \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{(Abs_{final} - Abs_{inicial})}{0,01 \cdot t_{reação} \cdot V_{extrato}} \quad \text{eq.(1)}$$

### **3.2 Efluente da análise de AR por DNS**

Inicialmente foi realizada a separação do lote de efluente a ser utilizado em todos os ensaios do trabalho e foi realizada sua caracterização. O lote foi mantido em temperatura ambiente em embalagem opaca, evitando a incidência de luz no material. O pH do material foi determinado utilizando um pHmetro de bancada e a condutividade um condutivímetro de bancada. A absorbância de 200 a 800 nm foi analisada por varredura em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo.

### **3.3. Reator enzimático**

Foram montados os reatores enzimáticos para verificação da atuação da peroxidase sobre o efluente das análises de DNS. Os reatores consistiram em tubos tipo Falcon, de 50 mL, envoltos em papel alumínio (abrigo da luz) mantidos em banho termostático à 30 °C durante 24 horas. Um branco, sem enzima, foi realizado paralelamente. A Tabela 1 apresenta as condições experimentais, sendo que cada uma foi conduzida em triplicata, inclusive o branco.

**Tabela 1** – Ensaios de degradação do efluente de análises de DNS pelas peroxidases extraídas de *Raphanus sativus var. acanthioformis*.

Reagentes	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Branco 1	Branco 2	Branco 3
	Volume (μL)	Volume (μL)	Volume (μL)	Volume (μL)	Volume (μL)	Volume (μL)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,3% - v/v)	2400	2400	2400	2400	2400	2400
Tampão	9000 pH 7,0	9000 pH 5,0	9000 Água destilada	9000 pH 7,0	9000 pH 5,0	9000 Água destilada
Extrato enzimático* (15000 U/mL)	600	600	600	0**	0**	0**

\*Preparado no mesmo tampão da reação.

\*\* Extrato enzimático substituído por 600 uL de tampão correspondente.

### 3.4 Análise de fenólicos totais

A análise de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu foi realizada de acordo com Roesler *et al.* (2007) com modificações. De forma sucinta, 200 μL da amostra diluída adequadamente foi adicionada à 1000 μL de Folin-Ciocalteu e 800 μL de solução carbonato de sódio 7,5% (m/v) em tubos de ensaio recobertos por papel alumínio e conduzidos em um banho termostático a 40 °C por 5 minutos. Um branco foi realizado substituindo a amostra por água destilada. Após a incubação, imediatamente resfriou-se as análises em um banho de água gelada e realizou-se a leitura da absorbância a 760

nm com o auxílio de um espectrofotômetro. O cálculo da quantidade de fenólicos foi realizado através de uma curva padrão de ácido gálico (de 0,025 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,25 mg mL<sup>-1</sup>) sendo o resultado expresso em ácido gálico equivalente.

### **3.5 Atividade enzimática residual**

A atividade enzimática residual nos reatores enzimáticos foi determinada seguindo o mesmo procedimento descrito na metodologia para o extrato enzimático, sendo este substituído pelas amostras retiradas do reator. Esta análise foi realizada para detectar se ainda havia atividade enzimática após os tempos de incubação.

### **3.6 Estudo da estabilidade da peroxidase de nabo**

A estabilidade da enzima extraída em pH 7,0 e armazenada em temperatura ambiente, temperatura de geladeira (5°C) e temperatura de congelamento (-18°C) por 31 dias foi verificada, sendo determinada a atividade residual do extrato enzimático, da mesma forma já descrita no item 3.1.

### **3.7 Análise estatística**

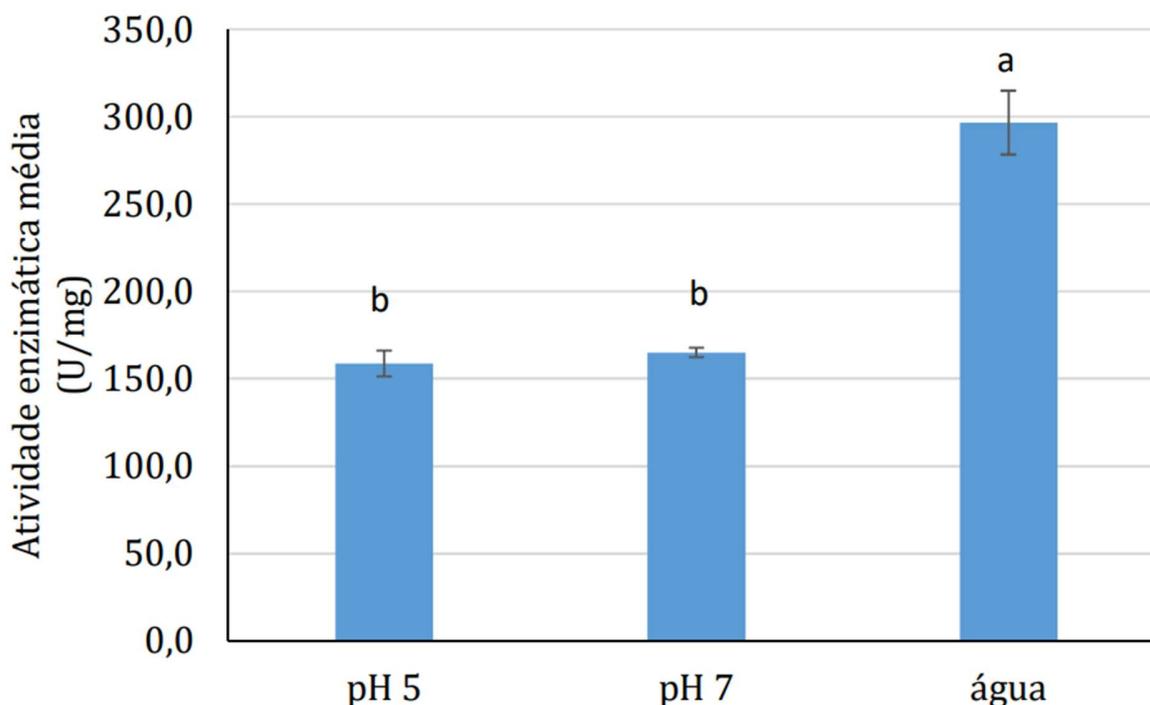
As análises foram feitas em triplicata e as médias comparadas pela ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança, utilizando o software R versão 4.1.0 (<https://www.r-project.org/>).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Extração da peroxidase de nabo japonês**

Após o preparo dos extratos enzimáticos obtidos com as 3 diferentes soluções extratoras, foi realizada a análise de atividade enzimática, a qual pode ser observada na Figura 4.

**Figura 4** - Atividade de peroxidase dos extratos liofilizados de nabo (*Raphanus sativus* var. *acanthioformis*).



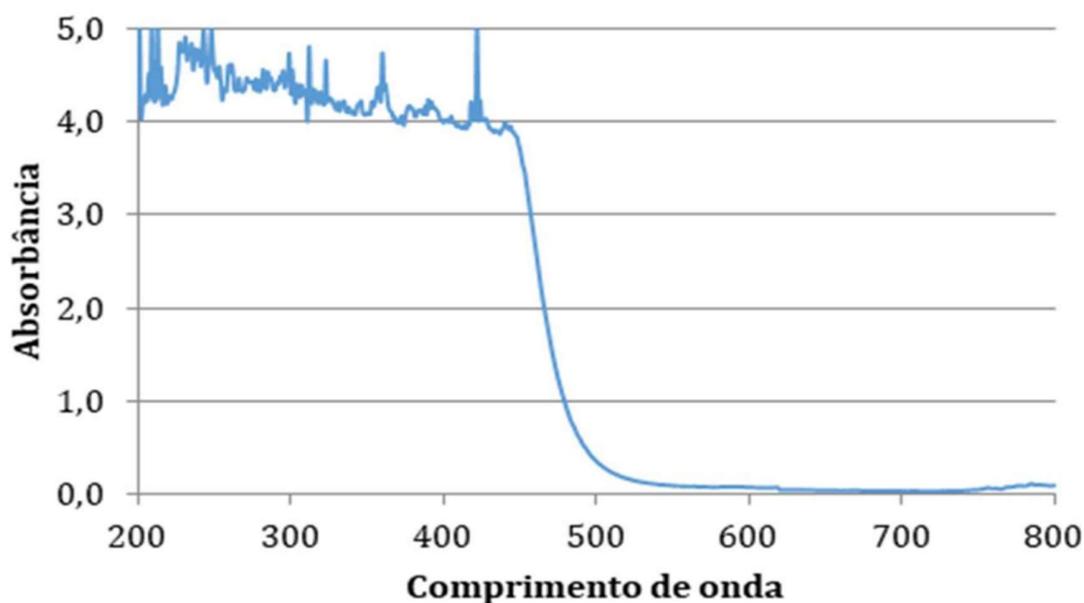
Na Figura 4, as letras sobre as barras indicam a comparação das médias realizada pelo teste Tukey, sendo que letras iguais indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Embora a maior atividade enzimática tenha sido obtida com a extração realizada com água destilada, este extrato ficou muito higroscópico, não permanecendo estável em pó quando em temperatura ambiente, dificultando a manipulação do extrato e, em diversos momentos, levando a perdas de massa quando manipuladas. Desta forma, optou-se por conduzir os ensaios de degradação com os extratos obtidos com solução tampão fosfato pH 7,0, o qual apresentou boas características físicas em relação à absorção de umidade ambiente quando comparado aos demais extratos.

## 4.2 Caracterização do efluente

O efluente utilizado para todos os ensaios propostos apresentou valor médio de pH e condutividade de 7,85 e 5448,04  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , respectivamente. A Figura 5 ilustra o comportamento do efluente de análises de DNS que foi utilizado nos ensaios de degradação pela peroxidase em varredura espectrofotométrica (200 a 800 nm). O composto formado na reação entre açúcares redutores e o DNS (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) apresentam absorvância máxima em 540 nm enquanto o DNS em si apresenta absorvância máxima em 345 nm (Fisher scientific).

**Figura 5** - Absorvância do efluente da análise de DNS de 200 nm a 800 nm.



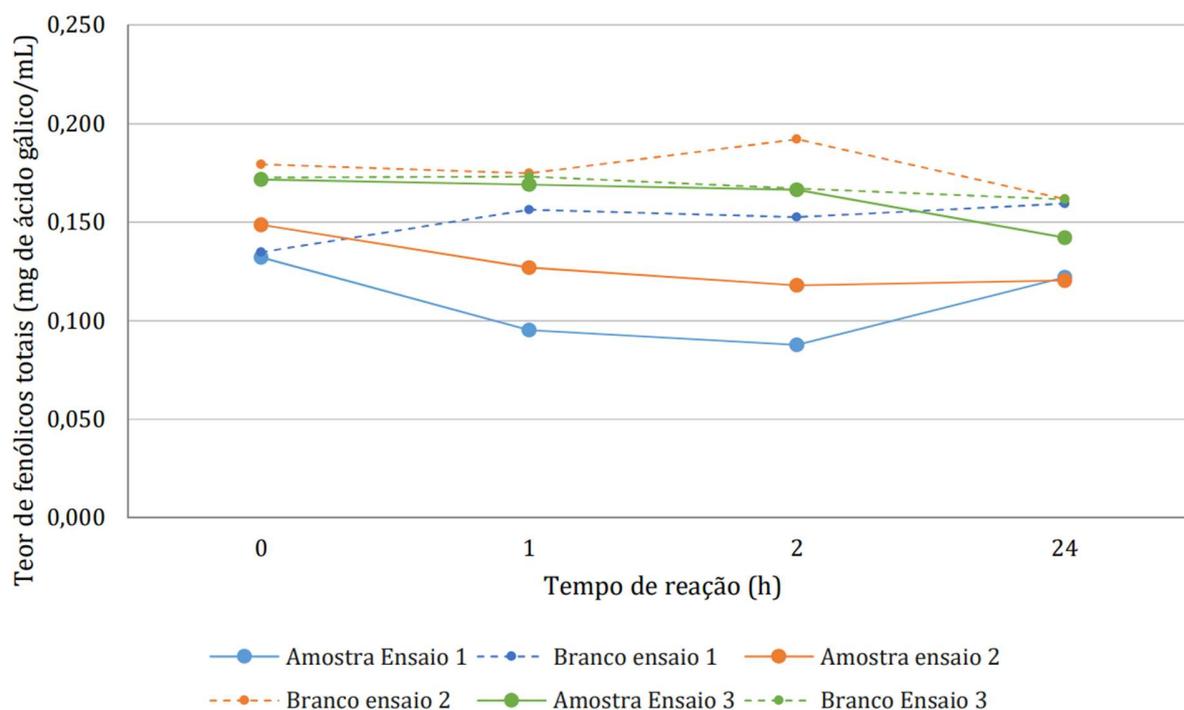
Fonte: Elaborada pelo autor

## 4.3 Reações de Degradação

O pH das reações (amostra e branco) conduzidas em tampão fosfato pH 7,0 não variou ao longo do tempo de incubação. Para as reações executadas em tampão citrato-fosfato pH 5,0, o pH já atingiu valor de 6,0 já no início da reação (amostra e branco).

A Figura 6 apresenta os valores do teor de fenólicos totais (determinados pelo método de Folin-Ciocalteu) expresso em ácido gálico equivalente. Nota-se que houve diferença significativa entre as amostras e os seus brancos, sendo o teor fenólico das amostras sempre mais baixas. O tempo de reação de 1 hora já foi capaz, nos ensaios 1 e 2, de provocar a maior redução no teor de fenólicos observada, sendo esta redução de 28% para o ensaio 1 e de 14% para o ensaio 2. Já no ensaio 3, conduzido com água destilada, houve pouca redução nos períodos iniciais, diminuindo efetivamente no período de 24 horas, entretanto, o mesmo não obteve tanto êxito sendo o que menos reduziu seu teor de fenólicos totais.

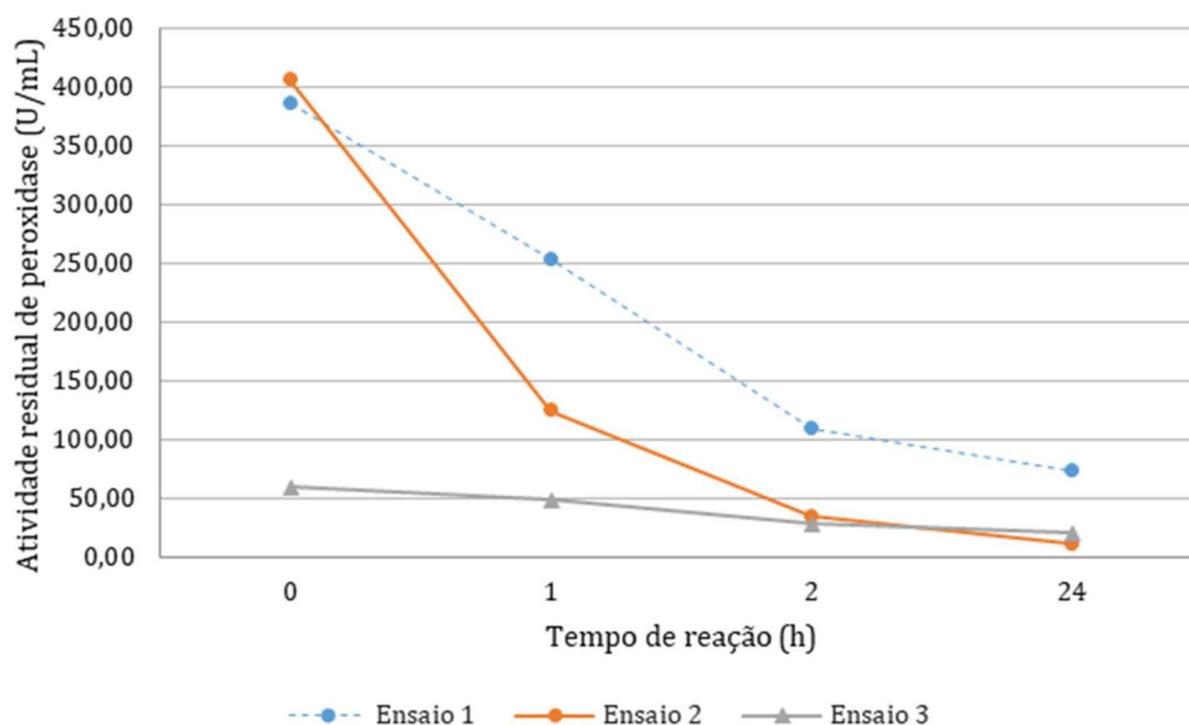
**Figura 6** – Teor de fenólicos totais para as reações e seus respectivos brancos.



A Figura 7 apresenta a atividade de peroxidase residual ao longo do tempo de incubação dos ensaios. Observa-se que, embora os extratos tenham partido de uma mesma concentração de enzima, o ensaio 2 apresentou atividade mais elevada inicialmente, o que pode ser explicado pelo pH da reação ter sido mais favorável à atuação enzimática. Houve queda no valor das atividades logo após a primeira hora de

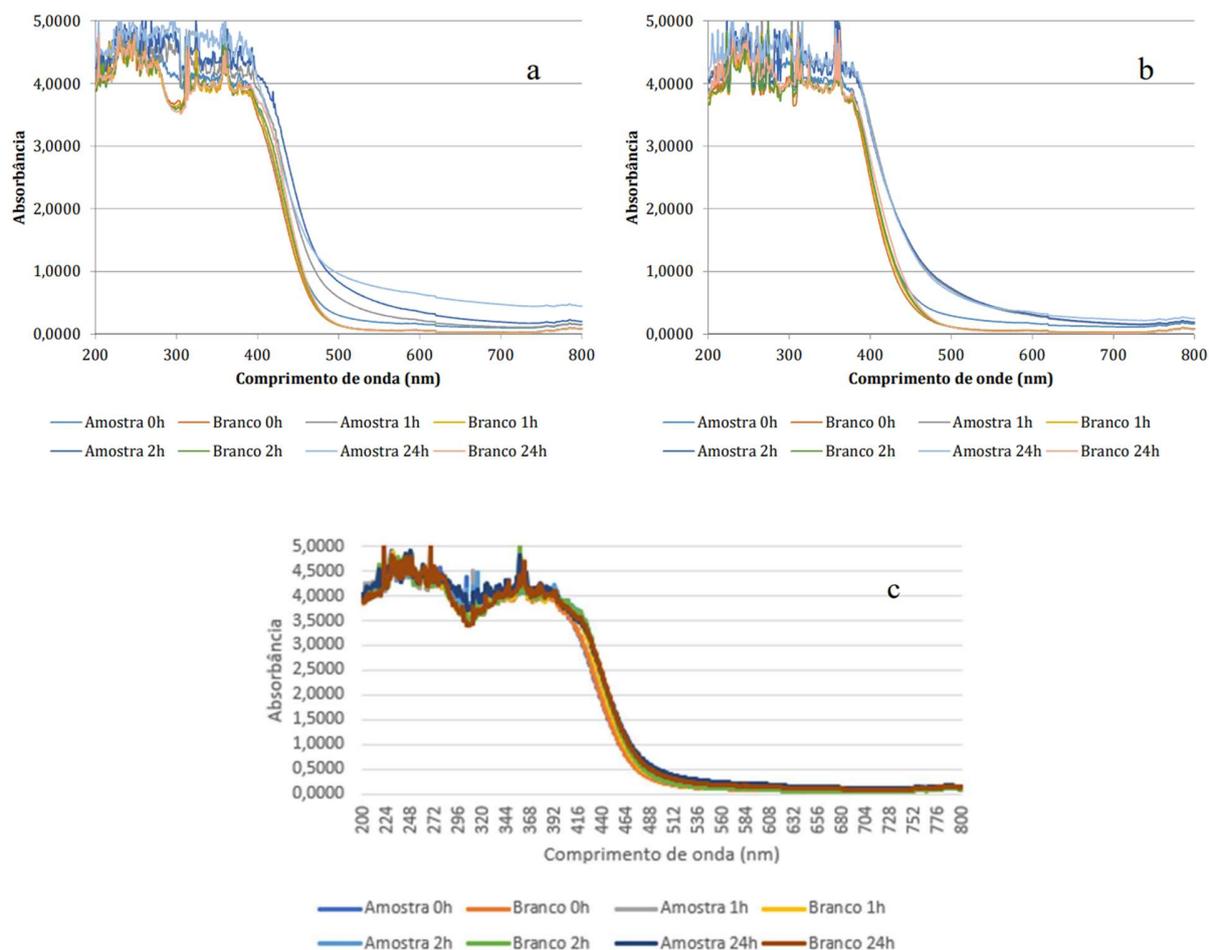
incubação, sendo que no ensaio 1 observou-se redução de 34% do valor da atividade de peroxidase e no ensaio 2 a queda foi de 69% e no ensaio 3 a queda foi de 18%. Desta forma, embora inicialmente a atividade enzimática tenha sido mais elevada no ensaio 2, essa atividade decaiu mais rapidamente que para o ensaio 1, sendo o ensaio 1, então, mais favorável ao processo.

**Figura 7** – Atividade residual de peroxidase para as amostras e seus respectivos brancos.



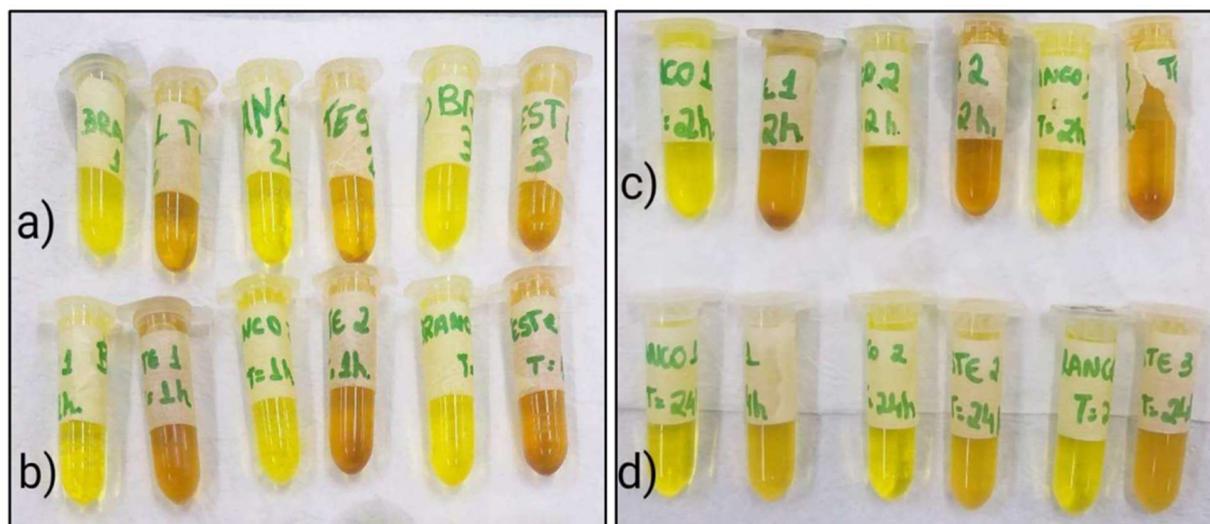
A Figura 8 apresenta o comportamento em relação à absorvância (de 200 a 800 nm) dos testes e seus respectivos brancos. Observa-se que houve um aumento da absorvância para as amostras, nos dois ensaios, na região entre 600 e 400 nm. Esse fato pode ser explicado pela formação de quinonas pela ação da peroxidase sobre o peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos. Essas moléculas se complexam formando compostos de coloração marrom avermelhada, as melaninas.

**Figura 8** - Curva média de absorvância (200 a 800 nm) das amostras dos ensaios de degradação e seus respectivos brancos para o a) ensaio 1, o b) ensaio 2 e o c) ensaio 3.



Outra evidência da ação da peroxidase no efluente estudado é mostrada na Figura 9, onde se observam as amostras retiradas dos reatores enzimáticos do ensaio 1 e seus respectivos brancos. Observa-se que a coloração do meio reacional ficou mais intensa e com precipitados sendo formados e depositados ao fundo.

**Figura 9** – Amostras do ensaio enzimático, coletadas e dispostas em sequência estando os brancos à esquerda de cada teste. a) tempo zero; b) Após 1 hora de incubação; c) Após 2 horas de incubação; d) Fim do teste, com 24 horas de acompanhamento.



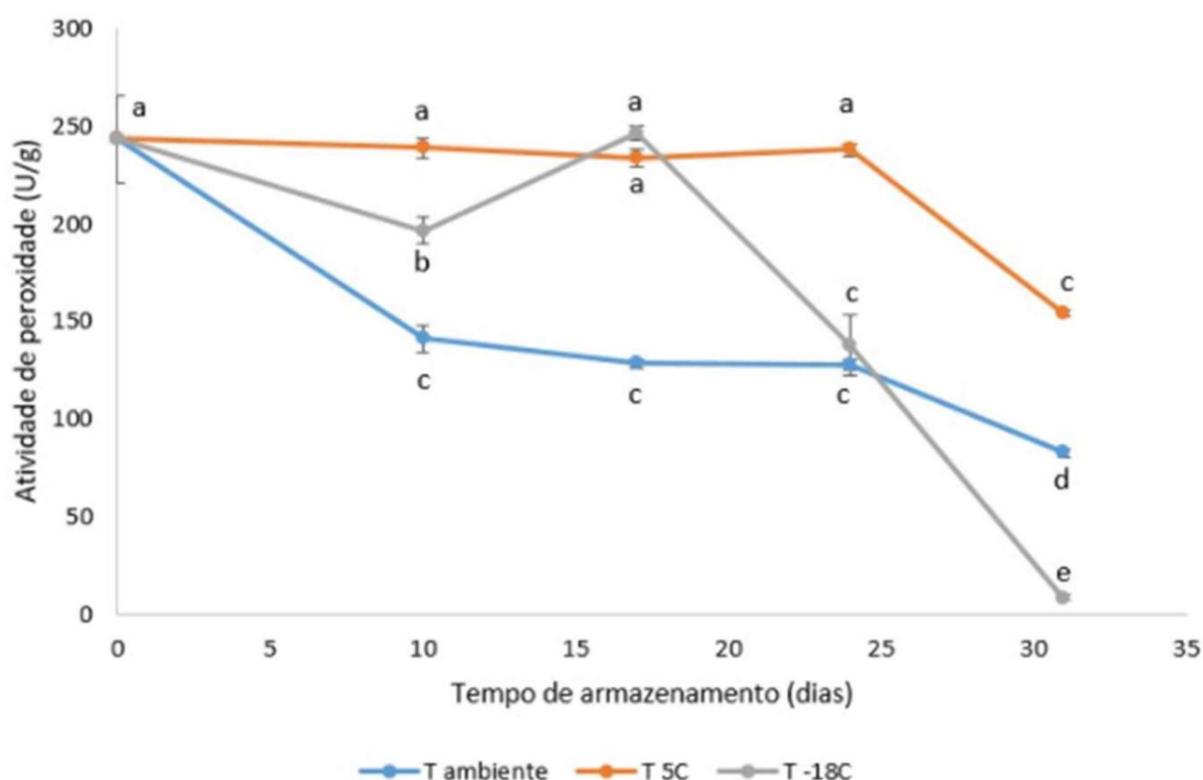
#### 4.4 Estudo da estabilidade da enzima peroxidase de Nabo

A estabilidade da enzima peroxidase de nabo foi conduzida com extratos enzimáticos em tampão fosfato pH 7,0 nas temperaturas ambiente, geladeira (entre 5 e 8°C) e congelador (-18°C). As análises foram feitas em triplicatas com o auxílio de tubos Falcon e amostradas nos tempos 0, 10 dias, 17 dias, 24 dias e 31 dias, sendo analisada a sua atividade enzimática conforme descrito no item 3.1.

A Figura 10 apresenta o comportamento médio da estabilidade da enzima peroxidase de Nabo (U/g). Observa-se que no tempo inicial de armazenamento, todos os ensaios apresentaram a mesma atividade enzimática de peroxidase, que foi se alterando conforme o tempo. A amostra armazenada em temperatura ambiente obteve uma queda brusca de atividade enzimática ao longo do período de 31 dias, perdendo cerca de 66% de sua atividade. A amostra avaliada em temperatura de congelamento apresentou as maiores variações nos valores de atividade, sendo que a partir de 17 dias de armazenamento a atividade caiu bruscamente, sendo perdido 96% da atividade inicial após os 31 dias. Já a amostra mantida em temperatura de geladeira (entre 5 e 8°C)

apresentou boa estabilidade em relação à atividade enzimática no período de 31 dias, sendo esta a mais indicada para o armazenamento da enzima. O congelamento e descongelamento pode ter prejudicado o sítio ativo da enzima assim como a falta de controle da amostra mantida em condições ambientes pode ter colocado o produto em temperaturas elevadas em alguns dias, prejudicando o sítio ativo ou a estrutura da enzima.

**Figura 10** - Média da atividade da enzima peroxidase extraída de nabo ao longo do tempo de estocagem em temperatura ambiente, de refrigeração (5°C) e de congelamento (-18°C).



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que, embora as atividades enzimáticas tenham sido mais elevadas nos extratos de nabo preparados com água destilada, este não foi estável, sendo o mais vantajoso aquele obtido com tampão fosfato em pH 7,0. A peroxidase de

nabo apresentou atividade sobre parte dos compostos presentes no efluente de análises de açúcares redutores por DNS, atuando na formação de moléculas de alta massa molecular e coloração escura, as melaninas, que podem ser removidas do meio reacional por precipitação, em trabalhos futuros. O ensaio de tratamento do efluente conduzido em pH 7,0 apresentou resultados mais vantajosos, sendo que a redução no teor de fenólicos totais foi o dobro da observada para o ensaio conduzida em pH 5,0. A estabilidade do extrato enzimático bruto de nabo foi maior quando armazenada em temperatura de refrigeração 5 °C.

## REFERÊNCIAS

*Raphanus sativus* peroxidase, 2018-. ISSN 1997-5902 versão online. Disponível em: 10.4314/jab.v125i1.2. Acesso em: 20 ago. 2023.

ABIRAMI, Balakrishnan. Current Approaches on the Biodegradation of Recalcitrant Compounds from Various Industrial Effluents. **Scientia Biologia Journal**, Madurai, v.1, n.1, p. 22-28, mar. 2013. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/247158751\\_CURRENT\\_APPROACHES\\_ON\\_THE\\_BIODEGRADATION\\_OF\\_RECALCITRANT\\_COMPOUNDS\\_FROM\\_VARIOUS\\_INDUSTRIAL\\_EFFLUENTS](https://www.researchgate.net/publication/247158751_CURRENT_APPROACHES_ON_THE_BIODEGRADATION_OF_RECALCITRANT_COMPOUNDS_FROM_VARIOUS_INDUSTRIAL_EFFLUENTS). Acesso em: 20 ago. 2023.

AKHTAR, Suhail e HUSAIN, Qayyum. Potential applications of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. **Chemosphere**, India, v.65, n. 7, p. 1228-1235. Nov. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.049>. Acesso em: 26 ago. 2023.

BERNARDS, Mark A. *et al.* Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato. **Plant Physiology**, Canada, v.121, n. 1, p. 135-146, set.1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1104%2Fpp.121.1.135>. Acesso em: 26 ago. 2023.

BERNFELD, Peter. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*, v. 1, p. 149-157, 1955.

BILAL, Muhammadi; RASHEED, Tahir; IQBAL, Hafiz; YAN, Yunjun. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, China, v.124, p. 336- 353, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.011>. Acesso em: 20 ago. 2023.

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Fortaleza: Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos, 2013-. ISSN 1679-6543.

BOUSLIMI, Houda; JOUILI, Hager; CAÇADOR, Isabel; SLEIMI, Noomene. Assessment of phenol compound removal from olive oil mill wastewater by using peroxidases extracted from radish and nettle leaves. **Journal of Water Science**, Lisboa, v.32, n. 1, p. 1,81, mai. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7202/1059877ar>. Acesso em: 20 ago. 2023.

BRITTO, Jaildes Marques; RANGEL, Maria do Carmo. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Química Nova**, Salvador

Bahia, v.31, n.1, p. 114-122, fev. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000100023>. Acesso em: 20 ago. 2023.

CHAUSSEONNERIE, Sébastien. *et al.* Microbial Degradation of a Recalcitrant Pesticide: Chlordecone. **Frontiers in Microbiology**., França, v.7, n.1, p. 1-12, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02025>. Acesso em: 20 ago. 2023.

CHIONG, Adrian Tiong *et al* 2016 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 36 012048

Comunicado técnico: Programa de Gerenciamento de Resíduos de Laboratórios da EMBRAPA instrumentação. São Carlos, São Paulo: EMBRAPA, 2014-. ISSN 1517-4786.

DUNFORD, Hugh Brian e STILLMAN, Jennifer .S, On the function and mechanism of action of peroxidases, **Coordination Chemistry Reviews**, Canadá, v. 19, n. 3, p. 187-251, ago. 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(00\)80316-1](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(00)80316-1). Acesso em: 26 ago. 2023.

**Fisher Scientific**. 3,5 Dinitrosalicylic acid, 98%, Thermo Scientific Chemicals. Disponível em: <https://www.fishersci.fi/shop/products/3-5-dinitrosalicylic-acid-98-thermo-scientific/10654632>. Acesso em: 20 nov. 2023.

GROSS, George. From lignins to tannins: Forty years of enzyme studies on the biosynthesis of phenolic compounds, **Phytochemistry**, Alemanha, v. 69, n. 18, p. 3018-3031, dez.2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.031>. Acesso em: 26 ago. 2023.

HAMID, Mohsina e REHMAN, Khalil-ur. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry** , Paquistão, v. 115, n. 4, p. 1177-1186. Ago.2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>. Acesso em: 20 ago. 2023.

HUANG, Renhua. *et al.* Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation, **Scientia Horticulturae**, China, v. 113, n. 2, p. 166-172, jun.2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.010>. Acesso em: 26 ago. 2023.

Journal of Applied Biosciences. França: Biochemical characterization of Burkina red radish

KHAN, A.A.; ROBINSON, David Stuart. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**., Leeds, v. 49, n.4, p. 407-410, mai. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90013-2). Acesso em: 20 ago. 2023

KUMAR, Santosh. *et al.* Cloning, characterization and localization of a novel basic peroxidase gene from *Catharanthus roseus*, **The FEBS Journal**, India, v.274, n. 5, p. 1290-303, mar.2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05677.x>. Acesso em: 26 ago. 2023.

LAGE, Nildo. Publicado pelo canal O pensador. Disponível em: <https://www.pensador.com/sustentabilidade/>. Acesso em: 03 set. 2023.

LOPES, Erisson Paulo Borges. **Desenvolvimento de protocolo de tratamento resíduos de DNS**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, São Paulo, 2018.

LÓPEZ, Carmen. *et al.* Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. **Journal of Biotechnology**, Espanha, v. 99, n.3, p. 249-257, nov. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00217-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00217-1). Acesso em: 20. Ago. 2023.

MACIEL, Hermelinda Penha Freire; GOUVÊA, Cibele Marli Cação Paiva; PASTORE, Gláucia Maria. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf. com alta atividade, **Food Science and Technology**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 1-5. Dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400003>. Acesso em: 26 ago. 2023.

MARTINS, Alysson S. *et al.* Simultaneous degradation of hexazinone and diuron herbicides by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and toxicity assessment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 11, p. 2000-2006, nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140184>. Acesso em: 20 ago. 2023.

MARTINS, Sónia Daniela Vaz. **Remoção de Nitrofenóis de uma corrente de efluente rico**. 2008. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química) – Ciências Exatas, Universidade do Porto, 2008.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31 n. 3, p. 426-428, mar. 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 20 ago. 2023.

PAGNO, Vanessa. *et al.* Levantamento de resíduos de laboratórios, propostas de atividades experimentais e ações com foco em Química Verde. **ACTIO**, Curitiba, 2017 v. 2 n. 2, p. 80-96.

PRADO, Alexandre Gustavo Soares Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, Brasília, v. 26, n. 5, p. 738-744, mar. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000500018>. Acesso em: 20 ago. 2023.

PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO E SUA APLICAÇÃO AMBIENTAL. Goiás: REEC Revista Eletrônica de Engenharia Civil, 2011-. ISSN 2179-0612 versão online. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/reec.v3i1.17000>. Acesso em: 20 ago. 2023.

Revista Virtual de Química. Santa Catarina: Aplicação de Peroxidases no Tratamento de Efluentes, 2016-. 1-13. ISSN 1984-6835.

RODRÍGUEZ, Gil. *et al.* A Novel Heme Peroxidase from *Raphanus sativus* Intrinsically Resistant to Hydrogen Peroxide. **Wiley**, México, v. 8, n. 3, p. 286-296, mar.2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elsc.200700073>. Acesso em 20 ago. 2023.

ROESLER, Roberta., *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Goiânia, v. 27, n.1, p. 53-60, mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>. Acesso em: 20 ago. 2023.

RUZGAS, Tautgirdas. *et al.* Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. **Analytica Chimica Acta**, Sweden v. 330, n. 2-3 p. 123 – 138, set. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00169-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00169-9). Acesso em: 20 ago. 2023.

SILVA, Maria Cristina. Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo. 2011. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Ciências Exatas, **Universidade Federal de Lavras.**, Lavras, p. 12-135, fev.2011.

SILVA, Roberto do Nascimento. *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n.3, p. 337- 341, dez. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000300007>. Acesso em: 20 ago. 2023.

SRINIVAS, N.D. *et al.* Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase, **Journal of Food Engineering**, India, v. 54, n. 1, p. 1-6, ago. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00170-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00170-4). Acesso em: 26 ago. 2023.

ULIANA, Carolina Venturini.; RICCARDI, Carlos dos Santos.; YAMANAKA, Hideko. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Eclética Química**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 57-

62, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702008000100008>. Acesso em: 20 ago. 2023.

VEITCH, Nigel C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, **Phytochemistry**, Reino Unido, v. 65, n. 3, p. 249-259, fev.2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>. Acesso em: 26 ago. 2023.