



FURG

Dissertação de Mestrado

**PEROXIDASE APLICADA NA DEGRADAÇÃO
SIMULTÂNEA DE MICOTOXINAS E AGROTÓXICO EM
ÁGUA DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ**

Ediane Patricia Pedrosa Braga

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2024

PEROXIDASE APLICADA NA DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOTOXINAS E AGROTÓXICO EM ÁGUA DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ

por

EDIANE PATRICIA PEDROSA BRAGA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química Tecnológica e Ambiental.

PPGQTA

Rio Grande, RS – Brasil

2024

Ficha Catalográfica

B813p Braga, Ediane Patricia Pedrosa.
Peroxidase aplicada na degradação simultânea de micotoxinas e agrotóxico em água da cadeia produtiva de arroz / Ediane Patricia Pedrosa Braga. – 2024.
85 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande/RS, 2024
Orientadora: Dra. Jaqueline Guarda-Buffon.
Coorientadora: Dra. Maristela Barnes Rodrigues Cerqueira.

1. Biotecnologia 2. Biodegradação Aflatoxina B1 3. Ocratoxina A 4. 2,4-D I. Guarda-Buffon, Jaqueline II. Cerqueira, Maristela Barnes Rodrigues III. Título.

CDU 633.18

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Peroxidase aplicada na degradação simultânea de micotoxinas e agrotóxico em água da cadeia produtiva de arroz

Elaborada por

Ediane Patrícia Pedrosa Braga

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica e Ambiental

Comissão Examinadora

Documento assinado digitalmente
 **JAQUELINE GARDA BUFFON**
Data: 18/09/2024 09:30:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon (FURG)
(Presidente-Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **OSMAR DAMIAN PRESTES**
Data: 18/09/2024 10:12:11-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Osmar Damian Prestes (UFSM)

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO MEIRA SOARES**
Data: 18/09/2024 10:46:21-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG)

Rio Grande, 09 de agosto de 2024.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação marca um momento especial e muito importante em minha trajetória acadêmica e pessoal. E graças ao apoio e incentivo de muitas pessoas, às quais gostaria de expressar minha sincera gratidão.

Primeiramente, agradeço a minha orientadora, Prof. Dra. **Jaqueline Garda-Bufferon**, por sua orientação inestimável, paciência e por acreditar em mim, as suas valiosas sugestões e críticas construtivas que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada pela oportunidade e incentivo.

Agradeço a minha coorientadora, Dra. **Maristela Barnes Rodrigues Cerqueira**, pela paciência, e por me ensinar as técnicas dos equipamentos cromatográficos e pela amizade.

Um agradecimento especial aos meus amigos e colegas, do Laboratório de micotoxinas e ciência de alimento – LAMCA, em especial ao **Danilo, Daiane, Juliane** e o **Wescley**, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo suporte emocional e momentos de descontração que foram essenciais ao longo deste processo acadêmico.

As professoras Dra. **Karine Kupski** e Dra. **Eliana Badiale-Furlong**, pelas dicas, ajudas ensinamentos e conselhos dentro do laboratório.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnologia e Ambiental- PPGQA.

À minha família, que sempre acreditou em mim e me incentivou a seguir meus sonhos, dedico meu mais profundo agradecimento. Em particular, à minha mãe, **Maria Terezinha Pedrosa Souza**, e ao meu pai, **Edilson Marques Braga**, por seu amor incondicional e apoio inabalável.

Agradeço também à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar esta pesquisa. Sem o suporte este trabalho não teria sido possível.

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMO.....	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 MICOTOXINAS	5
3.1.1 Métodos de preparo de amostras e técnicas analíticas empregadas para micotoxinas	13
3.2 AGROTÓXICOS.....	16
3.3 DEGRADAÇÃO DE MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS.....	22
3.4 ENZIMA PEROXIDASE	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 INSTRUMENTAÇÃO	35
4.2 REAGENTES E SOLVENTES	36
4.3 MÉTODOS	36
4.3.1 Água de parbolização	36
4.3.2 Padrões das micotoxinas e agrotóxicos.....	37
4.3.3 Extração simultânea OTA e 2,4-D	38
4.3.4 Extração de AFB1.....	38
4.3.5 Condições cromatográficas OTA, AFB1 e 2,4-D	39
4.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	40
4.4.1 OBTENÇÃO DA ENZIMA PO.....	41
4.4.1.1 Determinação da atividade enzimática.....	41
4.5 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DAS MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS POR PO.....	42
4.5.1 Degradação para OTA, AFB1 e 2,4-D por ação enzimática.....	42
4.5.2 Confirmação de degradação por PO	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	44
5.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	44
5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DAS MICOTOXINAS E AGROTÓXICO POR PO	46
5.2.1 Degradação de OTA, AFB1 e 2,4-D por PO	46
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área semeada e produtividade 2023/2024 no RS.....	1
Figura 2 - Estrutura química da AFB1.	6
Figura 3 - Estrutura química da OTA.....	7
Figura 4 - Esquema original da técnica SILLME.....	14
Figura 5 - Estrutura química do 2,4-D.....	17
Figura 6 - Sistema para produção da água de parboilização.	37
Figura 7 - Esquema da técnica extração SILLME para OTA e AFB1.	38
Figura 8 - Esquema da extração da técnica SILLME para AFB1.	39
Figura 9 - Esquema de ensaio de degradação simultânea para AFB1, OTA e 2,4-D.....	42
Figura 10 - Cromatogramas obtidos por LC-DAD do 2,4-D em diferentes controles experimentais	46
Figura 11 - Cromatogramas obtidos por LC-FL da OTA em diferentes controles experimentais	47
Figura 12 - Cromatogramas obtidos por LC-FL da AFB1 em diferentes controles experimentais	47
Figura 13 - Perfis cromatográficos de degradação das melhores condições para OTA, AFB1 e 2,4-D	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micotoxinas detectados em matrizes de interesse ambiental.	9
Tabela 2 - Comparação da técnica SILLME com outros métodos para determinação em diferentes matrizes.....	15
Tabela 3 - Classificação toxicológica de agrotóxicos.....	18
Tabela 4 - Ocorrência do agrotóxico 2,4-D em águas.	19
Tabela 5 - Valor Máximo Permitido do agrotóxico 2,4-D em água em vários países.....	22
Tabela 6 - Métodos físicos, químicos e biológicos para degradação de micotoxina em água	23
Tabela 7 - Métodos físicos, químicos e biológicos para degradação de agrotóxicos em água.....	24
Tabela 8 - Emprego da enzima PO em diversas matrizes para degradação de micotoxinas e outros contaminantes.	31
Tabela 9 - Níveis e variáveis analisadas no delineamento fatorial fracionado 2^{7-3}	43
Tabela 10 - Curvas analíticas e faixa linear para AFB1, OTA e 2,4-D em LC-FL/DAD*.	45
Tabela 11 - Recuperação (RSD%) e precisão em termos de repetibilidade (RSD) e precisão intermediária.....	45
Tabela 12 - Degradação (%) simultânea de OTA, AFB1 e 2,4-D por ação da PO avaliado por delineamento experimental 2^{7-3}	49
Tabela 13 - Efeitos sobre a degradação simultânea de 2,4-D, OTA e AFB1 no delineamento fracionado 2^{7-3} pela aplicação da enzima Peroxidase (PO)	52
Tabela 14 - ANOVA para valor de degradação da AFB1.	54
Tabela 15 - Validação das melhores condições de ensaio para AFB1, OTA e 2,4-D.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. APCI: Ionização Química a Pressão Atmosférica
2. DLLME: Microextração Dispersiva Líquido-Líquido
3. DAD: Detector de Arranjo de Diodos
4. DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*)
5. DMSPE: Microextração Dispersiva Líquido-Líquido e Extração Dispersiva em Fase Microssólida
6. EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
7. ESI: Ionização por Eletrospray
8. ETE: Estação de Tratamento de Esgoto
9. EU: União Europeia (do inglês, *European Union*)
10. FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, *Food and Agriculture Organization*)
11. FL: Detector de Fluorescência
12. GC-ECD: Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons
13. GC-MS: Cromatografia Gasosa com Detecção Espectrométrica de Massas
14. MeCN, Acetonitrila
15. ha: hectares
16. HLLME: Microextração Líquida-Líquida Homogênea baseada em Líquido Iônico
17. IARC, Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (do inglês *International Agency for Research on Cancer*)
18. IBAMA, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente Recursos Naturais Renováveis
19. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

20. INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
21. IRGA: Instituto Rio-Grandense do Arroz
22. IUPAC, União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
23. LC-ESI-MS: Cromatografia Líquida-Ionização Electrospray-Espectrometria de Massas; Cromatografia Gasosa – Ionização Electrospray
24. LC-UV: Cromatografia Líquida-Detecção Ultravioleta
25. LDs: Limite de Detecções
26. LLE: extração líquido-líquido
27. MS/MS: Espectrometria de massas modo sequencial
28. MSPE- Extração Magnética em Fase Sólida
29. OMS: Organização Mundial de Saúde
30. SILLME: Microextração Líquido Líquido induzido por *Salting Out* (do inglês, *Saltingout Induced Liquid–Liquid Microextraction*)

RESUMO

TÍTULO: PEROXIDASE APLICADA A DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS EM ÁGUA DA CADEIA PRODUTIVA DE ARROZ

Autora: Ediane Patricia Pedrosa Braga

Orientadora: Profa. Dr^a. Jaqueline Garda-Bufferon

Coorientadora: Dr^a. Maristela Barnes Rodrigues Cerqueira

O arroz desempenha um papel crucial na dieta global; no entanto, sua produção enfrenta desafios ambientais, especialmente no beneficiamento do arroz parboilizado, que resulta em efluentes contaminados. O objetivo deste estudo foi aplicar a enzima peroxidase (PO) em águas residuais da cadeia produtiva do arroz para degradar simultaneamente de aflatoxina B1, ocratoxina A, e 2,4-diclorofenoxiacético. Para isso, o estudo aplicou parâmetros de validação dos métodos analíticos para a técnica SILLME que incluíram faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, precisão intermediária e exatidão no sistema LC-DAD/FL. Para o estudo de degradação de OTA, AFB1 e 2,4-D pela enzima PO foi realizado avaliando as condições de atividade enzimática (0,005-0,01 U mL⁻¹), tempo de reação (1-24 h), temperatura (10-40 °C), agitação (0-100 rpm), concentração de peróxido de hidrogênio (0,02-0,1%) e adição de íons metálicos Ca²⁺ Mg²⁺ (0-5 mmol L⁻¹), por delineamento experimental fatorial 2⁷⁻³. Os ensaios de degradação simultânea foram realizados em reator tipo Erlenmeyer tendo 10 mL como volume de meio reacional, empregando a água de parboilização. A técnica SILLME demonstrou ser eficiente, possibilitando a extração rápida, fácil e econômica dos analitos. As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação (r) superiores a 0,99. Os limites de detecção e quantificação foram adequados para a análise do 2,4-D e micotoxinas em água, com recuperações entre 80 e 120% e precisão inferior a 20%. Em relação a maior degradação dos contaminantes foi observada quando empregadas as condições de atividade da PO de 0,005 U mL⁻¹, tempo de reação de 1 h, sem agitação, na temperatura de 40 °C, com adição dos cofatores Ca²⁺ e Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹), e H₂O₂ (0,1%). Nestas condições, a degradação de OTA foi 91,7%, para AFB1 58,8% e 2,4-D 90,7%. Este método apresenta potencial para mitigar os impactos ambientais associados à produção de arroz, contribuindo para a preservação da qualidade do sistema hídrico.

Palavras-chave: *Biotecnologia; Biodegradação Aflatoxina B1; Ocratoxina A; 2,4-D.*

ABSTRACT

TITLE: PEROXIDASE APPLIED TO THE SIMULTANEOUS MYCOTOXINS AND PESTICIDES DEGRADATION IN WATER FROM RICE PRODUCTION CHAIN

Author: Ediane Patricia Pedrosa Braga

Advisor: Profa. Dra. Jaqueline Garda-Buffon

Co-Advisor: Maristela Rodrigues Barnes Cerqueira

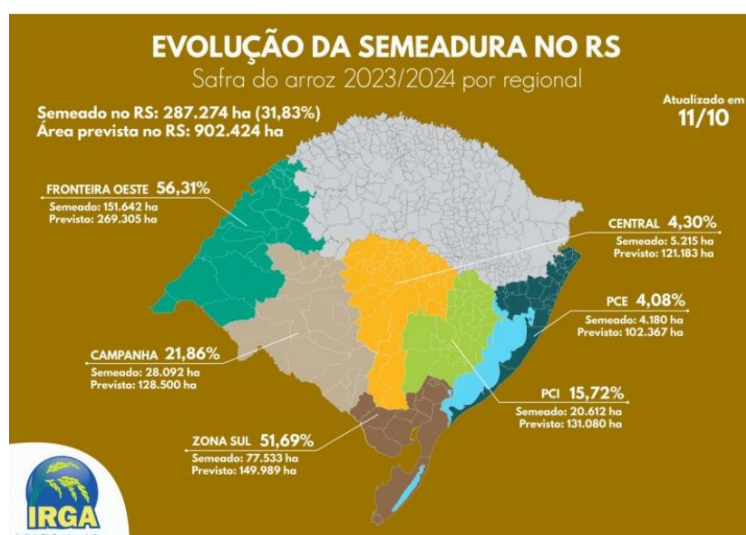
Rice plays a crucial role in the global diet; however, its production faces environmental challenges, especially in the processing of parboiled rice, which results in contaminated effluents. This study aimed to apply the enzyme peroxidase (PO) to wastewater from the rice production chain to simultaneously degrade aflatoxin B1, ochratoxin A, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. To this end, the study applied analytical method validation parameters for the SILLME technique which included linear working range, detection and quantification limits, intermediate precision, and accuracy in the LC-DAD/FL system. The degradation study of OTA, AFB1 and 2,4-D by the PO enzyme was carried out by evaluating the conditions of enzyme activity (0.005-0.01 U mL⁻¹), reaction time (1-24 h), temperature (10-40 °C), agitation (0-100 rpm), hydrogen peroxide concentration (0.02-0.1%) and addition of Ca²⁺ Mg²⁺ metal ions (0-5 mmol L⁻¹), using a 27-3 factorial experimental design. The simultaneous degradation tests were carried out in an Erlenmeyer flask with 10 mL as the volume of the reaction medium, using parboiling water. The SILLME technique proved efficient, making it possible to extract the analytes quickly, easily, and economically. The analytical curves showed correlation coefficients (r) greater than 0.99. The detection and quantification limits were adequate for analyzing 2,4-D and mycotoxins in water, with recoveries between 80 and 120% and precision of less than 20%. Greater degradation of the contaminants was observed when using the conditions of 0.005 U mL⁻¹ OP activity, 1 h reaction time, without stirring, at a temperature of 40 °C, with the addition of the cofactors Ca²⁺ and Mg²⁺ (5 mmol L⁻¹), and H₂O₂ (0.1%). Under these conditions, OTA degradation was 91.7%, AFB1 58.8%, and 2,4-D 90.7%. This method can potentially mitigate the environmental impacts associated with rice production, contributing to preserving the quality of the water system.

Keywords: *Biotechnology; Biodegradation; Aflatoxin B1; Ochratoxin A; 2,4-D*

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa L.*) é cultivado e consumido em todos os continentes, sendo um alimento básico da dieta para cerca de 2,5 bilhões de pessoas. Segundo estimativas feitas pela FAO, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro dessa população (EMBRAPA, 2023). Dentre o ranking do cultivo em todos os continentes, o asiático se destaca em primeiro lugar com cerca de 90% da produção mundial, onde estão presentes os oito maiores produtores de arroz: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar e Filipinas. O Brasil ocupa o nono lugar no ranking mundial de produção (EMBRAPA, 2023). No Brasil, o segundo prognóstico da produção nacional de grãos, cereais, leguminosas e oleaginosas para 2024 é de 306,2 milhões de toneladas. A produção do arroz em casca deve crescer no Rio Grande do Sul (41,2%) e declinar no Mato Grosso (-14,6%), Paraná (-1,4%), Goiás (-4,5%), Mato Grosso do Sul (-7,4%), Minas Gerais (-4,5%), Santa Catarina (-1,9%), Tocantins (-6,4%), Rondônia (-10,3%), São Paulo (-3,2%), Bahia (-2,9%), Maranhão (-1,3%), Piauí (-3,9%), Pará (-5,9%) e em Sergipe (-7,0%). A estimativa para a produção em 2024 para o arroz é de 10,5 milhões de toneladas (IBGE, 2023). A Figura 1 demonstra a distribuição de cultivo de arroz na região do estado do Rio Grande do Sul de acordo com IRGA, (2023).

Figura 1: Área semeada e produtividade 2023/2024 no RS.



Fonte: IRGA, (2023).

O mais recente levantamento do IRGA (2024) indica que 603.136 hectares (ha) de arroz foram colhidos no Rio Grande do Sul, isso representa cerca de 66,99% dos 900.203 ha semeados

na safra de 2023/2024 em todo o estado. Porém este avanço é pequeno, em função das chuvas registradas e que provocaram enchentes em algumas regiões produtoras de arroz.

Neste sentido, a cultura de arroz em si, gera preocupações ambientais significativas, como redução de ecossistemas devido a abertura de novas áreas para cultivo, a redução da capacidade produtiva do solo em decorrência de práticas inadequadas de produção, a redução da qualidade do ar em decorrência da emissão de gás metano (gás de efeito estufa), e a redução da quantidade e qualidade da água devido ao assoreamento dos rios e devido a contaminação pela utilização de agrotóxicos (BARRIGOSI et al., 2004).

Além disso, os impactos ambientais não se limitam ao cultivo; os processos da indústria de beneficiamento do arroz, ressaltando a produção de arroz parboilizado é o que gera maior impacto ambiental. O beneficiamento do arroz parboilizado pode ser dividida basicamente em 3 importantes etapas: encharcamento, gelatinização e secagem. Essas etapas geram uma grande quantidade de efluente, podendo chegar a 4 L por kg de arroz beneficiado (BASTOS et al., 2010; SANTOS; TURNES; CONCEIÇÃO, 2012).

Com isso, a presença de contaminantes biológicos e químicos contribui igualmente para esse impacto ambiental. Destacam-se entre os contaminantes biológicos as micotoxinas, que são substâncias produzidas por fungos que provocam efeitos tóxicos em animais e humanos. A identificação de micotoxinas atualmente corresponde a mais de 500 moléculas diferentes (EMBRAPA, 2021). As micotoxinas mais nocivas são o grupo das aflatoxinas (AFLAs), Ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FUMO), Zearalenona (ZEN), Desoxinivalenol (DON), Citrinina (CIT), Patulina (PAT) (RIBEIRO et al., 2023; MARIN et al., 2013).

Os grupos de relevância para a cadeia produtiva de cereais são as aflatoxinas (AFLA) e a ocratoxina A (OTA) pela toxicidade, especialmente carcinogenicidade (CARVAJAL, 2013; PFOHL-LESZKOWICZ; MANDERVILLE, 2012). As micotoxinas, quando presentes, encontram-se principalmente na camada mais externa do grão sendo que a etapa de irrigação no cultivo do cereal e a etapa de encharcamento na parboilização pode proporcionar a migração destas moléculas para água agregada a outros solutos, comprometendo a qualidade do efluente a ser descartado (LEITE, 2019). Outros contaminantes de destaque são os agrotóxicos, empregados no controle de pragas e aumento da produtividade agrícola. Apesar da vantagem do uso de agrotóxicos, estudos vêm relacionando o seu emprego com doenças em humanos e animais, como câncer e alterações hormonais (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Dentre os 10 agrotóxicos mais comercializados em 2022 encontram-se o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e o glifosato

(IBAMA, 2022). A importância de abordar contaminantes, como micotoxinas e agrotóxicos, reside no potencial impacto que essas substâncias podem ter na saúde humana e nos ecossistemas aquáticos. Dados reforçam que o cultivo de arroz no estado do Rio Grande do Sul emprega fortemente o uso do recurso hídrico para a produção deste cereal, Tendo como consequência a presença de contaminantes biológicos, como micotoxinas, e químicos, como agrotóxicos, nestes efluentes gerados, pode ocorrer a possibilidade de retorno ao consumo humano e animal, conforme mencionado por Silva et al. (2011) em todas as regiões produtoras de arroz do Sul do Brasil verifica-se a presença de ao menos um agrotóxico ocorrente em águas subterrâneas. Desta forma, alternativas quanto a degradação destes contaminantes se tornam necessárias e urgentes para a disponibilização de sistema hídrico de qualidade. Com base nestes dados, a hipótese deste estudo é avaliar a potencialidade de aplicar a enzima PO na degradação de micotoxinas em água da cadeia produtiva do arroz. No entanto, outros contaminantes potenciais como os agrotóxicos são detectados neste sistema pela aplicação durante o cultivo do grão. Assim, a aplicação da enzima pode também reduzir a contaminação por agrotóxicos, devido sua estrutura química, concomitante a de micotoxinas, descontaminando o sistema ambiental.

Dados reforçam essa hipótese, uma vez que já foi estudada em degradação de micotoxinas como, peroxidase como agente de degradação simultânea de ocratoxina A e zearalenona aplicada a solução modelo e cerveja (Garcia et al., 2020); Na degradação de deoxinivalenol (DON) e a atividade da enzima peroxidase durante fermentação submersa (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011), e Degradação de níveis de aflatoxina B1 por ação da peroxidase em solução modelo (MARINON; FELTRIN; GARDA-BUFFON, 2016) sendo assim, podendo ser aplicada concomitantemente na degradação de agrotóxicos no tratamento de água da cadeia produtiva do arroz, principalmente devido a sua estrutura química, principalmente pela capacidade da enzima de oxido-redução destes compostos e seu mecanismo de ação variado pela atuação em diferentes grupamentos: CH-CH; C=O; HC=CH; CH-NH-; NADH e NADPH (VELDE; RANTWIJK; SHELDON, 2001). Assim, a aplicação da enzima na descontaminação de águas da cadeia produtiva do arroz pode contribuir com a recuperação da qualidade do sistema hídrico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar a enzima peroxidase em águas residuais da cadeia produtiva do arroz visando a degradação de micotoxinas aflatoxina B1 e ocratoxina A, e agrotóxico 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Validar método para determinação de AFB1, OTA e 2,4-D empregando a extração por SILLME e quantificação em LC-DAD-FL;
- Padronizar as condições de aplicação da PO na degradação de micotoxinas e agrotóxico (temperatura, atividade da enzima, sistemas de agitação e concentração de peróxido de hidrogênio) em águas de cultivo e de processamento do arroz.

3 REVISÃO DA LITERATURA

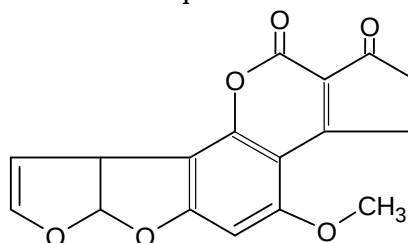
3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos filamentosos, especialmente por espécies toxigênicas dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (BENTO et al., 2012). Os efeitos deletérios desses compostos sobre a saúde humana e animal estão relacionados a efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos. Cerca de 25 a 80% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina (FAO, 2024; ESKOLA, et al., 2019). As micotoxinas são consideradas os contaminantes naturais que ocorrem com maior frequência na dieta de humanos e animais (YAFEI et al., 2020). Os teores de água dos grãos, umidade do ar, temperatura, período de armazenamento, nível inicial de contaminação, impurezas, insetos, concentração de dióxido de carbono (CO₂), condições físicas e sanitárias dos grãos, são fatores importantes para o desenvolvimento de fungos em grãos (REED et al., 2007; PARK et al., 2012; RAUDIENE et al, 2017; SANTOS et al., 2012; JIAN et al., 2014; CARNEIRO, 2019; REHMAN et al., 2002; PARAGINSKI et al., 2014a; PARAGINSKI et al., 2014b; PARAGINSKI et al., 2015; CORADI et al., 2016; LANE; WOLOSHUK, 2017; PARAGINSKI, et al., 2019). Em condições ambientais favoráveis, os esporos dos fungos germinam, formando hifas que se distribuem pelos grãos e outros substratos, sendo capazes de produzir estes metabólitos secundários tóxicos (PRADO et al., 1991; LAZZARI, 1997). Atualmente, ainda é restrito o conhecimento sobre a produção de toxinas e a relação com o desenvolvimento dos fungos produtores. Porém, sabe-se que se multiplicam, se proliferam e produzem micotoxinas em cereais, especialmente em milho (MUNKVOLD et al., 2019), trigo (GETAHUN, et al., 2023), cevada (BADEA, et al., 2023), sorgo (RATNAVATHI; KOMALA; CHAVAN, 2016), e, com destaque, arroz (TROESTCH; REYES; VEJA; 2022); ZHU, et al., 2021; YI, et al., 2021; ZHAO, et al., 2019), por encontrar um substrato altamente nutritivo (CONCEIÇÃO et al., 2022).

Dessa maneira, as micotoxinas representam um risco significativo não só para a saúde humana, mas também para a saúde animal (CORDERO-MENDOZA, 2023). Existem várias classes de micotoxinas, e cada uma possui uma natureza química específica, sendo as principais as aflatoxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As aflatoxinas pertencem a uma classe de compostos conhecidos como aflatóxicos, que são na

verdade um grupo de quatro compostos relacionados as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. A de maior relevância é aflatoxina B1, (3S,7R)-11-metoxi-6,8,19-trioxapentaciclo[10.7.0.0^{2,9}.0^{3,7}.0^{13,17}]nonadeca-1,4,9,11,13(17)-pentaeno-16,18-diona, descrita por ser mais hepatotóxica e hepatocarcinogênica das aflatoxinas e ocorre como contaminante em uma variedade de alimentos. A estrutura da AFB1(Figura 2) é derivada de molécula de difuranocumarina e possuem anéis di-hidrofurano. A AFB1 possui características cristalinas, amarelo-claro ou incolores, mostra-se levemente solúvel em água (10-20 g L⁻¹) e em solventes como clorofórmio, dimetil sulfóxido e/ou metanol. As aflatoxinas, são resistentes a elevadas temperaturas, principalmente a AFB1, isto representa uma barreira para sua degradação nos alimentos por tratamento térmico, sendo seu ponto de fusão 296 °C (PIEREZAN, 2013; MANOEL-MARTINS, 2015).

Figura 2-Estrutura química da AFB1.



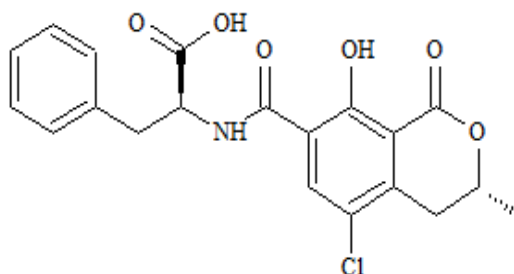
Fonte: autoria própria.

Em relação a toxicidade da AFB1, ela é uma molécula que uma vez absorvida no organismo, é metabolizada no fígado, sofrendo reações de hidroxilação com formação de aflatoxinas M1 e Q1. Com isso, essas moléculas tornam-se solúveis em água, possibilitando sua rápida excreção através da urina, bile e leite (OLIVEIRA; GERMANO, 1997; NIDHINA et al., 2017). Por outro lado, reações de epoxidação, também no fígado, levam a formação de compostos ativados, como o 8,9-óxido de AFB1 e o AFB1-2,3 epóxido, compostos altamente eletrofílicos, capazes de reagir de forma covalente com macromoléculas de DNA, RNA e proteínas. Esta ligação modifica a estrutura e a atividade biológica do DNA e de proteínas, provocando alterações mutagênicas na célula, que por sua vez leva a ocorrência de alterações bioquímicas como inativação de macromoléculas essenciais tendo como consequência a morte celular, originando os efeitos básicos da intoxicação (OLIVEIRA; GERMANO, 1997). Por isto, as aflatoxinas são potentes hepatotóxicos, apresentando também propriedades carcinogênicas, mutagênicas e imunossupressoras. Os sinais clínicos são conhecidos como aflatoxicose uma doença crônica que incluem na redução da produção de leite em bovinos leiteiros, baixo ganho de peso em animais

em crescimento, redução no consumo de matéria seca, danos ao fígado com elevação das enzimas hepáticas e bilirrubina, dores abdominais, cólica, diarreia e tenesmo, podendo estar acompanhado por prolapso de reto e imunocompetência reduzida. A aflatoxicoses agudas são raras, porém podem provocar fotodermatite, edema submandibular, diarreia e alterações nervosas (AWAD et al., 2012; RIET-CORREA et al., 2013). Além disso, a AFB1 é classificada como pertencente ao Grupo 1 (IARC, 2012). Essa classificação como cancerígena do Grupo 1 indica que a AFB1 possui evidências suficientes de sua carcinogenicidade em humanos e é considerada um risco significativo para a saúde humana (DAI et al., 2017).

Outra molécula importante de se destacar, é a ocratoxina A, que está entre as mais importantes moléculas do grupo das ocratoxinas, que são produzidas por vários fungos, incluindo *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* e *Penicillium verrucosum* (DHARMAPUTRA; RETNOWATI; NURFADILA, 2023; ALSALABI, 2023). As ocratoxinas são grupo de compostos que consistem em uma fenilalanina ligada a uma isocumarina por uma ligação amida. A OTA (Figura 3) é caracterizada por uma fluorescência verde e contém uma molécula de cloro (radical R1) em sua fórmula, o que contribui para sua natureza tóxica. No entanto, ocratoxina B (OTB), por outro lado, apresenta uma fluorescência azulada e não é tóxica devido à ausência da molécula de cloro. A ocratoxina C (OTC), que também tem fluorescência verde, é um éter etílico da ocratoxina A e é significativamente menos tóxica (MASI, 2021). A OTA, ácido (2S)-2-[[[(3R)-5-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-3,4-dihidroisocromeno-7-carbonil]amino]-3-fenilpropanóico, descrita por $C_{20}H_{18}ClNO_6$ apresenta massa molar de 403,8 g mol⁻¹ (KIESSLING, 1986). Esta substância possui valores de pKa entre 4,2 e 4,4 relacionado ao grupo carboxílico da fenilalanina, e entre 7,0 e 7,3 devido a hidroxila da porção isocumarínica. Esta toxina mostra-se como um cristal quando em solvente xileno e apresenta ponto de fusão de 169° C (DINIZ, 2002).

Figura 3 - Estrutura química da OTA.



Fonte: Autoria própria.

A toxicidade da OTA, está relacionada principalmente por ser considerada nefrotóxica, hepatotóxica, genotóxica, teratogênica e imunotóxica a animais e humanos. Ela tem sido relacionada com nefropatia endêmica dos Bálcãs, ao desenvolvimento de tumores no trato urinário de humanos. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC,1993), classifica a OTA no grupo 2B, essa classificação refere-se que esse composto é considerado como “possivelmente cancerígeno para humanos”. Essa classificação é baseada em evidências limitadas de carcinogenicidade em animais experimentais, fortes evidências mecanísticas e evidências moderadas de imunossupressão ou evidências inadequadas de carcinogenicidade em humanos. A avaliação dessas substâncias envolve verificar a associação entre a exposição e o risco de câncer específico (KHOURY; ATOUI, 2010; PATHARAJAN et al., 2011; SHEPHARD, 2008). A OTA tem sua principal via de contaminação o trato gastrointestinal, a absorção ocorre primariamente no estômago como consequência de suas características ácidas e após em nível intestinal. No sangue, ela encontra-se fortemente ligada às proteínas plasmáticas, determinante para a persistência da micotoxina no sangue e, portanto, para a sua toxicidade (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006). A fração associada a macromoléculas constitui um reservatório da micotoxina que permite liberá-la para os tecidos durante um longo período. Também a alta afinidade para as proteínas séricas retarda a eliminação da micotoxina pelo organismo, prolongando o seu tempo de meia-vida no sangue (NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006).

Embora as ocorrências de micotoxinas e seus metabólitos têm sido estudada extensivamente em alimentos para humanos e animais, pouco é conhecido sobre seu impacto e distribuição ambiental, sendo que poucos estudos foram realizados com este enfoque (SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010). A Tabela 1, apresenta a ocorrência de diversas micotoxinas e metabolitos encontrado em vários tipos de sistemas aquáticos e aquosos incluindo também as técnicas de extração e análises empregados.

Tabela 1 - Micotoxinas detectados em matrizes de interesse ambiental.

Micotoxinas/Metabolitos	Matriz	País	Extração	Técnicas de análises	LD (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referências
ZEN	Efluente de ETE	Itália	SPE	LC-APCI-MS/MS	-	1-7	Laganà et al. (2001)
ZEN	Afluente e efluente de ETE, água fluvial	Itália	SPE	LC-APCI-MS/MS	-	Afluente ETE:	Laganà et al. (2004)
α -ZAL						ZEN: 3-18	
β -ZAL						α ZAL: ND-10;	
						β -ZAL:	
						ND-10	
						Efluente ETE:	
						ZEN: 3-10.	
						α -ZAL: ND-7	
						β -ZAL: ND-5	
						Água fluvial	
						ZEN: 2-5	
						(α -ZAL): ND-3	
						β -ZAL: ND-3	

Micotoxinas/Metabolitos	Matriz	País	Extração	Técnica de análise	LD (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
ZEN	Água fluvial	Suíça	SPE	LC-APCI-MS/MS	-	ND-35	Bucheli et al. (2008a)
DON	Água de drenagem	Suíça	SPE	LC-MS	1,4	23	Bucheli et al.(2008b)
ZEN					1,5	35	
AFB1	Água mineral	Portugal	SPE	LC-MS/MS	0,10	AFB2: 0,5	Marta et al. (2015)
AFB2					0,20	AFB1: 0,7	
AFG1					0,30	AFG1: 0,6	
OTA					0,30	OTA: 0,3	
ZEN	Água superficial	Polônia	Colunas de imunoafinidade ZearalaTest	LC	0,3	0 a 44	Gromadzka et al. (2009)
AFB2	Água potável	Inglaterra	-	LC-FL	-	AFB2: 1–7	Parteson; Kelley;Gallagher, (1997)
AFG1						AFG1: 0–1000	
ZEN	Água residual	Suíça	SPE	LC-MS/MS	0,5	30	Hartman et al. (2007)

Micotoxinas/Metabolitos	Matriz	País	Extração	Técnica de análise	LD (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
ENB	Água mineral	Bélgica	SPE	LC-MS/MS	0,04 a 27,91	7	Goessens et al. (2021)
ENB1						3	
ENA1						3	
BEA						1	
Éter monometílico de alternol						10	
Toxina HT2						40	
ZEN						25	
α-ZEL						10	
ZEN	Água superficial	Brasil	DLLME	LC-MS/MS	4 a 20	35 a 90	Emídio et al. (2020)
ZAN						ND a 19	
α-ZEL						ND	
β-ZEL						ND	
α-ZAL						ND	
β-ZAL						ND a 48	

Micotoxinas/Metabolitos	Matriz	País	Extração	Técnica de análise	LD (ng L ⁻¹)	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
AFB1	Água superficial	Portugal	SPE	LC-MS/MS	0,1 a 3,0*	3 a 5	Oliveira et al. (2018)
AFB2						4 a 5	
Fumonisin B3						6 a 35	
OTA						8 a 9	
ENA1	Água de cozimento		DLLME	LC-MS/MS	60	10000 a 50000	Serrano et al. (2016)
ENB					130	50000	
ENB1					170	10000 a 30000	
					90		
3-AcDON	Efluente de ETE	Suíça	SPE	LC-MS/MS	6,0	42	Schenzel et al. (2012)
DON					1,3	73	
NIV					1,6	39	
BEA					3,4	3	

*-Para todas micotoxinas; ND - não detectado; NM - Não mencionado; ENB-Eniatina B; ENB1-Eniatina B1; ENA1-Eniatina A1; BEA- Beauvericina; NIV-nivelanol; 3-AcDON – 3-Acetildeoxinivalenol; α -ZEL - α -zearalenol; β -ZEL - β -zearalenol; α -ZAL- α -zearalanol; β -ZAL- β -zearalanol. APCI: ionização química a pressão atmosférica; ESI: ionização por eletrospray; FLD: detector de fluorescência; LLE: extração líquido-líquido; MS/MS: espectrometria de massas modo sequencial; SPE: extração em fase sólida; ETE: Estação de tratamento de esgoto;

Para Goessens et al. (2021), as micotoxinas são frequentemente provenientes de vazamentos do tecido vegetal, que são transportados através da água de escoamento para lagoas vizinhas. Isso torna-se preocupante, pois conseqüentemente pode afetar espécies aquáticas como por exemplo as algas (JUAN-GARCÍA; TAIPALE; VEHNIÄINEN, 2024), anfíbios e zooplâncton (ARSECULERATNE et al., 1969) e peixes (NOGUEIRA et al., 2023). As práticas agrícolas foram identificadas como a principal fonte de contaminação por micotoxinas, conforme demonstrado em estudo realizado por Schenzel et al. (2012), que detectou várias micotoxinas, incluindo 3-acetil-desoxinivalenol, desoxinivalenol, fusarenona-X, nivalenol, toxina HT-2, toxina T-2, beauvericina e zearalenona na drenagem de água. De acordo com Schenzel et al. (2012), a maioria das micotoxinas são estáveis no ambiente aquático, uma delas possuem o tempo de meias-vida de 38 dias para DON e 180 dias para Beauvericina (BEA) em águas naturais. Diante disso, destaca-se a importância de estudar o destino das micotoxinas, em ecossistemas de água doce (BUCHELI et al., 2005; GAUTAM; DILL-MACKY, 2012).

Para entender melhor como as micotoxinas surgem em meio aquáticos, Bucheli e colaboradores (2008) apresentaram em detalhe a hipóteses para a presença das micotoxinas considerado estrogênicas no ambiente aquático: (1) toxinas produzidas por fungos em plantas podem contaminar e penetrar no solo e se infiltrar em águas subterrâneas; eluir por escoamento superficial ou drenagem subsuperficial para águas superficiais ou estação de tratamento de esgoto; (2) resíduos da toxina em fezes de animais expostos podem penetrar nos solos agrícolas e águas locais diretamente ou por meio da aplicação de esterco (excremento de animais ou vegetais apodrecidos); (3) efluente de indústria de alimentos e/ou excreções humanas podem introduzir resíduos de toxina através de sistemas de esgoto nas águas superficiais.

3.1.1 Métodos de preparo de amostras e técnicas analíticas empregadas para micotoxinas.

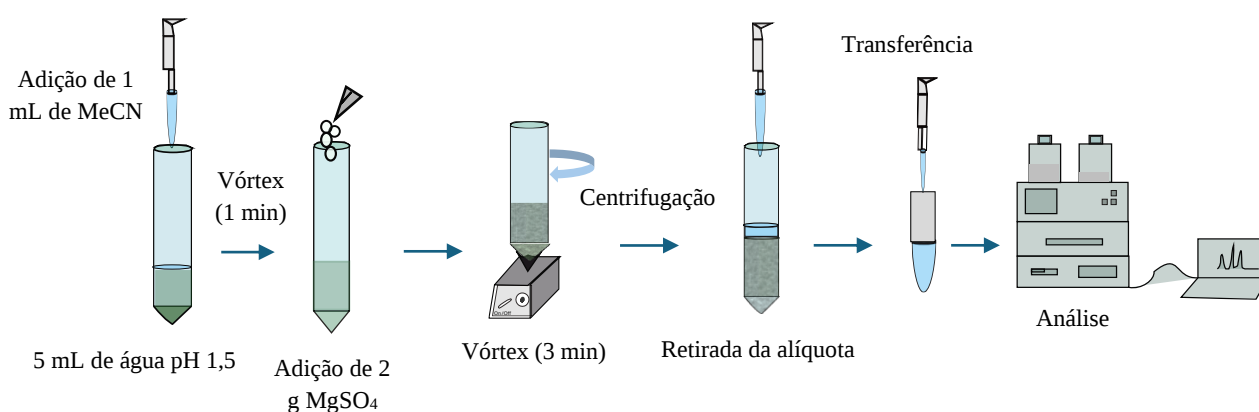
Contudo, para detecção e quantificação de micotoxinas em água, é importante salientar que são necessários empregos analíticos altamente seletivo e sensíveis. Esses métodos precisam ser capazes de distinguir as micotoxinas, de outros compostos presentes na matriz ambiental e de detectá-los mesmo quando estão presentes em concentrações extremamente baixas, da ordem de nanogramas por litro (ng L^{-1}) em água (EMÍDIO et al., 2015). O método analítico mais comum para a determinação em matrizes ambientais inclui a técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (LC) acoplada à espectrometria de massa em série (MS/MS) (EMÍDIO et al., 2015). Para atingir esses baixos limites de detecção, a pré-concentração por extração em fase sólida (SPE) antes da detecção tem sido preferida na última década (LAGANÀ et al., 2004; GROMADZKA et al., 2009; SCHENZEL et al., 2010; KIBAMBE et al., 2020; HARTMAN et al., 2007). No entanto,

as técnicas de SPE apresentam desvantagens (por exemplo, às vezes são lenta, com baixa reprodutibilidade em alguns casos) e necessitam de grandes quantidades de solventes orgânicos (XIAO-HUAN et al., 2009). Além disso, a SPE é caro e introduz uma quantidade significativa de resíduos, incluindo cartuchos descartáveis contaminados com SPE (YAN; WANG, 2013).

Outra técnica que é muito utilizada para a quantificar micotoxinas na água é o método de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), é equivalente a um tipo miniaturizado de extração líquido-líquido (LLE) que geralmente é estabelecido em um sistema de solvente de componente ternário, no qual um solvente dispersor apropriado é introduzido para ajudar na dispersão de um solvente de extração orgânico em uma amostra aquosa e obter ainda mais uma extração altamente eficiente (YAN et al., 2013) a Tabela 2, apresenta dois estudos que utilizam a técnica DLLME, onde foi usado para a detectar e quantificar ZEN e seus metabolitos em água superficial com técnica de análise LC-MS/MS por (EMÍDIO, et al., 2020), e análise de OTA e eniatinas detectados em água de cozimento de macarrão por Serrano et al. (2016).

O presente estudo, foi realizado um método analítico robusto, econômico e seletivo, para para detecção de micotoxinas e agrotóxico em água de parboilização do arroz. O método compreende extração por SILLME, Microextração Líquido-Líquido Induzida por Salting-Out (do inglês, *Saltingout Induced Liquid-Liquid Microextraction*). Esta técnica miniaturizada por Du et al. (2014), juntamente com LC-FL, na qual foi usado pela primeira vez para extração de água residual de indústria farmacêutica em diferentes matrizes, incluindo água de campo a Figura 4 ilustra as etapas original do procedimento da técnica SILLME.

Figura 4 - Esquema original da técnica SILLME.



Fonte: adaptado Du et al. (2014).

A técnica original consiste em adicionar 5,0 mL de água ultrapura (pH 1,5 com ácido fosfórico) em um tubo falcon de 15 mL, em seguida, adicionar 1,0 mL de acetonitrila e agitar em vórtex uniformemente. Em seguida adicionar 2,0 g de sulfato de magnésio e misturar em vórtex

por 3 min. Após centrifugação por 5 min a 4300 rpm, retirar o sobrenadante para análise em sistema LC.

Tabela 2 - Comparação da técnica SILLME com outros métodos para determinação em diferentes matrizes.

Métodos	Matriz	Tempo de extração (min)	Recuperação (%)	LDs (ng L ⁻¹)	Referências
UA-DLLME-LC-UV	Água residual farmacêuticas	10	83-111	0,1-0,8	Yan et al. (2011)
vSPE-CLC-UV-vis	Água mineral	5	95-112	0,2-0,5	Xu et al. (2012)
	Mel	5	85-106		
HLLME-DAD baseado-IL	Leite	5	93-119	4-16	Gao et al. (2011)
SPE-LC-UV	Plasma de porco	-	86-102	7-12	Garcés et al. (2006)
DLLME-LC-DAD	Musculo suíno	1,5	93-105	6-24	Yan et al. (2011)
DMSPE-LC-DAD	Musculo suíno	10	96-111	8-26	
SILLME	Água de campo	3	101-109	0,1-0,6	Du et al. (2014)
		3		0,5-2,5	
	Mel	3	89-114	0,8-5	
	Plasma suíno	3	89-111	0,4-5	
		3	84-108	0,4-5	
	Musculo suíno	3	61-83	0,4-5	

Unidades de concentração em ng L⁻¹ para água, leite e plasma suíno e µg kg⁻¹ para mel e musculo suíno; UA-DLLME-LC-UV - microextração dispersiva líquido-líquido assistida por ultrassom com detector ultravioleta por cromatografia líquida; MSPE-CLC-UV-vis - extração magnética em fase sólida com variável detector UV-vis de comprimento de onda; HLLME-DAD baseado em IL - Microextração líquida-líquida homogênea baseada em líquido iônico com detector de conjunto de fotodiodos por cromatografia líquida de alto desempenho; SPE-UV - extração em fase sólida com líquido cromatografia acoplada com detector ultravioleta; DLLME-LC-DAD e DMSPE-LC-DAD - Microextração Dispersiva Líquido-Líquido e extração dispersiva em fase microssólida com cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos. **Fonte:** adaptado (Du et al., 2014).

De acordo com Du et al. (2014), os resultados da Tabela 2, ao comparar os valores de LDs de outros métodos com a técnica SILLME, pode-se afirmar que o SILLME apresenta valores inferiores aos outros métodos. Além disso, a técnica SILLME, proposto integrou o pré-tratamento e a pré-concentração num único passo, que tornaria o procedimento mais simples, economizador de tempo e ecológico (DU et al., 2014). Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a técnica SILLME é usado para detectar e quantificar contaminantes como OTA, AFB1 e 2,4-D simultaneamente em água de arroz.

Ao compararmos os valores de LDs da Tabela 1 com os resultados da Tabela 2, é evidente que os limites de detecção também são consideravelmente altos em comparação com o método SILLME por DU et al. (2014). Com isso, torna a técnica vantajosa em aplicações que exigem uma sensibilidade extrema, uma vez que, para analisar micotoxinas essas exigências são extremamente necessárias, já que as concentrações são muito baixas (ng L^{-1}).

3.2 AGROTÓXICOS

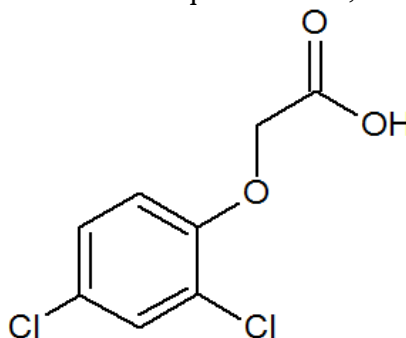
Em virtude do aumento no consumo, a produção, armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas ao longo dos anos tem provocado o acúmulo de resíduos de compostos químicos nocivos no meio ambiente (CARVALHO et al, 2020), tendendo a acumular-se no solo, e seus resíduos podendo chegar às águas superficiais, por meio de escoamento, e às subterrâneas, por meio de lixiviação (PERES et al, 2005; D'AVILA, 2016). Em relação a exposição direta com os agrotóxicos, é importante ressaltar que a utilização deles, devem ser realizadas de forma responsável e seguindo as normas e regulamentações estabelecidas pelos órgãos competentes de cada país e rótulo de uso, a fim de garantir a segurança tanto para os agricultores quanto para o meio ambiente e os consumidores dos produtos agrícolas. Além disso, o conhecimento sobre agrotóxicos está em constante evolução, com novas substâncias sendo desenvolvidas e outras sendo reavaliadas em relação à sua segurança e impacto ambiental.

Os agrotóxicos são produtos químicos utilizados na agricultura para controlar pragas, doenças e ervas daninhas que possam afetar o desenvolvimento das plantas cultivadas. Eles podem ser classificados em diferentes grupos com base em sua estrutura química e modo de ação. Os principais grupos de agrotóxicos são inseticidas, herbicidas, fungicida e nematicidas (LOPES et al., 2021).

Para a classe dos herbicidas que geralmente são derivados de ácidos que contêm grupos carboxílicos ou sulfônicos em sua estrutura, encontra-se o 2,4-D (Figura 5). Entre as diversas formulações de agrotóxicos disponíveis, os herbicidas ocupam a posição de destaque no mercado brasileiro. O princípio ativo do 2,4-D é líder nesse segmento, classificando-se em segundo lugar

em termos de vendas (IBAMA, 2021). O herbicida 2,4-D é um ácido orgânico, com pKa 2,6, e possui uma solubilidade de 45 mg L⁻¹ em água, e em alguns solventes orgânicos, seus sais e ésteres são os mais conhecidos agentes químicos utilizados como herbicida desta classe dos fenóxidos, sua fórmula molecular é descrito por C₈H₆Cl₂O₃, possui massa molar de 221,03 g mol⁻¹, seu aspecto físico é pó cristalino branco a amarelo, ponto de fusão a 138 °C (PUBCHEM, 2024).

Figura 5 - Estrutura química do 2,4-D.



Fonte: Autoria própria.

Os agrotóxicos, em geral, podem causar intoxicação aguda, subaguda e crônica por vias dérmicas, gastrointestinais e/ou respiratórias. A intoxicação aguda ocorre rapidamente após exposição de curto prazo a produtos tóxicos, com sinais e sintomas facilmente reconhecíveis, facilitando o diagnóstico e o tratamento (ADEL; AKEFIWARD, 2020; EDDLESTON, 2020). Pode variar de leve a grave, dependendo da quantidade de agrotóxico absorvida (ADIBELLI; ÖZKAN; ÖZKAN, 2019). A intoxicação crônica, por outro lado, tem um início tardio dos sintomas e pode ocorrer após exposição pequena ou moderada a pesticidas por meses ou anos (TAVARES; ALBUGUERGUE, 2018). Essa forma de intoxicação pode causar danos irreversíveis, como paralisia e neoplasias entre outras doenças graves (SINGH; MURTHY; RAMASSAMY, 2012). Estudos demonstram efeitos de danos causados pelo 2,4-D em organismos não-alvo, sobretudo as espécies aquáticas por exemplo, *Eritrócitos de Lithobates catesbeianus* (MESAK et al., 2018); malformações na morfologia dos discos orais internos, anomalias morfológicas no intestino e alterações no formato corporal de *Phisalaemus abonatus* (CURI et al., 2019). Apesar disso, agências governamentais de muitos países classificam o 2,4-D como praticamente não tóxico para organismos aquáticos (OMS, 2020). Vale ressaltar que o 2,4-D foi proibido em algumas regiões, como no continente africano em Moçambique, na Europa, na Noruega, na Ásia, no Vietnã e na América do Sul na Argentina (PAVAN et al., 2021). No Brasil, o 2,4-D é classificado como Classe I pela ANVISA, (2019a),

isso significa, que é pertencente ao indicativo de cor vermelha, que caracteriza os fitossanitários extremamente tóxicos (Tabela 3). Esse critério baseia-se unicamente nos efeitos agudos que a substância é capaz de produzir após a exposição única em animais de laboratório.

Tabela 3 - Classificação toxicológica de agrotóxicos.

Classe toxicológica	Dose letal (DL50*) mg kg ⁻¹ peso vivo	Faixa de indicativa de cor
I – Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II – Altamente tóxico	5 – 50	Vermelha
III – Moderadamente tóxico	50 - 300	Amarelo
IV – Pouco tóxico	300 – 2000	Verde
V – Produto Improvável de Causar Dano Agudo	2000 – 5000	Azul

*Dose letal 50 aguda - DL 50 - por via oral e dérmica, para animais de laboratório, para os produtos técnicos e produtos formulados. Concentração letal 50 inalatória - CL 50 - para produtos formulados: fumegantes, vaporizáveis, voláteis e pós com partículas de diâmetro igual ou menor que 15 µm, nas condições de uso. **Fonte:** adaptado (ANVISA, 2019b).

Os agrotóxicos são substâncias químicas que se degradam lentamente e podem se acumular nos seres vivos e no meio ambiente, persistindo por até 30 anos no solo. Eles são altamente solúveis em gordura e podem contaminar humanos por meio do contato direto, bem como pela cadeia alimentar e ingestão de água e alimentos contaminados (MATSUMOTO et al., 2009). O acúmulo do 2,4-D no meio ambiente pode causar graves problemas ambientais devido à sua alta toxicidade, principalmente quando se trata de uma substância química moderadamente persistente com meia-vida entre 20 e 312 dias dependendo das condições ambientais (ORDAZ-GUILLÉN et al. 2014). De acordo com Dehghani et al. (2014), devido ao baixo coeficiente de adsorção no solo e a elevada solubilidade do 2,4-D, este agrotóxico se infiltra nas águas superficiais e subterrâneas na forma iônica, persistindo por longos períodos. Com isso, torna-se um desafio significativo para a qualidade dos recursos hídricos, com potenciais impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente.

Tabela 4 - Ocorrência do agrotóxico 2,4-D em águas.

Agrotóxico	Matriz	País	Extração	Técnica de análise	LOD (µg L⁻¹)	Concentração (µg L⁻¹)	Referência
2,4-D	Água superficial	EUA	SPE	LC-MS/MS	0,02	0,5	Wijnja; Doherty; Safie, (2014)
2,4-D	Água superficial	EUA	-	-	-	Estação seca 0,08 – 12 Estação de chuvosa 0,08 – 10	Esminger et al. (2013)
2,4-D	Água superficial	EUA	-	-	-	<0,1	Gilliom, (2007)
2,4-D	Água superficial	EUA	SPE-ELISA	GC/MS	0,05	10	Turman et al., (2001)
2,4-D	Água superficial	EUA	Clorofórmio	GC	0,01	0,7	Schultz; Harman (1971)
2,4-D	Água potável e de superfície	Espanha	SPE	LC-ESI-MS	-	0,06-0,21	Rodil et al., (2012)
2,4-D	Água de sedimento	EUA	-	-	-	0,1-12	Ensminger et al., (2013)
2,4-D	Água superficial	EUA	-	-	1,0	3	Serrano; Delorenzo, (2008)

Agrotóxico	Matriz	País	Extração	Técnica de Análise	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
2,4-D	Água superficial	EUA	-	-	-	8	Serrano; Delorenzo, (2008)
2,4-D	Água superficial	México	Diclorometano líquido-líquido (DCM)	CG-ECD	-	0,05	Arévalo-Hernández, et al., (2011)
2,4-D	Água superficial	Grécia	SPE	GC-MS/MS LC-MS/MS	<0,1	1,2	Tsaboula et al., (2016)
2,4-D	Água superficial	Canadá	Diclorometano líquido-líquido (DCM)	LC-MS/MS	0,0005	0,00024 a 0,00043	Environment Canada, (2011)
2,4-D	Água superficial	Canada	Diclorometano líquido-líquido (DCM)	GC-EI-MS	0,0004 a 0,001	0,00017	Glozier et al., (2012)
2,4-D	Água residual	Australia	SPE	LC-MS/MS	-	3	Cardenas et al., (2016)
2,4-D	Água de piscicultura Água da chuva	Irã	Microextração de emulsificação	GC de derivatização	2	15 16	Yamini; Saleh (2013)
2,4-D	Água de rio	Brasil	SPE	LC-UV	-	>2,0	Primel et al. (2005)

Agrotóxico	Matriz	País	Extração	Técnica de análise	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
2,4-D	Água superficial	Brasil	SPE	LC-UV	-	75	Pinheiro et al., (2010)
	Água subterrânea					1,2	
2,4-D	Água de lagoa	Canadá	SPE	GC/MS	-	5,3	Hall et al. (1993)
2,4-D	Água subterrânea	Irlanda	SPE	UHPLC	0,00008	0,007	McManus et al. (2014)
2,4-D	Água de esgoto	Canadá	SPE	LC-MS/MS	-	2,8	Raina et al. (2011)
2,4-D	Água subterrânea	México	SPE	LC-DAD	<0,5	0,5	Cejudo et al. (2021)
2,4-D	Água de rio	União europeia	SPE	LC-MS/MS	-	1,2	Loos et al. (2009)
2,4-D	Água de rio	Chile	SPE	LC-DAD	0,1	10	Palma et al. (2004)

– :Não mencionado; GC-ECD: Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons; GC-MS: Detecção Espectrométrica de Massas; LC-ESI-MS cromatografia líquida-ionização electrospray-espectrometria de massas; Cromatografia Gasosa – ionização electrospray; LC-UV: Cromatografia Líquida-Detecção Ultravioleta.

A presença do 2,4-D em sistemas aquáticos tem sido uma preocupação significativa devido aos seus potenciais impactos ecológicos. Estudos mostraram (Tabela 4) que o 2,4-D pode penetrar nas águas subterrâneas em áreas agrícolas (BAIMA et al., 2021), também presente em água superficial, chuva e até mesmo em água potável. Vários métodos foram desenvolvidos para extrair e detectar e quantificar o 2,4-D em amostras de água, e várias técnicas de extração, empregando diferentes técnicas para analisar o agrotóxico, incluindo cromatografia de alta eficiência acoplada a espectro de massa e massa (HPLC-MS/MS), cromatografia gasosa e espectro de massa (GC/MS), cromatografia líquida-ionização electrospray-espectrometria de massas (LC-ESI-MS), cromatografia líquida acoplada com ultravioleta (HPLC-UV), Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa por ionização eletrônica (GC-EI-MS), cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) e LC-DAD todas as técnicas estão presente na Tabela 4 devido ao aumento de ocorrências em sistemas ambientais e principalmente em águas superficiais e subterrâneas, existem legislações para controlar esses efeitos. A Tabela 5 apresenta algumas diretrizes de cada país.

Tabela 5 - Valor Máximo Permitido do agrotóxico 2,4-D em água em vários países.

Limite máximo de resíduo em água para 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
OMS	Brasil	União Europeia	Argentina	Austrália	EUA	Canadá	Nova Zelândia
30	30	0,1	100	0,1	70	100	40

Fonte: OMS, (2021); BRASIL, (2021); EU, (2020); ARGENTINA, (1994); ADWG (2021); USEPA (2021); CANADÁ, (2020); MINISTRY OF HEALTH, (2018).

Os valores máximos permitidos pela OMS e pelo Brasil são de $30 \mu\text{g L}^{-1}$, observando na Tabela 4 de ocorrência do 2,4-D em água, a detecção do 2,4-D em água no Brasil excedeu o limite máximo permitido, em $74,5 \mu\text{g L}^{-1}$. O limite máximo permitido pela União Europeia é de apenas $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, é considerado uns dos mais rigorosos em comparação com outras regiões. Assim como a Austrália, que também estabelece um limite bastante rigoroso de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ foi possível detectar resíduos de 2,4-D acima do permitido. Entretanto, a maioria das detecções do 2,4-D nos estudos presente na Tabela 4, encontram-se com as concentrações abaixo do limite permitido.

3.3 DEGRADAÇÃO DE MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS

Como visto, esses contaminantes em água, torna-se preocupante, e como alternativas de amenizar este problema, métodos físicos, químicos e biológicos tem sido amplamente estudado para a descontaminação de produtos para a alimentação humana e animal (BULLERMAN;

BIANCHINI, 2007). A efetividade destes métodos deve ainda obedecer a alguns requisitos básicos como a capacidade de remover, destruir ou detoxificar contaminantes, não originarem outros compostos tóxicos, não alterarem significativamente as características nutritivas dos alimentos e a sua implementação ser técnica e economicamente viável (GALVANO et al., 2001). Vale ressaltar que alguns destes métodos, em especial os químicos, nem sempre garantem a segurança toxicológica do produto, uma vez que na sua grande maioria não são estudados os produtos de reação formados.

Sendo assim, degradação das micotoxinas em água pode ser alcançada por meio de vários métodos. Na Tabela 6 está presente os resultados de degradação com variação entre 27 e 100% de mitigação em diferentes métodos.

Tabela 6 - Métodos físicos, químicos e biológicos para degradação de micotoxina em água.

Método	Metodologia aplicada	Micotoxina	Matriz	Degradação	Referência
Químico	Ozônio	PAT	Água destilada	92%	Cataldo, (2008)
	Fotocatálise	Fumonisin B1 e B2	Água	97%	Hilda-Elizabeth et al., (2005)
	Ozônio	ZEN	Água desionizada	100%	Dudziak, (2012)
Biológicos	Enzima PO Comercial	OTA e ZEN	Solução Modelo	27% OTA; 65% ZON	Garcia et al., (2020)
	Enzima PO Comercial	AFB1	Solução modelo	97%	Sibaja et al., (2018)
	Enzima PO de Farelo de Arroz Filtrada	DON	Solução modelo	82%	Gautério et al., (2017)
	Enzima PO comercial, enzima de arroz e soja	ZEN	Solução modelo	70% Comercial; 47% Arroz; 40% Soja	Garcia et al., (2018)
	Enzima Lacase de <i>Weizmannia coagulans</i> 36D1	AFB1 DON Toxina T2 FB1 OTA			
Físicos	Plasma Frio	PAT	Água	96%	Xue et al., (2021)
	Luz pulsada	DON, ZEN, OTA e AFB1	Micotoxina solubilizada em solventes	72% DON; 84% ZEN; 98% OTA; 93% AFB1	Moreau et al., (2013)

Método	Metodologia aplicada	Micotoxina	Matriz	Degradação	Referência
Físicos	Luz pulsada	Alternariol Éter monometílico de alternariol Citrinina	Suco de maçã	79,2% 68,7% 78,5%	Qi et al., (2024)

PAT: Patulina; ZEN: Zearalenona; OTA: Ocratoxina A; AFB1: Aflatoxina B1; DON: Desoxinivalenol.

De modo geral, a metodologia aplicando ozônio teve resultado de 100% na degradação da ZEN, esta metodologia é usada quando se trata de método químico de degradação. No entanto, a eficiência de degradação das micotoxinas durante a ozonização pode ser influenciada por fatores como a estrutura e distribuição das micotoxinas no produto, bem como o tamanho das partículas (ROMERO, et al., 2021).

A eficiência de degradação em diferentes métodos para remoção de agrotóxicos em água está apresentada na Tabela 7, onde os resultados de degradação variam de 17 a 100%.

Tabela 7 - Métodos físicos, químicos e biológicos para degradação de agrotóxicos em água.

Método	Metodologia aplicada	Agrotóxicos	Matriz	Degradação	Referência
Químico	Vacância de oxigênio (NiAl _x Fe _{2-x} O ₄)	2,4-D	Água	95%	Zuo et al., (2024)
	Peroximonossulfato por partículas magnéticas de NiFe ₂ O ₄ em nanoescala	2,4-D	Água	97,5%	Zuo et al., (2024)
	Ozonização Catalítica (NiFe ₂ O ₄)	2,4-D	Água superficial	70%	Zhoa et al., (2023)
	Oxidação	2,4-Diclorofenol	Água subterrânea	96,5%	Wang et al., (2024)
	Nanopartículas de peroximonossulfato/ferri ta de cobre magnética/ozônio	2,4-D	Água superficial	42,7 a 67,3%	Jaafarzadeh et al., (2017)
	Fotocatalise utilizando nanopartículas sol-gel e TiO ₂ comercial	2,4-D	Água	62,2 a 95,4%	Seck et al., (2012)
	Biossíntese de nanocomposito	2,4-D	Água	94%	Punyasamudram et al. (2023)
	Catálise sob luz visível	2,4-D	Água	89,1%	Yu et al., (2023)

Método	Metodologia aplicada	Agrotóxicos	Matriz	Degradação	Referência
Biológico	ozonização catalítica de alta eficiência	2,4-D	Água	80%	Zhu et al., (2022)
	Eletropolimerização	2,4-D	Efluente	100%	George et al., (2023)
	Oxirredução	2,4-D	Água	85,7%	Zuo et al., (2023)
	Biomassa microbiana	2,4-D	Água	85%	Girardi et al., (2013)
	Degradação microbiana	2,4-D	Água	81 a 100%	Vanita et al., (2023)
	Enzima lacase imobilizada	2,4-Diclorofenol	Água	82,9%	He et al., (2023)
	Biossorção acoplada à degradação pela lacase imobilizada	Isoproturon, a Atrazina, Prometrina, Mefenaceto, Penoxsulam	Água	54,5 a 65,9%	Chen et al., (2019)
	Fotocatálise heterogênea e processo biológico aeróbico	Clorpirifós	Água residuais	88%	Becerre et al., (2022)
	Fungo <i>P. chrysosporium</i> BKM ^F -1767	2,4-Diclorofenol	Água residual	57%	Chen et al., (2014)
	Lacase Imobilizada (<i>Coriolus versicolor</i>)	2,4-Diclorofenol	Sistema aquoso	52,2%	Zhan et al., (2009)
Físico	Bacterias cepa <i>Bacillus cereus</i> GN1	Clorofenol	Água superficial	77,6%	Matafonova et al., (2006)
	Fotocatalise sob radiação de luz visível	2,4-Diclorofenol	Água	63%	Ali et al., (2020)
	Cavitação hidrodinâmica	2,4-Diclorofenol	Água	96,67%	Azizollahi et al., (2023)
	Sílica mesoporosa usada como transportador para imobilizar a lacase	2,4-Diclorofenol	Água	62%	Yang et al., (2015)
	Membrana de osmose reversa e biofiltração	2,6-Diclorobenzamid a	Água	97%	Schotag et al., (2022)

Em resumo, os métodos químicos geralmente têm um impacto direto no alvo, oferecendo uma ação rápida. Os métodos biológicos tendem a ser mais específicos para alguns compostos, reduzindo os efeitos colaterais. Métodos físicos, como radiação, podem atingir uma variedade de alvos com eficiências variadas (LARISA; DONERIAN; VODYANOVA, 2018; SMAILI et al.,

2014). Para isso, é necessário entender as propriedades físico-químicas dos compostos e do ambiente de aplicação para entender a eficácia do método. É importante destacar que há evidências significativas que comprovam a eficácia da degradação de agrotóxicos, como pode-se observar na Tabela 7. Os resultados dos métodos biológicos apresentam uma excelentes resultados de degradação onde o valor mínimo degradado de 2,4-D é de 52,2% aplicando lacase imobilizada, entretanto o maior resultado de degradação é 100% usando a metodologia microbiana, esses dados fortalecem a noção de que os métodos biológicos desempenham um papel crucial nesse processo. Isso reforça a importância da utilização da biodegradação e, por conseguinte, estimula o desenvolvimento contínuo de novas técnicas biotecnológicas. Principalmente em relação a utilização de enzimas que têm sido extensivamente estudadas. Como por exemplo o emprego da enzima lacase, descrito por Bhatt et al. (2023) que demonstrou sua capacidade de degradação do glifosato na faixa de 48%, hidrolisando especificamente a ligação C-N no glifosato e produzindo produtos não tóxicos (BHATT et al., 2023). Estudo de La Cecilia e Maggi (2018) avaliaram as vias de degradação do glifosato e seus subprodutos, mostrando que as bactérias *agrobacterium radiobacter*, *Achromobacter* VD, *Flavobacterium* sp, *Ochrobactrum anthropi* e *Pseudomonas* sp podem degradar até 98% do glifosato e 9% de seu subproduto, o ácido aminometilfosfônico (AMPA) no solo. Neste contexto, os métodos biológicos para degradação de agrotóxicos além de serem eficientes, são de fato mais sustentáveis e ecologicamente corretos para o meio ambiente (SATHIA et al., 2023; MCCLARE, 2022).

3.4 ENZIMA PEROXIDASE

Com a evolução da ciência em seus diversos setores, inúmeras metodologias biotecnológicas têm sido sistematizadas, aumentando a eficiência dos produtos gerados, proporcionando benefícios econômicos, sociais e ambientais. Uma das principais técnicas relacionada à biotecnologia é a biodegradação (FALEIRO; ANDRADE, 2009) principalmente relacionada a aplicação de enzimas, estando entre elas a utilização de enzimas oxidativas no tratamento de efluentes. As enzimas apresentam propriedades interessantes como requisitos de baixa energia, processo de fácil controle, operação em uma ampla faixa de pH (2,0 a 8,0) e concentração de substratos, no caso de biodegradação relacionado a contaminantes, além de possuírem um baixo impacto sobre os ecossistemas (ELY et al., 2016; DURAN; ESPOSITO, 2000).

As enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente proteica, que participam de várias reações bioquímicas, tendo como papel fundamental o controle metabólico.

Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis e estereoespecíficas (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). As peroxidases (PO) (E.C.1.11.1.7) são predominantemente proteínas heme que utilizam peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos como aceptor de elétrons na catálise da oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. Estas enzimas são classificadas em duas famílias principais (vegetal e animal) e sua massa molar pode variar de 30 a 150 kDa (SOUZA, 2020). As hemiperoxidases são uma superfamília de enzimas que contém Fe (III) e protoporfirina IX como grupo prostético, mas que evoluíram de forma independente, divergindo, por exemplo, na arquitetura do sítio ativo e na atividade enzimática (ZAMOCKY et al., 2014).

As POs podem ser aplicadas para a oxidação de uma ampla variedade de compostos na presença de peróxido de hidrogênio, como na desodorização de dejetos de suínos (YE, ZHU; LI, 2009), na descoloração de corantes (ULSON DE SOUZA, FORGIARINI; ULSON DE SOUZA, 2007). A aplicação da oxidação enzimática, por meio da peroxidase, representa um método eficaz para degradar diversas micotoxinas, sendo a AFB1 um exemplo relevante de estudo. Nesse sentido, Das e Mishra (2000), utilizaram a peroxidase comercial de rábano (HRP) em concentração de 200 U mg⁻¹ *in vitro*, onde foi possível degradar 60% da AFB1, bem como enzimas peroxidase parcialmente purificadas de raiz de rabanete recém-colhida, com 20 e 30 µg⁻¹ de proteína foram feitos para agir sobre a AFB1 *in vitro*. Os resultados demonstraram que as enzimas peroxidase parcialmente purificadas apresentaram uma conversão significativa da micotoxina, atingindo cerca de 30% e 38% de degradação, respectivamente. A otimização da reação enzimática revelou que as condições ideais ocorreram em tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ a 20°C, com pH 6, tempo de incubação de 60 minutos e pressão normal. O peróxido de hidrogênio foi utilizado como agente oxidante em todas as reações e em concentração de 5 mmol L⁻¹. Os produtos resultantes dessa reação enzimática foram submetidos a testes de toxicidade em *Bacillus megaterium* e outros microrganismos. Os resultados desses testes indicaram um significativo crescimento do micro-organismo, atingindo 97% e 30% de crescimento quando utilizadas concentrações de 200 e 30 U mg⁻¹ de enzima na reação, respectivamente.

A utilização da enzima peroxidase proveniente do farelo de soja (FS) foi descrita por Feltrin et al. (2017) que envolveu a otimização das condições de extração, incluindo a taxa de agitação, tempo, pH e volume do solvente empregado. Para obter a enzima desejada, foram empregados 5 g de farelo de soja (FS) e 50 mL de tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 4,7, com agitação por 60 minutos a 100 rpm, resultando em uma atividade específica de 100 U mg⁻¹ para o

FS. A peroxidase, tanto em sua forma bruta quanto purificada, foi submetida a caracterização cinética, termodinâmica e bioquímica. Adicionalmente, a peroxidase na forma bruta demonstrou uma maior manutenção da atividade, preservando 50% de sua atividade ao longo de 114 dias a 0 °C. Por outro lado, a forma purificada da peroxidase apresentou uma maior afinidade pelo substrato e reduziu os níveis de Deoxinivalenol em 80%, superando em 20% a forma bruta, nas condições: tampão fosfato 5 mmol L⁻¹ pH 5, reação a 35 e 30 °C durante 10 e 5 min, K_m de 0,17 e 0,05 mmol L⁻¹ e V_{máx} de 196 e 182 U mg⁻¹, respectivamente, conforme observado por Feltrin et al (2017).

O estudo conduzido por Garcia et al. (2020) focou na avaliação da eficácia da enzima peroxidase comercial (PO) de *Armoracia rusticana* na degradação simultânea da ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEN) em uma solução modelo e cerveja. O processo incluiu a otimização dos parâmetros reacionais para a ação da PO, a avaliação da aplicabilidade na degradação de micotoxinas tanto em solução modelo quanto em cerveja, e a determinação dos parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten - K_M e velocidade máxima - V_{max}). As condições ideais para a reação enzimática foram pH de 7, força iônica de 25 mmol L⁻¹, incubação a 30 °C, cofatores 1 mmol L⁻¹ K⁺ e 26 mmol L⁻¹ de H₂O₂, a PO em uma concentração de 0,6 U mL⁻¹ apresentou a máxima atividade para a degradação simultânea de OTA e ZEA, alcançando 27,0% e 64,9% de degradação, respectivamente, em solução modelo após 360 minutos. Ao aplicar a PO à cerveja, observou-se uma degradação simultânea de OTA e ZEA de 4,8% e 10,9%, respectivamente. Os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} para a degradação de OTA e ZEA foram determinados, sendo 50 e 10,710 nmol L⁻¹ e 0,168 e 72 nmol L⁻¹ min⁻¹, respectivamente. O estudo realizado por Garcia, Feltrin e Garda-Buffon (2018) teve como objetivo avaliar a eficácia da PO comercial e das PO provenientes do farelo de soja (FS) e do farelo de arroz (FR) na redução da zearalenona (ZEA) em solução modelo, além de caracterizar o mecanismo de ação dessa enzima. Para a obtenção da PO, houve a extração a partir do FS e FR em tampão fosfato sob agitação orbital. A avaliação da capacidade redutora da PO comercial e das PO de FS e FR na redução de ZEA foi realizada em tampão fosfato e solução aquosa, respectivamente. Os parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{max}), foram determinados na faixa de concentração de 0,16 a 6 µg mL⁻¹. Os resultados mostraram que o uso da PO comercial e das PO provenientes de FR e FS resultou em reduções significativas da concentração de ZEA em 69,9%, 47,4% e 30,6%, respectivamente, ao longo de 24 horas. Os valores de K_M foram calculados como

39,61 e 8,90 μM , enquanto os valores de V_{max} foram determinados como 0,170 e 0,011 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para a PO comercial e a PO proveniente de FR respectivamente.

O estudo de Nora et al (2019) avaliou o potencial da enzima PO na redução dos níveis de OTA e sua aplicação em suco de uva. Tanto a PO comercial quanto o PO extraído do farelo de arroz foram avaliados, respectivamente, quanto à sua atividade em relação à OTA em um sistema modelo. A afinidade entre PO e OTA foi verificada pela constante de Michaelis-Menten e pelos parâmetros de velocidade máxima, resultando em 0,27 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,015 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para a enzima comercial e 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,031 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ para PO extraído do farelo de arroz, respectivamente. Os menores níveis residuais de OTA ocorreram quando 0,063 U mL^{-1} da enzima foi aplicada. Nessas condições, a redução da OTA foi de 41% em 5 horas para a enzima comercial, e de 59% em 24 horas, para o PO extraído do farelo de arroz. Quando o PO extraído, com atividade de 0,6 U mL^{-1} , foi aplicado ao suco de uva integral, os níveis de OTA diminuíram para 17%, às 24 horas.

O estudo de Sibaja et al. (2019) avaliou os efeitos da concentração enzimática, pH, temperatura e tempo de reação na biotransformação de AFB1 pela PO comercial em solução modelo (tampão fosfato 100 mmol L^{-1}) onde obteve o resultado quando 0,015 U mL^{-1} foi utilizado para tratar 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BAAR₁, em pH 7,0–8,0 e 30–40 °C, por 8,0 h, a biotransformação de BAAR₁ atingiu seu máximo (97%). O valor K_M de PO para a biotransformação de AFB1 foi de 0,0160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) com um V_{MAX} de 6,4 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, que foram determinados com base no gráfico de Lineweaver-Burk. PO (0,015 U mL^{-1}) reduz efetivamente BAAR₁ (97%) e M₁ (65%) em leite UHT e BAAR₁ (24%) em amostras de cerveja lager. As POs servem também para remover hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CHEN et al., 2014; LEE et al., 2015) e no tratamento de águas residuais de indústrias (NICELL et al., 1993). Vale ressaltar também que possui forte potencial para degradação de contaminantes fenólicos (AITKEN et al., 1994; DEVAIAH; SHETTY, 2009) podendo assim ter capacidade também de degradar os agrotóxicos.

Para Bhatt et al. (2023), realizou investigação da potencialidade da enzima lacase (também enzima oxirredutase), na degradação do glifosato. Explorando lacase-glifosato usando abordagens de acoplamento molecular (MD) e simulação de dinâmica molecular (MDS). Os resultados sugeriu que a lacase interage bem com o glifosato. Numa solução aquosa a estabilidade da lacase com glifosato é mediada através da formação de interações hidrofóbicas ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. A presença de compostos tóxicos xenobióticos compostos tóxicos no

sítio ativo alteraram a conformação da lacase. O MDS dos complexos lacase-substrato confirmou a sua estabilidade durante a degradação catalítica. Os resultados do ensaio de lacase confirmaram que a degradação de glifosato foi de 48,34% em 2 horas.

Apesar da lacuna e carência na literatura científica de informações acerca da degradação de agrotóxicos envolvendo as enzimas oxirredutases como a lacase e a peroxidase, a aplicação dessas enzimas, particularmente lacases e peroxidases, são de interesse excepcional devido aos seus substratos de ampla variedade e grande capacidade para aplicações ambientais. Inegavelmente, a aplicação de enzimas oxidativas para fins industriais e biotecnológicos é uma área de pesquisa próspera (BARILLI; KEMPK, 2020).

É importante ressaltar, que aplicabilidade da PO, está vinculada ao ciclo catalítico das hemes peroxidases. No seu substrato preferencial, guaiacol, na etapa inicial, enzima férrica nativa é oxidada pelo H_2O_2 a uma forma intermediária chamada composto I (CI), deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do íon Fe^{3+} e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente, Fe^{4+} e radical cátion porfirínico. Posteriormente, o CI aceita um composto aromático (ROH) no seu sítio ativo e realiza a sua oxidação, formando o composto II (CII), um intermediário deficiente em um elétron. Um radical livre (RO) é produzido e lançado em solução. Logo, CII oxida, então, uma segunda molécula aromática, liberando um segundo radical livre, que conduz à formação de um produto polimérico, retornando a peroxidase ao seu estado nativo (estado reduzido Fe^{3+}), completando assim o ciclo. Na presença de excesso de H_2O_2 , pode acontecer a inibição da enzima, formando o composto III (CIII), forma reversivelmente inativa da enzima (ELY; KEMPKA; SKORONSKI, 2016; MEDINA et al., 2017).

A Tabela 8 mostra diversas pesquisas que examinaram a capacidade de várias fontes de peroxidase para degradar micotoxinas em situações particulares. Os resultados destacam o impacto de fatores como concentração enzimática, matriz de reação, força iônica, temperatura, tempo de reação e pH na eficiência da degradação de micotoxinas e compostos aromáticos. degradação de micotoxinas. Neste contexto, há a uma grande lacuna para estudo da degradação de contaminantes empregando enzima como fonte de ecologica e segura. Esta pesquisa mostra uma resposta promissora ao trabalhar biodegradação de agrotóxico e micotoxinas simultaneamente, além de executar um método de extração eficiente, rápido e econômico.

Tabela 8 - Emprego da enzima PO em diversas matrizes para degradação de micotoxinas e outros contaminantes.

Enzima (Fonte de obtenção)	Concentração enzimática	Matriz	Força Iônica	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	pH	Contaminante	Degradação (%)	referência
Peroxidase comercial (<i>Armoracia rusticana</i>)	0,6 U mL ⁻¹	Solução modelo	25	30	360	1 mmol L ⁻¹ K ⁺ e 26 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	7	OTA	27,0	Garcia et al. (2020)
Peroxidase (farelo de arroz)	0,063 U mL ⁻¹	Solução modelo	5	25	1440	26 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	5,5	OTA	59,0	Nora et al. (2019)
Peroxidase comercial (<i>Armoracia rusticana</i>)	0,6 U mL ⁻¹	Solução modelo	25	30	360	1 mmol L ⁻¹ K ⁺ e 26 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	7	ZEN	64,9	Garcia et al. (2020)
Peroxidase (farelo de soja)	6,0 U mL ⁻¹	Solução modelo	5	25	1440	26 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	5	ZEN	30,6	Garcia; Feltrin e Garda-Buffon (2018)

Enzima (Fonte de obtenção)	Concentração enzimática	Matriz	Força Iônica	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	pH	Contaminante	Degradação (%)	Referência
Peroxidase (Farelo de soja)	0,035 U mg ⁻¹	Ração para peixe	-	32	360	-	-	AFB1	90	Nogueira et al. (2023)
Peroxidase (farelo e soja)	1 U mL ⁻¹	Solução modelo	10 mmol L ⁻¹	30	10	-	5	DON	81	Feltrin et al. (2017)
Peroxidase (Farelo de arroz)	10.385,5 U mg ⁻¹	Efluente têxtil	-	25	1440	-	3,09	Corante vermelho	100	Klanovicz et al. (2020)
Peroxidase (<i>Armouracia rusticana</i>)	0,6 U mL ⁻¹	Cerveja	25 mM	30	360	1 mmol L ⁻¹ K ⁺ e 26 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	7	OTA e ZEN	4,8 e 10,9	Garcia et al. (2019)
Peroxidase (farelo de arroz)	0,01 U mL ⁻¹	Solução modelo	-	10	90	-	6	DON	80	Gautério et al., (2017)

Enzima (Fonte de obtenção)	Concentração enzimática	Matriz	Força Iônica	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	pH	Contaminante	Degradação (%)	Referência
Peroxidase	0,5 U mL ⁻¹	Solução modelo	-	30	60	-	6	AFB1	67	Melo et al. (2020)
Peroxidase (<i>Allium sativum</i>)	13,5 U	Pimentão vermelho	50	-	1560	-	7	AFB1	70	Tripathi; Mishra (2011)
Peroxidase (lactoperoxidase)	50 U mL ⁻¹	Água	-	28	1440	225 µmol L ⁻¹ de NaCl e 50 µ mol L ⁻¹ de H ₂ O ₂	-	AFB1	5	Doyle; Marth (1978)
Peroxidase (<i>Cedrela fissilis</i>)	126,60 U mg ⁻¹	Água residual	-	50	300	-	5	Corante têxtil Brilliant Sky-Blue G	83	Fritzke et al. (2020)
Peroxidase (comercial)	0,015 U mL ⁻¹	Leite	-	30–40	480	-	7,0–8,0	AFM1	69	Sibaja et al. (2019)

Enzima (Fonte de obtenção)	Concentração enzimática	Matriz	Força Iônica	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Cofator	pH	Contaminante	Degradação (%)	Referência
Peroxidase (<i>Raphanus sativus</i>)	25,000 U L ⁻¹	Água residual	-	25	1440	-	-	Antraceno	65	Chen et al. (2014)
								Fenantreno	0	
								Pireno	15	
								Fluoranteno	8	
Peroxidase (cascas de jicama)	0,79 U mL ⁻¹	Água	-	30 – 40	60	-	7	Fenol	97	Chiong et al. (2016)

-: Não adicionado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

- Balança analítica de precisão FA2104N (Bioprecisa, São Paulo, Brasil);
- Banho de areia Quimis (São Paulo, Brasil);
- Banho-maria Quimis (São Paulo, Brasil)
- Banho ultrassônico 40 kHz, 150 W - UNIQUE (São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico UNIQUE Ultra Cleaner 700 (São Paulo, Brasil);
- Bomba de vácuo Primatec – (São Paulo, Brasil);
- Capela de exaustão;
- Centrífuga Mini Spin Eppendorf - (Hamburg, German)
- Coluna Phenomenex Chrom-Clone 5 μ m C18 (150 mm x 4,6 mm) (São Paulo, Brasil).
- Coluna cromatográfica utilizada com fase estacionária composta por C18(5 μ m e 150 mm x 4,6 mm) Kromasil - Supelco® (Bellefonte, EUA) a 35 °C.
- Destilador de água Quimis 341-25 (São Paulo, Brasil);
- Destilador de nitrogênio Tecnal (São Paulo, Brasil);
- Espectrômetro FEMTO UV-Vis modelo Cirrus 80;
- Estufa – Quimis (São Paulo, Brasil);
- Membrana de acetato de celulose 0,45 μ m de diâmetro de poro de 47 mm de diâmetro (Millipore, São Paulo, Brasil) com utilização na filtração de solventes para HPLC;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 – 1000 μ L;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de de 1000 – 10000 μ L;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 20 – 200 μ L;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 5 – 50 μ L;
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável de 1 – 10 μ L;
- Peneira com abertura 42 mesh;
- Incubadora Shaker Refrigerada SL – 223 – (São Paulo, Brasil);
- Sistema de filtração em membrana Supelco (EUA);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3 Millipore (Millipore, EUA).
- Vórtex Biomixer Vtx-2500 (São Paulo, Brasil);
- Vidraria de rotina laboratorial (balões volumétricos, copo de béquer,

erlenmeyers, tubos falcon ...)

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

- Acetona P.A. (Synth, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Panreac, Espanha);
- Ácido acético glacial P.A. 99,7% (Synth, Brasil);
- Ácido clorídrico P.A. (Synth, Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3 Millipore (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- Benzeno P.A. (Vetec, Brasil);
- Cloreto de metileno grau HPLC (J.T. Baker, USA);
- Etanol P.A. (Synth, Brasil);
- Gás nitrogênio;
- Hidróxido de sódio P.A. (Synth, Brasil);
- Metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA);
- Padrões analíticos: Ocratoxina-A, Aflatoxina B1 (Sigma Chemical Company – EUA.); 2,4-D (Sigma-Aldrich - Brasil).
- Peróxido de Hidrogênio P.A. (Synth, Brasil);
- Sulfato de magnésio P.A. (Synth, Brasil);
- Sulfato de cálcio P.A. (Synth, Brasil);

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Água de parbolização

Para iniciar este estudo, o arroz em casca foi adquirido de indústria beneficiadora para simular a parboilização e assim, obter a água desta etapa do processo. A obtenção da água utilizada no processo de parboilização dos grãos de arroz foi realizada em escala laboratorial conforme procedimento descrito por Dors et al. (2009) (Figura 3). Para isso, os grãos foram imersos em água destilada na proporção de 1:2 (arroz:água) e submetidos a aquecimento em banho-maria a 60 °C por um período de 4 h (Dors et al., 2009). A água de parboilização obtida foi separada em volumes de 100 mL e mantida sob congelamento até o momento dos experimentos.

Figura 6 - Sistema para produção da água de parboilização.



Fonte: autoria própria.

4.3.2 Padrões das micotoxinas e agrotóxicos

Os padrões de OTA e AFB1, com pureza $\geq 99,0\%$, foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (Saint Louis, EUA). A solução estoque de OTA (concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada em benzeno: ácido acético (99: 1, v v⁻¹) e congelado. As soluções de trabalho resultaram de diluições de soluções de estoque até a concentração desejada às análises. A estimativa da concentração da solução de trabalho (Equação 1) de OTA foi realizada em espectrofotômetro empregando o comprimento de onda de absorção máxima de 333 nm, a absorvância molar de $5550 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ em benzeno: ácido acético (99: 1, v v⁻¹).

$$\text{Micotoxina } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{\text{abs} \times \text{MM} \times 1000 \times \text{fc}}{\epsilon \times b} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: micotoxina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) é a concentração da micotoxina presente em 1 mL; abs é o valor da absorvância da solução padrão; MM é a massa molecular da micotoxina em estudo (g mol^{-1}); fc é o fator de correção do instrumento; ϵ é a absortividade molar no comprimento de onda da absorção característica de cada micotoxina (mol L^{-1}) e b é a largura da cubeta (cm).

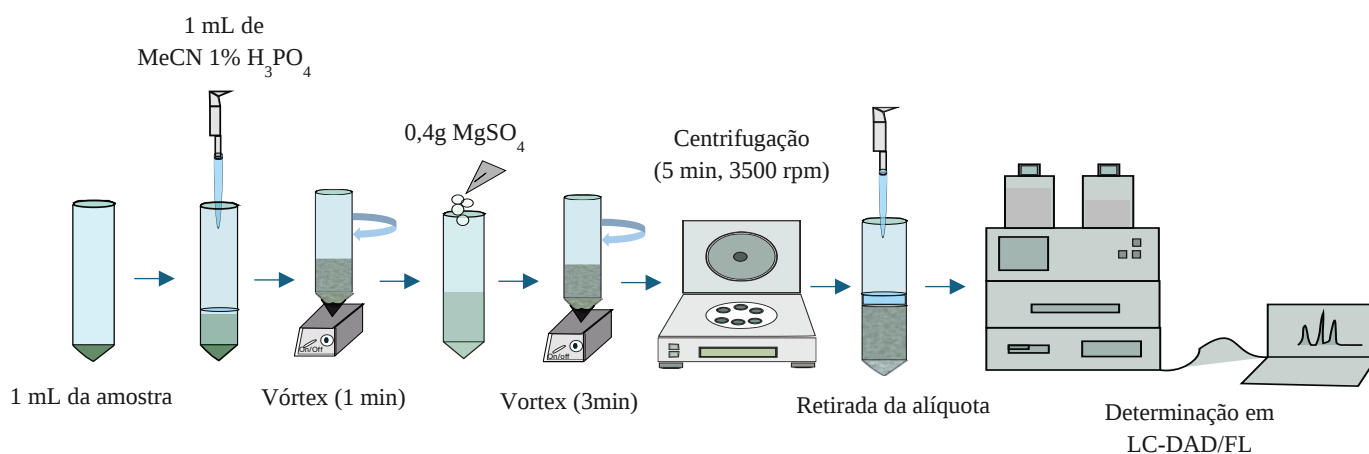
A solução estoque da AFB1 (concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$) foi preparada em benzeno:acetonitrila (98:2, v v⁻¹) e congelados. As soluções trabalho resultaram da diluição da solução estoque até as concentrações desejadas. A estimativa da concentração de trabalho foi calculada empregando a Equação 1. A quantificação da AFB1 em espectrofotômetro empregou o comprimento de onda de absorção máxima de 360 nm, absorvância molar de $0,656 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

O padrão de 2,4-D, adquirido da Sigma Aldrich Co, foi preparado em metanol grau HPLC, na concentração de 1000 mg L^{-1} , correspondendo a solução estoque. A solução foi armazenada em frasco âmbar e estocado a -18°C . A partir da solução estoque foi preparada solução de concentrações de 100 mg L^{-1} , e desta uma solução trabalho de 10 mg L^{-1} do 2,4-D.

4.3.3 Extração simultânea OTA e 2,4-D

A extração dos analitos foi realizada empregando a técnica SILLME proposto por Du et al (2014). O procedimento consistiu em adicionar 1 mL de água de parboilização e 1 mL de MeCN acidificada com 0,1% (v v⁻¹) de ácido fosfórico. O tubo foi agitado por 1 min em vórtex, seguida da adição de 0,4 g de sulfato de magnésio, agitação em vórtex por 3 min, e centrifugação por 5 min a 3500 rpm. As alíquotas foram então injetadas no sistema LC-DAD/FL.

Figura 7 - Esquema da técnica extração SILLME para OTA e AFB1.



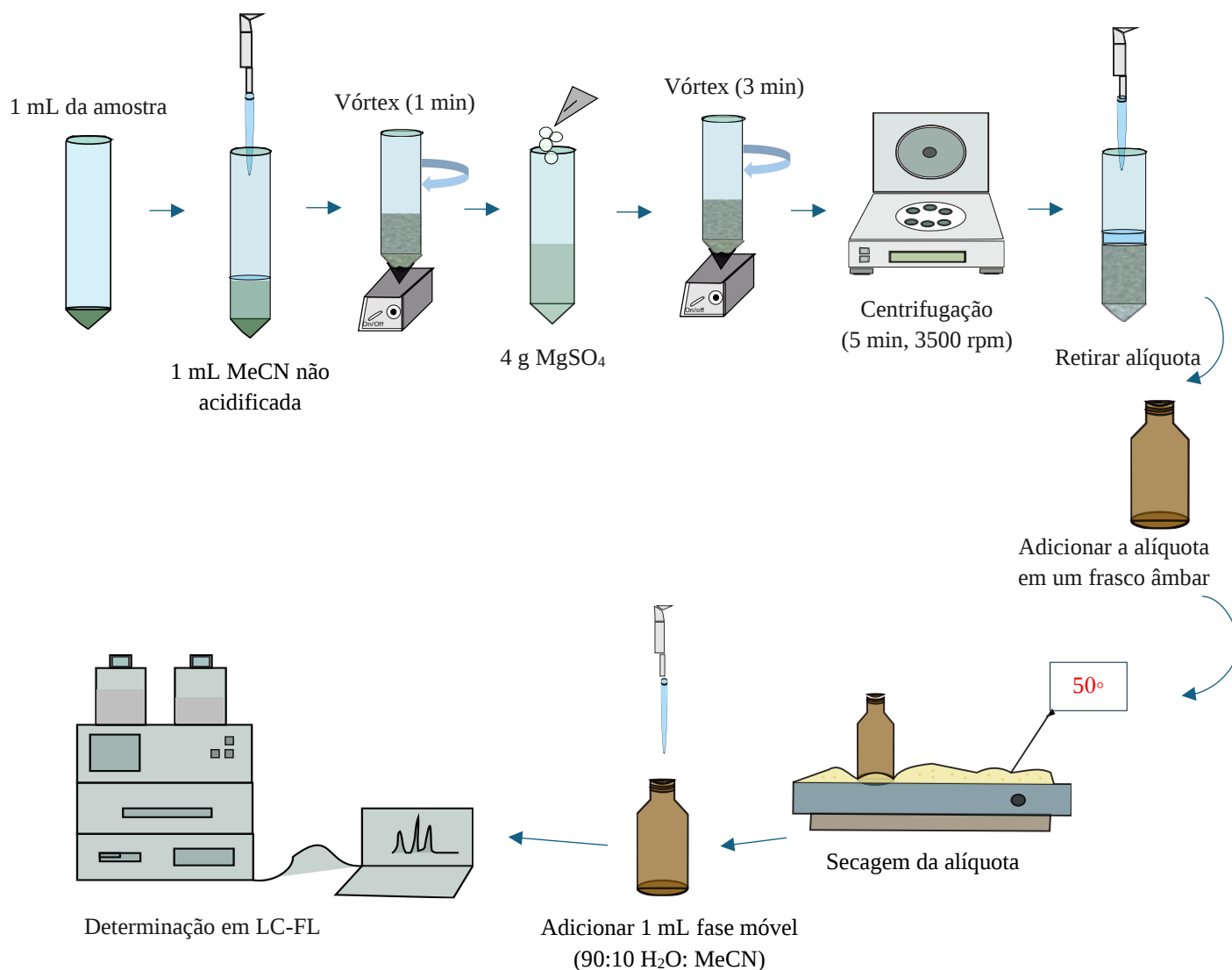
Fonte: Autoria própria.

4.3.4 Extração de AFB1

A técnica SILLME também foi aplicada a extração de AFB1, no entanto sem a acidificação da MeCN. A extração foi realizada empregando 1 mL de água de parboilização, 1 mL de acetonitrila, seguida da agitação em vórtex durante 1 min. Após, 0,4 g de sulfato de magnésio foi adicionado e o tubo foi agitado novamente em vórtex durante 3 min e centrifugado por 5 min a

3500 rpm. A alíquota (1 mL) do sobrenadante foi seca em banho de areia a 60 °C, ressuspensa em uma solução água: acetonitrila (90:10, v v⁻¹) e empregada para detecção e quantificação de AFB1 em LC-FL.

Figura 8 - Esquema da extração da técnica SILLME para AFB1.



Fonte: Autoria própria.

4.3.5 Condições cromatográficas OTA, AFB1 e 2,4-D

A determinação de OTA e 2,4-D foi realizada em cromatógrafo a líquido acoplado a um detector de arranjo de diodo e fluorescência sequencial (LC-DAD/FL). As condições de detecção

de OTA foram excitação a 333 nm e emissão a 460 nm (KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2015) e 220 nm para 2,4-D (CALDAS; DEMOLINER; PRIMEL, 2009). A fase móvel foi composta por acetonitrila: água acidificada com ácido fosfórico pH 3,0 (60:40, v v⁻¹), em eluição isocrática. A coluna cromatográfica utilizada com fase estacionária composta por C18 (5 µm e 150 mm x 4,6 mm) Kromasil - Supelco®) a 35 °C, A vazão da fase móvel foi estabelecida em 0,8 mL min⁻¹, totalizando o tempo de análise de 16 min, com o tempo de retenção de 7,5 min para 2,4-D e 13 min para OTA.

A determinação de AFB1 foi realizada em um cromatógrafo a líquido acoplado ao detector de fluorescência (LC-FL), com derivatização fotoquímica pós-coluna. Para a separação da micotoxina foi utilizada empregando uma coluna analítica C18 (Phenomenex Chrom-Clone 5 µm C18, 150 mm x 4,6 mm) em uma temperatura de 40 °C. A fase móvel foi composta por água: acetonitrila: metanol (60:15:25, v v v⁻¹) em uma vazão de 1,0 mL/min, resultando um tempo total de análise de 17 min, e o tempo de retenção da AFB1 de 13,5 min. A detecção foi realizada em comprimentos de onda de 370 nm e 410 nm para excitação e emissão, respectivamente

4.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Para este estudo os parâmetros utilizados para a validação dos métodos analíticos foram: faixa linear de trabalho, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (precisão intermediária) e exatidão (recuperação) (INMETRO, 2020).

A faixa linear de trabalho foi avaliada pela construção de curvas analíticas através de curva na matriz com soluções analíticas nas concentrações de 0,2 a 10 ng mL⁻¹ OTA em LC-FL, 0,2 a 10 µg mL⁻¹ para 2,4-D em LC-DAD e 0,2, a 11 ng mL⁻¹ para AFB1 em LC-FL, todas contendo, no mínimo, 8 concentrações.

O limite de detecção (LD) foi determinado utilizando uma abordagem de diluição da solução dos padrões até a ausência de sinal no tempo de retenção do analito, obtenção do ruído. O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido a partir do primeiro ponto de concentração da faixa linear de trabalho.

A exatidão foi avaliada adicionando concentrações conhecidas dos analitos, na água de parboilização em três níveis (baixo, médio e alto) nas concentrações de 0,2; 1,0 e 5,0 ng mL⁻¹ para OTA e AFB1, e 0,2; 1,0 e 5,0 µg mL⁻¹ para 2,4-D. As amostras foram injetadas no sistema cromatográfico em triplicatas.

A exatidão no indicativo de recuperação foi calculada conforme a Equação 2.

$$\text{Recuperação(\%)} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: C1 é a concentração do analito na amostra fortificada; C2 é a concentração do analito na amostra não fortificada; C3 é a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

A repetibilidade foi avaliada empregando água de parboilização fortificada em diferentes níveis em triplicata nas mesmas concentrações descritas na etapa da exatidão, seguido posteriormente da extração, e injeção em triplicata, pelo mesmo analista e nas mesmas condições cromatográficas. A precisão intermediária do método foi avaliada seguindo o mesmo procedimento, no entanto em diferentes dias. A partir das nove determinações foi calculado o RSD (%). Para os cálculos dos RSD utilizou-se a Equação 3, apresentada a seguir:

$$\text{RSD(\%)} = \frac{s}{Xm} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão absoluto; Xm é a média das medidas em replicata (n =9, replicatas injetadas em triplicata para OTA, AFB1 e 2,4-D).

4.4 OBTENÇÃO DA ENZIMA PO

A extração da enzima foi realizada empregando 5 g do farelo de arroz (moído e com granulometria de 42 mesh), ao qual foi adicionado 50 mL de tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 5, mantidos sob agitação orbital a 100 rpm por 60 min a 25°C. Após, o conteúdo foi centrifugado por 10 min a 3500 rpm em temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado e ajustado para um volume final de 50 mL em um balão volumétrico.

4.4.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade da PO do farelo do arroz foi determinada de acordo com Feltrin (2013). Para avaliar a atividade enzimática foram utilizados água destilada (400 µL), tampão fosfato 5 mM pH 5,5 (300 µL), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,08 v/v%) (200 µL), extrato enzimático (200 µL) e guaiacol 1% (100 µL). A incubação foi realizada em banho termostático por 20 min a 25 °C. A oxidação do composto foi verificada em espectrofotômetro a 470 nm e a atividade da enzima PO foi estimada de acordo com a Equação 4 descrita por Schüttmann et al. (2014). Uma unidade de atividade da PO representou a quantidade de enzima que catalisou a oxidação de 1 µmol de guaiacol em 1 min (ZERAIT, 2008).

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{abs \times V_{\text{reação}} \times DF \times 10^3}{\epsilon \times d \times t \times V_{\text{reação}}} \quad \text{Equação 4}$$

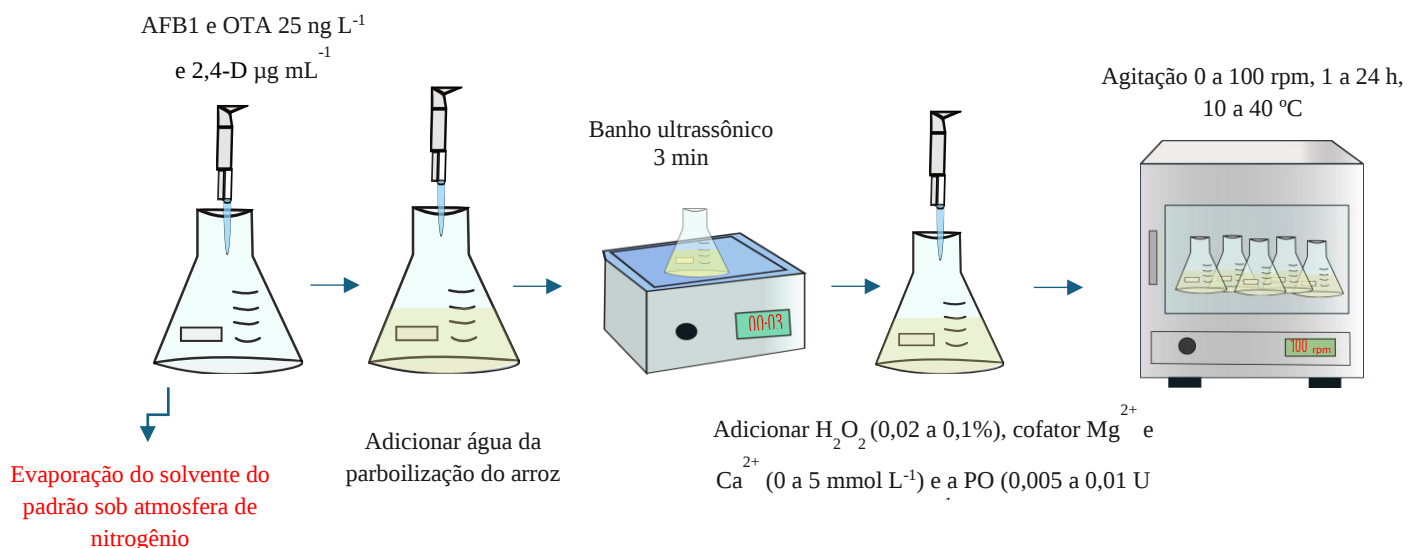
Onde $U \text{ mL}^{-1}$ é a unidade de atividade de PO por mL de extrato; *abs* é a absorbância da reação; $V_{\text{reação}}$ é o volume total da reação (mL); V_{amostra} é o volume de extrato enzimático (mL); *FD* é o fator de diluição (diluição do extrato enzimático); 10^3 é a conversão de mol para μmol ; ϵ é coeficiente de atenuação molar do tetraguaiacol ($26.600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); *d* é o diâmetro da cubeta (cm) e *t* é o tempo de reação (min).

4.5 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DAS MICOTOXINAS E AGROTÓXICOS POR PO

4.5.1 Degradação para OTA, AFB1 e 2,4-D por ação enzimática

O estudo de degradação de OTA, AFB1 e 2,4-D pela enzima peroxidase foi realizada avaliando as condições de reação (Tabela 9) (atividade enzimática, tempo de reação, temperatura, agitação, concentração de peróxido de hidrogênio e adição de íons metálicos) por delineamento experimental fatorial fracionado 2^{7-3} resultando em 16 ensaios e 4 pontos centrais, totalizando 20 experimentos, observa-se na Figura 9 o esquema realizado no procedimento dos ensaios de degradação.

Figura 9 - Esquema de ensaio de degradação simultânea para AFB1, OTA e 2,4-D.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - Níveis e variáveis analisadas no delineamento fatorial fracionado 2⁷⁻³.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Atividade enzimática (U mL ⁻¹)	0,005	0,08	0,01
Tempo de reação (h)	1	12,5	24
Temperatura (°C)	10	25	40
Íons metálico Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	0	2,5	5
Ion metálico Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	0	2,5	5
Agitação (rpm)	0	50	100
Peroxido de hidrogênio (%)	0,02	0,06	0,1

Os ensaios de degradação simultânea de OTA e AFB1 (25 ng mL⁻¹), e 2,4-D (25 µg mL⁻¹) foram realizados em reator tipo Erlenmeyer com volume útil de 50 mL, onde foram adicionados os volumes da solução padrão dos analitos e em seguida o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Os analitos foram solubilizados em 10 mL de meio reacional, onde primeiramente foi adicionado a água de parboilização, seguida da homogeneização em banho ultrassônico (3 min). Foram adicionados os íons metálicos, peróxido de hidrogênio e a enzima PO, as concentrações variaram conforme o delineamento experimental (Tabela 9). O reator foi mantido sob agitação orbital também conforme Tabela 9. Foram realizados quatro ensaios controles denominados como: controle 1(contendo micotoxinas e sem PO com H₂O₂); controle 2 (com micotoxinas sem PO sem H₂O₂); controle 3 (sem micotoxinas e sem PO); controle 4 (sem micotoxina com PO). Os ensaios dos controles foram realizados para verificar a qualidade do perfil cromatográficos, ou possível efeito da matriz. Ao final de cada ensaio, variando de 1 a 24 h, as concentrações residuais das micotoxinas e agrotóxico foram extraídas pela técnica SILLME e quantificadas em LC-DAD-FL. Os resultados da degradação foram calculados conforme a Equação 5.

$$Degradação(\%) = \frac{CM_{inicial} - CM_{final}}{CM_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde CM_{inicial} é a concentração do padrão inicial (OTA ng mL⁻¹, AFB1 ng mL⁻¹ ou 2,4-D µg mL⁻¹); e CM_{final} é a concentração do padrão final (OTA ng mL⁻¹, AFB1 ou 2,4-D µg mL⁻¹), calculada através da curva analítica com os padrões dos analitos.

4.5.2 Confirmação de degradação por PO

A melhor condição de degradação dos analitos obtido pelo tratamento estatístico foi realizada em triplicata. Os padrões foram adicionados em concentrações de 25 ng mL⁻¹ para

micotoxinas e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 2,4-D, e o solvente foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Os experimentos também foram realizados em reator tipo Erlenmeyer com volume útil de 50 mL com adição dos analitos e o solvente evaporado sob atmosfera de nitrogênio. Os analitos foram solubilizados em 8,721 mL de água de parboilização, homogeneizados em banho ultrassônico (3 min), adicionado íons metálicos Mg^{2+} e Ca^{2+} (500 μL para cada solução) na concentração de 5 mmol L^{-1} , em seguida adicionado o peróxido de hidrogênio (28,5 μL) na concentração de 0,1% e a enzima PO em $0,005 \text{ U mL}^{-1}$ (250 μL) sendo assim, totalizando 10 mL de volume total no reator. O reator foi mantido a temperatura de 40°C sem agitação orbital por 1 h, por fim os resíduos foram extraídos e quantificados.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da degradação de OTA, AFB1, 2,4-D na água de processamento de arroz foram analisados em relação a normalidade dos dados, estatisticamente por análise de variância (ANOVA), e pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), empregando o Software Statistica 7.0.0.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

A validação do método analítico é necessária para garantir resultados exatos e precisos (EUROPEAN COMMISSION, 2006). As micotoxinas apresentaram limites de detecção do método (LD) de $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ para OTA, $0,06 \text{ ng mL}^{-1}$ para AFB1, e para o 2,4-D de $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os limites de quantificação do método (LQ) para OTA foi de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$, AFB1 de 0,2, para o 2,4-D o limite foi de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Outros parâmetros de validação obtidos através de calibração da matriz para o método proposto estão apresentados na Tabela 10. Os coeficientes de correlação (r) foram maiores que ($r > 0,99$) estando dentro da faixa recomendadas (IMETRO, 2020).

Tabela 10 - Curvas analíticas e faixa linear para AFB1, OTA e 2,4-D em LC-FL/DAD*.

Parâmetros analíticos	OTA (ng mL ⁻¹)	AFB1(ng mL ⁻¹)	2,4-D (µg mL ⁻¹)
Equação da curva	y=132551x- 8250,8	y = 29701x + 10680	y=39132x-7354
Faixa linear	0,2 a 10	0,2 a 11	0,2 a 10
Coefficiente de correlação	0,999	0,996	0,999
Coefficiente de determinação	0,999	0,993	0,998

*LC-FL - Coluna Phenomenex Chrom-Clone 5 µm C18 a 40 °C com fase móvel (água: acetonitrila: metanol) (60:15:25, v v v⁻¹); LC-DAD/FL - coluna Kromasil - Supelco com fase estacionária composta por C18 a 35 °C - Fase móvel (acetonitrila: água acidificada com ácido fosfórico pH 3,0) (60:40, v v⁻¹).

Tabela 11 - Recuperação (RSD%) e precisão em termos de repetibilidade (RSD) e precisão intermediária.

Analito	Nível de fortificação	Repetibilidade		Precisão intermediária	
		R (%)	RSD	R (%)	RSD
OTA	0,2 ng mL ⁻¹	101	4,5	103	9,3
	1,0 ng mL ⁻¹	82,0	6,2	85,0	1,5
	5,0 ng mL ⁻¹	88,0	6,9	88,0	6,4
2,4-D	0,4 µg mL ⁻¹	82,0	2,5	88,0	5,4
	1,0 µg mL ⁻¹	94,0	2,7	86,0	1,6
	5,0 µg mL ⁻¹	81,0	7,4	90,0	4,3
AFB1	0,2 ng mL ⁻¹	120	8,9	120	5,1
	1,0 ng mL ⁻¹	105	9,1	101	5,7
	5,0 ng mL ⁻¹	97,0	0,5	84,0	1,2

A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação em três níveis, nas concentrações correspondentes a 0,2; 1,0 e 5,0 ng mL⁻¹ para as micotoxinas AFB1 e OTA, para o

2,4-D foi de 0,4; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (RSD) e precisão intermediária em três níveis para cada analito. Os valores de repetibilidade e de precisão intermediária estão apresentados na Tabela 11.

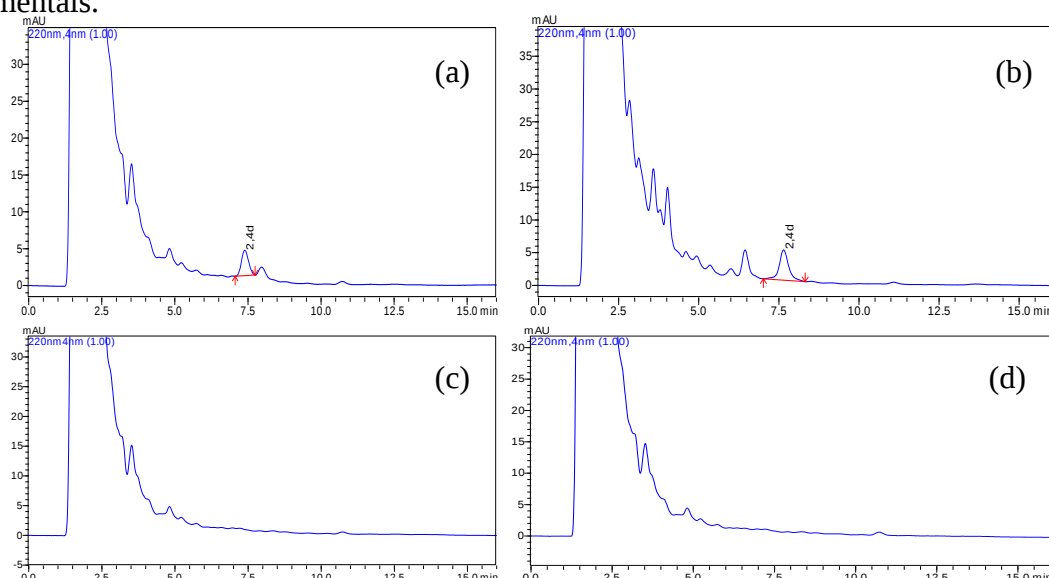
O método apresentou recuperações entre 82 e 120%, conforme apresentado na Tabela 11. A precisão do método foi expressa em RSD. O método demonstrou boa precisão com valores de RSD menores que 20% para a repetibilidade e precisão intermediária, seguindo a orientação para validação de métodos analíticos na faixa entre 80 e 120% com valores de $\text{RSD} \leq 20\%$ (INMETRO, 2020), sendo assim, os resultados foram considerados satisfatórios.

5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DAS MICOTOXINAS E AGROTÓXICO POR PO

5.2.1 Degradação de OTA, AFB1 e 2,4-D por PO

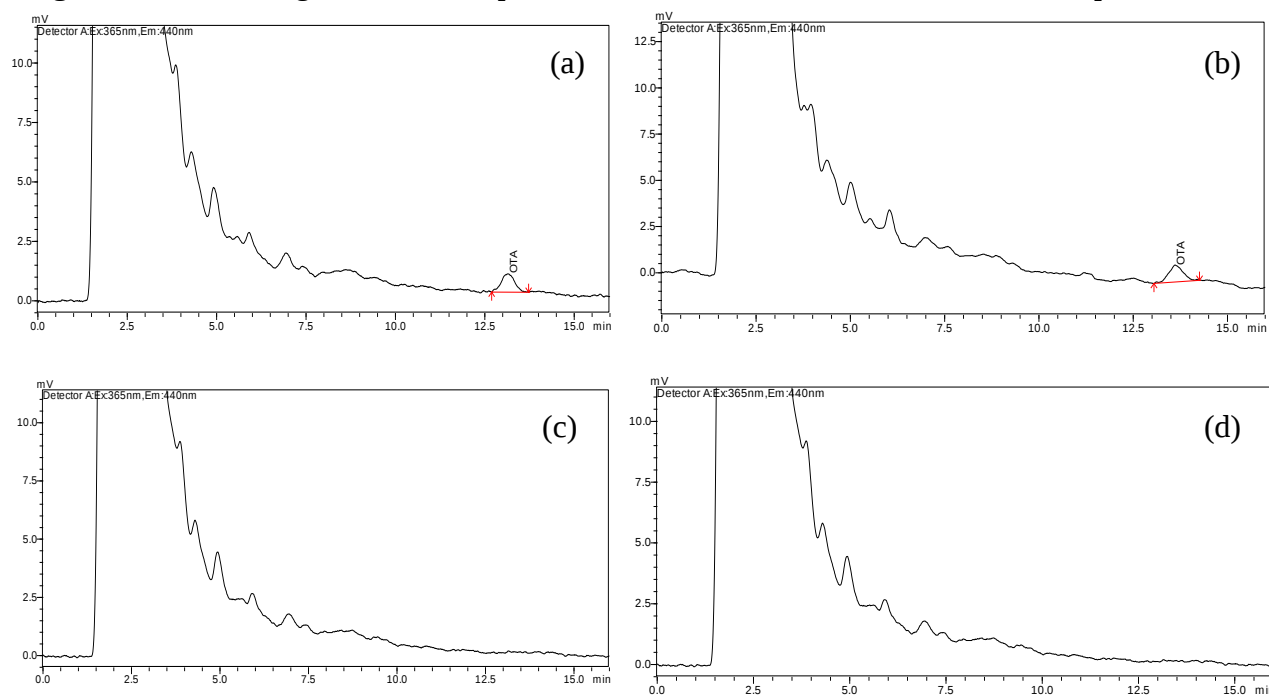
A aplicação da enzima PO como estratégia para mitigar micotoxinas e agrotóxicos torna-se favorável devido à sua especificidade e capacidade de desintoxicar esses contaminantes em diversas matrizes. Estudos prévios já demonstraram a eficácia dessa abordagem. Em algumas aplicações, as POs foram utilizadas com sucesso no tratamento de águas residuais contendo compostos fenólicos (AITKEN et al., 1994; DEVAIAH; SHETTY, 2009), e na síntese de produtos químicos aromáticos (CHEN et al., 2014; LEE et al., 2015) e entre outros tratamentos. Neste contexto, este estudo apresenta resultados inéditos na mitigação concomitante do herbicida 2,4-D e micotoxinas em água gerado no processamento de arroz parboilizado. Como mencionado no item 4.5.1, antes de iniciar os ensaios do planejamento experimental, foram realizados os ensaios dos controles para avaliar os perfis cromatográficos as Figuras 10, 11 e 12, apresentam as respostas dos controles avaliados em diferentes experimentos.

Figura 10 - Cromatogramas obtidos por LC-DAD do 2,4-D em diferentes controles experimentais.



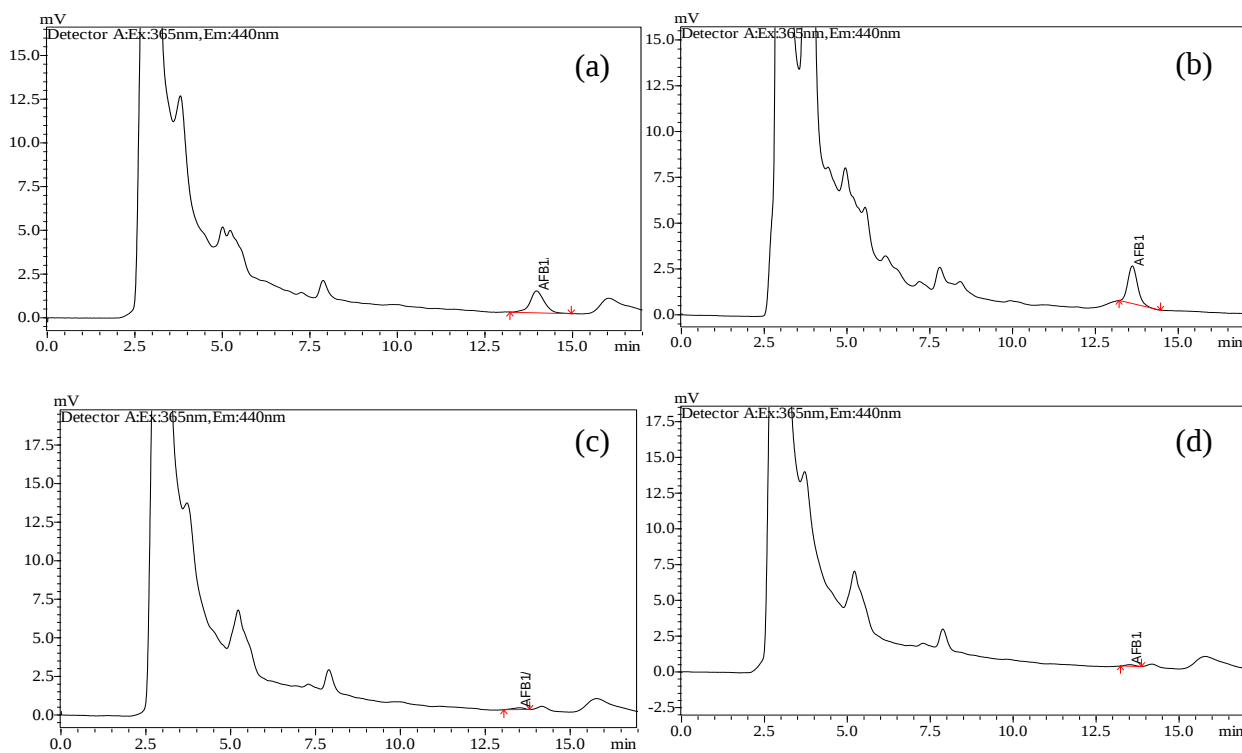
(a) Controle 1: sem adição de PO e adição do H_2O_2 ; (b) Controle 2: Sem adição PO e sem H_2O_2 ; (c) Controle 3: Ausência dos analitos, sem adição de PO; (d) Controle 4: Ausência dos analitos, com adição da PO.

Figura 11 - Cromatogramas obtidos por LC-FL da OTA em diferentes controles experimentais.



(a) Controle 1: sem adição de PO e adição do H_2O_2 ; (b) Controle 2: Sem adição PO e sem H_2O_2 ; (c) Controle 3: Ausência dos analitos, sem adição de PO; (d) Controle 4: Ausência dos analitos, com adição da PO.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos por LC-FL da AFB1 em diferentes controles experimentais.



(a) Controle 1: sem adição de PO e adição do H_2O_2 ; (b) Controle 2: Sem adição PO e sem H_2O_2 ; (c) Controle 3: Ausência dos analitos, sem adição de PO; (d) Controle 4: Ausência dos analitos, com adição da PO.

Observa-se que os perfis cromatográficos obtidos para todos os controles experimentais não apresentaram alterações significativas, indicando que os métodos de preparação e análise estão em ótimas condições para a avaliação das degradações de AFB1, OTA e 2,4-D estão garantindo resultados confiáveis para as análises dos ensaios de degradação.

Na Tabela 12 estão expressos os resultados obtidos pelo delineamento experimental fracionado 2^{7-3} , utilizado para verificar a influência das variáveis tempo de degradação (h), atividade enzimática (U mL^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), co-fatores (mmol L^{-1}), peróxido de hidrogênio (%) e agitação (rpm), buscando assim uma melhor condição para a degradação de 2,4-D, OTA e AFB1 a partir da PO extraída do farelo de arroz. É importante destacar que a atividade da PO no extrato enzimático obtido de farelo de arroz foi de $0,285 \text{ U mL}^{-1}$, enzima aplicada em todos os ensaios de degradação de micotoxinas e agrotóxico deste estudo. A Tabela 12 mostra que a degradação do 2,4-D varia entre 17,7 e 100%, em relevâncias as variáveis, que resultam em uma variação considerável nos diferentes ensaios, destaca-se o ensaio 8, onde as condições resultam em 91,8% de degradação. Este resultado foi decorrente da aplicação da maior temperatura (40°C), a presença de co-fator como Mg^{+2} em 5 mmol L^{-1} e a sem agitação (0 rpm), condições que contribuem mitigação do agrotóxico (2,4-D). Entretanto, no ensaio 10 pode-se verificar a influência da temperatura, onde na menor temperatura avaliada (10°C), maior concentração de peróxido (0,1%), presença dos co-fatores Ca^{+2} e Mg^{+2} e sem agitação (0 rpm) a degradação observada foi menor, somente 17,7%. Vale ressaltar, que o ensaio 2 também apresenta uma excelente resposta de mitigação de 2,4-D em 100%, porém, estatisticamente, essa condição do ensaio 2 não será utilizado, já que se trata de degradação simultânea e deve ser considerado os outros analitos presentes no reator.

Tabela 12 - Degradação (%) simultânea de OTA, AFB1 e 2,4-D por ação da PO avaliado por delineamento experimental 2⁷⁻³.

Ensaio	Atividade enzimática – U mL ⁻¹	Tempo – h	Temperatura – °C	Co-fator Ca – mM	Co-Fator Mg – mM	Peróxido de hidrogênio - %	Agitação - rpm	Degradação 2,4D	Degradação OTA	Degradação AFB1
	(X1)	(X2)	(X3)	(X4)	(X5)	(X6)	(X7)	(%)	(%)	(%)
1	-1(0,005)	-1(1)	-1(10)	-1(0)	-1(0)	-1(0,02)	-1(0)	27,9	91,4	28,5
2	1(0,01)	-1(1)	-1(10)	-1(0)	1(5)	-1(0,02)	1(100)	100	91,9	30,8
3	-1(0,005)	1(24)	-1(10)	-1(0)	1(5)	1(0,1)	-1(0)	26,5	90,8	41,5
4	1(0,01)	1(24)	-1(10)	-1(0)	-1(0)	1(0,1)	1(100)	14,8	90,9	45,6
5	-1(0,005)	-1(1)	1(40)	-1(0)	1(5)	1(0,1)	1(100)	25,7	92,4	54,7
6	1(0,01)	-1(1)	1(40)	-1(0)	-1(0)	1(0,1)	-1(0)	32,4	91,2	49,0
7	-1(0,005)	1(24)	1(40)	-1(0)	-1(0)	-1(0,02)	1(100)	43,7	91,0	38,4
8	1(0,01)	1(24)	1(40)	-1(0)	1(5)	-1(0,02)	-1(0)	91,8	91,2	47,2
9	-1(0,005)	-1(1)	-1(10)	1(5)	-1(0)	1(0,1)	1(100)	91,0	92,2	44,6
10	1(0,01)	-1(1)	-1(10)	1(5)	1(5)	1(0,1)	-1(0)	17,7	89,7	56,5
11	-1(0,005)	1(24)	-1(10)	1(5)	1(5)	-1(0,02)	1(100)	29,9	91,3	44,9
12	1(0,01)	1(24)	-1(10)	1(5)	-1(0)	-1(0,02)	-1(0)	22,7	91,0	33,2
13	-1(0,005)	-1(1)	1(40)	1(5)	1(5)	-1(0,02)	-1(0)	41,1	91,3	42,6
14	1(0,01)	-1(1)	1(40)	1(5)	-1(0)	-1(0,02)	1(100)	23,4	90,2	34,5
15	-1(0,005)	1(24)	1(40)	1(5)	-1(0)	1(0,1)	-1(0)	48,5	91,2	58,7
16	1(0,01)	1(24)	1(40)	1(5)	1(5)	1(0,1)	1(100)	41,5	91,5	67,4
17	0(0,008)	0(12,5)	0(25)	0(2,5)	0(2,5)	0(0,06)	0(50)	90,0	91,4	51,3
18	0(0,008)	0(12,5)	0(25)	0(2,5)	0(2,5)	0(0,06)	0(50)	90,0	91,5	54,6
19	0(0,008)	0(12,5)	0(25)	0(2,5)	0(2,5)	0(0,06)	0(50)	91,1	91,5	51,4
20	0(0,008)	0(12,5)	0(25)	0(2,5)	0(2,5)	0(0,06)	0(50)	91,1	91,5	50,4

A literatura descreve diversas estratégias envolvendo biodegradação do agrotóxico 2,4-D em água, como por exemplo, a utilização de bactérias (BARROS, 2022), fungos (OLIVEIRA, 2019) e algumas enzimas (ZDARTA; ZDARTA, 2022), mas nenhum estudo foi descrito na literatura sobre a aplicação da enzima PO extraída do farelo de arroz para a mitigação deste agrotóxico, principalmente em água de parboilização do arroz e ainda concomitante a micotoxinas.

O estudo de Zdarta e Zdarta (2022), propôs a produção e aplicação de membranas de celulose e enzima oxidoreductase, como lacase ($20,5 \text{ U mg}^{-1}$), tirosinase ($\geq 10.000 \text{ U mg}^{-1}$) e peroxidase ($\geq 200 \text{ U mg}^{-1}$) para tratamento de águas residuais para remoção de micropoluentes tais como 2,4-D, outras substâncias como 17α -etinilestradiol, tetraciclina, álcool ter-amílico (medicamento anestésico) e éster metílico de cetoprofeno. O resultado mostrou que a lacase removeu 56%, a tirosinase 40% e peroxidase 20% do herbicida 2,4-D antes da imobilização das enzimas, e após, a aplicação das enzimas lacase, tirosinase e peroxidase imobilizadas em membrana obtiveram a remoção de 61, 54 e 24%, respectivamente. Esses resultados indicam que diferentes abordagens, emprego de diferentes enzimas, podem afetar significativamente a eficiência da degradação e remoção do 2,4-D em água, e fortalece o presente estudo para a degradação do 2,4-D a partir de enzima PO extraída do arroz, como fonte de mitigação econômica, de fácil aplicação e alta eficiência.

Para a OTA, a degradação variou de 89,7 a 92,4% (Tabela 12), sendo o ensaio 5 o que apresentou maior eficiência de degradação, degradando 92,6% do composto. A combinação dos fatores como temperatura elevada (40°C), os co-fatores Mg^{+2} e Ca^{+2} em 5 mmol L^{-1} , peróxido de hidrogênio (0,1%) e agitação (100 rpm) favorece a degradação da OTA. Em outros estudos, Nora (2015), utilizou a peroxidase (PO) extraída do farelo de arroz para degradação da OTA, onde conseguiu uma redução de 41% em 24 h. Esse resultado foi obtido com uma concentração enzimática no meio de $0,063 \text{ U mL}^{-1}$, maior concentração no meio comparado a este estudo que obteve maior degradação com uma menor concentração enzimática no meio ($0,01 \text{ U mL}^{-1}$). Este estudo destaca a eficácia da PO do farelo de arroz na degradação da OTA em sistemas aquosos. Além disto, é possível destacar que o presente estudo demonstrou um resultado positivo de degradação acima de 90% para OTA em todos os ensaios.

No entanto, a degradação para AFB1 observada (Tabela 12) foi menor, os níveis de degradação variaram entre 28,5 a 67,4%. A melhor resposta de degradação para AFB1 foi obtida no ensaio 16, degradação máxima observada de 67,4%. Esse resultado é considerado eficaz para AFB1, as variáveis experimentais estavam todas ajustadas para os maiores níveis estudados, sugerindo que a combinação desses fatores pode ter contribuído para a degradação da AFB1.

No estudo de Sibaja (2019), degradação da AFB1 em solução modelo por enzima comercial (PO) foi avaliado, obtendo degradação máxima de 69%, os maiores percentuais de mitigação de AFB1 pela atividade de PO em solução modelo foi obtida aplicando como condição a maior concentração de tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ em pH 7,0 ou 8, aplicando 0,015 U mL⁻¹ de atividade da PO, mantidos na temperatura de 30 ou 40 °C e com tempo de incubação de 8 h.

A partir da análise estatística, os efeitos observados de cada variável estão apresentados na Tabela 13. Para as variáveis dependentes de degradação (%) de 2,4-D e OTA não foi observado nenhum efeito significativo. A eficácia da enzima e as condições específicas de aplicação podem ser atribuídas para tal resultado, não sendo observado a variação da degradação nas condições estudadas. No entanto, é crucial notar que estudos anteriores conduzidos por Sibaja (2019), Garcia (2020) e Feltrin et al. (2017) relataram efeitos significativos quando aplicado faixas semelhantes e emprego da enzima PO, sugerindo a diversidade de resultados quando empregado diferentes contextos experimentais. Em contrapartida, para a degradação de AFB1 foram observados efeitos significativos e positivos relacionado a temperatura, co-fator Ca e Mg, e peróxido de hidrogênio. O efeito positivo descreve que quando empregado o maior nível de estudo das variáveis significativas, temperatura (40°C), cofatores Mg⁺² e Ca⁺² (5 mmol L⁻¹) e o peróxido de hidrogênio (0,1%), maior degradação dos contaminantes foi verificado. Desta forma, o aumento da temperatura de 10 a 40 °C resultou em um aumento de 8,36% a média de degradação, para os cofatores Ca⁺² e Mg⁺² de 0 a 5 mmol L⁻¹ o aumento observado foi de 5,83% e 6,63%, respectivamente, para o peróxido de hidrogênio de 0,02 a 0,1% foi de 14,73%, tendo como média de degradação de 46,29% para AFB1 (Tabela 13).

Tabela 13 - Efeitos sobre a degradação simultânea de 2,4-D, OTA e AFB1 no delineamento fracionado 2⁷⁻³ pela aplicação da enzima Peroxidase (PO).

Analito	Fatores	Efeito	EP	t(12)	p	Coef.	EPC
2,4-D	Média/Interc	52,04	8,53175	6,099572	0,000053	52,04	8,531
	Atividade enzimática	1,25	19,07757	0,065522	0,948837	0,625	9,538
	Tempo	-4,975	19,07757	-0,26078	0,798685	-2,4875	9,538
	Temperatura	2,2	19,07757	0,115319	0,9101	1,1	9,538
	Co-fator Ca	-5,875	19,07757	-0,30795	0,763398	-2,9375	9,538
	Co-fator Mg	8,725	19,07757	0,457343	0,655594	4,3625	9,538
	Peróxido de hidrogênio	-10,3	19,07757	-0,5399	0,599142	-5,15	9,538
	Agitação	7,675	19,07757	0,402305	0,694533	3,8375	9,538
OTA	Média/Interc.	91,255	0,136809	667,0255	0	91,255	0,136
	Atividade enzimática	-0,5	0,305914	-1,6344	0,128108	-0,25	0,152
	Tempo	-0,175	0,305914	-0,5721	0,577843	-0,0875	0,152
	Temperatura	0,1	0,305914	0,3269	0,749383	0,05	0,152
	Co-fator Ca	-0,3	0,305914	-0,9807	0,346115	-0,15	0,152
	Co-fator Mg	0,125	0,305914	0,4086	0,690022	0,0625	0,152
	Peróxido de hidrogênio	0,075	0,305914	0,2452	0,81047	0,0375	0,152
	Agitação	0,45	0,305914	1,471	0,167022	0,225	0,152
AFB1	Média/Interc.	46,29	1,194822	38,74219	0	46,29	1,194
	Atividade enzimática	1,2875	2,671702	0,4819	0,638545	0,64375	1,335
	Tempo	4,4625	2,671702	1,67028	0,120719	2,23125	1,335
	Temperatura	8,3625	2,671702	3,13003	0,008691	4,18125	1,335
	Co-fator Ca	5,8375	2,671702	2,18494	0,049455	2,91875	1,335
	Co-fator Mg	6,6375	2,671702	2,48437	0,028727	3,31875	1,335
	Peróxido de hidrogênio	14,7375	2,671702	5,51615	0,000133	7,36875	1,335
	Agitação	0,4625	2,671702	0,17311	0,86545	0,23125	1,335

EP – Erro Padrão; t(12) – t – Student; p – valor p; Coef. – Coeficiente; EPC- Erro Padrão do Coeficiente; Atividade enzimática: de 0,005 a 0,01U mL⁻¹; Tempo: de 1 a 10 h; Temperatura: de 10 a 40 °C; cofatores: de 0 a 5 mmol L⁻¹; Peróxido de hidrogênio: de 0,02 a 0,1%; Agitação: de 0 a 100 rpm.

Comparando as variáveis significativas da AFB1 com outros estudos, como de Garcia (2020), o efeito da concentração de peróxido (0,1%) na solução modelo para degradação de OTA e ZEN foram significativas. Este fato é ressaltado por Wu et al. (1994) que relata que em um reator com baixas concentrações de H_2O_2 , a taxa de reação é limitada e, ao considerar os fatores de produção e recursos econômicos, a adição da concentração mínima admissível deste co-substrato deve ser determinada com o objetivo de obter a maior taxa de reação. Garcia (2020) também avaliou os efeitos dos íons metálicos, K^+ e Na^+ (1 mmol L^{-1}) e Mg^{2+} (5 mmol L^{-1}) que demonstraram aumentar significativamente a atividade da PO na degradação de OTA em 66; 38; 58 e 39%, respectivamente, enquanto o Ca^{2+} (1 e 5 mmol L^{-1}) inibiu a degradação em 100% quando comparado ao controle (sem adição do íon metálico). Por outro lado, observou que a adição de Ca^{2+} (5 mmol L^{-1}), Fe^{2+} (5 mmol L^{-1}), e Na^+ e Mg^{2+} em 5 mmol L^{-1} resultou na redução da atividade da PO na degradação de ZEA. Na literatura, existem vários estudos que descrevem a adição de íons metálicos para o aumento da atividade ou inibição de PO obtida de diferentes fontes para oxidação de diversos substratos. O Ca^{2+} nas concentrações de 5 mmol L^{-1} é reportado por inibir a atividade da PO de *Armoracia rusticana* na oxidação do guaiacol, em 64% (MOHAMED et al., 2011). Verificou-se também que a adição de Mg^{2+} e Ca^{2+} em uma concentração de 5 mmol L^{-1} induziu o aumento da atividade do PO purificado do feijão preto (*Vigna mungo*) na oxidação de o-dianisidina em 4 e 10%, respectivamente.

Cabe ressaltar também que a temperatura exerce uma influência significativa nas reações catalisadas por enzimas devido à sua capacidade de alterar a energia de ativação necessária para que a reação ocorra. O aumento da temperatura pode reduzir a energia de ativação por meio do acréscimo do nível de energia livre (GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015). Com isso temperaturas que se encontram abaixo ou acima do ótimo de ação enzimática acabam por desnaturar a enzima ou diminuir a velocidade de reação.

Para Garcia (2020), os maiores percentuais de degradação de OTA e ZEN não diferem estatisticamente quando aplicadas temperaturas entre 20 e 40 °C. Em resumo, a variação de degradação dos contaminantes por ação da enzima PO podem ser atribuídas às diferenças nos sistemas enzimáticos estudados, nas condições experimentais e nos substratos específicos de cada reação.

Dados evidenciam a complexidade das interações entre temperatura, presença de cofatores e atividade enzimática, destacando a importância de considerar esses fatores de forma específica para cada sistema enzimático e reação bioquímica estudada. É importante considerar os

efeitos significativos para AFB1, como temperatura, para o ensaio enzimático foi extremamente importante, pois o aumento gradual da temperatura pode aumentar a atividade enzimática até um certo valor no qual a desnaturação pode ocorrer e, também, o sítio catalítico é modificado e pode alterar as interações na formação do complexo enzima-substrato (DANIEL; DANSON, 2013). Os co-fatores, visto que o cofator ocasiona o aumento da atividade enzimática (MAHMOUDI et al., 2003). É possível sugerir que algumas propriedades químicas dos íons possam auxiliar ou prejudicar a ligação enzima-substrato, como por exemplo, o íon ser monovalente ou divalente, tamanho do raio atômico, densidade e potencial de ionização (GARCIA, 2020). Em relação ao peróxido de hidrogênio sendo co-substrato da PO, ele participa do ciclo catalítico através da oxidação da enzima nativa para formar uma molécula intermediária (composto I) que subsequentemente oxida um substrato fenólico e o converte em um radical livre (composto II) e, com isso a enzima retorna ao seu estado nativo ou pode ser convertida em formas inativas através da reação do composto II com peróxido de hidrogênio para formar o composto III (HOSHINO; NAKAJIMA; YAMAZAKI, 1987).

Os dados da AFB1 foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) (Tabela 14) por apresentar variáveis com efeitos significativos. Os resultados da ANOVA indicaram que os dados obtidos são estatisticamente significativos e preditivos, com valor p de 0,001158898. A predição foi observada pelo $F_{\text{calculado}}$, apresentando valor de 7,74615 que é maior que o valor de F_{tabelado} 2,913358179. Isso sugere que o modelo de regressão, que inclui todas as variáveis independentes, é capaz de explicar uma quantidade significativa da variação na variável dependente da degradação de AFB1.

Tabela 14 - ANOVA para valor de degradação da AFB1.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	p
Regressão	1548,1744	7	221,1678	7,74615	2,913358179	0,001158898
Resíduo	342,6236	12	28,55197			
Total	1890,7980	19				

SQ – Soma dos quadrados; GL – Grau de liberdade; MQ – Média dos quadrados; p: valor p com nível de significância de ($p < 0,05$)

O valor do modelo de regressão (soma dos quadrados da regressão) é consideravelmente maior do que a variação não explicada (soma dos quadrados do resíduo), o que indica que o modelo é capaz de explicar a maior parte da variação observada na variável dependente. Portanto, sugerem que o modelo de regressão é estatisticamente significativo e fornece uma boa descrição do relacionamento entre as variáveis independentes e a variável dependente. Isso pode ser útil para

entender e prever a degradação de AFB1 em condições específicas experimentais. A predição de degradação de AFB1 é apresentada na Equação 9. Ao observar o valor do erro relativo, os valores foram menores aos comparado aos valores reais. Isso significa que a variação observada entre os valores experimentais e os preditos, pode-se confirmar que isto é esperado por ter sido empregado um delineamento para triagem de variáveis significativas, e não um delineamento completo para emprego de modelagem matemática. A equação significativa e preditiva neste caso, serve como orientação para a continuação do estudo visando gerar um modelo matemático preditivo, com ótimos ajustes quando empregado delineamento, delineamento completo tendo como base estas condições observadas e significativas, sendo assim, para AFB1 o modelo matemático foi significativo, mas não preditivos, impossibilitando o uso da Equação 9.

$$\text{Degradação de AFB1(\%)} = 48,89 + 1,28(X1) + 4,46(X2) + 8,36(X3) + 5,84(X4) + 6,64(X5) + 14,73(X6) + 0,46(X7) \quad \text{Equação 9}$$

Para a confirmação de degradação dos analitos, foi realizado um experimento em triplicada para degradação do 2,4-D, OTA e AFB1, onde as melhores condições dos experimentos do delineamento fracionado 2^{7-3} foram selecionadas. As condições que não foram significativas nas reações de degradação para o 2,4-D, OTA e AFB1 como atividade da PO, foi mantida na sua menor concentração ($0,005 \text{ U mL}^{-1}$), tempo de reação enzimática, como o menor tempo (1 h), e sem agitação, foram selecionadas para o experimento visando o menor custo e redução de tempo de ensaio. Na Tabela 15 estão expressos os resultados da confirmação de degradação dos contaminantes.

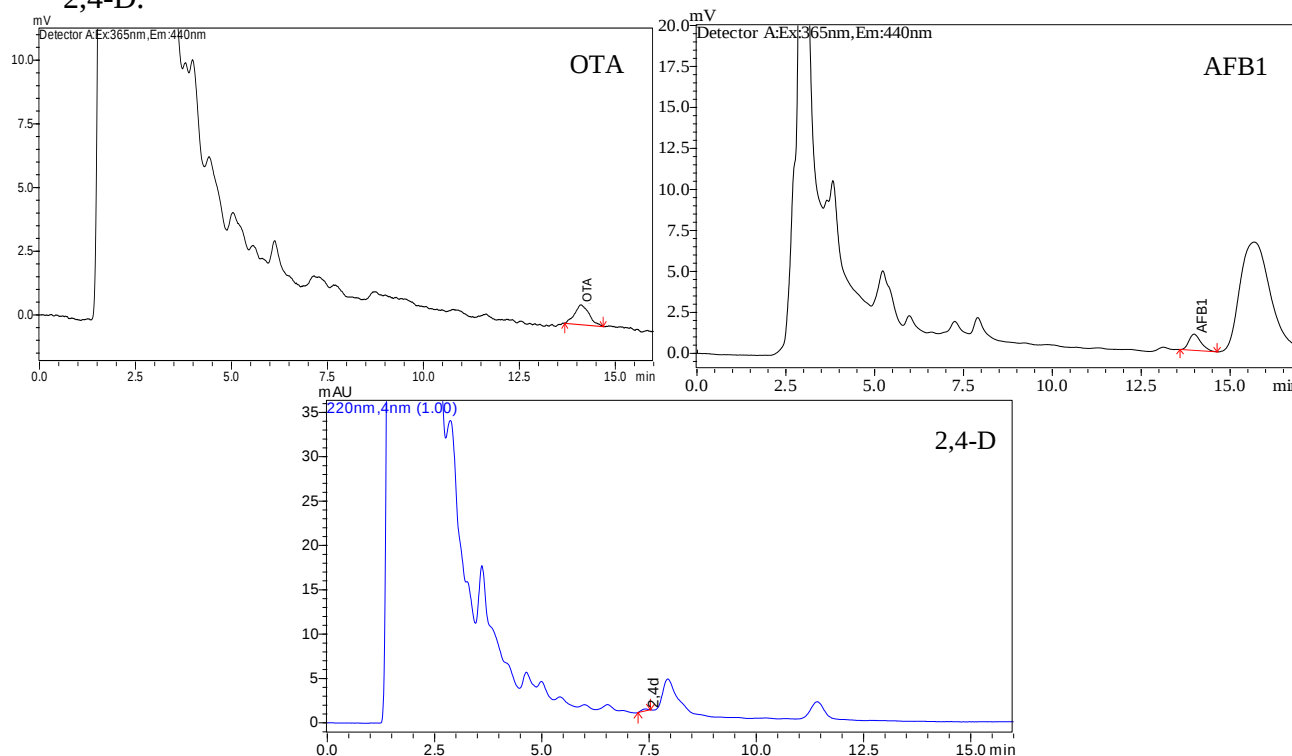
Tabela 15 - Validação das melhores condições de ensaio para AFB1, OTA e 2,4-D.

Analito	PO (U mL^{-1})	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Ca ⁺² (mmol L^{-1})	Mg ⁺² (mmol L^{-1})	H ₂ O ₂ (%)	Agitação (rpm)	Degradação (%)
2,4-D	-1(0,005)	-1(1)	1(40)	1(5)	1(5)	1(0,1)	-1(0)	90,7
OTA	-1(0,005)	-1(1)	1(40)	1(5)	1(5)	1(0,1)	-1(0)	91,7
AFB1	-1(0,005)	-1(1)	1(40)	1(5)	1(5)	1(0,1)	-1(0)	58,8

É notório a resposta da validação das melhores condições confirma a eficiência da degradação dos contaminantes concomitantemente. Ao observar os resultados dos ensaios descritos na Tabela 12, o 2,4-D no ensaio 8 foi de 91,2% de degradação, na validação das melhores condições, o resultado observado foi de 90,7% confirmando a degradação do 2,4-D. Para OTA, o resultado observado foi de 91,7% de degradação, destacando que as variáveis estudadas não apresentaram efeito significativo. Para AFB1, o resultado de degradação observado na validação

foi de 58,8%, uma degradação abaixo de 67,4 acordo com a degradação do ensaio 16 na Tabela 12. A Figura 13 apresenta os cromatogramas de cada analito das melhores condições.

Figura 13 - Perfis cromatográficos de degradação das melhores condições para OTA, AFB1 e 2,4-D.



Neste sentido, o estudo apresenta as condições experimentais que estabelece uma resposta positiva na degradação do 2,4-D, OTA e AFB1. Essa degradação pode ser explicada, especialmente quando relaciona a natureza química específica de cada composto a sua suscetibilidade à degradação sob condições estabelecidas. Como já citado anteriormente a enzima peroxidase catalisa reações de oxidação dessas substâncias em componentes menos tóxicos ou até mesmo inofensivos (ELY; KEMPKA; SKORONSKI, 2016; MEDINA et al., 2017).

Portanto, comparando os resultados em termo matemáticos sobre os níveis de significâncias de algumas variáveis, com outros estudos na literatura, pode-se sugerir expandir os intervalos de concentração ou tempo, avaliar de forma mais ampla as concentrações de compostos, tempos de exposição pode fornecer informações mais detalhadas sobre a resposta do sistema às diferentes condições. Explorar outras variáveis, como verificado por Garcia (2020) e Feltrin et al. (2017) e Sibaja et al. (2019) como força iônica, pH e atividade enzimática entre outras variáveis relevantes que possam influenciar o resultado do experimento, junto com o delineamento experimental completo para predição exata dos dados possibilitará ampliar a aplicação da PO como um método de biorremediação destes contaminantes.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo confirma que o método SILLME é uma excelente técnica para o preparo de amostra na qual possibilitou a extração dos analitos em estudo de modo rápido, fácil e econômico. A validação dos métodos foi obtida de forma satisfatória. As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração estudadas. Os limites de detecção e de quantificação foram adequados para análise de agrotóxico e para as micotoxinas em água. O método apresentou recuperações entre 80 e 120%, com valores de precisão menores que 20%.

A aplicação da enzima PO como estratégia para mitigar micotoxinas e agrotóxicos torna-se favorável. O estudo apresentou resultados inéditos na mitigação concomitante do herbicida 2,4-D e micotoxinas em água obtida do processamento de arroz parboilizado. A degradação de 2,4-D foi entre 17,7 e 100%, OTA de 89,7 a 91,6%, para AFB1 entre 28,5 a 67,4%. As variáveis significativas na degradação destes contaminantes foram temperatura, cofatores Ca^{2+} e Mg^{2+} e peróxido de hidrogênio. As melhores condições de degradação do agrotóxico e das micotoxinas estudadas foram quando empregado no reator a atividade enzimática da PO de $0,005 \text{ U mL}^{-1}$, peróxido de hidrogênio na concentração de 0,1%), os cofatores enzimáticos Ca^{2+} e Mg^{2+} na concentração de 5 mmol L^{-1} , tempo de reação enzimática de 1 h, temperatura de 40°C e sem agitação orbital, obtendo degradação de 2,4-D, OTA e AFB1 de 90,7%, 91,7% e 58,8%, respectivamente.

Como melhoria para valores que deram efeitos não significativos, sugere-se expandir os intervalos de concentração e tempo de exposição, além de explorar outras variáveis como força iônica, pH e atividade enzimática, conforme discutido em estudos anteriores. Um delineamento experimental mais completo permitirá uma melhor predição dos dados e ampliará a aplicação da PO como método de biorremediação desses contaminantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.; HUMAYUN, M.; PI, W.; YUAN, Y.; WANG, M.; KHAN, A.; YUE, P.; SHUA, L.; ZHENG, Z.; FUA, Q.; LUO, W. Fabrication of BiFeO₃-g-C₃N₄-WO₃ Z-scheme heterojunction as highly efficient visible-light photocatalyst for water reduction and 2,4-dichlorophenol degradation: Insight mechanism. **Diário de Materiais Perigosos**, v. 397, p.122708, 2020.

ALSALABI, F. A.; HASSAN, Z. U.; AL-THANI, R. F.; JAOUA, S. Molecular identification and biocontrol of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in animal feed marketed in the state of Qatar. **Heliyon**, v. 9, n. 1, 2023.

ABRUNHOSA L.; SANTOS L.; VENÂNCIO A. Degradação da ocratoxina A por proteases e por uma enzima bruta de *Aspergillus niger*. **Biociência Alimentar**, v. 20, p. 231-242, 2006.

ADEL, A.; AKEFIWAD, B. Pesticide Use Related to Pesticide Poisoning Factors and the Impact of Pesticide Exposure on Health. **Journal Wetenskap Health**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2020.

ADIBELLI, D.; ÖZKAN, İ.; ÖZKAN, H. Ö. Retrospective analysis of pesticide poisoning in rural area. **Eastern Journal of Medicine**, v. 24, n. 3, p. 289-298, 2019.

AITKEN, M. D.; MASSEY, I. J.; CHEN, T.; HECK, P. E. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research*, v. 28, n. 9, p. 1879-1889, 1994.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 294, DE 29 DE JULHO DE 2019. 2019. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/RDC_294_2019_.pdf/c5e8ab56-c13d-4330-a7a4-153bed4c5cda> acesso em: 10/08/2024.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PARECER TÉCNICO DE REAVALIAÇÃO Nº 07, de 2015/GGTOX/ANVISA. 2015. Disponível em: <<https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2719308/Parecer+T%C3%A9cnico+de+Reavalia%C3%A7%C3%A3o+n%C2%BA+7-2015+-+GGTOX.pdf/055bdca1-a19d-4ee0-a50c-975e8ef43577?version=1.0>> acesso em: 10/08/2024.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução do Gerente Geral de Toxicologia da Anvisa - RE nº 2.080, de 31 de julho de 2019. 2019. Disponível em:<

https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-58-de-27-de-agosto-de-2019-213474289?mc_cid=37298eec51&mc_eid=38ddf01f7b> acesso em: 10/08/2024.

ARGENTINA. Ley 18.284 de 1994. Código Alimentario Argentino Normas oficiales para la calidad del agua Argentina. Buenos Aires: 1994.

ARSECULERATNE, S. N.; DE SILVA, L. M.; BANDUNATHA, C. H. S. R.; TENNEKOON, G. E.; WIJESUNDERA, S.; BALASUBRAMANIAM, K. The use of tadpoles of *Bufo melanostictus* (Schneider), *Rhacophorus leucomystax maculatus* (Gray) and *Uperodon* sp. in the bioassay of aflatoxins. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 50, n. 3, p. 295, 1969.

AUSTRALIA. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy-Updated March 2021. Canberra, p. 1170, 2011.

AWAD, W. A. GHAREEB, K.; BÖHM, J. Occurrence, health risks and methods of analysis for aflatoxins and ochratoxin A. **J Vet Anim Sci**, v. 2, p. 1-10, 2012.

AZIZOLLAHI, N.; FATEHIZADEH, A.; POURZAMANI, H.; TAHERI, E.; AMINABHAVI, T. M. Degradation of 2,4-diclorophenol via coupling zero valent iron and hydrodynamic cavitation for sulfite activation: A turbulence modeling. **Journal of Environmental Management**, v. 332, p. 117295, 2023.

BARRIGOSSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Agrotóxicos no cultivo do arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo. 2004.

BADEA, A.; TUCKER, J. R.; SABRA, A.; NETTICADAN, T.; BLACKWELL, B.; YU, L.; KODIKARA, C.; WIJEKOON, C. Endogenic Phenolic Compounds of Barley as Potential Biomarkers Related to Grain Mycotoxin Production and Cultivar Selection. **Biology**, v.12, n. 10, p. 1306, 2023.

BARROS, G. V. L. Estudo da biodegradação anaeróbia do herbicida 2, 4-D sob diferentes condições de oxirredução. 2022.

BARILLI, N. Z.; KEMPKA, A. P. Glifosato: O Tratamento Enzimático Como Alternativa De Remoção Em Águas Superficiais. Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UDESC OESTE (SEPE), Chapecó-SC, novembro, 2020.

BHATT, P.; BHATT, K.; HUANG, Y.; XIAO, Y.; WU, S.; LEI, Q.; ZHONG, J.; ZHUA, X.; CHEN, S. Bioremediation potential of laccase for catalysis of glyphosate, isoproturon, lignin,

and parathion: Molecular docking, dynamics, and simulation. **Diário de Materiais Perigosos**, v. 443, p. 130319, 2023.

BASTOS, R. G.; SEVERO, M.; VOLPATO, G.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I. Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente e Água**, v.5, n.3, 2010.

BRASIL. Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; DE FIGUEIREDO, M. C., KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; DE JESUS ANDRADE, P. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.

BHATT, P.; BHATT, K.; HUANG, Y.; XIAO, Y.; WU, S.; LEI, Q.; ZHONG, J.; ZHUA, X.; CHEN, S. Bioremediation potential of laccase for catalysis of glyphosate, isoproturon, lignin, and parathion: Molecular docking, dynamics, and simulation. **Diário de Materiais Perigosos**, v. 443, p. 130319, 2023.

CHEN, Z.; LI, H.; PENG, A.; GAO, Y. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase in water containing an organic cosolvent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 10696–10705, 2014.

BRASIL: ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de agrotóxicos. 2017.

BRASIL. Ministério Público de saúde. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. Brasília – DF, 2021.

BUCHELI, T. D.; WETTSTEIN, F. E.; HARTMANN, N.; ERBS, M.; VOGELGSANG, S.; FORRER, H. R.; SCHWARZENBACH, R. P. Fusarium mycotoxins: overlooked aquatic micropollutants? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1029-1034, 2008.

- BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 140-146, 2007.
- CALDAS, S. S.; DEMOLINER, A.; PRIMEL, E. G. Validation of a method using solid phase extraction and liquid chromatography for the determination of pesticide residues in groundwaters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 125-132, 2009.
- CANADA. PESTICIDES, OF PRIORITY. PRESENCE AND LEVELS OF PRIORITY PESTICIDES IN SELECTED CANADIAN AQUATIC ECOSYSTEMS. 2011. Disponível em: <<https://www.tonu.org/tonu/MyFiles/01/MF069-PriorityPesticidesInCanadianAquaticEcosystems%20FINAL-s.pdf>> acesso em 26/03/2024.
- CAMPOS, S. X. C.; VIEIRA, E. M. Estudo da degradação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por meio da radiação gama do cobalto-60 em solução aquosa contendo ácido húmico. **Química Nova**. 2002, v. 25, n. 4, p. 529-532.
- CARMAGO, C. M. Efeitos da radiação UV-C na qualidade nutricional e tecnológica de grãos de milho inoculados com fungos e armazenados sob diferentes umidades. Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Maurício de Oliveira, orientador; Nathan Levien Vanier, Moacir Cardoso Elias, coorientadores. — Pelotas, 2017.
- CARVAJAL, M. Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 16, n. 2, p. 109-120, 2013.
- CARNEIRO, Zenilda de Fátima. Resistência de variedades de milho crioulo ao gorgulho-do-milho *sitophilus zeamais* (coleoptera: curculionidae). 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Pato Branco, 2019.
- CATALDO, F. Ozone decomposition of Patulin—a micotoxin and food contaminant. **Ozone: Science and Engineering**, v. 30, n. 3, p. 197-201, 2008.
- CARDENAS, M. A. R.; ALI, I.; LAI, F. Y.; DAWES, L.; THIER, R.; RAJAPAKSE, J. Removal of micropollutants through a biological wastewater treatment plant in a subtropical climate, Queensland-Australia. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 14, p. 1-10, 2016.

CARVALHO, N. L.; BESTER, A. U.; MELO, M. O. B.; DE, MELLO, M. B.; DE, PEREIRA, É. A. LUCCHESI, O. A. Os efeitos das moléculas de 2,4D, acefato e tebuconazol sobre o meio ambiente e organismos não alvos. **Revista Monografias Ambientais**, v.1, n. 2, 2020.

CEJUDO, E.; LEAL-BAUTISTA, R. M.; SMITH, D. N.; GRIMALDO-HERNÁNDEZ, C. D. Detección de 2, 4-D en agua subterránea en el noreste de la Península de Yucatán. **Ecosistemas y recursos agropecuarios**, v. 8, n. 1, 2021.

CHEN, Y.; YAJIE, Y.; YU, W.; YE, P.; JINMEI, N.; GUANYUE, G.; JINFANG, Z.; Development of an Escherichia Coli-based Electrochemical Biosensor for Mycotoxin Toxicity Detection. **Bioelectrochemistry**, v. 133, p. 107453, 2020.

CHEN, A.; ZENG, G.; CHEN, G.; ZHANG, C.; YAN, M.; SHANG, C.; HU, X.; LU, L.; CHEN, M.; GUO, Z.; ZUO, Y. Hydrogen sulfide alleviates 2,4-dichlorophenol toxicity and promotes its degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**, v.109, p. 208-212, 2014.

CHEN, M.; TAO H.; LI, X.; ZHANG, C.; LI, Q.; GAO, X. Advances in degradation and detoxification of pesticides with engineered nanomaterials: A review. **Science of the Total Environment**, v.759, p.143606, 2021.

CHEN, Z.; LI, H.; PENG, A.; GAO, Y. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase in water containing an organic cosolvent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 10696-10705, 2014.

CHEN, X.; ZHOU, Q.; LIU, F.; PENG, Q.; TENG, P. Removal of nine pesticide residues from water and soil by biosorption coupled with degradation on biosorbent immobilized laccase. **Chemosphere**, v. 233, p. 49-56, 2019.

CHIONG, T.; LAU, S.; KHOR, E.; Danquah, M. Peroxidase extraction from jicama skin peels for phenol removal. **International Conference on Chemical Engineering and Bioprocess Engineering**, v. 36, p. 1–8, 2016.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M. RIBEIRO, B. D. Tecnologia enzimática. **Fundação Carlos chagas filho de amparo à pesquisa do estado do rio de janeiro - FAPERJ**. Editora: EPUB, Petrópolis, 2008.

CONCEIÇÃO, A. A.; MENDES, T. D.; MENDONÇA, S.; QUIRINO, B. F.; ALMEIDA, E. G.; SIQUEIRA, F. G. Nutraceutical Enrichment of Animal Feed by Filamentous Fungi Fermentation. *Fermentation*, v. 8, n. 8, p. 402, 2022.

CORADI, P. C.; MILANE, L. V.; ANDRADE, M. G. O.; CAMILO, L. J.; SOUZA, A. H. S. Secagem de grãos de milho do cerrado em um secador comercial de fluxos mistos. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 14-26, 2016.

CORDERO-MENDOZA, D. D.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, M. D. C. A.; MUÑOZ-JUÁREZ, S.; IZQUIERDO-VEGA, A. J.; VEGA-GAITAN, I.; LEDEZMA, J. C. R. Exposure to Mycotoxins and Its Importance in Public Health. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, v. 15, n. 10, p. 21-28, 2023.

CURI, L. M.; PELTZER, P. M.; SANDOVAL, M. T.; LAJMANOVICH, R. C. Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, p. 1-15, 2019.

DAI, Y.; HUANG, K.; ZHANG, B.; ZHU, L.; XU, W. Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 683-689, 2017.

DHARMAPUTRA, O. S.; RETNOWATI, I; NURFADILA, N. Potency of yeast as a biocontrol agent of ochratoxin a-producing fungi and its effect on arabica coffee taste. **BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2023.

D'AVILA, A. A. F.; CHAIS, C.; RADAELLI, A. A. P.; GANZER, P. P.; OLEA, P. M.; DORION, E. C. H. Agrotóxicos ou defensivos agrícolas: um estudo bibliométrico na biblioteca digital de teses e dissertações. In: **II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INOVAÇÃO EM CADEIAS PRODUTIVAS DO AGRONEGÓCIO**. 2016.

DANIEL, R. M.; DANSON, M. J. Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS Letters*, v. 587, n. 17, p. 2738-2743, 2013.

DORS, G. C.; DE ALMEIDA PINTO, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. Migration of mycotoxins into rice starchy endosperm during the parboiling process. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 433-437, 2009.

LA CECILIA, D; MAGGI, F. Analysis of glyphosate degradation in a soil microcosm. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 201-207, 2018.

- LANE, B.; WOLOSHUK, C. Impacto do ambiente de armazenamento na eficácia de sacos herméticos de armazenamento. **Journal of stored products research**, v. 72, p. 83-89, 2017.
- DAS, C.; MISHRA, H. N. In vitro degradation of aflatoxin B1 by horse radish peroxidase. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 309-313, 2000.
- DEHGHANI, M.; NASSERI, S.; KARAMIMANESH, M. Remoção do herbicida ácido 2,4-diclorofenolixacético (2,4-D) na fase aquosa utilizando carvão ativado granular modificado. **Revista de Ciência e Engenharia de Saúde Ambiental**, v. 1-10, 2014.
- DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, n. 2-3, p. 119-126, 2009.
- DINIZ, S.P.S.S. micotoxinas. Ed. Liv. Rural. Campinas, p.181, 2002.
- DOYLE, M. P.; MARTH, E. H. Degradação de aflatoxina pela lactoperoxidase. **Z Lebensm Unters Forch**, v. 166, p. 271–273, 1978.
- DU, D.; DONG, G.; WU, Y.; WANG, J.; GAO, M.; WANG, X.; LI, Y. Salting-out induced liquid–liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of fluoroquinolones in water, food and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Analytical methods**, v. 6, n. 17, p. 6973-6980, 2014.
- DUDZIAK, M. Removal of Zearalenone from Water by means of Ozonation and Integrated System of Ozonation/Nanofiltration. **Ecological Chemistry and Engineering A**, v. 19 n. 7, p. 779-785, 2012.
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A Review. **Applied Catalysis B: Environmental**, 2000.
- EDDLESTON, M. Poisoning by pesticides. **Medicine**, v. 48, n. 3, p. 214-217, 2020.
- ELY, C.; KEMPKA, P. A.; SKORONSKIA, E. Aplicação de Peroxidasas no Tratamento de Efluentes. **Revista Virtual de Química**, V. 8, n. 6, ISSN 1984-6835, 2016.

ELIZABETH CALDERÓN-VILLAGÓMEZ, H.; THANGARASU, P.; CARVAJAL-MORENO, M.; BURILLO, G.; DENISE PEÑA-BETANCOURT, S. Photo-Degradation of Fuminisins B 1 and B 2, Toxins of the Fungus *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg From Corn (*Zea mays* L.), by Ultraviolet Radiation With Titanium Dioxide. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 23, n. 3, 2005.

EMBRAPA. Importância econômica e social. 2023. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/socioeconomia/importancia-economica-e-social>> acesso em 02/03/2024.

EMBRAPA. Uso de Agrotóxico. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/arroz/pre-producao/uso-de-agrotoxicos>> Disponível em: 02/03/2024.

EMÍDIO, E. S. Micotoxinas estrogênicas em águas superficiais da microbacia hidrográfica do Córrego Rico (SP): desenvolvimento de método analítico verde, ocorrência e persistência ambiental. 2016.

EMÍDIO, E. S.; DA SILVA, C. P.; DE MARCHI, M. R. R. Determination of estrogenic mycotoxins in environmental water samples by low-toxicity dispersive liquid–liquid microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, p. 1-8, 2015.

EMÍDIO, E. S.; DA SILVA, C. P.; DE MARCHI, M. R. R. Estrogenic mycotoxins in surface waters of the Rico Stream micro-basin, São Paulo, Brazil: occurrence and potential estrogenic contribution. **Eclética Química**, v. 45, n. 2, p. 23-32, 2020.

ENSMINGER, M. P.; BUDD, R.; KELLEY, K. C. *et al.* Ocorrência de pesticidas e excedências de parâmetros aquáticos em águas superficiais urbanas e sedimentos em três áreas urbanas da Califórnia, EUA, 2008–2011. **Environ Monit Assess**, v. 185, p. 3697–3710, 2013.

ESKOLA, M.; KOS, G.; ELLIOTT, C., T., HAJŠLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRŠKA, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 16, p. 01-17, 2020.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12-34, 2006.

EU - Drinking water legislation - European Commission. 2020. Disponível em:<

<https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/legislation>>. Acesso em 27/07/2024.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Disponível em <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>. Acesso em: 25/02/2024.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. Biossegurança ambiental. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 61-76, 2009.

FELTRIN, A. C. P.; FONTES, M. R. V.; GRACIA, H. D. K.; BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase from soybean meal: obtention, purification and application in reduction of deoxynivalenol levels. **Química Nova**, v. 40, n. 8, p. 8, 2017.

FRITZKE, W.; SALLA, E. G.; BAGATINI, M. D.; DA SILVA ROSA BONADIMAN, B.; SKORONSKI, E.; MORONI, L. S.; KEMPKA, A. P. Peroxidase of *Cedrela fissilis* leaves: Biochemical characterization and toxicity of enzymatically decolored solution of textile dye Brilliant Sky-Blue G. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 101553, 2020.

QI, L.; ZHONG, X.; GAO, L.; CAI, R.; YUE, T.; YUAN, Y.; WANG, Z.; ZHAO, X. Degradation of mycotoxins by pulsed light and evaluation of the safety of degradation products. **Journal of Food Engineering**, v. 376, p.112085, 2024.

GAUTÉRIO, G. V.; MALTA, D. S.; REGINATTO, L.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J.; KALIL, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 8, p. 1998-2008, 2017.

GAUTAM, P.; DILL-MACKY, R. Free water can leach mycotoxins from *Fusarium*-infected wheat heads. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 9, p. 484-490, 2012.

GAO, S.; JIN, H.; YOU, J.; DING, Y.; ZHANG, N.; WANG, Y.; ZHANG, H. Ionic liquid-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of antibiotics in milk by high-

performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7254-7263, 2011.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. **Journal of Food Protection**, v.64 n. 1, p. 120-131, 2001.

GARCIA, S. DE O. Peroxidase e Amase Lipase A como agentes de degradação simultânea de ocratoxina A e zearalenona em solução modelo, mosto e cerveja. Tese (Doutorado em engenharia e ciência de alimentos), Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2020.

GARCIA, S. DE O., SIBAJA, K.V.M., NOGUEIRA, W.V., FELTRIN, A.C.P., PINHEIRO, D.F.A., CERQUEIRA, M.B.R., BADIALE FURLONG, E., GARDA-BUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039, 2020.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, n. 9, p. 1819-1831, 2018.

GARCIA, S.O.; SIBAJA, M.; V. K. NOGUEIRA, V. W.; FELTRIN, P. C. A.; DIEM, P. A. F.; CERQUEIRA, R. B. M. BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BBUFFON, J. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, V. 131, p. 109039, 2020.

GARCÉS, A.; ZERZAŇOVÁ, A.; KUČERA, R.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J. Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection: Application to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography A**, v. 1137, n. 1, p. 22-29, 2006.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, pp. 198-203, 2011.

GILLIOM, R. J. Pesticides in US streams and groundwater. **Environmental Science & Technology**, 2007.

GIRARDI, C.; NOWAK, K. M.; CARRANZA-DIAZ, O.; LEWKOW, B.; MILTNER, A.; GEHRE, M.; KÄSTNER, M. Microbial degradation of the pharmaceutical ibuprofen and the herbicide 2,4-D in water and soil — Use and limits of data obtained from aqueous systems for predicting their fate in soil. **Science of The Total Environment**, v. 444, p. 32–42, 2013.

GETAHUN, M.; FININSA, C.; MOHAMMED, A.; BEKEKO, Z.; SULYOK, M. Fungal species and multi-mycotoxin in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in Ethiopia. **World Mycotoxin Journal**, v. 16, n. 2, p. 179-194, 2023.

GRAHAME, D. A. S.; BRYKSA, B. C.; YADA, R. Y. Factors affecting enzyme activity. In: Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality. **Woodhead Publishing**, p. 11-55, 2015.

GROMADZKA, K.; WAŚKIEWICZ, A.; GOLÍŃSKI, P.; ŚWIETLIK, J. Occurrence of estrogenic mycotoxin–zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. **Water research**, v. 43, n. 4, p. 1051-1059, 2009.

GEORGE, H. S.; ARAVIND, P.; SELVARAJ, H.; ILANGO VAN, A.; SUNDARAM, M.; VASUDEVAN, S. Effective removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous solutions using polyaniline recovered from non-recyclable pigment effluent via electro polymerization. **Journal of Water Process Engineering**, v. 51, p.103407, 2023.

GOESSENS, T.; DE BAERE, S.; DE TROYER, N.; DEKNOCK, A.; GOETHALS, P.; LENS, L.; CROUBELS, S. L. Multi-residue analysis of 20 mycotoxins including major metabolites and emerging mycotoxins in freshwater using UHPLC-MS/MS and application to freshwater ponds in flanders, Belgium. **Environmental Research**, v. 196, p. 110366, 2021.

GLOZIER, N. E.; STRUGER, J.; CESSNA, A. J.; GLEDHILL, M. RONDEAU, M.; ERNST, W. R.; SEKELA, M. A.; CAGAMPAN, S. J.; SVERKO, E.; MURPHY, C. MURRAY, J. L.; DONALD, D. B. Ocorrência de glifosato e herbicidas ácidos em rios e córregos urbanos selecionados no Canadá, 2007. **Environemtal Science and Pollution Research**, v. 19, p. 821–834, 2012.

HALL, J. C.; VAN DEYNZE, T. D.; STRUGER, J.; CHAN, C. H. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2, 4-D. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 28, n. 5, p. 577-598, 1993.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. **Journal of chromatography A**, v. 1138, n. 1-2, p. 132-140, 2007.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; HOERGER, C. C.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Quantification of zearalenone in various solid agroenvironmental samples using D6-zearalenone as the internal standard. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2926-2932, 2008.

HE, S.; XU, B.; LIU, Y.; YIN, X.; YANG, W.; CHEN, Y. Immobilization of laccase on PAMAM dendrimers modified core-shell Fe₃O₄-SiO₂ magnetic composite particles for degradation of 2,4-dichlorophenol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 679, p. 132606, 2023.

HERNÁNDEZ, A. A.; SILVA, M. R.; MOYA, C. Á. Compuestos organo-persistentes y daño genético en núcleos hepáticos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala. **revista científica**, p. 1, 2011.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality—Summary Table. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario. 2020.

HOSHINO, N.; NAKAJIMA, R.; YAMAZAKI, I. The Effect of Polymerization of Horseradish Peroxidase on the Peroxidase Activity in the Presence of Excess H₂O₂: A Background for a Homogeneous Enzyme Immunoassay. *The Journal of Biochemistry*, v. 102, n. 4, p. 785-791, 1987.

IBAMA. Painel de informações sobre a comercialização de Agrotóxicos e Afins no Brasil - série histórica 2009 - 2020, 2022. Disponível: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos>> acesso: 05/02/2024.

IBAMA. Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002. 2021. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>> acesso: 05/02/2024

IBGE. IBGE prevê safra de 306,2 milhões de toneladas para 2024, com queda de 3,2% frente a 2023. 2023. Disponível em:< <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/38568-ibge-preve-safra-de-306-2-milhoes-de-toneladas-para-2024-com-queda-de-3-2-frente-a-2023>> acesso em 02/02/2024.

IARC. Monografias sobre Avaliação de Riscos Carcinogênicos para Humanos: Agentes Químicos e Profissões Relacionadas. Uma revisão de cancerígenos humanos. Lyon, França: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer 100F p. 224-24, 2012. Disponível: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/08/14-002.pdf>> acesso: 22/02/2024

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.** Lyon, France, 1993.

IRGA - Instituto de Arroz Rio Grandense - Colheita do arroz no RS está em 67%. Disponível em: <https://irga.rs.gov.br/colheita-do-arroz-no-rs-esta-em-67> acesso 22/05/2014>. Acesso: 20/03/2024.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre avaliação de desempenho de métodos analíticos. Junho de 2020. Disponível em:< http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=ComTecLab> acesso em: 20/03/2023.

JAAFARZADEH, N.; GHANBARI, F.; AHMADI, M. Efficient degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by peroxy monosulfate/magnetic copper ferrite nanoparticles/ozone: a novel combination of advanced oxidation processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 320, p. 436-447, 2017.

JUAN-GARCÍA, A.; JUAN, C.; TAIPALE, S.; VEHNÄINEN, E. R. Beauvericin and enniatin B mycotoxins alter aquatic ecosystems: Effects on green algae. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 107, p. 104415, 2024.

JIAN, F.; CHELLADURAI, V.; JAYAS, D. S.; DEMIANYK, C. J.; WHITE, N. D. G. Interstitial concentrations of carbon dioxide and oxygen in stored canola, soybean, and wheat seeds under various conditions. **Journal of stored products research**, v. 57, p. 63-72, 2014.

- KLANOVICZ, N.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F. S.; ZANIVAN, J.; SCAPINI, T.; POLLON, R.; TREICHEL, H. Advanced oxidation processes applied for color removal of textile effluent using a home-made peroxidase from rice bran. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 43, p. 261-272, 2020.
- KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.
- KIBAMBE, M. G.; MOMBA, M. N.; DASO, A.; VAN ZIJL, M.; COETZEE, M. A. Efficiency of selected wastewater treatment processes in removing estrogen compounds and reducing estrogenic activity using the T47D-KBLUC reporter gene assay. **Journal of Environmental Management**, v. 260, p. 110135, 2020.
- KIESSLING, K. H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986.
- KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Principal components analysis: An innovative approach to establish interferences in ochratoxin A detection. **Food chemistry**, v. 177, p. 354-360, 2015.
- LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 501, n. 1, p. 79-88, 2004.
- LAGANÀ, A.; FAGO, G.; MARINO, A.; SANTARELLI, D. Development of an analytical system for the simultaneous determination of anabolic macrocyclic lactones in aquatic environmental samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 4, p. 304-310, 2001.
- LARISA, G., DONERIAN., MARIIA, A., VODYANOVA. Substantiation of the place of alternative biological methods in hygienic research. v. 97, p.1093-1097, 2018.
- LAZZARI, F. A. Umidade, Fungos E Micotoxinas Na Qualidade De Sementes, Grãos E Rações. 2 ed. p.148, 1997.
- LEE, H.; YUN, S. Y.; JANG, S.; KIM, G.-H.; KIM, J.-J. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Creosote-Contaminated Soil by *Peniophora incarnata* KUC8836. **Bioremediation Journal**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2015.

LEITE, C. C.; GARDA-BUFFON, J.; FAGUNDES, C. A.; BADIALE-FURLONG, E. Análises qualitativas e quantitativas de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz por CCD e CCDAE. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1955–1960, 2012.

LOOS, R.; GAWLIK, B. M.; LOCORO, G.; RIMAVICIUTE, E.; CONTINI, S., G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. **Environmental pollution**, v. 157, n. 2, p. 561-568, 2009.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.

LOPES, P. R. S., RADÜNZ NETO, J., MALLMANN, C. A., LAZZARI, R., PEDRON, F. DE A.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p.1029–1034, 2005.

LOURTHURAJ, A. A., et al. Biocatalytic Degradation of Organophosphate Pesticide from the Wastewater and Hydrolytic Enzyme Properties of Consortium Isolated from the Pesticide Contaminated Water. **Environmental Research**, v. 205, p. 112553, 2022.

MATAFONOVA, G.; SHIRAPOVA, G.; ZIMMER, C.; GIFFHORN, F.; BATOEV, V.; KOHRING, G. W. Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. isolated from an aeration pond in the Baikalsk pulp and paper mill (Russia). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58, n. 3-4, p. 209–212, 2006.

MARTA, A. T.; FERREIRA, J. P.; OLIVEIRA, B. R.; BATORÉU, M. C.; BARRETO CRESPO, M. T.; PEREIRA, V. J.; BRONZE, M. R. Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC–MS/MS. **Food chemistry**, v. 176, p. 455-464, 2015.

MARTINS, Ligia Manoel. Ocorrência de fungos e aflatoxinas, cinética da degradação de aflatoxinas durante a torração e modelagem probabilística do risco de exposição pelo consumo de amendoim. 2015.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

- MASI, M.; DI LECCE, R.; MADDAU, L.; MARSICO, G.; SUPERCHI, S.; EVIDENTE, A. ArgYROtoxins AC, a trisubstituted dihydroisobenzofuranone, a tetrasubstituted 2-hydroxyethylbenzamide and a tetrasubstitutedphenyl trisubstitutedbutyl ether produced by *alternaria argyroxiphii*, the causal agent of leaf spot on African mahogany trees (*Khaya senegalensis*). **Phytochemistry**, v. 191, p. 112921, 2021.
- MATSUMOTO, E.; KAWANAKA, Y. YUN, S. J., OYAIZU, H. Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Applied Microbiological Biotechnology*, v. 84, p. 205-216, 2009.
- MAHMOUDI, A.; NAZARI, K.; MOHAMMADIAN, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Effect of Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cu^{2+} on Horseradish Peroxidase: Activation, Inhibition, and Denaturation Studies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 104, n. 1, p. 81 94, 2003.
- MEDINA, J. D. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; GUIMARÃES, L. R. C.; KARP, S. G.; SOCCOL, C. R. Peroxidases. In: **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Elsevier, p. 217-232, 2017.
- MESAK, C.; DE OLIVEIRA MENDES, B.; DE OLIVEIRA FERREIRA, R.; MALAFAIA, G. Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2, 4-D herbicide in a simulated realistic scenario. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 15, p. 15235-15244, 2018.
- MINISTRY OF HEALTH - Drinking-water Standards for New Zealand. 2005 (Revised 2018). Disponível em: <https://www.health.govt.nz/publication/drinking-water-standards-new-zealand-2005-revised-2018>. Acesso em: 27/08/2024.
- MOHAMED, S. A.; ABULNAJA, K. O.; ADS, A. S.; KHAN, J. A.; KUMOSANI, T. A. Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. *Food Chemistry*, v. 128, n. 3, p. 725 730, 2011.
- SCHENZEL, J.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11207-11217, 2010.
- MARAGOS, C. M. Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. **Food Additives & Contaminants: Part B Surveillance**, v. 5, n. 1, p. 55-64, 2012.

MARINON, K. V.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Degradação de níveis de aflatoxina b1 por ação da peroxidase em solução modelo. XII seminário Brasileiro de tecnologia enzimática - ENZITEC, Caxias do Sul - RS, 2016.

MELO, J. O. F.; RIOS, J. C. C.; SOUZA, J. W. S.; VITORIO, M. A. P.; SANTOS, M. P. P. M. S.; SANTOS, R. M. D. S.; GARDA-BUFFON, J. Peroxidase Commercial Effect on Aflatoxin B1 and M1 in Model System. *Open Science Research III*, v.3 n.1, p. 290-300, 2022.

MOREAU, M.; LESCURE, G.; AGOULON, A.; SVINAREFF, P.; ORANGE, N.; FEUILLOLEY, M. Application of the pulsed light technology to mycotoxin degradation and inactivation: Destruction of mycotoxins by pulsed light. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 357–363, 2013.

MCMANUS, S. L.; MOLONEY, M.; RICHARDS, K. G.; COXON, C. E.; DANAHER, M. Determination and occurrence of phenoxyacetic acid herbicides and their transformation products in groundwater using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20627-20649, 2014.

MUNKVOLD, G. P.; ARIAS, S.; TASCHL, I.; GRUBER-DORNINGER, C. Mycotoxins in corn: Occurrence, impacts, and management. In: *Corn*. AACC International Press, p. 235-287, 2019.

NICELL, J. A.; AL-KASSIM, L.; BEWTRA, J. K.; TAYLOR, K. E. Wastewater treatment by enzyme catalysed polymerization and precipitation. **Biodeterioration Abstracts**, v. 7, n. 1, p.1-8, 1993.

NIDHINA, N, BHAVYA, M.L, BHASKAR, N, MUTHUKUMAR, S.P, MURTHY, P. S. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in rumen liquor and its implications, *Food Control*, vol. 71, pp. 26–31, 2017.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. PREVALÊNCIA DE OCRATOXINA A EM ALIMENTOSE CONSEQUENTES PROBLEMAS DE SEGURANÇAALIMENTAR. 2006.

NOGUEIRA, W. V.; MOYANO, F. J.; TESSER, M. B.; GARDA-BUFFON, J. Mitigation of aflatoxin B1 in fish feed by peroxidase from soybean meal. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 40, n. 1, p. 110-120, 2023.

NORA, N. S.; FELTRIN, A. C. P.; SIBAJA, K. V. M.; FURLONG, E. B.; GARDA-BUFFON, J. Ochratoxin A reduction by peroxidase in a model system and grape juice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1075-1082, 2019.

OLIVEIRA, M.S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E.P.; BADIALE-FURLONG, E.; Souza-Soares, L. A. Physico-Chemical Characterization of Fermented Rice Bran biomass. *CyTA- Journal of Food*, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.

OLIVEIRA, P. J. B. D. Bioprospecção de fungos de interesse biotecnológico na degradação dos herbicidas 2, 4-D e Imazapyr. Dissertação de mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná Dois Vizinhos, 2019.

OLIVEIRA, B. R. MATA, A. T.; FERREIRA, J. P.; BARRETO CRESPO, M. T.; PEREIRA, V. J.; BRONZE, M. R. Production of mycotoxins by filamentous fungi in untreated surface water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 17519-17528, 2018.

OLIVEIRA, C.A.F, GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular *Revista de Saúde Pública*, vol. 31, no. 4, p. 417-424, 1997.

OLIVEIRA, A. Q.; SOARES, L. M. V. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 60, n. 2, p. 129-134, 2001.

OLIVEIRA, F. K.; COMUNELLO, A. F. V.; SANTOS, L. O. BUFFON, J. G. Peroxidase obtida de farelo de soja aplicada a degradação de aflatoxinas B1 e M1 no leite. **R. bras. Ci. Vet.**, supl., v. 28, n. 2, p. 47-49, 2021.

ORDAZ-GUILLÉN, Y.; GALÍNDEZ-MAYER, C. J.; RUIZ-ORDAZ, N.; JUÁREZ-RAMÍREZ, C.; SANTOYO-TEPOLE, F.; RAMOS-MONROY, O. Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2, 4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation. **Environmental science and pollution research**, v. 21, p. 8765-8773, 2014.

PALMA, G.; SÁNCHEZ, A.; OLAVE, Y.; ENCINA, F.; PALMA, R.; BARRA, R. Pesticide levels in surface waters in an agricultural–forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 763-770, 2004.

- PAVAN, F. A.; SAMOJEDEN, C. G.; RUTKOSKI, C. F.; FOLADOR, A.; DA FRÉ, S. P.; MÜLLER, C.; HARTMANN, M. T. Morphological, behavioral and genotoxic effects of glyphosate and 2, 4-D mixture in tadpoles of two native species of South American amphibians. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 85, p. 103637, 2021.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K.R.N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M.L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on in vitro biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 290-296, 2011.
- PATERSON, R. R. M.; KELLEY, J.; GALLAGHER, M. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. *Letters in Applied Microbiology*, v. 25, n. 6, p. 435-436, 1997.
- PARAGINSKI, R. T.; NATHAN, L. V.; JOSE D. J. B.; MAURÍCIO DE OLIVEIRA.; MOACIR, C. E. Physicochemical and Pasting Properties of Maize as Affected by Storage Temperature. **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 209-214, 2014.
- PARAGINSKI, R. T.; VANIER, N. L.; BERRIOS, J. J.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Physicochemical and pasting properties of maize as affected by storage temperature. **Journal of Stored Products Research**, 2014.
- PARAGINSKI, Ricardo Tadeu et al. Physicochemical, pasting, crystallinity, and morphological properties of starches isolated from maize kernels exhibiting different types of defects. **Food Chemistry**, Washington/EUA, v. 274, p. 330-336, 2019.
- PARAGINSKI, R.T.; ROCKENBACH, B.A.; SANTOS, R.F.; ELIAS, M.C.; OLIVEIRA, M. Qualidade de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.4, p.358-363, 2015
- PARK, C.; YUN, K.; KEE, P.; BUM, K. Changes in Physicochemical Characteristics of Rice during Storage at Different Temperatures. **Journal of Stored Products Research**, v. 48, p. 25-29, 2012.
- PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; DELLA-ROSA, H. V.; DE LUCC, S. R. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 10, p. 27-37, 2005.
- PRADO, G.; MATTOS, S. V. M.; PEREIRA, E. C. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 11, n. 2, p. 264-273, 1991.

PIEREZAN, F. Aflatoxicosis in cattle. 2013. 61 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 7, n. 2, p. 17-26, 2010.

PFOHL-LESZKOWICZ, Annie; MANDERVILLE, Richard A. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. *Chemical research in toxicology*, v. 25, n. 2, p. 252-262, 2012.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. D. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005.

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1486, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Disponível em:<
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dichlorophenoxyacetic-acid>. Acesso: 27/07/2014.

PUNYASAMUDRAM, S.; PUTHALAPATTU, R. P.; BATHINAPATLA, A.; KANCHI, S.; JYOTHI, S.; KUMAR, P. V. N. Biosynthesis of ZnFe₂O₄@Ag hybrid nanocomposites for degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide. **Chemical Physics Impact**, v. 7, p. 100282, 2023.

QIN, H.; GUO, W.; HUANG, X.; GAO, P.; XIAO, H. Preparation of yttria-stabilized ZrO₂ nanofiltration membrane by reverse micelles-mediated sol-gel process and its application in pesticide wastewater treatment. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 40, n. 1, p. 145-154, 2020.

RAINA, R.; ETTER, M. L.; BUEHLER, K.; STARKS, K.; YOWIN, Y. Phenoxyacid herbicides in stormwater retention ponds: urban inputs. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, n. 08, p. 962, 2011.

RAUDIENE, Edita et al. Carbon dioxide respiration rates in wheat at various temperatures and moisture contents. **Journal of metrology society of India**, v. 32, n.1, p. 51-58, 2017.

RATNAVATHI, C. V.; KOMALA, V. V.; CHAVAN, U. D. Mycotoxin contamination in Sorghum. In: **Sorghum biochemistry**. Academic Press, p. 107-180, 2016.

REED, C.; DOYUNGAN, S.; IOERGER, B.; GETCHELL, A. Response of Storage Molds to Different Initial Moisture Contents of Maize (Corn) Stored at 25 °C, and Effect on Respiration Rate and Nutrient Composition. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p.443-458, 2007.

REHMAN, Zia-Ur; HABIB, F.; ZAFAR, S. I. Nutritional changes in maize (Zea mays) during storage at three temperatures. **Food Chemistry**, Washington/EUA, v. 77, n. 2, p. 197-201, 2002.

RIBEIRO, M. D. S.; GONÇALVES, R. C.; ALVARES, V. D. S.; DIAS, J.; ABREU, L.; SCHURT, D.; FREITAS-SILVA, O. Fungos e micotoxinas: estratégias de controle. 2023

ROMERO, A. D. C., MORAIS, J. B. D. A., AUGUSTO, P. E. D.; CALORI-DOMINGUES, M. A. Ozonation of agri-food products for reducing mycotoxin contamination: challenges in grains and particulates processing. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 56, n. 9, p. 845-851, 2021.

RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CONCHA-GRAÑA, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, n. 10, p. 1040-1049, 2012.

RIET-CORREA, F, RIVERO, R, ODRIOSOLA, E, ADRIEN, M.L, MEDEIROS, R.M.T, SCHILD, A. L. Mycotoxicoses of ruminants and horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 6, p. 692-708, 2013.

SANTOS, S. B. et al. Perda de matéria seca em grãos de milho armazenados em bolsas herméticas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 674- 682, dez. 2012.

SANTOS, D. G.; TURNES, C. G.; CONCEIÇÃO, F. R. Bioremediation of Parboiled Rice Wastewater Supplemented with Biodiesel-Derived Glycerol Using *Pichia pastoris* X-33. **Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

SERRANO, L.; DELORENZO, M. E. Water quality and restoration in a coastal subdivision stormwater pond. **Journal of environmental management**, v. 88, n. 1, p. 43-52, 2008.

SERRANO, A. B.; FONT, G. M.; J. FERRE, E. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of Emerging Fusarium Mycotoxins in Water. **Food Anal. Methods**, v. 9, p. 856–862, 2016.

SECK, E.; DOÑA-RODRÍGUEZ, J.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ-DÍAZ, O.; ARAÑA, J.; PÉREZ-PEÑA, J. Photocatalytic removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by using sol–gel synthesized nanocrystalline and commercial TiO₂: Operational parameters optimization and toxicity studies. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 125, p. 28-34, 2012.

SILVA, D. R. O. D.; AVILA, L. A. D.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A. D. C.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 748–752, 2011.

SIBAJA, K.V.M.; GARCIA, S. DE O.; FELTRIN, A.C.P.; REMEDI, R.D., CERQUEIRA, M.B.R., BADIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Aflatoxin biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 8, 2018.

SOARES, C.; RODRIGUES, I.; FREITAS-SILVA, O.; SILVA, V. Occurrence of mycotoxins in Portuguese drinking water. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, p. 644-654, 2017.

SCHENZEL, J.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11207-11217, 2010.

SCHENZEL, J.; HUNGERBÜHLER, K.; BUCHELI, T. D. Mycotoxins in the environment: II. Occurrence and origin in Swiss river waters. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 24, p. 13076-13084, 2012.

SHEPHARD, G.S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008

SMAILI, M. C.; EL GHADRAOUI, L.; GABOUN, F.; BENKIRANE, R.; BLENZAR, A. Impact of some alternative methods to chemical control in controlling aphids (Hemiptera: Sternorrhyncha) and their side effects on natural enemies on young Moroccan citrus groves. **Phytoparasitica**, v. 42, p. 421-436, 2014.

SCHULTZ, D. P.; HARMAN, P. D. Resíduos de 2,4-D em água de lago, lama e peixes. Diário de monitoramento de pesticidas. Centro de Ciências Ambientais do Alto Centro-Oeste, **Pesticides Monitoring Journal**, 1971.

SIBAJA, K. V. M. LEITE: OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B1 E M1 E O USO DA PEROXIDASE COMO ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO. Tese de doutorado, Engenharia e Ciência de Alimentos., Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2020.

SIBAJA, K. V. M.; DE OLIVEIRA GARCIA, S.; FELTRIN, A. C. P.; DIAZ REMEDI, R.; CERQUEIRA, M. B. R.; BARDIALE-FURLONG, E.; GARDA-BUFFON, J. Biotransformation by commercial peroxidase and its application in contaminated food. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 1187-1194, 2019.

SINGH, M.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. Standardized extracts of *Bacopa monniera* protect against MPP⁺-and paraquat-induced toxicity by modulating mitochondrial activities, proteasomal functions, and redox pathways. **Toxicological Sciences**, v. 125, n. 1, p. 219-232, 2012.

TAVEIRA, B. L. S.; ALBUQUERQUE, G. S. C. D. Análise das notificações de intoxicações agudas, por agrotóxicos, em 38 municípios do estado do Paraná. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 211-222, 2018.

TRIPATHI, S.; MISHRA, H. N. Modelagem e Otimização da Degradação Enzimática de Aflatoxina B₁ (AFB₁) em Pimentão Vermelho em Pó Usando Metodologia de Superfície de Resposta. **Food Bioprocess Technol**, v. 4, p. 770–780, 2011.

TSABOULA, A.; PAPADAKIS, E. N.; VRYZAS, Z.; KOTOPOULOU, A.; KINTZIKOGLU, K.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: a prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. **Environment International**, v. 91, p. 78-93, 2016.

THURMAN, E. M.; ZIMMERMAN, L. R.; AGA, D. S.; GILLIOM, R. J. Regional Water-Quality Analysis of 2,4-D and Dicamba in River Water Using Gas Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 79, n.3, p. 185–198, 2001.

TROESTCH, J; REYES, S; VEGA, A. Determination of Mycotoxin Contamination Levels in Rice and Dietary Exposure Assessment. **Journal of Toxicology**, v. 2022, 2022.

ULSON DE SOUZA, S. M. A. G.; FORGIARINI, E.; ULSON DE SOUZA, A. A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 1073-1078, 2007.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. National Primary Drinking Water Regulations.

URSELER, N.; BACHETTI, R.; MORGANTE, V.; AGOSTINI, E.; MORGANTE, C. Groundwater quality and vulnerability in farms from agricultural-dairy basin of the Argentine Pampas. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 42, p. 63655-63673, 2022.

VANITHA, T.; SURESH, G.; BHANDI, M. M.; MUDIAM, M. K. R.; MOHAN, S. V. Microbial degradation of organochlorine pesticide: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by axenic and mixed consortium. **Bioresource Technology**, v. 382, p. 129031, 2023.

VELDE, F. VAN DE; RANTWIJK, F. VAN; SHELDON, R. A. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 73–80, 2001.

WANG, L.; HUA, X.; JING, N.; JI, T.; ZHOU, C.; LIU, W.; BING L.V.; LIU, L.; CHEN, Y. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* YL-1 with ochratoxin A degradation ability and biocontrol activity against *Aspergillus westerdijikiae*. **Biological Control**, v. 105052, ISSN 1049-964, 2022.

WANG, XIAOLU., XING, QIN., ZHENZHEN, HAO., HUIYING, LUO., BIN, YAO., SU, XIAOYUN. "Degradation of Four Major Mycotoxins by Eight Manganese Peroxidases in Presence of a Dicarboxylic Acid. **Toxins**, v. 1, p. 566, 2019.

WANG, Q.; SUN, Y.; HAO, M.; YU, F.; HOUDA, C. Persistent degradation of 2,4-dichlorophenol in groundwater by persulfate synergize with Fe(III)/CaSO₃ system: Role of Fe(IV) and 1O₂ oxidation. **Separation and Purification Technology**, v. 334, p. 125979, 2024.

WIJNJA, H.; DOHERTY, J. J.; SAFIE, S. A. Mudanças na ocorrência de pesticidas em águas superficiais suburbanas em Massachusetts, EUA, 1999–2010. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 93, p. 228–232, 2014.

WHO – World Health Organization. Water, Sanitation and Health - Guidelines for drinking water quality.

XIAO-HUAN, Z. A. N. G.; QIU-HUA, W. U.; ZHANG, M. Y.; GUO-HONG, X. I.; ZHI, W. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.

XU, S.; JIANG, C.; LIN, Y.; JIA, L. Magnetic nanoparticles modified with polydimethylsiloxane and multi-walled carbon nanotubes for solid-phase extraction of fluoroquinolones. **Microchimica Acta**, v. 179, p. 257-264, 2012.

XUE, M.; WANG, T.; SUN, Q.; QU, G.; JIA, H.; ZHU, L. Insights into the highly efficient detoxification of the biotoxin patulin in water by discharge plasma oxidation. **Chemical Engineering Journal**, 411, 128432, 2021.

YAN, H.; WANG, H. Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 1-15, 2013.

YAN, H.; WANG, H.; QIN, X.; LIU, B.; DU, J. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 1, p. 53-57, 2011.

YAMINI, Y.; SALEH, A. Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of some chlorophenoxyacetic acids in water samples. **Journal of separation science**, v. 36, n. 14, p. 2330-2338, 2013.

YANG, J.; HUANG, Y.; YANG, Y.; YUAN, H.; LIU, X. Cagelike mesoporous silica encapsulated with microcapsules for immobilized laccase and 2, 4-DCP degradation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 38, p. 52-62, 2015.

YE, F. X.; ZHU, R. F.; LI, Y. Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1-3, p. 148-153, 2009.

YOUNG, J. C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 417-424, 2006.

YI, Y.; FAN, K.; WANG, J.; FU, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, H. Primary research on sampling scheme for analyzing mycotoxin distribution in wheat and rice fields. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 12, p. 4980-4986, 2021.

YU, G.; YANG, Y.; WANG, S.; YU, Z.; SUN, Q.; LI, Y.; SUN, J.; LING, T.; SHU, Z. Preparation of $\text{Bi}_2\text{O}_2\text{CO}_3/\text{BiOBr}$ 0.9I0.1 photocatalyst and its degradation performance for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 952, p. 169835, 2023.

ZÁMOCKY, M.; HOFBAUER, S.; SCHAFFNER, I.; GASSELHUBER, B.; NICOLUSSO, A.; SOUDI, M.; PIRKER, K. F.; FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 108, p. 574, 2015.

ZDARTA, A.; ZDARTA, J. Study of membrane-immobilized oxidoreductases in wastewater treatment for micropollutants removal. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14086, 2022.

ZHAO, Y.; WANG, Q.; HUANG, J.; CHEN, Z.; LIU, S.; WANG, X.; WANG, F. Mycotoxin contamination and presence of mycobiota in rice sold for human consumption in China. **Food Control**, v. 98, p. 19-23, 2019.

ZHANG, J.; XU, Z.; CHEN, H.; ZONG, Y. Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 1, p. 54-59, 2009.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S. A. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, p. 731-734, 2008.

ZUO, J.; SHEN, J.; KANG, J.; YAN, P.; WANG, B.; WANG, S.; FU, D.; WANG, W.; SHE, T.; ZHAO, S.; CHEN, Z. B-doped NiFe_2O_x based on the activation of peroxymonosulfate for degrading 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in water. **Chemical Engineering Journal**, v. 459, p. 141565, 2024.

ZUO, J.; FU, D.; YAN, P.; WANG, S.; LI, Y.; SHEN, L.; CHENG, Y.; SHEN, J.; KANG, J.; CHEN, Z. Synergistic mechanism of surface oxygen vacancies and metal sites on Al-substituted NiFe_2O_4 during peroxymonosulfate activation in the solid-water interface for 2,4-D degradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 480, p.147884, 2024.

ZHU, X.; ZENG, Z.; CHEN, Y.; LI, R.; TANG, X.; ZHU, X.; CHEN, J. Genotoxicity of three mycotoxin contaminants of rice: 28-day multi-endpoint assessment in rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 867, p. 503369, 2021.

ZHU, X.; WANG, B. Y.; KANG, J.; SHEN, J.; YAN, P. W.; LIA, X.; YUANB, L.; ZHAO, S.; CHENG, Y.; LIA, Y.; ZUO, J. X.; CHEN, Z. Interfacial mechanism of the synergy of biochar adsorption and catalytic ozone micro-nano-bubbles for the removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water. **Separation and Purification Technology**, v. 299, p.121777, 2022.