



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE PEROXIDASE DE *Smallanthus
sonchifolius* E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO
DE FENOL**

DIEGO HOEFLING SOUZA

LAGES, 2020

DIEGO HOEFLING SOUZA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
PEROXIDASE DE *Smallanthus sonchifolius* E SUA APLICAÇÃO NA
BIOCONVERSÃO DE FENOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Everton Skoronski

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Trevisan

**LAGES, SC
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Souza, Diego Hoefling

Extração, purificação e caracterização bioquímica de peroxidase de *Smallanthus sonchifolius* e sua aplicação na bioconversão de fenol / Diego Hoefling Souza. -- 2020.

83 p.

Orientador: Everton Skoronski

Coorientadora: Viviane Trevisan

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Lages, 2020.

1. Yacon. 2. Peroxidase. 3. Purificação. 4. 2,4-diclorofenol. 5. Toxicidade. I. Skoronski, Everton. II. Trevisan, Viviane. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. IV. Título.

DIEGO HOEFLING SOUZA

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
PEROXIDASE DE *Smallanthus sonchifolius* E SUA APLICAÇÃO NA
BIOCONVERSÃO DE FENOL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

Professor Dr. Everton Skoronski

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV

Coorientadora: _____

Professora Dra. Viviane Trevisan

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV

Membros:

Professora Dra. Rosana Oliveira Henriques

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Professora Dra. Aniela Pinto Kempka

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CEO

Lages, 24 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, à Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade, pelo ensino e por todo aprendizado adquirido. Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC pela bolsa de dedicação exclusiva à pesquisa e possibilidade de desenvolver este trabalho.

Um agradecimento especial ao meu orientador e amigo, Professor Dr. Everton Skoronski por toda confiança e apoio ao longo desses anos trabalhando juntos e, principalmente, pelo estímulo ao aprendizado e à pesquisa. Também sou fortemente grato por todo incentivo e auxílio nessa nova etapa da minha vida que, sem dúvidas, foram fundamentais.

Do mesmo modo, expresso minha gratidão à Professora Dra. Viviane Trevisan por todos os ensinamentos e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho. À Mylena por todos os conhecimentos compartilhados, pelas análises que aprendi e por todas as dúvidas sanadas diariamente no laboratório. Ademais, agradeço também a todos os amigos do LABTRAT pelo apoio e companheirismo, certamente foi um período que ficará marcado para sempre em minha vida.

Agradeço, imensuravelmente, aos meus pais, Maria e Jorge, pois são os pilares fundamentais para que eu chegasse até aqui e à minha namorada, Aline, pelo apoio incondicional, por todas as conversas e por, mesmo que de longe, estar sempre comigo.

Por fim, deixo meus agradecimentos a todos os meus amigos que, de certa forma, contribuíram no decorrer dessa jornada e, principalmente, aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se mostra como uma fonte promissora de enzimas peroxidase. É uma planta de fácil plantio, adaptável a condições climáticas diversificadas e que ganha espaço em distintas regiões do mundo, tendo seu cultivo voltado, sobretudo, para o aproveitamento de suas raízes. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar enzima peroxidase da casca de raízes de yacon, bem como aplicar a enzima obtida na bioconversão de 2,4-diclorofenol, em efluente sintético, e avaliar o potencial toxicológico do mesmo. A purificação parcial por meio de um sistema de separação por duas fases aquosas resultou em um fator de purificação de 4,66 vezes, com recuperação de 33,87% da atividade enzimática. A enzima mostrou máxima atividade a 60 °C e pH 11, utilizando pirogalol como substrato padrão. A atividade enzimática reduziu significativamente quando incubada a 60 °C e 70 °C, mas se manteve estável a 50 °C por 60 minutos. Foi identificado que o mecanismo das reações segue um modelo de *Ping-Pong* Bi–Bi. A atividade enzimática se mostrou bastante sensível a variações da concentração de peróxido de hidrogênio, sendo a enzima fortemente inibida pelo excesso do substrato. Os íons metálicos Ba⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ (1 e 5 mM) não influenciaram significativamente a atividade da enzima, mas esta foi inibida por Cu²⁺ (5 mM) e sofreu ativação na presença de Co²⁺ (5 mM). Quando armazenada, em temperatura ambiente (21,31 ± 1,22 °C) e sob refrigeração (-1,22 ± 0,74 °C), a solução enzimática parcialmente purificada apresentou estabilidade similar à solução de *Horseradish* peroxidase comercial. Na bioconversão de 2,4-diclorofenol, a enzima mostrou máxima atividade a 37,5 °C e pH 7. A melhor eficiência de bioconversão foi alcançada em uma concentração de peróxido de hidrogênio de 0,63 mM (86,82%), após 180 minutos de reação. A eficiência atingida pela peroxidase de casca de yacon foi superior à mostrada pela enzima *Horseradish* peroxidase (70,76%), nas mesmas condições reacionais. A adição de PEG (4.000 e 6.000) não apresentou efeito significativo sobre a bioconversão de 2,4-diclorofenol. Os efeitos toxicológicos do efluente bruto e tratado foram avaliados utilizando *Lactuca sativa* L. var. *Buttercrunch* e *Allium cepa* como bioindicadores. O efluente tratado apresentou redução da toxicidade, quando comparado ao bruto, para *Lactuca sativa*. *Allium cepa* apresentou maior sensibilidade ao contaminante, com efeitos equivalentes de inibição para efluente tratado e bruto. Os resultados sugerem que a peroxidase de casca de yacon apresenta potencial e pode ser uma alternativa a ser explorada em processos de biocatálise.

Palavras-chave: Yacon. Peroxidase. Purificação. 2,4-diclorofenol. Toxicidade.

ABSTRACT

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a promising source of peroxidase enzymes. It is an easy-to-grow plant, adaptable to diverse climatic conditions and its cultivation gains space in several regions of the world, especially aimed the use of its roots. This work aimed to extract, purify and characterize peroxidase enzyme from the yacon root peels, as well to apply the enzyme obtained in the bioconversion of 2,4-dichlorophenol, in synthetic effluent, and to evaluate its toxicological potential. The partial purification using an aqueous two phases system resulted in a purification factor of 4.66-fold, with recovery of 33.87% of the enzymatic activity. The enzyme showed maximum activity at 60 °C and pH 11, using pyrogallol as a standard substrate. Enzymatic activity decreased significantly when it was incubated at 60 °C and 70 °C, but remained stable at 50 °C for 60 minutes. It was identified that the reaction mechanism follows a Ping-Pong Bi-Bi model. The enzymatic activity was sensitive to variations in the hydrogen peroxide concentration and the enzyme was strongly inhibited by the excess of the substrate. The metal ions Ba⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ (1 and 5 mM) did not significantly influence the enzyme activity, but it was inhibited by Cu²⁺ (5 mM) and activated in the presence of Co²⁺ (5 mM). When stored, at room temperature (21.31 ± 1.22 °C) and refrigeration (-1.22 ± 0.74 °C), the partially purified enzyme showed similar stability to the commercial *Horseradish* peroxidase. For the 2,4-dichlorophenol bioconversion, the enzyme showed maximum activity at 37.5 °C and pH 7. The best bioconversion efficiency was achieved at a hydrogen peroxide concentration of 0.63 mM (86.82%), after 180 minutes of reaction time. The efficiency achieved by yacon peel peroxidase was higher than that shown by the enzyme *Horseradish* peroxidase (70.76%), at the same reaction conditions. The addition of PEG (4,000 and 6,000) had no significant effect on wastewater treatment. The toxicological effects of the raw and treated wastewater were evaluated using *Lactuca sativa L. var. Buttercrunch* and *Allium cepa* as bioindicators. The treated wastewater showed a reduction in toxicity for *Lactuca sativa*. *Allium cepa* showed greater sensitivity to the contaminant, with equivalent inhibition effects for treated and raw wastewater. The results suggest that yacon peel peroxidase has potential for application in biocatalysis processes.

Keywords: Yacon. Peroxidase. Purification. 2,4-dichlorophenol. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Yacon: a) flores e folhas e b) raízes.....	22
Figura 2- Imagem do gel obtido pela SDS-PAGE para diferentes amostras: a) marcador, b) TPP (pó), c) TPP e d) ATPS.	40
Figura 3 – Efeito do pH na atividade enzimática de YPP.	41
Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade enzimática de YPP.	42
Figura 5 – Estabilidade térmica da YPP a 50, 60 e 70 °C.	43
Figura 6 – Gráficos de Lineweaver-Burk para: a) variação da concentração de pirogalol em diferentes concentrações fixas de H ₂ O ₂ e b) variação da concentração de H ₂ O ₂ para diferentes concentrações fixas de pirogalol.....	44
Figura 7 – Efeito do aumento da concentração de H ₂ O ₂ na atividade enzimática em uma concentração saturante não inibitória de pirogalol (20,80 mM).....	45
Figura 8 – Efeito do aumento da concentração de pirogalol na atividade enzimática em uma concentração saturante não inibitória de H ₂ O ₂ (4,16 mM).....	45
Figura 9 - Gráfico de Lineweaver-Burk com ajuste de um modelo de inibição mista aos dados.	46
Figura 10 – Estocagem de alíquotas de soluções de HRP e YPP (1 U/mL) em: a) temperatura ambiente (21,31 ± 1,22 °C) e b) refrigeração (-1,22 ± 0,74 °C).....	49
Figura 11 - Efeito do aumento da concentração de H ₂ O ₂ na atividade enzimática em uma concentração não inibitória de 2,4-DCP (5 mM).	59
Figura 12 - Efeito do aumento da concentração de 2,4-DCP na atividade enzimática em uma concentração não inibitória de H ₂ O ₂ (0,25 mM).	59
Figura 13 - Efeito do pH na atividade da YPP com 2,4-DCP como substrato padrão.	60
Figura 14 - Efeito da temperatura na atividade da YPP com 2,4-DCP como substrato padrão.	60
Figura 15 - Concentração de 2,4-DCP ao longo do tempo, utilizando diferentes concentrações de YPP.	61
Figura 16 - Efeito da concentração de H ₂ O ₂ na bioconversão de 2,4-DCP.....	62
Figura 17 – Característica visual do efluente: a) bruto, b) início do tratamento com HRP, c) tratado com HRP, d) início do tratamento com YPP e e) tratado com YPP.	64
Figura 18 – Série de cinco sementes de <i>Lactuca sativa L. var. Buttercrunch</i> após contato com os tratamentos: a) controle, b) YPP, c) HRP e d) bruto.....	65

Figura 19 – Imagens obtidas em microscópio de lâminas referentes aos diferentes tratamentos:
a) controle, b) YPP, c) HRP e d) bruto..... 67

Figura 20 - Série de cinco bulbos de *A. cepa* após contato com os tratamentos: **a) controle, b) YPP, c) HRP e d) bruto**..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação taxonômica do yacon.....	23
Tabela 2 – Purificação parcial da peroxidase de casca de yacon por diferentes métodos.....	38
Tabela 3 - Efeito do PEG na atividade da YPP.	47
Tabela 4 - Efeito de íons metálicos na atividade da YPP.....	48
Tabela 5 - Efeito da adição controlada de enzima e peróxido de hidrogênio na concentração final de 2,4-DCP no efluente.	63
Tabela 6 – Influência do PEG na bioconversão de 2,4-DCP catalisada por YPP.	63
Tabela 7 – Resultados do teste de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> <i>L. var. Buttercrunch</i>).	65
Tabela 8 – Índice mitótico das raízes de <i>A. cepa</i> após 24 h de exposição aos diferentes tratamentos.	66
Tabela 9 – Comprimento das raízes de <i>A. cepa</i> após 48 h em contato com as soluções em teste.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ATPS	Sistema bifásico aquoso
Ba	Bário
BSA	Albumina do soro bovino
°C	Grau Celsius
Ca	Cálcio
cm	centímetro
Co	Cobalto
g	grama
<i>GE</i>	Efeito de germinação
<i>GI</i>	Índice de germinação
\overline{GS}	Número médio de sementes germinadas
h	hora
HRP	<i>Horseradish</i> peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
<i>IM</i>	Índice mitótico
K	Potássio
kDA	quilodalton
K_m	Constante de Michelis-Menten
L	Litro
M	molar
mA	miliampere
Mg	Magnésio
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
Mn	Manganês
min	minuto
mm	milímetro
m/v	Massa para volume
N	Normal
n°	Número
Na	Sódio
Ni	Níquel
nm	nanômetro
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona

R^2	Coeficiente de determinação
\overline{RL}	Comprimento médio das raízes
RGI	Inibição do crescimento da raiz
s	segundo
SBP	Peroxidase da soja
SC	Santa Catarina
TPP	Particionamento em três fases
U	Unidade de atividade enzimática
UV-vis	Ultravioleta-visível
V	volt
V_0	Velocidade inicial
$V_{máx}$	Velocidade máxima inicial
v/v	Volume para volume
YPP	Peroxidase de casca de yacon
Zn	Zinco
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenóxiacético
2,4-DCP	2,4-diclorofenol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo geral	21
1.1.2	Objetivos específicos	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	22
2.2	ENZIMAS PEROXIDASE E FONTES DE EXTRAÇÃO	23
2.3	APLICAÇÃO DE ENZIMAS PEROXIDASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO COMPOSTOS FENÓLICOS	26
2.3.1	Avaliação toxicológica de efluentes tratados com auxílio de enzimas peroxidase	27
3	USO DE CASCA DE RAÍZES DE YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENZIMA PEROXIDASE	29
3.1	RESUMO	29
3.2	INTRODUÇÃO	29
3.3	MATERIAL E METÓDOS	31
3.3.1	Materiais	31
3.3.2	Obtenção do extrato bruto	31
3.3.3	Determinação da concentração de proteínas e atividade da peroxidase	31
3.3.4	Purificação parcial da peroxidase de casca de yacon (YPP)	32
3.3.4.1	Purificação parcial via precipitação com sulfato de amônio	32
3.3.4.2	Purificação parcial via particionamento em três fases (TPP)	33
3.3.4.3	Extração via particionamento em três fases (TPP) utilizando pó de casca de yacon ..	33
3.3.4.4	Purificação parcial utilizando sistema de duas fases aquosas (ATPS – polímero/sal)	33
3.3.4.5	Diálise	34
3.3.4.6	Eletroforese.....	34
3.3.4.7	Avaliação dos processos de purificação parcial	34
3.3.5	Influência do pH na atividade enzimática da YPP	35
3.3.6	Efeito da temperatura e avaliação da estabilidade térmica da YPP	35

3.3.7	Efeito da concentração dos substratos na atividade enzimática e caracterização do mecanismo cinético	35
3.3.8	Efeito de íons metálicos na atividade da YPP.....	36
3.3.9	Influência do polietilenoglicol (PEG) na atividade enzimática.....	36
3.3.10	Estocagem do extrato enzimático	37
3.3.11	Análises estatísticas	37
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.4.1	Purificação parcial da YPP	37
3.4.2	Efeito do pH na atividade da YPP	40
3.4.3	Efeito da temperatura e estabilidade térmica	41
3.4.4	Influência dos substratos e caracterização do mecanismo cinético	44
3.4.5	Efeito do PEG	47
3.4.6	Efeito de íons metálicos na atividade da YPP.....	47
3.4.7	Estocagem	49
3.5	CONCLUSÃO	49
4	APLICAÇÃO DE PEROXIDASE DE CASCA DE RAÍZES YACON NA BIOCONVERSÃO DE 2,4-DICLOROFENOL E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EFLUENTE	51
4.1	RESUMO	51
4.2	INTRODUÇÃO	51
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.3.1	Obtenção do extrato bruto e purificação parcial da YPP	53
4.3.2	Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática utilizando 2,4-DCP como substrato padrão	53
4.3.3	Influência das concentrações de substrato na velocidade da reação.....	53
4.3.4	Influência do pH e da temperatura na bioconversão de 2,4-DCP	54
4.3.5	Aplicação da YPP no tratamento de efluente sintético.....	54
4.3.5.1	Cinética de bioconversão do 2,4-DCP	54
4.3.5.2	Influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão de 2,4-DCP em efluente sintético	55
4.3.5.3	Efeito da adição controlada de enzima e peróxido de hidrogênio	55
4.3.5.4	Influência da adição de PEG na eficiência do tratamento	55

4.3.6	Ensaios de toxicológicos	56
4.3.6.1	Tratamento do efluente	56
4.3.6.2	Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (<i>Lactuca sativa L. var. Buttercrunch</i>).....	56
4.3.6.3	Ensaio de citotoxicidade em cebolas (<i>Allium cepa</i>)	57
4.3.7	Análises estatísticas	58
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.4.1	Influência das concentrações dos substratos na velocidade da reação	58
4.4.2	Influência do pH e temperatura na bioconversão de 2,4-DCP	60
4.4.3	Aplicação da YPP no tratamento de efluente sintético	61
4.4.3.1	Cinética de bioconversão do 2,4-DCP.....	61
4.4.3.2	Influência da concentração de H ₂ O ₂ na bioconversão de 2,4-DCP em efluente sintético	61
4.4.3.3	Efeito da adição controlada de enzima e peróxido de hidrogênio.....	62
4.4.3.4	Influência da adição de PEG na eficiência de tratamento	63
4.4.4	Ensaios toxicológicos	63
4.4.4.1	Características do efluente bruto e tratado utilizados na avaliação toxicológica	63
4.4.4.2	Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (<i>Lactuca sativa L. var. Buttercrunch</i>).....	64
4.4.4.3	Ensaio de citotoxicidade em cebolas (<i>Allium cepa</i>)	66
4.5	CONCLUSÃO.....	68
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

As peroxidases (E.C.1.11.1.7) são predominantemente proteínas heme que utilizam peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos como acceptor de elétrons na catálise da oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (DEMARCHE et al., 2012; ELSAYED et al., 2018; PANDEY et al., 2017). Estas enzimas são classificadas em duas famílias principais (vegetal e animal) e sua massa molecular pode variar de 30 a 150 kDa (ELSAYED et al., 2018).

Diversas peroxidases de fontes vegetais, pertencentes à classe III, vêm sendo caracterizadas e tendo sua aplicação estudada, uma vez que a especificidade relacionada aos substratos e as propriedades multifuncionais dessas enzimas justificam sua aplicação em vários processos analíticos, industriais e bioquímicos (VETAL; RATHOD, 2015). Entre algumas das fontes de peroxidases já mencionadas na literatura, por exemplo, pode-se citar: *Cedrela fissilis* (FRITZKE et al., 2020), *Commiphora gileadensis* (ALMULAIKY; AL-HARBI, 2019), *Ficus carica* (ELSAYED et al., 2018), *Artocarpus heterophyllus* (TAO et al., 2018), *Azadirachta indica* (PANDEY et al., 2017), *Panicum maximum* (CENTENO; SOLANO; CASTILLO, 2017), *Vigna radiata* (BASHA; PRASADA RAO, 2017), *Caralluma umbellata* (ACHAR et al., 2017).

As principais aplicações destas enzimas têm sido no tratamento de efluentes contaminados por corantes (BOUACEM et al., 2018; FRITZKE et al., 2020; JIN et al., 2018; ZHANG et al., 2018), compostos fenólicos (ELY et al., 2017, 2020; FERNANDES et al., 2020) e contaminantes emergentes (MORSI et al., 2020; VO et al., 2019), além da aplicação em biosensores, kits de diagnósticos (CENTENO; SOLANO; CASTILLO, 2017; DÍAZ NIETO et al., 2018; FEIZABADI et al., 2019; KAFI et al., 2018; THENMOZHI; NARAYANAN, 2017; WU, LONG et al., 2016) e em síntese orgânica e de polímeros (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009).

Ademais, destaca-se que fenóis são matéria-prima básica para diversos produtos tais como herbicidas, tintas, cosméticos e lubrificantes. Deste modo, compostos fenólicos podem estar presentes em efluentes de diversas indústrias, tais como: refinarias de petróleo, produção de fibra de vidro, têxteis e de produtos químicos (CAZA et al., 1999; VEERESH; KUMAR; MEHROTRA, 2005). Além dos efluentes produzidos por estes empreendimentos, os fenóis também podem ser encontrados em efluentes oriundos da fabricação de produtos farmacêuticos, plásticos, produtos de madeira e de papel e celulose (MOHAMMADI et al., 2015).

Os compostos fenólicos são poluentes orgânicos, com alto teor de toxicidade e que tendem a persistir e acumular-se no ambiente e na cadeia alimentar (VÍCTOR-ORTEGA; OCHANDO-PULIDO; MARTÍNEZ-FÉREZ, 2016). Evidencia-se que a presença de fenóis na água pode conduzir à formação de novos compostos durante processos de desinfecção e de oxidação (BUSCA et al., 2008). Alguns compostos de grande preocupação são os fenóis clorados, com destaque para o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), o qual também pode ser inserido no ambiente como um subproduto do ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), composto presente na composição de herbicidas utilizados em áreas de agricultura (YANG et al., 2017).

Em função da sua elevada toxicidade e baixa biodegradabilidade, quando presentes em efluentes, os fenóis exercem um efeito inibitório sobre os microrganismos nos processos convencionais de tratamento. Nesse sentido, muitos métodos vêm sendo estudados e empregados na remoção destes compostos de efluentes industriais. Algumas das tecnologias estudadas incluem processos como extração por solvente, oxidação química e separação por membrana (MOHAMMADI et al., 2015). No entanto, estes métodos têm desvantagens como alto custo, tempo de reação elevado e baixa eficiência devido à remoção incompleta dos fenóis (QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008).

Desta forma, o emprego de enzimas como as peroxidases se mostra uma alternativa em potencial, sobretudo devido sua alta especificidade relacionada aos substratos (VETAL; RATHOD, 2015). O uso destas enzimas para remover compostos fenólicos de soluções aquosas foi proposto pela primeira vez por Klivanov e Morris (1981) e, desde então, o método tem sido melhorado para maximizar fatores técnicos e econômicos, além de ser avaliado em efluentes de diversas origens e com uma gama bastante diversificada de compostos.

Um das enzimas com maior destaque neste cenário é a *Horseradish Peroxidase* (HRP), a qual tem sido aplicada com eficiência em uma ampla gama de efluentes industriais (NICELL et al., 1993; STANISAVLJEVIĆ; NEDIĆ, 2004; WANG et al., 2016). No entanto, devido ao seu alto custo, ainda é inviável para aplicação no tratamento de efluentes e peroxidases de diversas outras fontes vêm sendo estudadas (DEVA et al., 2014).

Neste sentido, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma planta com origem nos Andes (SANTANA; CARDOSO, 2008), mostra-se como uma alternativa promissora, uma vez que é de fácil cultivo, adaptável a condições climáticas diversificadas e que ganha espaço em diversas regiões do mundo devido a suas propriedades nutritivas e medicinais, sobretudo de suas raízes tuberosas (DE MOURA et al., 2012; GENTA et al., 2009; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011; PERUSSELLO et al., 2015).

A atividade de enzimas peroxidase em raízes de yacon já foi relatada em alguns estudos voltados a indústria alimentícia (NEVES; DA SILVA, 2007; PADILHA; ROLIM; OLIVEIRA, 2009). No entanto, estes trabalhos são direcionados à inibição das enzimas, visto que a oxidação de polifenóis presentes nas raízes pode gerar alterações oxidativas do sabor, cor, aroma e qualidade nutricional, o que é indesejável na produção de alimentos (CAMPOS; AGUILAR-GALVEZ; PEDRESCHI, 2016; FANTE et al., 2013). Diante disto, destaca-se que estudos voltados para a caracterização de peroxidases de casca yacon, direcionados para sua aplicação, são inexistentes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar enzima peroxidase da casca de raízes de yacon, bem como aplicar a enzima obtida na bioconversão de 2,4-diclorofenol em efluente sintético, com posterior avaliação do potencial toxicológico do efluente bruto e tratado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta pesquisa é extrair, caracterizar e avaliar o desempenho da peroxidase de casca de raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na bioconversão de compostos fenólicos em águas residuárias.

1.1.2 Objetivos específicos

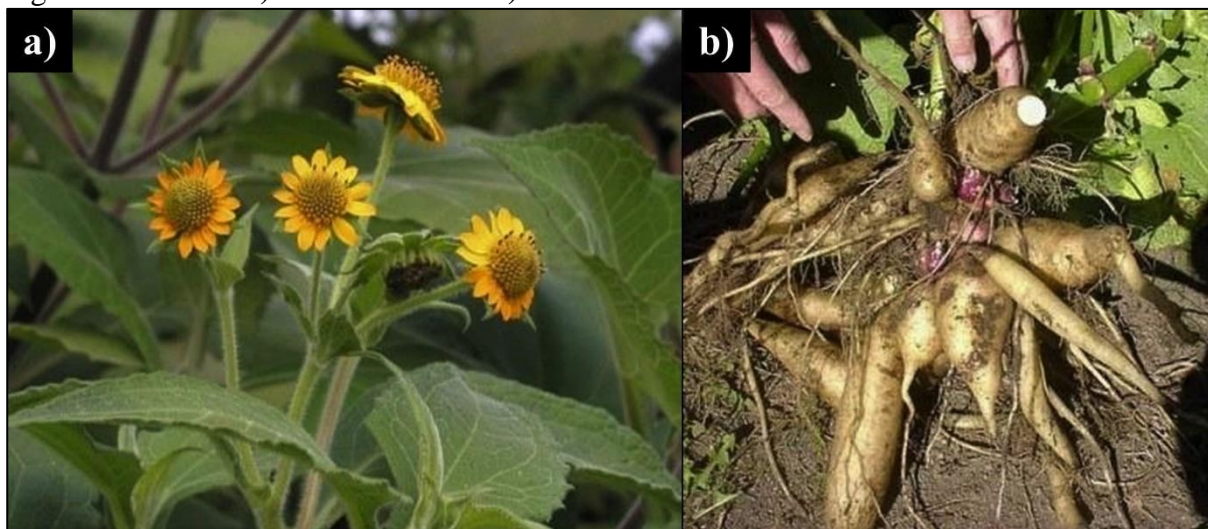
- a) obter as melhores condições de extração da enzima;
- b) caracterizar a enzima obtida para fins de comparação com proteínas avaliadas em outros trabalhos;
- c) obter as melhores condições de aplicação da peroxidase, examinando as principais variáveis do processo como pH, temperatura, tempo de reação, concentração de enzima, peróxido de hidrogênio, pirogalol e 2,4-diclorofenol.
- d) avaliar o potencial toxicológico de efluente fenólico antes e após submetido ao processo de tratamento utilizando peroxidase de casca de yacon.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

O yacon (Figura 1) pode ser caracterizado como uma espécie perene e herbácea com altura entre 1 e 2,5 metros (SEMINARIO; VALDERRAMA, 2003). Normalmente utiliza-se o nome yacon para designar a planta e/ou a sua raiz. Tem origem nos Andes, região de clima temperado e pode se desenvolver com frequência a partir da Colômbia e a Venezuela até o noroeste da Argentina (HERMANN; FREIRE; PAZOS, 1998).

Figura 1 – Yacon: **a)** flores e folhas e **b)** raízes.



Fonte: Portal de Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares (PPMAC). Batata-yacon. Disponível em: <http://www.ppmac.org/print/content/batata-yacon>. Acesso em: 25 abr. 2020.

A planta faz parte da família *Asteraceae* (*Compositae*) e seu nome científico é *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (SANTANA; CARDOSO, 2008). A Tabela 1 apresenta em síntese a classificação taxonômica da planta.

O yacon já é cultivado em muitos países fora dos Andes, como Paraguai, Estados Unidos, Eslováquia, China, Coreia e Taiwan (LACHMAN et al., 2004). No Brasil, foi introduzido no início dos anos 90 (MOSCATTO; FERREIRA; HAULY, 2004).

A planta mostra características como rusticidade e resistência a secas. Adapta-se bem ao clima, à altitude e aos tipos de solo. Sua alta resistência ao frio e à seca está relacionada à grande quantidade de carboidratos de reserva nos órgãos subterrâneos. Além disso, seus rizóforos contêm gemas que regeneram uma nova planta a cada ano, após o inverno (VILHENA; CÂMARA; KAKIHARA, 2000). Desta forma, pode ser cultivada com êxito no

Brasil. O yacon atinge sua maturidade fisiológica entre 6 e 10 meses após o plantio, período em que as flores iniciam a desabrochar. Este período depende, principalmente, da região de cultivo, sendo que em altitudes mais baixas a maturidade é adiantada (SANTANA; CARDOSO, 2008). A colheita das raízes de yacon comumente é realizada de 10 e 12 meses após o plantio, quando a planta apresenta sua parte aérea seca (OLIVEIRA; NISHIMOTO, 2004).

Tabela 1 – Classificação taxonômica do yacon.

Classificação Taxonômica	
Superreino	Eucariontes
Reino	<i>Plantae</i>
Sub-reino	Embriófita
Filo	Tracófito
Superclasse	Angiosperma
Classe	Dicotiledônea
Ordem	Asterales
Família	<i>Asteraceae (Compositae)</i>
Gênero	<i>Smallanthus</i>
Espécie	<i>Sonchifolius</i>

Fonte: Adaptado de Santana e Cardoso (2008).

As raízes de yacon são constituídas, sobretudo, por água. Outros componentes como açúcares, vitaminas, polifenóis e proteínas também são relatados (LACHMAN et al., 2004). Além disso, a presença de enzimas como as polifenoloxidasas e peroxidases é conhecida pela indústria alimentícia. Entretanto, quando se trata desse setor, os estudos são direcionados, com ênfase, para a inativação e não para o aproveitamento dessas enzimas, uma vez que podem interagir com os polifenóis presentes na raiz e causar seu escurecimento (FANTE et al., 2013; LAGO; NOREÑA, 2014). Kamimura (2006) caracterizou peroxidases de yacon. No entanto, seu estudo foi direcionado apenas para a polpa das raízes.

2.2 ENZIMAS PEROXIDASE E FONTES DE EXTRAÇÃO

As peroxidases (E.C.1.11.1.7 – peróxido de hidrogênio oxidoreduases) são enzimas amplamente encontradas na natureza. A especificidade relacionada aos substratos, propriedades multifuncionais e a disponibilidade de peroxidases justificam sua aplicação em vários processos analíticos, industriais e bioquímicos (VETAL; RATHOD, 2015).

Esta é uma das classes de enzimas que possui grande importância industrial uma vez que possui vasta aplicação no tratamento de efluentes, como na degradação de corantes e

compostos fenólicos, além da aplicação em kits de diagnósticos e no processamento de alimentos (BANSAL; KUMARI; KANWAR, 2012).

Peroxidasas são predominantemente proteínas heme, que utilizam peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos como co-substrato para oxidar uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (DEMARCHE et al., 2012). O grupo prostético ferriprotoporfirina IX é uma característica comum de todas as peroxidases heme. Este grupo consiste de quatro anéis pirrólicos ligados por pontes de metileno com ferro (III), como átomo central (DUNFORD; STILLMAN, 1976).

A enzima peroxidase que apresenta a utilização mais consolidada atualmente é a *Horseradish* Peroxidase, a qual é extraída da raiz forte. Entretanto, uma vez que esta enzima ainda tem sua utilização relacionada a um alto custo, diversas fontes alternativas vêm sendo estudadas (DEVA et al., 2014).

Nesse sentido, o Quadro 1 apresenta algumas das peroxidases caracterizadas ao longo das últimas décadas, bem como sua fonte de origem e características ótimas de pH e temperatura relacionadas a determinado substrato.

Quadro 1 – Fontes de enzimas peroxidase já estudadas e características das enzimas obtidas.
(continua)

Fonte	pH	Temp. (°C)	Substrato	K_m (mM)	Massa molecular (kDa)	Referência
Couve-flor	6,5	40	Guaiacol	3,1	-	(LEE; PENNESI; DICKSON, 1984)
<i>Hibiscus esculentus</i>	-	30-35	Guaiacol	-	-	(YEMENICIOĞLU; ÖZKAN; CEMEROĞLU, 1998)
<i>Solanum tuberosum L.</i>	4,5	40-60	Ácidos fenólicos	-	45,8	(BERNARDS et al., 1999)
<i>Elaeis guineensis Jacq.</i>	5	-	Guaiacol	3,96	48	(DEEPA; ARUMUGHAN, 2002)
<i>Coprinus</i>	7	-	Fenol	-	36	(IKEHATA et al., 2005)
<i>Trachycarpus fortunei</i>	5,5	-	Guaiacol	-	50	(CARAMYSHEV et al., 2006)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	9	30	Guaiacol	0,288	46,1	(SUZUKI et al., 2006)
<i>Olea europaea L.</i>	7	34,7	Fenol	41	18-20	(SARAIVA; NUNES; COIMBRA, 2007)
<i>Prunus persica L.</i>	-	-	4MN	0,39	-	(JIMÉNEZ-ATIÉNZA et al., 2007)
<i>Cynara scolymus L.</i>	-	-	Guaiacol	-	51	(CARDINALI et al., 2007)

Quadro 1 – Fontes de enzimas peroxidase já estudadas e características das enzimas obtidas.

(continuação)

Fonte	pH	Temp. (°C)	Substrato	K_m (mM)	Massa molecular (kDa)	Referência
<i>Fragaria vesca</i> L.	6	25	Guaiacol	18,18	-	(CHISARI; BARBAGALLO; SPAGNA, 2007)
<i>Capsicum annuum</i> L.	4,5	-	ABTS	0,495	-	(SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2008)
<i>Ipomoea carnea</i>	-	-	Pirogalol	1,63	42,06	(PATEL et al., 2008)
<i>Ricinus communis</i>	5	60	O-dianisidina	-	-	(KUMAR et al., 2008)
<i>Brassica rapa</i>	4	35	Fenol	-	-	(MOTAMED; GHAEMMAGHAMI; ALEMZADEH, 2009)
<i>Anabaena</i> sp.	4	35	Azul reativo 5	3,6	53	(OGOLA et al., 2009)
<i>Allium sativum</i> L.	4	-	4MN	0,17	37,8	(MARZOUKI et al., 2010)
<i>Brassica rapa</i>	5,5	-	TMB	0,045	45	(DALAL; GUPTA, 2010)
<i>Pallavicinia lyelli</i>	6	40	Ascorbato	-	28	(SAJITHA RAJAN; MURUGAN, 2010)
<i>Leucaena leucocephala</i>	5	55	Guaiacol	2,9	200	(PANDEY; DWIVEDI, 2011)
<i>Viscum angulatum</i>	7	-	Pirogalol	6,22	46,42	(DAS; SHARMA; MISHRA, 2011)
<i>Santalum album</i>	5	50	O-dianisidina	250	-	(KUMAR; KAMLE; SINGH, 2011)
<i>A. sativum</i> L.	5	25	Guaiacol	0,096	30	(EL ICHI et al., 2011)
<i>Mastocarpus stellatus</i>	5	25	ABTS	13	-	(FORTEA et al., 2011)
<i>L. sativa</i>	6-8,5	30	Guaiacol	0,33	-	(ALTUNKAYA; GÖKMEN, 2011)
<i>Moringa oleifera</i> L.	6	50	Guaiacol	0,2335	43	(KHATUN et al., 2012)
<i>Jatropha curcas</i>	5	60	Guaiacol	0,17	48	(CAI et al., 2012)
<i>Carica papaya</i> L.	5	50	OPD	2,8	69,4	(CHEN; CHUNG; CHANG, 2012)
<i>Streptomyces</i> sp.	5	80	2,4-DCP	-	60	(FODIL et al., 2012)
<i>Lens culinaris</i> L.	4-7	-	Guaiacol	32	18-52	(HIDALGO-CUADRADO et al., 2012)
<i>Cucurbita moschata</i> Lam. Poiret	7,5	50	Guaiacol	17,1	85	(KOKSAL et al., 2012)
<i>Zizania latifolia</i>	6	40	Guaiacol	10	20-22	(LUO et al., 2012)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	6	20	Guaiacol	0,958	46,8	(SUZUKI et al., 2012)

Quadro 1 – Fontes de enzimas peroxidase já estudadas e características das enzimas obtidas. (conclusão)

Fonte	pH	Temp. (°C)	Substrato	K_m (mM)	Massa molecular (kDa)	Referência
<i>Z. mays L. ssp. saccharata Sturt</i>	4,8	-	Guaiacol	11,01	-	(LIU et al., 2013)
<i>Persea americana Mill</i>	7	35	Pirogalol	0,45	40	(ROJAS-REYES et al., 2014)
<i>Camellia sinensis</i>	6,5	30	O-dianisidina	0,04	-	(SHAH; BORAH; YADAV, 2014)
<i>Carica papaya L.</i>	6	38	Pirogalol	0,027	50-55	(BARI et al., 2014)
Castanhas (Jiangsuluhe)	7	50	2-hidroxi fenol	49	30,3	(GONG et al., 2015)
<i>Brassica oleracea</i>	6,5	30	Guaiacol	3,19	73,2	(ERDEM et al., 2015)
<i>Euphorbia tirucalli</i>	6	50	Guaiacol	4,13	38,8	(SHUKLA; GUNDAMPATI; JAGANNADHAM, 2016)
<i>Azadirachta indica</i>	5	40	Guaiacol	3,33	50	(PANDEY et al., 2017)
<i>Triticum aestivum</i>	5,5	40	Guaiacol	2,467	38,8	(ALTIN et al., 2017)
<i>Manilkara zapota</i>	4,5-5	65	Guaiacol	22,3	20	(VISHWASRAO; CHAKRABORTY; ANANTHANARAYAN, 2017)
<i>Caralluma umbellata</i>	6,2	45	Guaiacol	0,63	42	(ACHAR et al., 2017)
<i>Vigna radiata</i>	5,5	-	O-dianisidina	1,28	50	(BASHA; PRASADA RAO, 2017)
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	5,5	55-60	Guaiacol	3,7	104	(TAO et al., 2018)
<i>Ficus carica</i>	5,5	40	O-fenilenodiamina	3,87	30	(ELSAYED et al., 2018)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

2.3 APLICAÇÃO DE ENZIMAS PEROXIDASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO COMPOSTOS FENÓLICOS

O uso destas enzimas para remover compostos fenólicos de soluções aquosas foi proposto pela primeira vez por Klivanov e Morris (1981) e, desde então, o método tem sido melhorado para maximizar fatores técnicos e econômicos, além de ser avaliado em efluentes de diversas origens e com uma gama bastante diversificada de compostos.

Autores como Cooper e Nicell (1996), por exemplo, avaliaram o uso de enzimas HRP no tratamento de efluentes de fundição. Em outro contexto, Al-Kassim et al. (1994), utilizando reatores em batelada aplicou peroxidases de *Coprinus macrorhizus* na bioconversão de diversos compostos fenólicos em meio aquoso, incluindo fenóis clorados, com eficiência superior a 99%. Já Wagner e Nicell (2001) propuseram uso de enzimas HRP no tratamento de efluentes fenólicos oriundos da indústria de papel e celulose.

Angelini et al. (2014) estudaram o uso de extratos obtidos a partir de raízes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin) na remoção de 2,4-diclorofenol de água. Os resultados iniciais indicaram bioconversão em torno de 75%. No entanto, os autores relatam que por meio da adição de polietilenoglicol (PEG) foi possível alcançar valores próximos a 92%. O mesmo comportamento é observado no trabalho de Deva et al. (2014), com peroxidases de couve-flor (*Brassica oleracea*). Este fato indica que o uso de PEG pode proporcionar maior proteção às peroxidases, o que tende a aumentar sua eficiência na bioconversão de compostos fenólicos.

Com relação ao aproveitamento de subprodutos, Kurnik et al. (2017) estudaram resíduos de polpa de batata como fonte de enzimas peroxidase para remoção de 2,4-diclorofenol de água e obtiveram resultados entre 95 e 98%. Lakshmi et al. (2018) por sua vez, avaliaram peroxidases extraídas de resíduos da produção de milho, como uma alternativa na remediação de efluentes fenólicos, e obtiveram eficiência superior a 90%. Os autores destacam que os resíduos são de fácil obtenção e têm potencial para utilização em escala industrial.

Singh et al. (2017), com uma nova perspectiva, visaram o uso de uma espécie invasora (*Prosopis juliflora*) para obtenção de enzimas peroxidase e posterior aplicação no tratamento de efluentes com espécies fenólicas. Os autores evidenciaram eficiência superior, na remoção de fenóis e clorofenóis, da enzima obtida com relação a HRP, em diferentes condições de operação. Observadas as diversas possibilidades de aplicação destaca-se, ainda, que o tratamento enzimático tem vantagens como a de gerar produtos polimerizados de baixa solubilidade, um alto grau de especificidade, pode operar sob condições leves e apresentar alta taxa de reação (KARAM; NICELL, 1997).

2.3.1 Avaliação toxicológica de efluentes tratados com auxílio de enzimas peroxidase

A germinação de sementes de plantas pode ser considerada um dos métodos mais simples e de curto prazo utilizados na avaliação da toxicidade geral de efluentes (HAQ; RAJ; MARKANDEYA, 2018). Neste sentido, a aplicação desses testes em efluentes contaminados por 2,4-DCP tratados por enzimas peroxidase é citada com bons resultados. Por exemplo,

Fernandes et al. (2020) utilizaram, no tratamento, peroxidase extraída de casca de soja e *Lactuca sativa* nos ensaios de toxicidade. Singh et al. (2017) utilizaram peroxidase de *Prosopis juliflora* e *Vigna mungo* como bioindicador. Kurnik et al. (2017) estudaram peroxidases de polpa de batata e a espécie *Lepidium sativum* na avaliação da toxicidade. Por fim, Angelini et al. (2014) aplicaram peroxidases extraídas de raízes de tabaco e tomate na remoção de 2,4-DCP e também *Lactuca sativa* na verificação de possíveis efeitos toxicológicos do efluente. Todos os trabalhos apresentaram redução da toxicidade e destacam a importância da avaliação toxicológica, no que diz respeito ao tratamento de efluentes.

Ademais, os ensaios com uso de plantas apresentam algumas vantagens sobre os testes que utilizam animais e microrganismos, sobretudo com relação ao custo e a velocidade dos resultados. Entre algumas das espécies mais utilizadas se destacam *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, principalmente pelo fácil manuseio, baixo custo, fácil aquisição e alta sensibilidade a produtos químicos. Além disso, o uso de *Allium cepa* proporciona avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade, sendo empregado para uma série de contaminantes (FISKESJÖ, G.; LASSEN; RENBERG, 1981; FISKESJÖ, GEIRID, 1985, 1988; HAQ *et al.*, 2017; HAQ; RAJ; MARKANDEYA, 2018).

3 USO DE CASCA DE RAÍZES DE YACON (*Smallanthus sonchifolius*) COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENZIMA PEROXIDASE

3.1 RESUMO

O yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se mostra como uma fonte promissora de enzimas peroxidase. É uma planta de fácil plantio, adaptável a condições climáticas diversificadas e que ganha espaço em distintas regiões do mundo, tendo seu cultivo voltado, sobretudo, para o aproveitamento de suas raízes. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar enzima peroxidase obtida da casca de raízes de yacon, com perspectivas para sua aplicação em processos industriais e na remediação ambiental. A purificação parcial por meio de um sistema de separação por duas fases aquosas resultou em um fator de purificação de 4,66 vezes, com recuperação de 33,87% da atividade enzimática. A enzima mostrou máxima atividade a 60 °C e pH 11, utilizando pirogallol como substrato padrão. A atividade enzimática reduziu significativamente quando incubada a 60 °C e 70 °C, mas se manteve estável a 50 °C por 60 minutos. Foi identificado que o mecanismo das reações segue um modelo de *Ping-Pong Bi-Bi*. A atividade enzimática se mostrou bastante sensível a variações da concentração de peróxido de hidrogênio, sendo a enzima fortemente inibida pelo excesso do substrato. Os íons metálicos Ba⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ (1 e 5 mM) não influenciaram significativamente a atividade da enzima, mas esta foi inibida por Cu²⁺ (5 mM) e sofreu ativação na presença de Co²⁺ (5 mM). A adição de PEG (4.000 e 6.000) não apresentou efeito significativo sobre a atividade enzimática. Quando armazenada, em temperatura ambiente (21,31 ± 1,22 °C) e sob refrigeração (-1,22 ± 0,74 °C), a solução enzimática parcialmente purificada apresentou estabilidade similar à solução de *Horseradish* peroxidase comercial. Os resultados sugerem que a peroxidase de casca de yacon apresenta potencial e pode ser uma alternativa a ser explorada em processos de biocatálise.

Palavras-chave: Yacon. Peroxidase. Purificação.

3.2 INTRODUÇÃO

As peroxidases (E.C.1.11.1.7) são predominantemente proteínas heme que utilizam peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos como aceptor de elétrons na catálise da oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (DEMARCHE et al., 2012;

ELSAYED et al., 2018; PANDEY et al., 2017). Estas enzimas são classificadas em duas famílias principais (vegetal e animal) e sua massa molecular pode variar de 30 a 150 kDa (ELSAYED et al., 2018).

Diversas peroxidases de fontes vegetais, pertencentes à classe III, vêm sendo caracterizadas e tendo sua aplicação estudada, uma vez que a especificidade relacionada aos substratos e as propriedades multifuncionais dessas enzimas justificam sua aplicação em vários processos analíticos, industriais e bioquímicos (VETAL; RATHOD, 2015). Entre algumas das fontes de peroxidases já mencionadas na literatura, por exemplo, pode-se citar: *Cedrela fissilis* (FRITZKE et al., 2020), *Commiphora gileadensis* (ALMULAIKY; AL-HARBI, 2019), *Ficus carica* (ELSAYED et al., 2018), *Artocarpus heterophyllus* (TAO et al., 2018), *Azadirachta indica* (PANDEY et al., 2017), *Panicum maximum* (CENTENO; SOLANO; CASTILLO, 2017), *Vigna radiata* (BASHA; PRASADA RAO, 2017), *Caralluma umbellata* (ACHAR et al., 2017).

As principais aplicações destas enzimas têm sido no tratamento de efluentes contaminados por corantes (BOUACEM et al., 2018; FRITZKE et al., 2020; JIN et al., 2018; ZHANG et al., 2018), compostos fenólicos (ELY *et al.*, 2017, 2020; FERNANDES et al., 2020) e contaminantes emergentes (MORSI et al., 2020; VO et al., 2019), além da aplicação em biosensores, kits de diagnósticos (CENTENO; SOLANO; CASTILLO, 2017; DÍAZ NIETO et al., 2018; FEIZABADI et al., 2019; KAFI et al., 2018; THENMOZHI; NARAYANAN, 2017; WU, LONG et al., 2016) e em síntese orgânica e de polímeros (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Destaca-se ainda que enzima peroxidase que apresenta a utilização mais consolidada atualmente é a *Horseradish Peroxidase*, a qual é extraída da raiz forte. Entretanto, uma vez que esta enzima ainda tem sua utilização relacionada a aplicações de alto valor agregado, se justifica o estudo de fontes alternativas (DEVA et al., 2014).

Neste sentido, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma planta com origem nos Andes (SANTANA; CARDOSO, 2008), mostra-se como uma alternativa promissora, uma vez que é de fácil cultivo, adaptável a condições climáticas diversificadas e que ganha espaço em diversas regiões do mundo devido a suas propriedades nutritivas e medicinais, sobretudo de suas raízes tuberosas (DE MOURA et al., 2012; GENTA et al., 2009; OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011; PERUSSELLO et al., 2015).

A atividade de enzimas peroxidase em raízes de yacon já foi relatada em alguns estudos voltados a indústria alimentícia (NEVES; DA SILVA, 2007; PADILHA; ROLIM; OLIVEIRA, 2009). No entanto, estes trabalhos são direcionados à inibição das enzimas, visto que a oxidação de polifenóis presentes nas raízes pode gerar alterações oxidativas do sabor, cor, aroma e

qualidade nutricional, o que é indesejável na produção de alimentos (CAMPOS; AGUILAR-GALVEZ; PEDRESCHI, 2016; FANTE et al., 2013). Diante disto, destaca-se que estudos voltados para a caracterização de peroxidases de casca yacon, direcionados para sua aplicação, são inexistentes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar enzima peroxidase obtida da casca de raízes de yacon, com perspectivas para sua aplicação em processos industriais e de remediação ambiental.

3.3 MATERIAL E METÓDOS

3.3.1 Materiais

Raízes de yacon frescas (*Smallanthus sonchifolius*) foram adquiridas de comerciantes locais no município de Lages, Santa Catarina (Brasil) e armazenadas sob refrigeração (-10 °C) até o uso. A enzima HRP foi adquirida da Toyobo (Brasil) e todos os demais reagentes citados nas etapas subsequentes foram de grau analítico.

3.3.2 Obtenção do extrato bruto

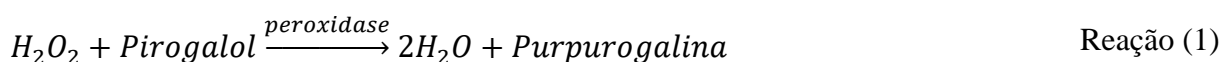
Inicialmente, as raízes de yacon foram lavadas com água destilada, cortadas e descascadas. Para extração de proteínas, 100 g de casca de yacon foram homogeneizados com 100 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,0 (100 mM) em equipamento tipo *mixer* durante 5 min. O extrato foi filtrado, com auxílio de bomba a vácuo, utilizando papel filtro (Whatman nº 1) e uma camada de gaze de algodão para remover partículas sólidas em suspensão (KHAN et al., 2019). Em seguida, 0,05% (m/v) de polivinilpirrolidona (PVPP) foi adicionada ao filtrado (DEVA et al., 2014), com agitação constante em banho de gelo durante 30 min. Na sequência, a solução foi centrifugada com rotação de 4.000 rpm (2.150 x g) durante 20 min para remoção do material insolúvel.

3.3.3 Determinação da concentração de proteínas e atividade da peroxidase

A determinação da concentração de proteína total no extrato bruto realizada de acordo com o método de Bradford (1976), com o uso do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Foi utilizado como padrão albumina do soro bovino (BSA). As leituras foram realizadas no

comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro UV-vis (Merck; Modelo Pharo 300). A concentração foi expressa em mg/mL.

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com o protocolo de Chance e Maehly (1955), utilizando pirogalol como substrato padrão. O sistema reacional (3 mL) foi constituído de 2,05 mL de água ultrapura, 0,32 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6), 0,16 mL de solução peróxido de hidrogênio (0,5%) e 0,32 mL de solução pirogalol (5%). Esta solução foi incubada em 20 °C até atingir o equilíbrio térmico. Após, adicionou-se 0,15 mL do extrato enzimático, a amostra foi agitada com auxílio de equipamento tipo *vortex* e, imediatamente, conduzida para leitura da absorbância (420 nm) em espectrofotômetro UV-vis (Merck; Modelo: Pharo 300). De acordo com o protocolo, uma unidade de peroxidase (U) é a quantidade de enzima responsável por catalisar a formação de 1,0 miligrama de purpurogalina a partir de pirogalol em 20 s, pH 6,0 e temperatura de 20 °C (Reação 1).



Para cada ensaio foi realizado um teste em branco, no qual foi utilizado 0,15 mL de tampão em substituição ao extrato enzimático. A variação de absorbância registrada neste teste foi utilizada no cálculo da atividade, conforme demonstrado na Equação (1).

$$\text{Atividade} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta A_{420}}{20 \text{ s}} \text{ teste} - \frac{\Delta A_{420}}{20 \text{ s}} \text{ branco} \right) V_{\text{ensaio}}}{12 * V_{\text{enzima}}} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, V_{ensaio} representa o volume total do ensaio (3 mL) e V_{enzima} se refere ao volume de extrato enzimático utilizado (0,15 mL). ΔA_{420} é a variação da absorbância registrada no comprimento de onda de 420 nm e 12 é o coeficiente de extinção com base em mg/mL de purpurogalina.

3.3.4 Purificação parcial da peroxidase de casca de yacon (YPP)

3.3.4.1 Purificação parcial via precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto foi mantido sob agitação e levado a 80% de saturação (0 °C) pela adição gradual de sulfato de amônio sólido (ALMULAIKY; AL-HARBI, 2019). Em seguida, a solução

foi centrifugada a 4.000 rpm (2.150 x g) por 20 min. O sobrenadante foi removido, a fração sedimentada foi novamente posta em suspensão em tampão fosfato de potássio pH 7,0 (100 mM) e posteriormente conduzida para diálise.

3.3.4.2 Purificação parcial via particionamento em três fases (TPP)

O procedimento foi executado de acordo com o descrito por Vetal e Rathod (2015). Em um recipiente de vidro com capacidade aproximada de 100 mL foram adicionados extrato bruto e *t*-butanol, na razão de 1:1,5 (v/v), e sulfato de amônio (50% m/v). A solução foi mantida sob agitação por 80 min, com o auxílio de barra e agitador magnético, à temperatura de 28 ± 2 °C. A mistura foi centrifugada a 4.000 rpm (2.150 x g) por 20 min, para facilitar a separação das fases, e transferida para um funil de separação por mais uma hora. Três fases distintas foram observadas após a separação no funil. A fase inferior, a qual contém maior atividade de enzimas peroxidase (VETAL; RATHOD, 2015), foi coletada e conduzida para diálise.

3.3.4.3 Extração via particionamento em três fases (TPP) utilizando pó de casca de yacon

Esta etapa foi realizada conforme metodologia proposta por Panadare e Rathod (2017). Inicialmente, a casca de yacon foi seca em estufa a 40 °C por 24 h. Depois de removida a umidade, a casca foi triturada em *mixer* e peneirada. O tamanho médio de partícula obtido foi de 0,225 mm.

O particionamento foi realizado em um recipiente de vidro com capacidade aproximada de 100 mL. Nele foram adicionados pó de casca de yacon (0,15 g/mL), dimetilcarbonato e água, em uma razão de 0,75:1 (v/v), e citrato de sódio a 20% (m/v). A mistura dos componentes foi mantida em suspensão por 3 h, com o auxílio de barra e agitador magnético, à temperatura de 28 ± 2 °C. Posteriormente a mistura foi separada por centrifugação durante 20 min a 4.000 rpm (2.150 x g). A fase inferior foi coletada e conduzida para diálise.

3.3.4.4 Purificação parcial utilizando sistema de duas fases aquosas (ATPS – polímero/sal)

Com o intuito de remover os compostos indesejáveis e concentrar o extrato bruto foi utilizado um sistema de duas fases aquosas, de acordo com o relatado por Khan et al. (2019). Conforme a metodologia, 14% (m/v) de polietilenoglicol sólido (PEG 6.000) e 10% (m/v) de sulfato de amônio sólido ((NH₄)₂SO₄) foram adicionados ao extrato bruto. A mistura foi

mantida sob agitação (4 °C) até a completa dissolução do PEG e depois transferida para um funil de separação durante 24 h a 4 °C. As fases superior e inferior foram separadas. A fase inferior, que contém peroxidase (KHAN et al., 2019), foi centrifugada (4.000 rpm (2.150 x g)) por 20 min, o sobrenadante clarificado foi coletado e conduzido para diálise.

3.3.4.5 Diálise

Todas as amostras coletadas, citadas nos tópicos anteriores, foram dialisadas contra tampão fosfato de potássio pH 7,0 (100 mM) por cerca de 12 h a 4 °C, alterando o tampão por três vezes (PANDEY et al., 2017) e, em seguida, analisadas quanto à concentração de proteínas e atividade enzimática.

3.3.4.6 Eletroforese

Para cada uma das metodologias supracitadas, o extrato parcialmente purificado foi submetido a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) com gel 12% (separação) e 4% (concentração) por aproximadamente 1,5 h (220 V, 70 mA). As proteínas foram coradas com corante *Coomassie Blue R-250*.

3.3.4.7 Avaliação dos processos de purificação parcial

A avaliação dos processos de purificação parcial se deu por meio da verificação da atividade específica, nível de recuperação da atividade enzimática e o fator de purificação da enzima, conforme as equações 2, 3, e 4 respectivamente.

$$\textit{Atividade específica}_{(U/mg)} = \frac{\textit{Atividade enzimática total (U)}}{\textit{Proteína total (mg)}} \quad \text{Equação (2)}$$

$$\textit{Recuperação}_{(\%)} = \frac{\textit{Ativ. enz. no extrato purificado (U)}}{\textit{Ativ. enz. no extrato bruto (U)}} * 100 \quad \text{Equação (3)}$$

$$\textit{Fator de purificação} = \frac{\textit{Ativ. específica purificado}_{(U/mg)}}{\textit{Ativ. específica bruto}_{(U/mg)}} \quad \text{Equação (4)}$$

3.3.5 Influência do pH na atividade enzimática da YPP

Para verificar a influência do pH na atividade enzimática, relativa ao substrato pirogalol, utilizou-se tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1 M / fosfato de sódio 0,2 M) para os pHs de 2,6 a 8 e tampão glicina de Sorensen (glicina 0,1 M / cloreto de sódio 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M) para os pHs entre 10 e 13. As medidas de atividade foram realizadas em triplicata, juntamente com a análise de uma prova em branco, devido a possibilidade de auto oxidação do pirogalol em pHs alcalinos (GAO et al., 1998), para que posteriormente o valor fosse corrigido. A maior atividade foi considerada como 100% e os demais resultados expressos em termos de atividade relativa (%).

3.3.6 Efeito da temperatura e avaliação da estabilidade térmica da YPP

O efeito da temperatura foi determinado incubando a mistura de ensaio de atividade a 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 °C até que atingisse o equilíbrio térmico. Após, foi inserido o extrato enzimático e imediatamente realizada a leitura da atividade, conforme descrito no tópico 3.3.3.

A estabilidade térmica da YPP foi verificada incubando alíquotas de enzimas a 50, 60 e 70 °C por 60 min e, em intervalos de 10 min, a atividade enzimática remanescente foi determinada (PANDEY et al., 2017).

3.3.7 Efeito da concentração dos substratos na atividade enzimática e caracterização do mecanismo cinético

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$), relativas ao pirogalol e ao H_2O_2 , foram utilizados os modelos de Michaelis-Menten (Equação 5), inibição incompetitiva por excesso de substrato (Equação 6) e inibição mista (Equação 7), com o auxílio do *software* SigmaPlot 14.0 (Systat). Para tal, foram determinadas as velocidades iniciais de reação (V_0), conforme item 3.3.3, para diferentes concentrações de pirogalol (1,04; 2,08; 4,16; 8,32; 20,8; 41,6 e 83,20 mM) em concentrações fixadas de H_2O_2 (0; 2,08; 4,16; 20,8; 41,6; 104; 208 e 416 mM). Além disso, avaliou-se o mecanismo cinético da enzima, tendo como base um modelo de *Ping-Pong* Bi-Bi (Equação 8).

$$V_{0(mM/min)} = \frac{V_{m\acute{a}x} * [A]}{K_m + [A]} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (5)}$$

$$V_{0(mM/min)} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m/[A] + 1 + [A]/K_i} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (6)}$$

$$V_{0(mM/min)} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{\left(K_m/[A]\right) * \left(1 + [I]/K_i\right) + \left(1 + [I]/K'_i\right)} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (7)}$$

$$V_{0(mM/min)} = \frac{V_{m\acute{a}x} * [A] * [B]}{K_b * [A] + K_a * [B] + [A] * [B]} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (8)}$$

Onde, $[A]$ e $[B]$ representam as concentra\c{c}\~{o}es de substrato, K_a e K_b s\~{a}o as constantes de Michaelis-Menten para os dois substratos distintos, $[I]$ representa a concentra\c{c}\~{a}o do inibidor, K_i \c{e} a constante de equil\~{b}rio da liga\c{c}\~{a}o do inibidor e K'_i \c{e} a constante de equil\~{b}rio para a liga\c{c}\~{a}o do inibidor ao complexo enzima-substrato.

3.3.8 Efeito de \~{i}ons met\~{a}licos na atividade da YPP

O efeito de diferentes \~{i}ons met\~{a}licos como Ba^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} na peroxidase parcialmente purificada foi verificado pela determina\c{c}\~{a}o da atividade enzim\~{a}tica, seguindo o protocolo 3.3.3, ap\~{o}s incuba\c{c}\~{a}o da enzima por 15 min (TAO et al., 2018) com concentra\c{c}\~{o}es de 1 e 5 mM dos respectivos \~{i}ons. A atividade enzim\~{a}tica determinada e um teste controle, sem a presen\c{c}\~{a}a de \~{i}ons met\~{a}licos na solu\c{c}\~{a}o, foi considerada como 100% e os demais resultados expressos em termos de atividade relativa (%).

3.3.9 Influ\~{e}ncia do polietilenoglicol (PEG) na atividade enzim\~{a}tica

Para determinar o efeito da adi\c{c}\~{a}o de PEG na cat\~{a}lise enzim\~{a}tica da peroxidase de casca de yacon, a atividade enzim\~{a}tica foi determinada com a adi\c{c}\~{a}o de PEG (4.000 e 6.000) em diferentes dosagens (0, 25, 50, 100, 250 e 500 mg/L). A atividade da amostra sem adi\c{c}\~{a}o de PEG foi considerada como 100% e os demais resultados expressos em termos de atividade relativa (%).

3.3.10 Estocagem do extrato enzimático

De modo a avaliar a capacidade de estocagem do extrato enzimático obtido, alíquotas com aproximadamente 1 U/mL foram armazenadas sob temperatura ambiente ($21,31 \pm 1,22$ °C) e sob refrigeração ($-1,22 \pm 0,74$ °C) por um período de duas semanas. Durante este período, em intervalos predeterminados, verificou-se a atividade enzimática remanescente na solução. Analogamente, o mesmo procedimento foi realizado para uma solução preparada com enzima HRP comercial (Toyobo do Brasil), também com concentração de 1 U/mL. A atividade lida no primeiro dia de experimento foi tomada como 100% e os resultados subsequentes apresentados como atividade relativa.

3.3.11 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores foram analisados por ANOVA fator único e teste de Tukey com 95% de confiança, com auxílio do software Statistica 12.0 (StatSoft). Os dados relacionados à modelos de cinética enzimática foram analisados por meio do software SigmaPlot 14.0 (Systat), com emprego da ferramenta *Enzyme Kinetics Wizard*.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Purificação parcial da YPP

O emprego de diferentes processos na purificação parcial da peroxidase de casca de yacon teve o intuito verificar um método que possibilitasse gerar um extrato enzimático com o mínimo de etapas de purificação possível e com características que o tornem aplicável em atividades que não necessitem de uma enzima com alto grau de pureza como, por exemplo, a remediação ambiental. Essa intensificação do processo de extração pode ser útil na redução de custos (PANADARE, DHANASHREE; RATHOD, 2018) e o emprego de metodologias como particionamento em três fases e sistemas de particionamento em duas fases aquosas vem sendo bem sucedido na extração e purificação parcial de diversas enzimas (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017; PANADARE, DHANASHREE; RATHOD, 2018).

Destaca-se que o extrato bruto apresentou coloração bastante escura, possivelmente devido oxidação de polifenóis presentes na casca. Esta oxidação aparentemente teve início com

a retirada da casca da raiz e sugere também a ação de enzimas polifenoloxidasas, com consequente formação de *o*-quinonas (NEVES; DA SILVA, 2007). Apesar do uso de PVPP na obtenção do extrato bruto, para precipitar polifenóis, a solução se manteve demasiadamente escura. Este fato pode também ter relação com à grande presença de materiais lignocelulósicos na casca de raízes de yacon. Pereira et al. (2013) relatam que em base seca a casca é composta por aproximadamente 54% de fibra alimentar, a qual corresponde a uma mistura de substâncias orgânicas complexas remanescentes de células vegetais que incluem hemiceluloses, celulosas, ligninas, pectinas, gomas e oligossacarídeos não digeríveis.

O extrato obtido por meio da precipitação por sulfato de amônio, além das proteínas, aparentou concentrar muitas das impurezas existentes no extrato bruto. Esta hipótese é reforçada pela coloração escura apresentada pela solução e pelo fato da precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não ser uma técnica seletiva (PANADARE, DHANASHREE; RATHOD, 2018). Apesar disso, foi observada razoável recuperação da atividade enzimática e purificação, no que se trata de *salting out* (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Tao et al. (2018), com recuperação de 78,90% e fator de purificação de 2,3, e Pandey et al. (2017) com recuperação de 72,56% e fator de purificação de 2,04, ambos trabalhando com extratos de peroxidase vegetal.

O processo de TPP também gerou um extrato parcialmente purificado de coloração escura. Além disso, os níveis de recuperação e purificação sugerem que o processo pode ser otimizado, visto que sofre influência de diversos fatores como concentração de solvente e sal, tempo de reação, pH, temperatura e agitação do meio reacional (NARAYAN; MADHUSUDHAN; RAGHAVARAO, 2008; VETAL; RATHOD, 2015).

Tabela 2 – Purificação parcial da peroxidase de casca de yacon por diferentes métodos.

Amostra	Ativ. total (U)	Proteína total (mg)	Ativ. específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	31,00	85,00	0,36	100,00	1,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80%)	23,10	34,10	0,68	74,52	1,88
TPP	17,75	16,00	1,11	57,26	3,08
TPP (pó)	0,11	0,30	0,37	-	-
ATPS	10,50	6,25	1,68	33,87	4,66

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Em condições otimizadas Vetal e Rathod (2015) obtiveram bons resultados ao utilizar o processo de TPP na biosseparação de peroxidase de cascas de laranja (*Citrus sinensis*), com

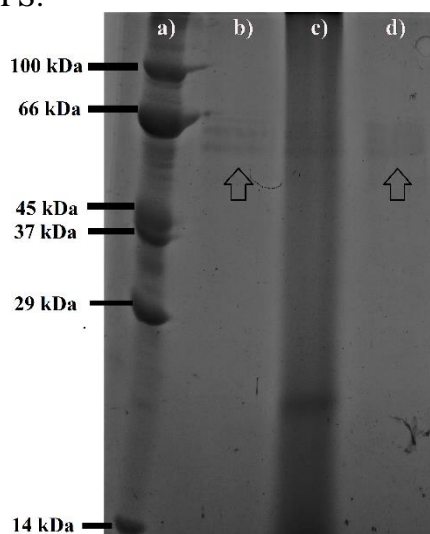
um fator de purificação de 18,20 vezes e 93,96% de recuperação da atividade. Já Narayan, Madhusudhan e Raghavarao (2008) relataram 81% de recuperação e purificação de 18 vezes para peroxidases de *Ipomoea palmata*.

O processo de TPP utilizando o pó da casca de yacon não se trata de uma purificação parcial do extrato bruto, mas sim de uma extração direta. Desta forma, na Tabela 2, não foram apresentados os níveis de recuperação e o fator de purificação para esta metodologia. Salienta-se que a atividade específica obtida ao se utilizar desse método foi similar à do extrato bruto. No entanto, o extrato se apresentou distintamente clarificado, o que indica a ausência das impurezas presentes nas soluções citadas anteriormente. Apesar disso, quando comparado proporcionalmente ao extrato bruto, apresentou resultados inferiores em termos de atividade total e proteína total. Isso pode sugerir que a migração da proteína do pó para a solução não foi eficiente. Consideradas as variáveis que influenciam no processo, o uso de TPP pode vir a ser interessante para a purificação parcial da YPP. Ademais, apresenta resultados favoráveis mesmo em temperatura ambiente (PANADARE, DHANASHREE C.; RATHOD, 2017), o que pode tornar sua aplicação mais rápida e de menor custo.

O processo de ATPS foi o que garantiu um extrato parcialmente purificado com atividade específica superior aos demais e com maior fator de purificação. Além disso, o extrato se apresentou bastante clarificado, assim como TPP (pó). Desta forma, a técnica de ATPS foi selecionada para purificação parcial da YPP e prosseguimento do trabalho. De acordo com Nadar, Pawar e Rathod (2017), este processo, também baseado em sistemas polímero/sal, vem sendo empregado para purificação de uma série de enzimas e tem alcançado fatores de purificação de até 123,89 vezes, com taxas de recuperação superiores a 90%.

Por fim, destaca-se que o extrato bruto e o extrato parcialmente purificado por *salting out* não foram utilizadas na eletroforese devido à grande presença de impurezas nas amostras. No extrato parcialmente purificado por TPP, apesar de apresentar melhores características que os anteriores, ainda foi notável um alto nível de impurezas conforme pode ser observado na Figura 2-c. Já para os processos de TPP (pó) (Figura 2-b) e ATPS (Figura 2-d) é possível constatar a maior pureza dos extratos. Além disso, para ambos, são visíveis bandas próximas a 66 kDa o que condiz com peroxidases de outras fontes como de *Carica papaya L.* com 69,4 kDa (CHEN; CHUNG; CHANG, 2012), *Streptomyces sp.* com 60 kDa (FODIL *et al.*, 2012) e *Brassica oleracea* com 73,2 kDa (ERDEM *et al.*, 2015).

Figura 2- Imagem do gel obtido pela SDS-PAGE para diferentes amostras: **a)** marcador, **b)** TPP (pó), **c)** TPP e **d)** ATPS.



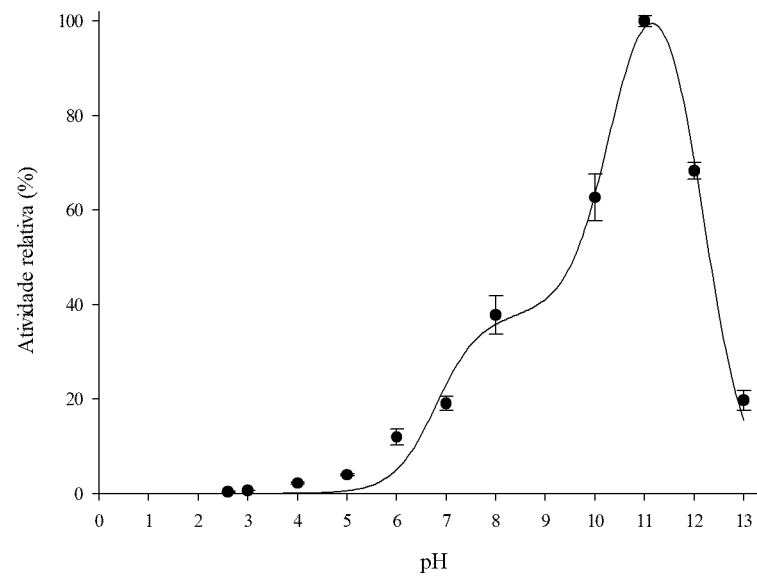
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.4.2 Efeito do pH na atividade da YPP

Os resultados do efeito do pH na atividade da YPP são apresentados na Figura 3. Destaca-se que a máxima atividade obtida para o substrato pirogalol foi no pH 11, com atividade relativa superior a 60% nos pHs 10 e 12. Este é um resultado atípico quando comparado a muitas outras peroxidases, em que o pH ótimo se situa próximo a neutralidade. Por exemplo, peroxidases de *Viscum angulatum* (DAS; SHARMA; MISHRA, 2011) e *Persea americana Mill* (ROJAS-REYES et al., 2014) obtiveram melhor atividade em pH 7 e peroxidases extraídas de *Carica papaya L* (BARI et al., 2014) em pH 6, todas tendo pirogalol como substrato padrão nos ensaios. Ely et al. (2017), também usando pirogalol como substrato, ao avaliar uma enzima *Horseradish* peroxidase comercial observou maior atividade enzimática em pH 7. Contudo, ao aplicar a enzima na bioconversão de compostos fenólicos, em um efluente real, o pH ótimo encontrado para a reação foi de 6,32.

Além disso, casos de peroxidases com alta atividade em pHs alcalinos já foram relatados. Suzuki et al. (2006) ao estudarem peroxidases de sementes de *Fagopyrum esculentum* constataram que o pH ótimo, utilizando guaiacol como substrato, foi de 9. Al-Kassim et al. (1994) ao avaliarem peroxidases de *Coprinus macrorhizus*, verificaram pH ótimo de 9 para a bioconversão de fenol, 2-clorofenol e 2,4-diclorofenol e pH ótimo entre 9 e 10 para bioconversão de 3-clorofenol e 4-clorofenol.

Figura 3 – Efeito do pH na atividade enzimática de YPP.



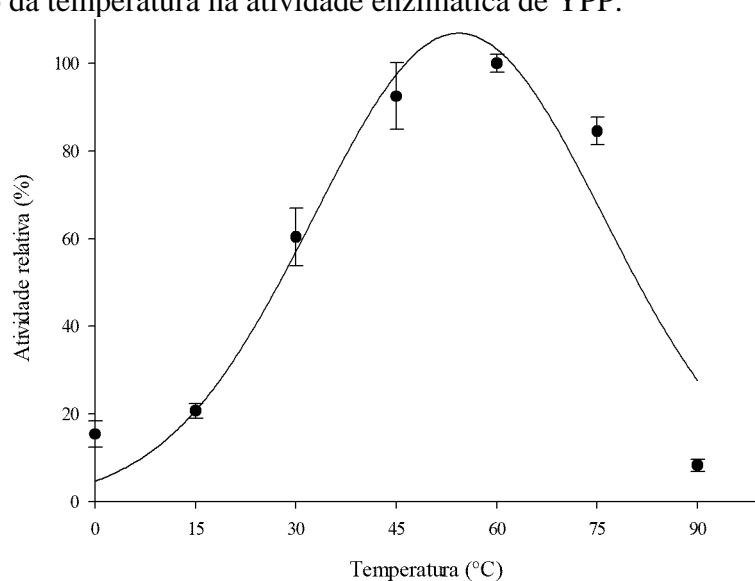
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.4.3 Efeito da temperatura e estabilidade térmica

A máxima atividade da YPP foi observada em 60 °C (Figura 4), com atividade relativa superior a 50% no intervalo de 30 a 75 °C. Esta mesma temperatura foi encontrada por Cai et al. (2012) e Kumar et al. (2008), ao caracterizarem peroxidases extraídas de *Jatropha curcas* e *Ricinus communis*, respectivamente. Para as peroxidases extraídas de *Persea americana Mill* (ROJAS-REYES et al., 2014) e *Carica papaya L* (BARI et al., 2014), utilizando pirogalol como substrato, as temperaturas ótimas relatadas foram de 35 e 38 °C, respectivamente. Já Ely et al. (2017), relata 50 °C para a HRP também com pirogalol como substrato padrão.

A gama de temperatura é bastante diversificada entre algumas das peroxidases já caracterizadas como 20 °C para peroxidase de *Fagopyrum esculentum* (SUZUKI et al., 2012) e 80 °C para peroxidases de *Streptomyces sp.* (FODIL et al., 2012). Deste modo, se ressalta que a variabilidade relacionada a temperatura pode ser atribuída em grande parte à estrutura enzimática específica de cada enzima (BOUACEM et al., 2018).

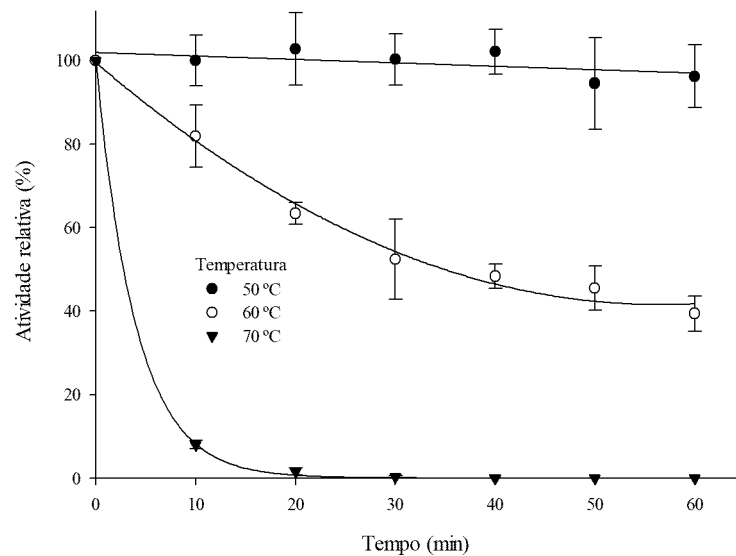
Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade enzimática de YPP.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Além disso, verificou-se que a enzima foi estável a 50 °C durante incubação de 60 min. A 60 °C, manteve 39,42% da atividade ao término do período e a 70 °C, com 10 min de incubação, apresentava apenas 8,02% de atividade remanescente, com total inativação no fim dos 60 min (Figura 5). Isto indica que mesmo a enzima apresentando boa eficiência catalítica em 60 e 75°C, no que se trata de velocidade inicial de reação, quando exposta a estas temperaturas por períodos maiores tem sua estrutura conformacional desfavorecida para a catálise da oxidação do pirogalol. Isto se deve ao fato de que esta estrutura é termossensível e se desestabiliza a alta temperatura, o que causa desnaturação. Esse processo se opõe à aceleração da velocidade da reação e é responsável por seu declínio em temperaturas mais elevadas. Destaca-se que, com a enzima testada imediatamente a uma temperatura moderada de desnaturação, sua atividade pode ser consideravelmente maior do que se for mantida na mesma temperatura por mais tempo antes de iniciar o ensaio (BISSWANGER, 2014). Desta forma, apesar da máxima velocidade inicial ter sido registrada em 60 °C, a aplicação da enzima se limita a processos que não ultrapassem os 50 °C.

Figura 5 – Estabilidade térmica da YPP a 50, 60 e 70 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

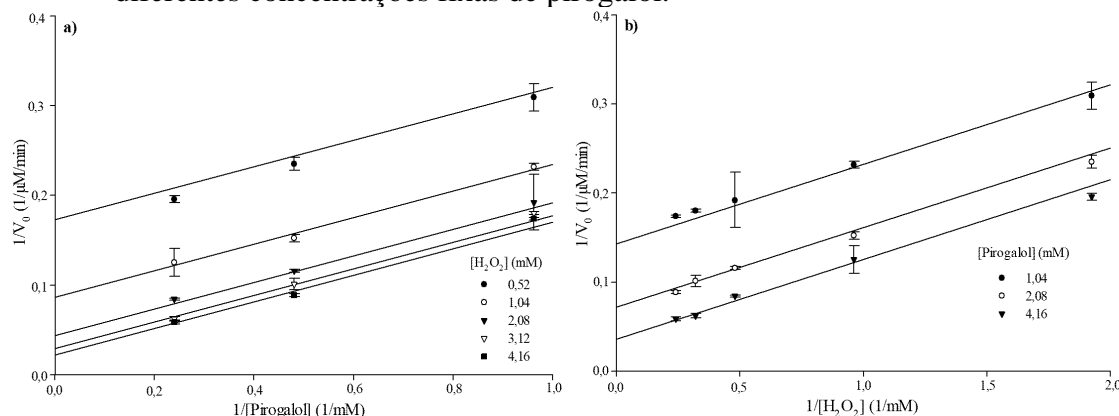
Comportamento similar foi relatado por Mogharrab, Ghourchian e Amininasab (2007) com a enzima HRP, a qual teve 96,4% de perda de atividade a 70 °C em 10 min. No mesmo sentido, Lavery et al. (2010) observaram máxima atividade em 30 °C para a HRP, no entanto a enzima desnaturou rapidamente em temperaturas superiores a 42 °C. Liu et al. (2006) relataram que a HRP retinha apenas cerca de 30% de atividade a 50 °C após 3 h de incubação. Por último, Khan et al. (2019) analisaram analogamente a peroxidase extraída de *Phoenix dactylifera* com a HRP e destacaram que a peroxidase em processo de caracterização permaneceu razoavelmente estável à temperatura de 75 °C durante 60 min, enquanto a HRP teve considerável perda de atividade (> 90%) nas mesmas condições. Estes resultados sugerem que a YPP apresenta termoestabilidade equivalente ou superior a HRP, uma enzima que tem seu uso consolidado em diversos processos, e pode vir a ser uma alternativa viável no campo da biocatálise.

Também se salienta que peroxidases recentemente caracterizadas vêm apresentado resultados promissores no que diz respeito a estabilidade térmica. Como exemplo se tem a peroxidase de *Artocarpus heterophyllus* que, de acordo com Tao et al. (2018), manteve a atividade sem redução significativa durante um tratamento de 60 min a 65 °C. Similarmente, Pandey et al. (2017) mostraram que a peroxidase de *Azadirachta indica* foi estável a 65 °C por 60 min e Elsayed et al. (2018) relataram peroxidases extraídas de *Ficus carica* termoestáveis a 50 °C.

3.4.4 Influência dos substratos e caracterização do mecanismo cinético

Em um sistema enzimático de dois substratos, dois mecanismos gerais são possíveis para descrever as interações entre enzima e substrato: sequenciais ou *Ping-Pong* (GALENDE et al., 2015). De acordo com a Figura 6, os gráficos de duplos-recíprocos das taxas iniciais de oxidação de pirogalol da YPP, em concentrações não inibitórias dos substratos, proporcionaram um conjunto de linhas aproximadamente paralelas, o que sugere um mecanismo de *Ping-Pong* Bi-Bi (NELSON; COX, 2001; VOET; VOET, 1995). Além disso, o ajuste do modelo aos dados experimentais apresentou um R^2 igual a 0,98062, o que reforça essa hipótese.

Figura 6 – Gráficos de Lineweaver-Burk para: **a)** variação da concentração de pirogalol em diferentes concentrações fixas de H_2O_2 e **b)** variação da concentração de H_2O_2 para diferentes concentrações fixas de pirogalol.



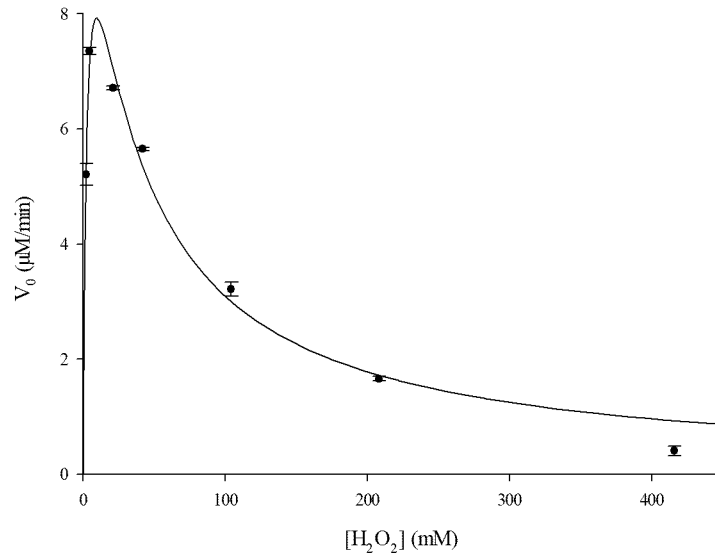
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

De modo resumido, nesse mecanismo o primeiro substrato se combina com a enzima para formar um estado enzimático intermediário, ocorrendo a liberação do primeiro produto. Na sequência, o segundo substrato interage com enzima para formar o segundo produto e regenerar a enzima ao seu estado nativo (GALENDE et al., 2015). Este mecanismo já foi encontrado para outras peroxidases como, por exemplo, a HRP (ŠEKULJICA et al., 2015).

Além da semelhança no mecanismo cinético, já foi relatado que no processo de oxidação catalisado pela HRP, o excesso de H_2O_2 pode fazer com que a enzima passe para um estado reversivelmente inativo, em síntese, a enzima é inibida por excesso de H_2O_2 (VEITCH, 2004). Este comportamento também foi constatado na YPP (Figura 7). Concentrações a partir de 20,80 mM de H_2O_2 apresentaram forte efeito inibitório na atividade enzimática. Os dados experimentais correspondem a um modelo de inibição incompetitiva ($R^2 = 0,98146$) por excesso de substrato, o que pode indicar a presença de um sítio distinto do sítio ativo, onde o substrato pode ter interações que resultem em alterações conformacionais da enzima e

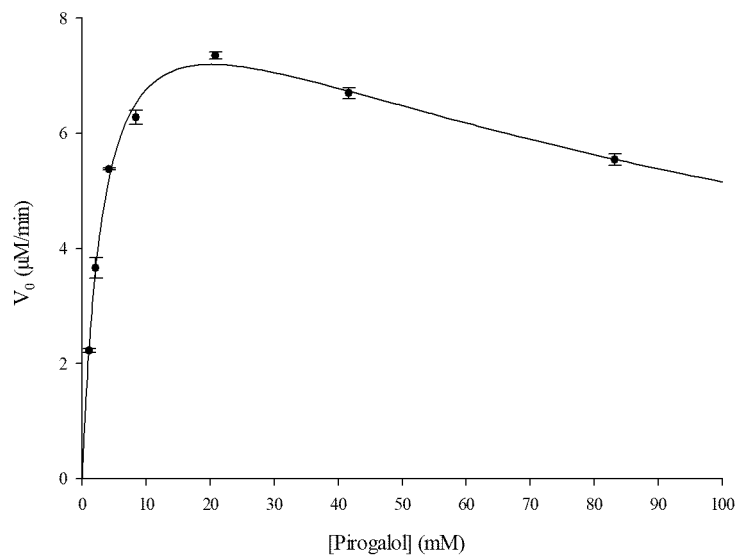
prejudique sua atividade (NELSON; COX, 2001; VOET; VOET, 1995). No entanto, apesar da inibição por excesso de H_2O_2 , destaca-se a baixa concentração necessária deste reagente (<10 mM) para que a YPP possa atingir sua máxima atividade catalítica, fato que pode implicar na redução dos custos para o emprego da enzima.

Figura 7 – Efeito do aumento da concentração de H_2O_2 na atividade enzimática em uma concentração saturante não inibitória de pirogalol (20,80 mM).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 8 – Efeito do aumento da concentração de pirogalol na atividade enzimática em uma concentração saturante não inibitória de H_2O_2 (4,16 mM).

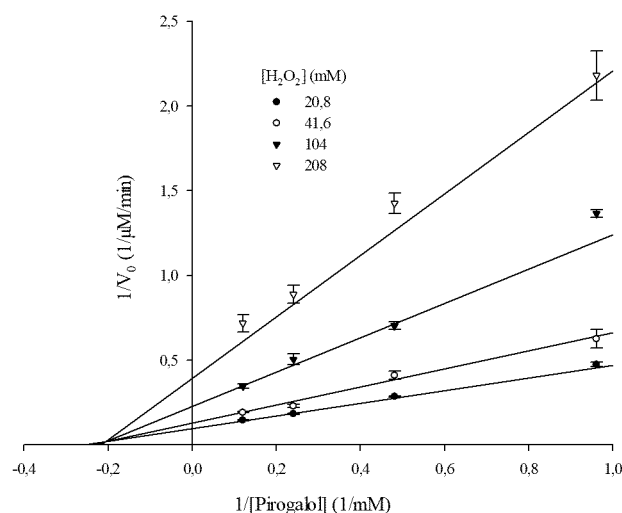


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

O mesmo modelo de inibição se adequa ao comportamento observado com relação ao pirogalol ($R^2 = 0,98685$), em que concentrações a partir de 41,60 mM causaram inibição da atividade enzimática (Figura 8).

Desta forma, ao se considerar que existe inibição incompetitiva pelos dois substratos e, uma vez que as formas da enzima em um mecanismo *ping-pong* podem ser bastante semelhantes (GALENDE et al., 2015), é plausível supor a possibilidade de inibição competitiva, o que é indicado pela Figura 9. O ajuste do modelo ($R^2 = 0,98694$) e a resposta das retas no gráfico Lineweaver-Burk ao aumento da concentração de H_2O_2 (em níveis inibitórios) sugerem a existência de inibição mista, ou seja, pode existir competição entre os substratos pelo sítio ativo e também sua ligação ao complexo enzima-substrato, em um sítio alostérico.

Figura 9 - Gráfico de Lineweaver-Burk com ajuste de um modelo de inibição mista aos dados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A inibição pelos substratos também é relatada por Galende et al. (2015) na peroxidase de *Cytisus multiflorus*. No entanto, nesse caso não foi relatado inibição mista, mas apenas a inibição competitiva. Além disso, os autores também relatam variação do K_m relativo ao H_2O_2 conforme o substrato utilizado, obtendo valores entre 0,71 e 4,10 mM. Neste trabalho, de acordo com os dados obtidos dos modelos, a YPP apresentou K_m de 2,5 mM para o peróxido e de 3,4 mM para o pirogalol, valores que indicam uma maior afinidade pelo primeiro substrato. Patel et al. (2008), Das, Sharma e Mishra (2011) e Rojas-Reyes et al. (2014), também utilizando pirogalol como substrato, relataram K_m de 42,06, 46,42 e 40 mM para peroxidases de *Ipomoea carnea*, *Viscum angulatum* e *Persea americana Mill*, respectivamente. Estes resultados

sugerem uma maior afinidade da peroxidase de casca de yacon com o substrato pirogalol, quando comparada com as enzimas citadas anteriormente.

3.4.5 Efeito do PEG

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática na presença de PEG. Apesar de uma tendência de aumento da atividade com o aumento da concentração do PEG 4.000, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre o ensaio controle e os demais.

Em contraste, Deva et al. (2014) relataram que o PEG forneceu uma proteção maior à peroxidase de *Brassica oleracea*, o que resultou em grande aumento na remoção de fenol pela enzima. Além disso, o incremento na remoção se deu conforme o aumento da massa molecular do PEG (4.000, 6.000 e 10.000), mas concentrações acima de 150 mg/L não mostraram melhora significativa na remoção de fenol. Conforme Kennedy, Alemany e Warith (2002) a adição de PEG aumentou a eficiência da peroxidase de soja (SBP) no tratamento de 2,4-diclorofenol por fatores de 10 (PEG 3.350) e 50 (PEG 8.000). De acordo com os resultados de Wu et al. (1997) o uso de PEG 3.350 reduziu significativamente a dose de HRP necessária na remoção de compostos fenólicos de soluções aquosas, sendo o mesmo comportamento observado por Caza et al. (1999) para a SBP. De forma divergente, Singh et al. (2017) observaram que a adição de PEG diminuiu a remoção de fenol, em efluente sintético, pela peroxidase de *Prosopis juliflora*.

Tabela 3 - Efeito do PEG na atividade da YPP.

PEG	Atividade relativa em diferentes concentrações (%)	
	4.000	6.000
0 mg/L	100,00	100,00
25 mg/L	98,84 ± 12,47	112,64 ± 8,07
50 mg/L	109,70 ± 10,02	107,19 ± 13,38
100 mg/L	115,45 ± 13,87	107,54 ± 13,83
250 mg/L	118,39 ± 17,40	115,66 ± 14,34
500 mg/L	122,54 ± 19,22	104,25 ± 6,46

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.4.6 Efeito de íons metálicos na atividade da YPP

Os efeitos de diferentes íons metálicos na atividade da YPP parcialmente purificada são apresentados na Tabela 4. Não foi observada alteração significativa na atividade de enzima na presença dos íons metálicos Ba⁺, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ nas concentrações de

1 e 5 mM. No entanto, na concentração de 5 mM, foi observada ativação por Co^{2+} e inibição por Cu^{2+} .

Tabela 4 - Efeito de íons metálicos na atividade da YPP.

Íons metálicos	Atividade relativa em diferentes concentrações dos íons metálicos (%)	
	1 mM	5 mM
Controle	100,00	100,00
Ba ⁺	94,78 ± 9,01	88,90 ± 9,07
Ca ²⁺	99,06 ± 7,99	85,11 ± 8,47
Co ²⁺	97,01 ± 5,14	129,37 ± 10,35 *
Cu ²⁺	92,01 ± 10,19	40,88 ± 9,32 *
K ⁺	114,38 ± 8,30	88,47 ± 8,29
Mg ²⁺	93,27 ± 6,12	94,83 ± 7,84
Mn ²⁺	100,85 ± 6,62	92,89 ± 5,83
Na ⁺	104,47 ± 8,87	106,33 ± 9,64
Ni ²⁺	87,76 ± 5,60	80,34 ± 6,27
Zn ²⁺	97,49 ± 12,70	97,59 ± 3,13

Os valores representam média ± desvio padrão das triplicatas. Asteriscos (*) indicam diferença significativa entre o controle e o tratamento ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Pandey et al. (2017) também relataram ativação da peroxidase de *Azadirachta indica* por Co^{2+} , em concentrações de até 15 mM. Além disso, mostraram que a enzima foi estável na presença de Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} e Ni^{2+} , retendo mais de 90% da atividade registrada no teste controle. No entanto, em concentrações muito superiores (500 mM) de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} a enzima sofreu inibição. Similarmente, no trabalho de Fritzke et al. (2020) foi observado que para a peroxidase de *Cedrela fissilis* não foi verificada alteração estatisticamente significativa da atividade enzimática na presença de Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} e Ni^{2+} (10 mM), mas, assim como neste trabalho, ocorreu inibição na presença de Cu^{2+} .

Da mesma forma, conforme Tao et al. (2018), na presença de Cu^{2+} e Ca^{2+} (5 mM) a peroxidase de *Artocarpus heterophyllus* também foi inibida significativamente, com leve efeito inibitório na presença de K^+ (5 mM). Em contraste, Zn^{2+} e Ba^{2+} (5 mM) proporcionaram aumento de 45,10% e 22,50%, respectivamente na atividade enzimática.

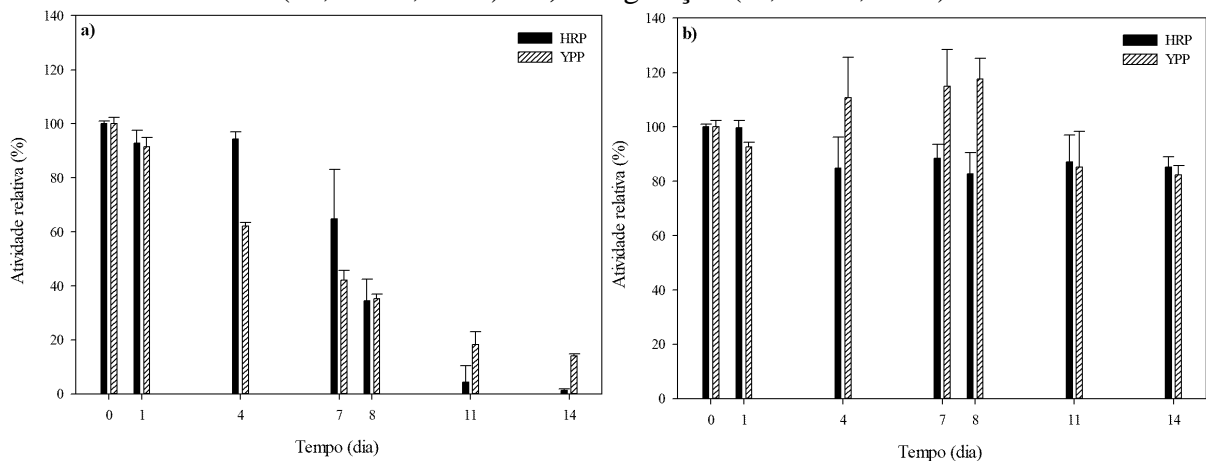
Resultados distintos são apresentados por Elsayed et al. (2018), que ao analisar o efeito de íons metálicos (1, 5 e 10 mM) em três isoenzimas peroxidase de *Ficus carica* constataram efeitos diversos. Por exemplo, uma delas foi inibida pela maior concentração de Cu^{2+} , enquanto as outras sofreram ativação. Duas foram ativadas e uma inibida com o aumento da concentração de Ni^{2+} e todas foram inibidas na presença de Co^{2+} (5 e 10 mM).

3.4.7 Estocagem

Foi perceptível redução da atividade enzimática, nos primeiros dias de armazenamento, para as soluções armazenadas sob temperatura ambiente ($1,31 \pm 1,22 \text{ }^\circ\text{C}$), conforme Figura 10. Ao término de período de duas semanas a solução de YPP reteve 13,25% da atividade observada no início do experimento contra 1,19% da HRP. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o armazenamento à temperatura ambiente de algumas soluções, como tampões e sais inorgânicos, apesar de estáveis, quando armazenados por longo prazo podem ter contaminação e consequente crescimento microbiano, o que leva à degradação ou inatividade das proteínas (BISSWANGER, 2014).

Sob refrigeração ($-1,22 \pm 0,74 \text{ }^\circ\text{C}$), não foram observadas perdas na atividade de nenhuma das soluções. Deste modo, salienta-se que a solução enzimática de YPP parcialmente purificada apresentou estabilidade equivalente à HRP comercial quando armazenadas sob as mesmas condições. Assim, os resultados obtidos aparentam ser interessantes do ponto de vista da aplicação da enzima, uma vez que a solução enzimática pode ser acondicionada facilmente, necessitando apenas de simples refrigeração.

Figura 10 – Estocagem de alíquotas de soluções de HRP e YPP (1 U/mL) em: **a)** temperatura ambiente ($21,31 \pm 1,22 \text{ }^\circ\text{C}$) e **b)** refrigeração ($-1,22 \pm 0,74 \text{ }^\circ\text{C}$).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a extração e purificação parcial da peroxidase de casca de yacon indicaram favoravelmente a utilização do processo de ATPS. Evidencia-se a presença de materiais lignocelulósicos e polifenóis na casca, os quais dificultam o processo de purificação. A enzima mostrou sua atividade máxima em pH 11 e $60 \text{ }^\circ\text{C}$, com razoável estabilidade térmica

a 50 °C. Além disso, destaca-se que foi inibida por Cu^{2+} e ativada na presença de Co^{2+} , sem sofrer efeito significativo dos demais metais testados. Outro fator importante é a sensibilidade da atividade enzimática com relação a concentração de peróxido de hidrogênio, o que indica a necessidade de um controle mais rigoroso sobre este parâmetro. Quando armazenada, a solução enzimática parcialmente purificada de YPP apresentou estabilidade similar à solução de *Horseradish* peroxidase comercial. Desta forma, pela observação de todos os aspectos mencionados, é notável que a peroxidase de casca de yacon apresenta potencial e pode ser uma alternativa a ser explorada em processos de biocatálise.

4 APLICAÇÃO DE PEROXIDASE DE CASCA DE RAÍZES YACON NA BIOCONVERSÃO DE 2,4-DICLOROFENOL E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO EFLUENTE

4.1 RESUMO

Compostos fenólicos como o 2,4-diclorofenol apresentam elevada toxicidade e baixa biodegradabilidade, quando presentes em efluentes, podem exercer um efeito inibitório sobre os microrganismos e impossibilitar processos convencionais de tratamento. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo aplicar enzima peroxidase, obtida da casca de raízes de yacon, na bioconversão de 2,4-diclorofenol em efluente sintético, com posterior avaliação do seu potencial toxicológico. Para a bioconversão de 2,4-diclorofenol, a enzima mostrou máxima atividade a 37,5 °C e pH 7. A melhor eficiência de bioconversão foi alcançada em uma concentração de peróxido de hidrogênio de 0,63 mM (86,82%), após 180 minutos de reação. A eficiência atingida pela peroxidase de casca de yacon foi superior à mostrada pela enzima *Horseradish* peroxidase (70,76%), nas mesmas condições reacionais. A adição de PEG (4.000 e 6.000) não apresentou efeito significativo sobre a bioconversão de 2,4-diclorofenol. Os efeitos toxicológicos do efluente bruto e tratado foram avaliados utilizando *Lactuca sativa L. var. Buttercrunch* e *Allium cepa* como bioindicadores. O efluente tratado apresentou redução da toxicidade, quando comparado ao bruto, para *Lactuca sativa*. *Allium cepa* apresentou maior sensibilidade ao contaminante, com efeitos equivalentes de inibição para efluente tratado e bruto. Os resultados obtidos sugerem que a peroxidase de casca de yacon apresenta potencial para aplicação no tratamento de efluentes fenólicos, sobretudo com relação as condições brandas de emprego.

Palavras-chave: Yacon. Peroxidase. 2,4-diclorofenol. Toxicidade.

4.2 INTRODUÇÃO

Fenóis são matéria-prima básica para diversos produtos tais como herbicidas, tintas, cosméticos e lubrificantes. Deste modo, compostos fenólicos podem estar presentes em efluentes de diversas indústrias, tais como: refinarias de petróleo, produção de fibra de vidro, têxteis e de produtos químicos (CAZA et al., 1999; VEERESH; KUMAR; MEHROTRA, 2005). Além dos efluentes originários destes empreendimentos, os fenóis também podem ser

encontrados em efluentes oriundos da fabricação de produtos farmacêuticos, plásticos, produtos de madeira e de papel e celulose (MOHAMMADI et al., 2015).

Os compostos fenólicos são poluentes orgânicos, com alto teor de toxicidade e que tendem a persistir e acumular-se no ambiente e na cadeia alimentar (VÍCTOR-ORTEGA; OCHANDO-PULIDO; MARTÍNEZ-FÉREZ, 2016). Destaca-se que a presença de fenóis na água pode conduzir à formação de novos compostos durante processos de desinfecção e de oxidação (BUSCA et al., 2008). Alguns compostos de grande preocupação são os fenóis clorados, com destaque para o 2,4-diclorofenol, o qual também pode ser inserido no ambiente como um subproduto do ácido 2,4-diclorofenóxiacético, composto presente na composição de herbicidas utilizados em áreas de agricultura (YANG et al., 2017).

Em função da sua elevada toxicidade e baixa biodegradabilidade, quando presentes em efluentes, os fenóis exercem um efeito inibitório sobre os microrganismos nos processos convencionais de tratamento. Nesse sentido, muitos métodos vêm sendo estudados e empregados na remoção destes compostos de efluentes industriais. Algumas das tecnologia estudadas incluem processos como extração por solvente, oxidação química e separação por membrana (MOHAMMADI et al., 2015). No entanto, estes métodos têm desvantagens como alto custo, tempo de reação elevado e baixa eficiência devido à remoção incompleta dos fenóis (QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008).

Desta forma, o emprego de enzimas como as peroxidases se mostra uma alternativa em potencial, sobretudo devido sua alta especificidade relacionada aos substratos (VETAL; RATHOD, 2015). O uso destas enzimas para remover compostos fenólicos de soluções aquosas foi proposto pela primeira vez por Klibanov e Morris (1981) e, desde então, o método tem sido melhorado para maximizar fatores técnicos e econômicos, além de ser avaliado em efluentes de diversas origens e com uma gama bastante diversificada de compostos.

Um das enzimas com maior destaque neste cenário é a *Horseradish* Peroxidase, a qual tem sido aplicada com eficiência em uma ampla gama de efluentes industriais (NICELL et al., 1993; STANISAVLJEVIĆ; NEDIĆ, 2004; WANG et al., 2016). No entanto, devido ao seu alto custo, ainda é inviável para aplicação no tratamento de efluentes e peroxidases de diversas outras fontes vêm sendo estudadas (DEVA et al., 2014).

Neste sentido, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma planta com origem nos Andes (SANTANA; CARDOSO, 2008), mostra-se como uma alternativa promissora, uma vez que é de fácil cultivo, adaptável a condições climáticas diversificadas e que ganha espaço em diversas regiões do mundo devido a suas propriedades nutritivas e medicinais, sobretudo de suas raízes tuberosas (DE MOURA et al., 2012; GENTA et al., 2009; OJANSIVU; FERREIRA;

SALMINEN, 2011; PERUSSELLO et al., 2015). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo aplicar enzima peroxidase, extraída de casca de raízes yacon, na bioconversão de 2,4-diclorofenol em efluente sintético, com posterior avaliação do potencial toxicológico do efluente bruto e tratado.

4.3 MATERIAL E METÓDOS

4.3.1 Obtenção do extrato bruto e purificação parcial da YPP

O extrato bruto foi obtido por meio da mesma metodologia descrita no item 3.3.2. A purificação parcial da YPP foi realizada pelo processo de ATPS (Item 3.3.4.3), uma vez que foi o protocolo que resultou em melhores resultados.

4.3.2 Determinação da concentração de proteínas e atividade enzimática utilizando 2,4-DCP como substrato padrão

A determinação da concentração de proteína total no extrato bruto foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) (Item 3.3.3). A atividade enzimática foi determinada conforme o protocolo descrito por Antonopoulos et al. (2001), com modificações. Para tal finalidade, foram utilizados 1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7), 0,6 mL de solução 2,4-DCP (25 mM), 0,6 mL de solução 4-aminoantipirina (16 mM), 0,2 mL da solução enzimática e 0,6 mL de H₂O₂ em solução (50 mM). A reação foi iniciada com a adição do peróxido de hidrogênio e a variação da absorbância foi monitorada, durante um minuto, a 510 nm em espectrofotômetro UV-vis (Merck; Modelo Pharo 300). Sendo uma unidade (U) de atividade enzimática definida como o aumento na absorbância registrado no intervalo analisado.

4.3.3 Influência das concentrações de substrato na velocidade da reação

A influência das concentrações de substrato nas taxas iniciais de reação foi verificada por meio do uso dos modelos de Michaelis-Menten (Equação 5) e inibição incompetitiva por excesso de substrato (Equação 6), com o auxílio do *software* SigmaPlot 14.0 (Systat). Para tal, foram determinadas as velocidades iniciais de reação (V_0), conforme item 4.3.2, para diferentes

concentrações de 2,4-DCP (0,05; 0,5; 1; 3; 5; 7; 10 e 13 mM) e H₂O₂ (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,25; 2,5; 5 e 10 mM).

4.3.4 Influência do pH e da temperatura na bioconversão de 2,4-DCP

Para verificar a influência do pH na atividade enzimática, relativa ao 2,4-DCP, utilizou-se tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1 M / fosfato de sódio 0,2 M) para pHs 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e tampão glicina de Sorensen (glicina 0,1 M / cloreto de sódio 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M) para os valores de pH de 10 e 11. A maior atividade registrada foi considerada como 100% e os demais resultados expressos em termos de atividade relativa (%).

O efeito da temperatura foi determinado incubando a mistura de ensaio de atividade em diferentes temperaturas (5; 15; 30; 37,5; 45; 60 e 75 °C) até que atingisse o equilíbrio térmico. Após, foi inserido o extrato enzimático e imediatamente realizada a leitura da atividade enzimática.

4.3.5 Aplicação da YPP no tratamento de efluente sintético

4.3.5.1 Cinética de bioconversão do 2,4-DCP

A avaliação da bioconversão de 2,4-DCP no tempo, mediada pela YPP, foi realizada por meio da aplicação de diferentes concentrações da enzima (0; 0,01; 0,02; 0,05 e 0,1 U/mL) em um efluente sintético com concentração inicial de 50 mg/L de 2,4-DCP e pH 7, ajustado por meio de tampão fosfato de potássio (100 mM). Alíquotas do efluente foram mantidas em agitação orbital em equipamento tipo *shaker*, sob temperatura de 30 °C. O início da contagem do tempo se deu com a adição do peróxido de hidrogênio (0,3 mM), amostras foram coletadas nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 min e, em seguida, conduzidas para determinação da concentração remanescente de 2,4-DCP por meio de análise colorimétrica, de acordo com o método 5530 D (APHA, 2005), em espectrofotômetro UV-vis (Merck; Modelo Pharo 300). Os resultados foram expressos por meio da relação entre a concentração inicial de 2,4-DCP no efluente (C₀) e a concentração remanescente ao final dos intervalos de tempo avaliados (C).

4.3.5.2 Influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão de 2,4-DCP em efluente sintético

Além dos efeitos do peróxido de hidrogênio na velocidade inicial da reação, também se avaliou o efeito de diferentes concentrações (0; 0,13; 0,25; 0,50; 0,63; 0,75 e 1 mM) no resultado final do efluente tratado. Para isso, em efluente sintético (2,4-DCP 50 mg/L e pH 7) foi adicionada solução de YPP, de modo a se ter uma concentração enzimática no meio reacional com atividade de 0,05 U/mL, e por fim o H₂O₂. A solução foi mantida em agitação orbital em equipamento tipo *shaker* (30 °C) por 180 min. Ao término do período, alíquotas foram coletadas e conduzidas para análise da concentração remanescente de 2,4-DCP, conforme descrito no item anterior.

4.3.5.3 Efeito da adição controlada de enzima e peróxido de hidrogênio

Também foi avaliado o efeito da concentração controlada do peróxido de hidrogênio, uma vez que este pode resultar no mecanismo de suicídio da enzima, o qual ocorre quando quantidades excessivas de H₂O₂ comparadas à disponibilidade do substrato fazem com que a enzima se torne cataliticamente inativa (KENNEDY; ALEMANY; WARITH, 2002).

Desta forma, foram estabelecidos dois procedimentos distintos de dosagem até se obter uma concentração final de 0,63 mM de H₂O₂ e uma atividade enzimática de 0,05 U/mL, no meio reacional. O primeiro (T1), consistiu de cinco aplicações de 25 µL de H₂O₂ e 40 µL de solução de YPP nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min. Já no segundo (T2), as dosagens foram realizadas nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 min. Além disso, foi executado um teste controle, no qual toda a enzima e o peróxido de hidrogênio foram adicionados logo no início. Todos os ensaios foram mantidos em agitação até o término do período de 180 min, sendo então coletadas amostras para determinação da concentração final de 2,4-DCP.

4.3.5.4 Influência da adição de PEG na eficiência do tratamento

A avaliação da adição do PEG (4.000 e 6.000), na bioconversão de 2,4-DCP catalisada pela YPP, se deu por meio de diferentes concentrações (100, 500 e 1.000 mg/L) em um efluente sintético (2,4-DCP 50 mg/L e pH 7) com concentração, no meio reacional, de 0,63 mM de H₂O₂ e atividade enzimática de 0,05 U/mL. As soluções foram mantidas em agitação orbital em equipamento tipo *shaker* (30 °C) por 180 min e após, alíquotas foram coletadas e conduzidas para a determinação da concentração de 2,4-DCP.

4.3.6 Ensaios de toxicológicos

4.3.6.1 Tratamento do efluente

Para os ensaios de toxicidade, o efluente sintético, com concentração inicial de 50 mg/L de 2,4-DCP, foi tratado a partir das condições definidas nos ensaios anteriores: concentração de H₂O₂ de 0,63 mM, YPP com 0,05 U/mL, pH 7 e temperatura de 30 °C, com um tempo de contato de 180 min. Paralelamente, de forma comparativa, o efluente foi tratado utilizando a enzima HRP, em solução com atividade equivalente, sob as mesmas condições supracitadas. Deste modo, os tratamentos considerados nos ensaios ecotoxicológicos foram: controle (água destilada ou mineral), efluente bruto, efluente tratado pelo uso de YPP e efluente tratado por HRP.

4.3.6.2 Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa L. var. Buttercrunch*)

Neste ensaio foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa L. var. Buttercrunch*) com 100% de germinação e 99,9% de pureza (Feltrin[®] Sementes). O teste baseou-se no descrito pela “United States Environmental Protection Agency” (USEPA, 1996), método “Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test”. Foi utilizada uma série de cinco placas de Petri contendo uma camada de papel filtro, previamente esterilizadas, para cada tratamento. Em cada placa, foram dispostas 5 sementes espaçadas uniformemente (25 sementes por tratamento) e 2 mL da respectiva solução teste. As placas foram envoltas por filme plástico e incubadas sob temperatura controlada (22 °C), em ambiente escuro, por cinco dias. Ao término deste período, foi determinado o número médio de sementes germinadas (\overline{GS}), bem como o comprimento médio das raízes (\overline{RL}) para cada tratamento. A avaliação da fitotoxicidade se deu por meio dos seguintes índices: Efeito de Germinação (*GE*), Inibição do Crescimento da Raiz (*RGI*) e Índice de Germinação (*GI*). Equações 9, 10 e 11, respectivamente.

$$GE(\%) = \frac{\overline{GS}}{n^{\circ} \text{ total de sementes}} \times 100 \quad (9)$$

$$RGI(\%) = \frac{\overline{RL}_{\text{controle}} - \overline{RL}_{\text{tratamento}}}{\overline{RL}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (10)$$

$$GI(\%) = \frac{\overline{RL}_{tratamento} \times \overline{GS}_{tratamento}}{\overline{RL}_{controle} \times \overline{GS}_{controle}} \times 100 \quad (11)$$

4.3.6.3 Ensaio de citotoxicidade em cebolas (*Allium cepa*)

Os bulbos de cebolas (2n = 16 cromossomos) utilizados no teste foram adquiridos no comércio local do município de Lages-SC. Para o ensaio, foram selecionadas cebolas com diâmetro aproximado de 2,5 cm. Inicialmente, as cascas externas marrons e as raízes secas do anel primordial foram cuidadosamente removidas. Os bulbos prontos foram mantidos mergulhados em água para evitar ressecamento (FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ et al., 1981). Após retirados da água, foram secos em uma macia camada de papel e imediatamente transferidos para um suporte de crescimento contendo cavidades individuais, preenchidas por água destilada, para o desenvolvimento inicial das raízes.

Após 48 h de desenvolvimento, com troca diária da água, foi realizada a alteração da água pelas soluções teste e os bulbos foram mantidos em contato com estas por mais 24 h, de acordo com descrito por Haq et al. (2017). Para cada tratamento foi utilizada uma série de cinco cebolas. As soluções em teste foram preparadas previamente e armazenadas a 4 °C durante o experimento. Antes do uso, as soluções foram estabilizadas em temperatura ambiente por uma hora (FISKESJÖ, 1985).

Depois de 24 h em contato com as soluções teste, foi realizada a preparação de lâminas para avaliação em microscópio. Para cada um dos cinco bulbos, crescidos em cada amostra, uma ponta da raiz foi retirada e cinco lâminas por tratamento foram elaboradas. As lâminas foram preparadas por meio da fixação e hidrólise das raízes em uma mistura de 9 partes de ácido acético 45% e 1 parte de ácido clorídrico 1 N a 50 °C por 5 min, seguidas de esmagamento com solução de Orceína acética a 2% (FISKESJÖ, 1985).

O índice mitótico (*IM*) foi determinado marcando aproximadamente 5.000 células (entre 500 e 1.000 células por lâmina) de acordo com o descrito por Fiskesjö (1985) e Haq et al. (2017), conforme a Equação 12.

$$IM (\%) = \left(\frac{A}{B} \right) * 100 \quad \text{Equação (12)}$$

Onde, A é número total de células em divisão e B é o número total de células contadas por tratamento. Além disso, o comprimento médio das raízes para cada série foi determinado após 48 h de exposição aos diferentes tratamentos.

4.3.7 Análises estatísticas

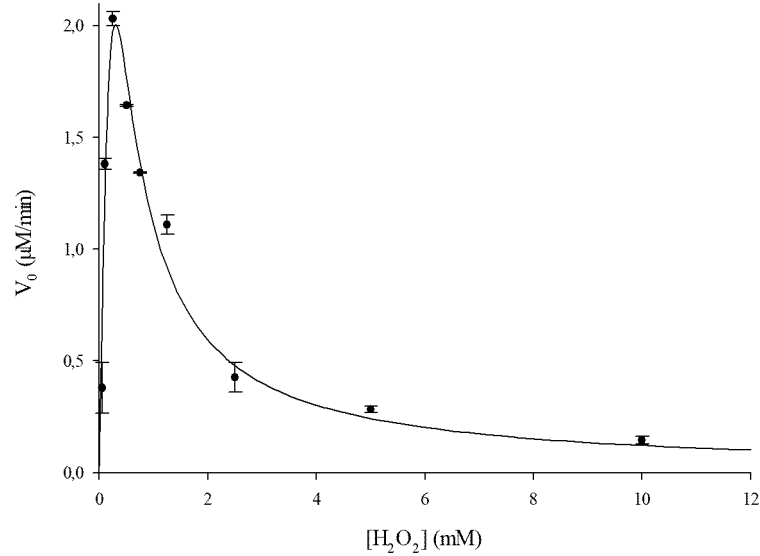
Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com exceção da análise cinética, em que se coletou apenas uma alíquota para cada intervalo de tempo. Os valores foram analisados por ANOVA fator único e teste de Tukey com 95% de confiança, com auxílio do software Statistica 12.0 (StatSoft). Os dados relacionados à modelos de cinética enzimática foram analisados por meio do software SigmaPlot 14.0 (Systat), com emprego da ferramenta *Enzyme Kinetics Wizard*.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Influência das concentrações dos substratos na velocidade da reação

Similarmente ao comportamento observado utilizando pirogalol como substrato padrão, a atividade enzimática apresentou elevada sensibilidade a variações na concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 11). No entanto, nesse caso, concentrações de H_2O_2 a partir de 0,5 mM apresentaram efeitos inibitórios. O modelo de inibição incompetitiva também apresentou um bom ajuste aos dados ($R^2 = 0,94320$) e, de acordo com os valores preditos, a concentração de peróxido de hidrogênio para a máxima atividade enzimática na catálise da oxidação de 2,4-DCP foi de 0,3 mM.

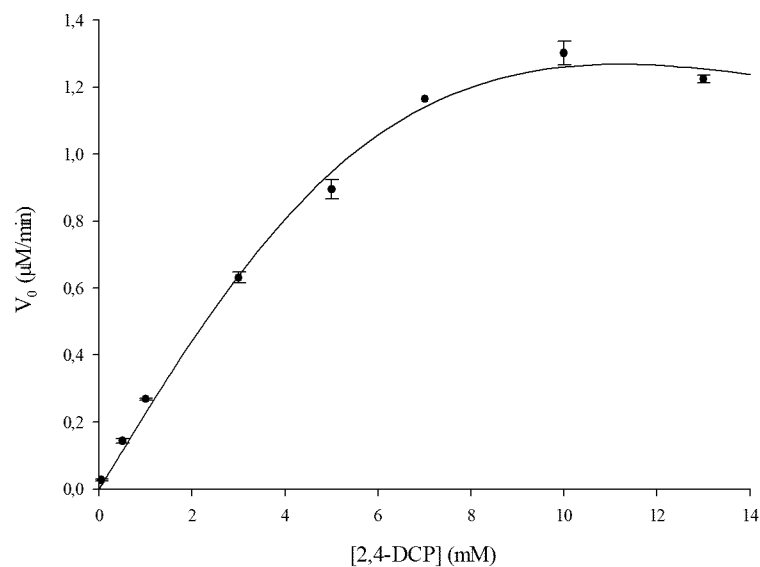
Figura 11 - Efeito do aumento da concentração de H_2O_2 na atividade enzimática em uma concentração não inibitória de 2,4-DCP (5 mM).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Para o 2,4-DCP, as concentrações elevadas do substrato também sugerem tendência a inibição da atividade enzimática (Figura 12). No entanto, as concentrações normalmente encontradas do contaminante em água e efluente estão bem abaixo da máxima concentração avaliada neste estudo. Deste modo, no que tange o tratamento de efluentes, a correta dosagem do peróxido é o fator que demanda de maior atenção.

Figura 12 - Efeito do aumento da concentração de 2,4-DCP na atividade enzimática em uma concentração não inibitória de H_2O_2 (0,25 mM).

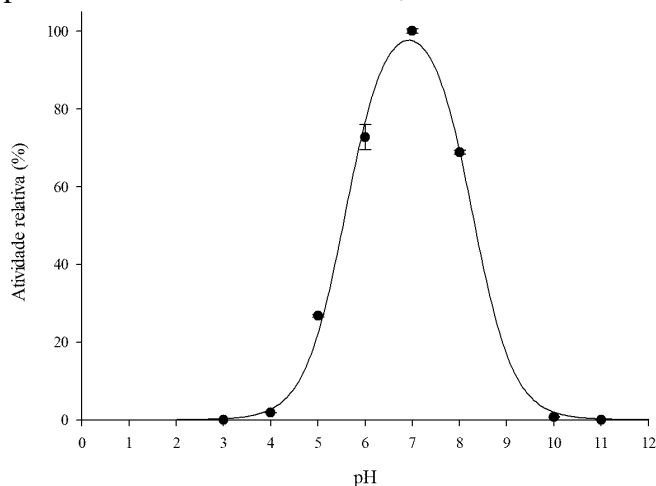


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.2 Influência do pH e temperatura na bioconversão de 2,4-DCP

Considerando a bioconversão de 2,4-DCP, a YPP apresentou máxima atividade em pH 7, com razoável desempenho entre os valores de pH de 6 a 8 (Figura 13). Desta forma, o pH de 7 foi selecionado para prosseguimento dos ensaios.

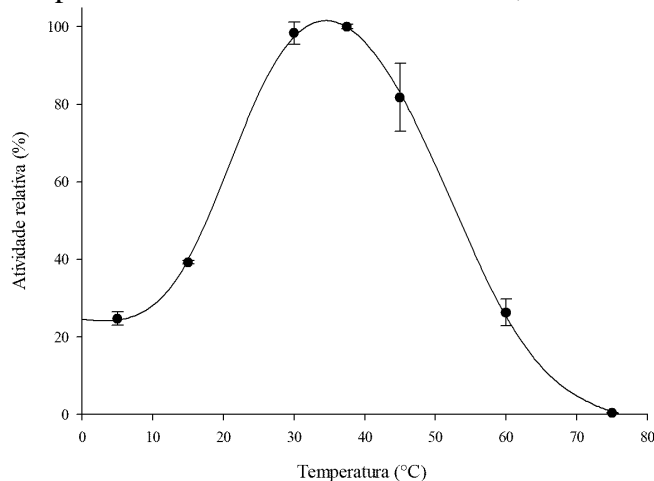
Figura 13 - Efeito do pH na atividade da YPP com 2,4-DCP como substrato padrão.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Com relação a temperatura (Figura 14), dos pontos estudados, a máxima atividade enzimática foi observada em 37,5 °C. No entanto, a 30 °C apresentou atividade similar (98,37%) e a 45 °C ainda manteve, em média, 81,76% da máxima atividade observada. Desta forma 30 °C foi determinada com a temperatura para continuidade dos experimentos, visto que representa uma condição mais branda e fácil de ser alcançada.

Figura 14 - Efeito da temperatura na atividade da YPP com 2,4-DCP como substrato padrão.



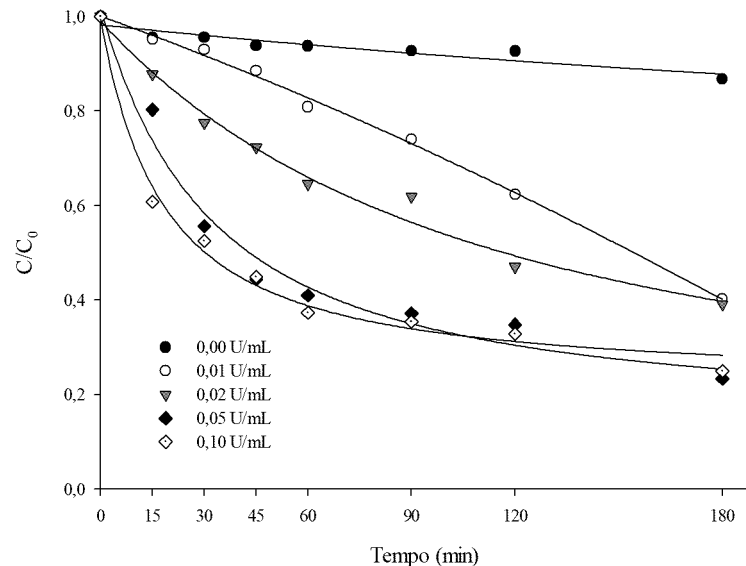
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.3 Aplicação da YPP no tratamento de efluente sintético

4.4.3.1 Cinética de bioconversão do 2,4-DCP

Os melhores resultados obtidos foram utilizando YPP com atividade de 0,05 e 0,1 U/mL, com índices de bioconversão de 76,67 e 75,06%, respectivamente (Figura 15). Destaca-se que nestes dois casos o ganho entre 90 e 180 min foi de 13,79 e 10,45%, também de forma respectiva. Deste modo, selecionou-se a concentração de enzima com atividade de 0,05 U/mL e o tempo de reação foi fixado em 180 min.

Figura 15 - Concentração de 2,4-DCP ao longo do tempo, utilizando diferentes concentrações de YPP.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

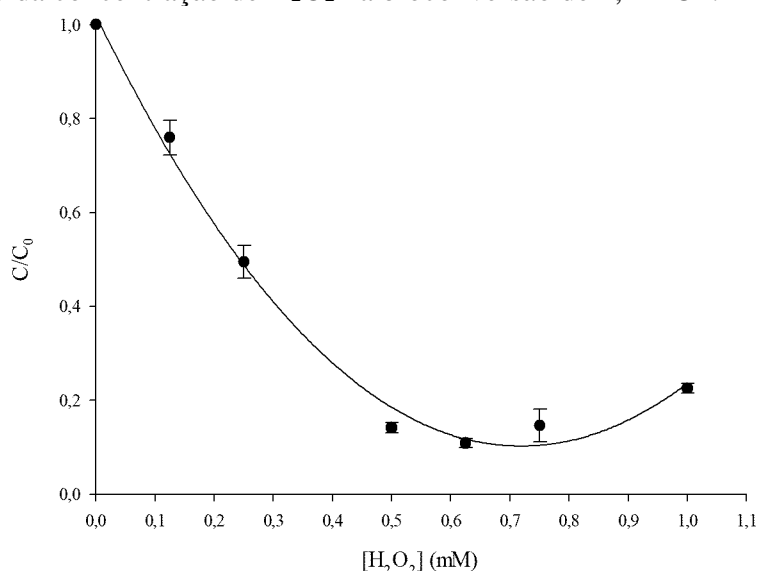
4.4.3.2 Influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão de 2,4-DCP em efluente sintético

Apesar de concentrações de H₂O₂ entre 0,25 e 0,3 mM terem proporcionado melhores níveis de atividade enzimática, em termos de velocidade inicial, quando aplicadas em um tratamento longo pareceram insuficientes para completar a bioconversão de 2,4-DCP. Desta forma, em um estudo mais detalhado foi possível observar que 0,63 mM resultou em uma melhor eficiência de bioconversão (89,15%) (Figura 16). Isto sugere que apesar dessa concentração possuir efeitos inibitórios nas taxas iniciais, pode ser rapidamente consumida na reação e não ter impactos negativos na bioconversão final. Entretanto, pequenas variações

resultam em perda de eficiência, fato que evidência a importância do controle deste parâmetro em um sistema real.

Não obstante, salienta-se que a baixa concentração de H_2O_2 , utilizada na catálise da bioconversão do 2,4-DCP mediada pela YPP, pode favorecer a aplicação da enzima em processos como o de tratamento de efluentes. Este pressuposto se baseia, sobretudo, na redução de custos com a aquisição do reagente e na eventual atenuação do potencial toxicológico do efluente tratado, uma vez que elevadas concentrações residuais de H_2O_2 podem ter efeitos nocivos sobre a biota aquática.

Figura 16 - Efeito da concentração de H_2O_2 na bioconversão de 2,4-DCP.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.3.3 Efeito da adição controlada de enzima e peróxido de hidrogênio

Não foram observadas diferenças significativas entre a dosagem controlada de enzima e peróxido e o tratamento controle (Tabela 5). Isto indica que para a concentração de H_2O_2 em estudo não ocorre a inibição da enzima durante o tratamento. Apesar disso, destaca-se que esta é uma técnica de grande importância na otimização do tratamento de efluentes fenólicos, com o uso de enzimas peroxidase, e pode trazer ganhos na eficiência final superiores a 20% (KENNEDY; ALEMANY; WARITH, 2002).

Tabela 5 - Efeito da adição controlada de enzima e peróxido de hidrogênio na concentração final de 2,4-DCP no efluente.

Tratamento	Concentração remanescente de 2,4-DCP (mg/L)
	Controle
T1	6,72 ± 0,46 a
T2	7,09 ± 0,43 a

Nota: Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.3.4 Influência da adição de PEG na eficiência de tratamento

A utilização de PEG não apresentou influência significativa ($p < 0,05$) no resultado final do tratamento (Tabela 6). Observação semelhante foi realizada por Singh et al. (2017), também utilizando peroxidase extraída de fonte vegetal e efluente sintético contaminado por 2,4-DCP. De acordo com os autores, a adição de PEG não teve influência na peroxidase de *Prosopis juliflora* e, em algumas situações, até mesmo reduziu a bioconversão do composto fenólico.

Em contraste, Angelini et al. (2014) estudaram o uso de extratos obtidos a partir de raízes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin) na remoção de 2,4-diclorofenol de água, com resultados iniciais próximos de 75%. No entanto, os autores relatam que por meio da adição de PEG foi possível alcançar valores próximos a 92%. O mesmo comportamento é observado no trabalho de Deva et al. (2014), com peroxidases de couve-flor (*Brassica oleracea*). Este fato indica que o uso de PEG, em alguns casos, pode proporcionar maior proteção às peroxidases, o que tende a aumentar sua eficiência na bioconversão de compostos fenólicos.

Tabela 6 – Influência do PEG na bioconversão de 2,4-DCP catalisada por YPP.

PEG	Concentração remanescente de 2,4-DCP (mg/L)	
	4.000	6.000
0 mg/L	6,63 ± 1,48	6,63 ± 1,48
100 mg/L	5,66 ± 1,34	6,14 ± 1,73
500 mg/L	6,32 ± 1,05	7,53 ± 2,12
1.000 mg/L	6,10 ± 1,88	10,98 ± 3,22

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.4 Ensaios toxicológicos

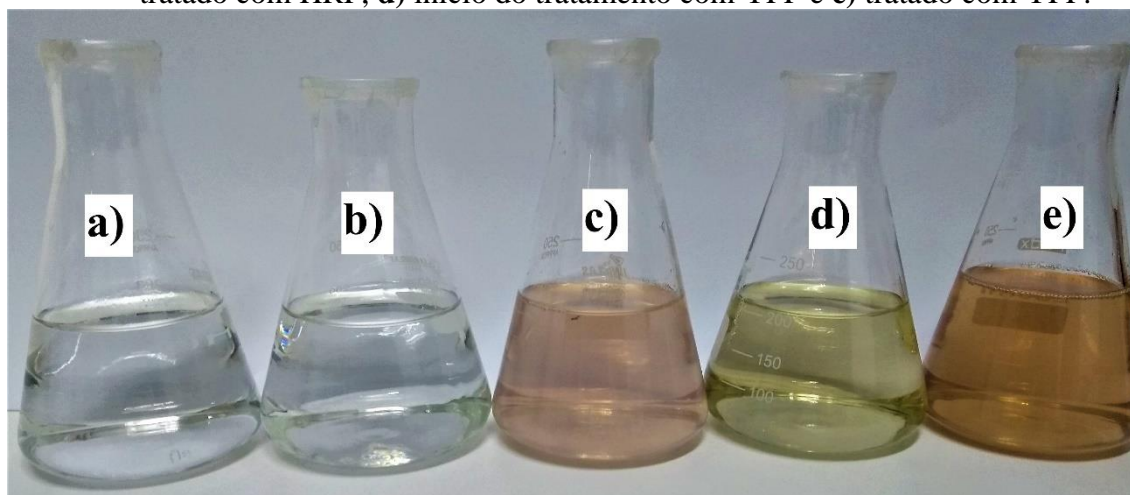
4.4.4.1 Características do efluente bruto e tratado utilizados na avaliação toxicológica

A concentração média de 2,4-DCP determinada no efluente sintético bruto foi de 48,07 ± 1,20 mg/L. Os efluentes tratados pelo uso de YPP e HRP apresentaram concentrações

remanescentes de 2,4-DCP de $6,34 \pm 0,19$ e $14,06 \pm 0,11$ mg/L, respectivamente. Desta forma, os resultados indicam uma bioconversão média de 86,82% para YPP e de 70,76% para a HRP, sob as mesmas condições reacionais. Nesse mesmo sentido, Singh et al. (2017), por meio do uso de uma espécie invasora (*Prosopis juliflora*) para obtenção de enzimas peroxidase e posterior aplicação no tratamento de efluentes fenólicos, constataram eficiência superior, na remoção de fenóis e clorofenóis, da enzima obtida com relação a HRP. Kurnik et al. (2017) estudaram resíduos de polpa de batata como fonte de enzimas peroxidase para remoção de 2,4-diclorofenol de água e obtiveram resultados entre 95 e 98%. Lakshmi et al. (2018) por sua vez, avaliaram peroxidases extraídas de resíduos da produção de milho, como uma alternativa na remediação de efluentes fenólicos, e obtiveram eficiência próxima a 90%.

Destaca-se, ainda, as características visuais distintas que os tratamentos geraram no efluente, sobretudo, quanto a coloração (Figura 17). Este evento pode indicar a formação de subprodutos diversos, apesar do uso de enzimas com características similares, fato que reforça a necessidade de testes toxicológicos e não apenas uma avaliação relativa à concentração final do contaminante.

Figura 17 – Característica visual do efluente: **a)** bruto, **b)** início do tratamento com HRP, **c)** tratado com HRP, **d)** início do tratamento com YPP e **e)** tratado com YPP.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.4.2 Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa L. var. Buttercrunch*)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, foi possível notar forte efeito negativo do efluente bruto sobre o desenvolvimento das sementes, uma vez que resultou em completa inibição da germinação. Além disso, destaca-se um efeito positivo do efluente tratado

utilizando YPP, visto que além de todas as sementes terem germinado, estas apresentaram um comprimento médio de raiz 31,23% superior ao tratamento controle. Com relação ao efluente tratado utilizando HRP, os resultados também se mostram favoráveis frente ao efluente bruto, no entanto as raízes apresentaram inibição quando comparadas ao grupo controle (Figura 18).

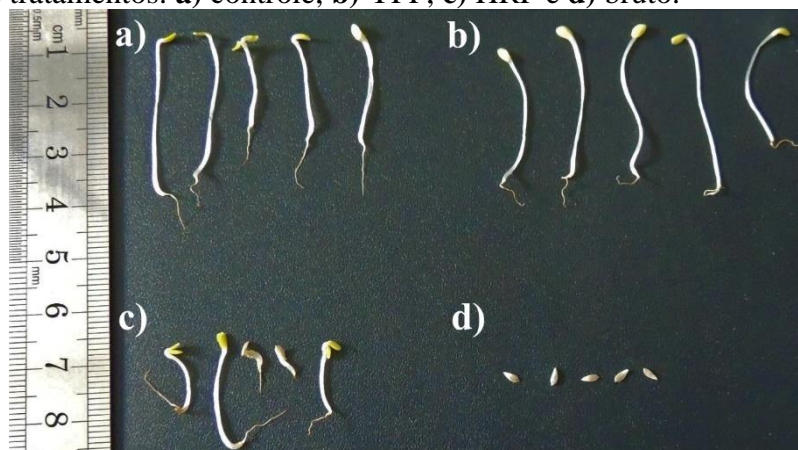
Tabela 7 – Resultados do teste de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa* L. var. *Buttercrunch*).

Tratamento	GE (%)	RGI (%)	GI (%)
Controle	100,00	0,00	100,00
YPP	100,00	-31,23	131,23
HRP	96,00	9,47	86,91
Bruto	0,00	100,00	0,00

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A redução de toxicidade em efluentes contaminados por 2,4-DCP, verificada com o uso de testes de desenvolvimento de sementes e raízes, tratados por enzimas peroxidase é citada por alguns autores. Por exemplo, Fernandes et al. (2020) utilizaram, no tratamento, peroxidase extraída de casca de soja e, do mesmo modo que neste trabalho, *Lactuca sativa* nos ensaios de toxicidade. Singh et al. (2017) utilizaram peroxidase de *Prosopis juliflora* e *Vigna mungo* como bioindicador. Kurnik et al. (2017) estudaram peroxidases de polpa de batata e a espécie *Lepidium sativum* na avaliação da toxicidade. Por fim, Angelini et al. (2014) aplicaram peroxidases extraídas de raízes de tabaco e tomate na remoção de 2,4-DCP e também *Lactuca sativa* na verificação de possíveis efeitos toxicológicos do efluente. Todos esses trabalhos enfatizam a importância da avaliação toxicológica, no que diz respeito ao tratamento de efluentes e mostram que testes baseados na germinação de sementes podem trazer resultados rápidos e consistentes para uma caracterização inicial do efluente.

Figura 18 – Série de cinco sementes de *Lactuca sativa* L. var. *Buttercrunch* após contato com os tratamentos: a) controle, b) YPP, c) HRP e d) bruto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.4.4.3 Ensaio de citotoxicidade em cebolas (*Allium cepa*)

Foi notável que o uso de *A. cepa* apresentou maior sensibilidade as características do efluente. Conforme o índice mitótico (Tabela 8), as concentrações de 2,4-DCP remanescentes no efluente tratado e os possíveis subprodutos formados apresentaram efeitos negativos similares aos causados pelo efluente bruto.

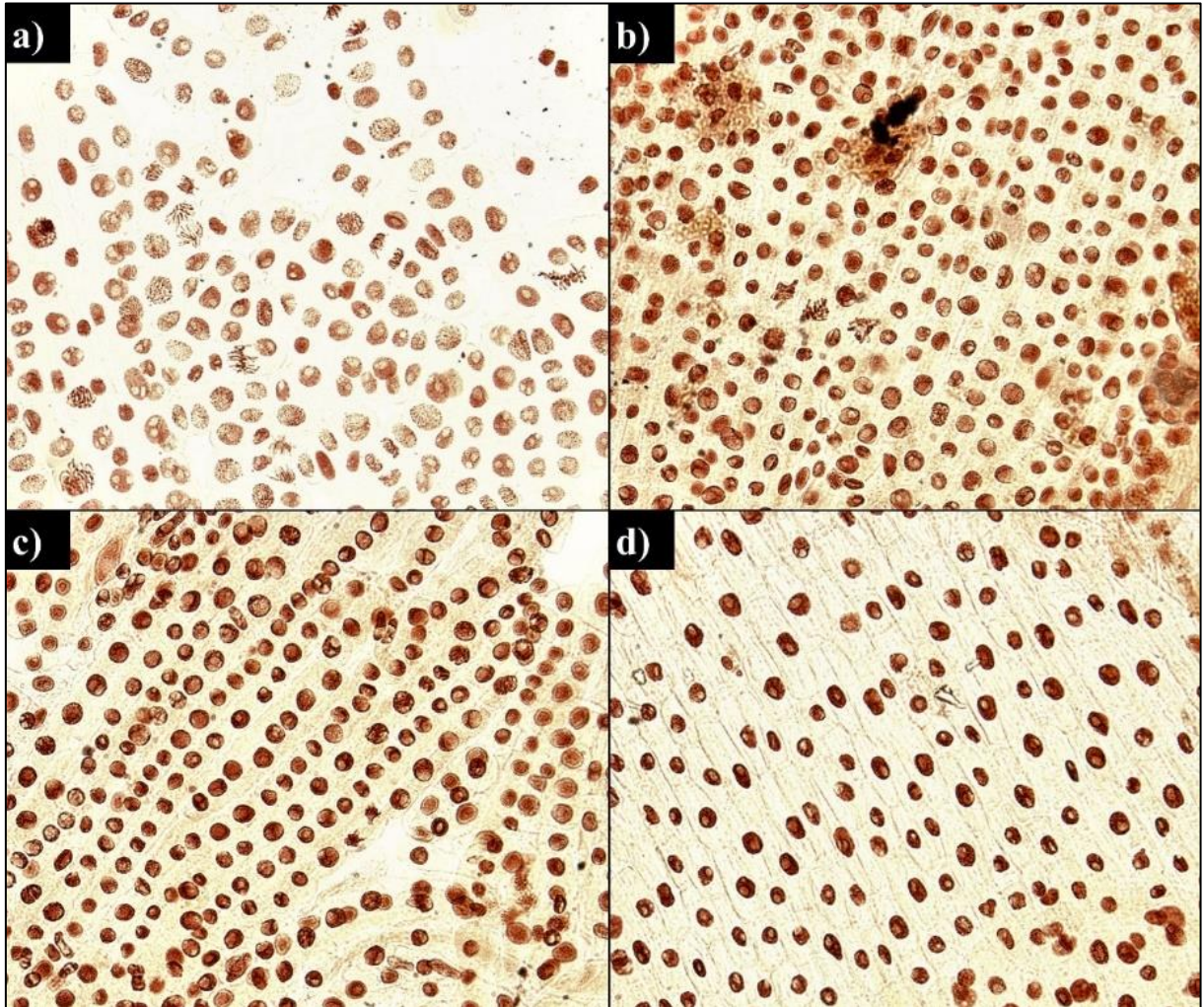
Tabela 8 – Índice mitótico das raízes de *A. cepa* após 24 h de exposição aos diferentes tratamentos.

Tratamento	MI (%)
Controle	53,58 ± 11,64 a
YPP	7,94 ± 4,68 b
HRP	10,24 ± 14,35 b
Bruto	8,91 ± 9,71 b

Nota: Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Um dos pontos que este teste permite quantificar é o potencial de genotoxicidade, por meio da análise de aberrações cromossômicas identificadas nas células das pontas das raízes (HAQ; RAJ; MARKANDEYA, 2018). Entretanto, devido à elevada inibição da divisão celular causado pelos tratamentos, neste trabalho não foi possível observar a presença de células aberrantes e constatar possíveis efeitos mutagênicos causados pelos contaminantes. Na Figura 19 é possível observar o aspecto das células após o contato das raízes com os tratamentos.

Figura 19 – Imagens obtidas em microscópio de lâminas referentes aos diferentes tratamentos: a) controle, b) YPP, c) HRP e d) bruto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

O comprimento médio apresentado pelas raízes reforça as características agressivas dos compostos presentes nos efluentes (Tabela 9). Apesar de uma tendência de maior desenvolvimento das raízes dos bulbos que foram mantidos em contato com os efluentes tratados pelo uso de YPP e HRP (Figura 20), não foi possível constatar diferença estatisticamente significativa com relação ao efluente sem tratamento.

Tabela 9 – Comprimento das raízes de *A. cepa* após 48 h em contato com as soluções em teste.

Tratamento	Comprimento (cm)
Controle	2,62 ± 0,41 a
YPP	1,16 ± 0,37 b
HRP	1,06 ± 0,36 b
Bruto	0,80 ± 0,16 b

Nota: Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Fiskesjö et al. (1981) também relataram os efeitos do 2,4-DCP em raízes de *A. cepa*. De acordo com os autores, a inibição do crescimento das raízes foi notada em concentrações a partir de 1 mg/L, sendo que com 50 mg/L do contaminante a inibição foi superior a 90%, similarmente ao observado neste trabalho.

Figura 20 - Série de cinco bulbos de *A. cepa* após contato com os tratamentos: **a)** controle, **b)** YPP, **c)** HRP e **d)** bruto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

4.5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o emprego da YPP na bioconversão de 2,4-DCP em efluentes destacam a importância do controle da concentração de peróxido de hidrogênio no processo. A enzima mostrou máxima atividade em pH 7 e 37,5 °C, condições brandas de operação que favorecem a aplicação no tratamento de efluentes. O uso de dois testes distintos na avaliação de efeitos toxicológicos evidenciou a maior sensibilidade de *A. cepa* ao contaminante, visto que apenas com a utilização de *L. sativa* os resultados sugeriram ausência de toxicidade para o efluente tratado por YPP. Deste modo, levando-se em conta o que foi observado é notável que a peroxidase de casca de yacon apresenta características adequadas para aplicação no tratamento de efluentes fenólicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o observado neste trabalho, a YPP apresentou características similares a uma enzima HRP comercial, nos processos em que foram comparadas. Entretanto, ainda são necessários estudos com intuito de otimizar os processos de extração e purificação e avaliar a sua viabilidade econômica. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade e as características apresentadas pelo efluente tratado sugerem a presença de compostos distintos, os quais podem ter diferentes efeitos nos organismos bioindicadores. Desta forma, a identificação dos subprodutos formados na bioconversão de 2,4-DCP pode fornecer uma base sólida para melhor interpretação do comportamento observado. Além disso, o sucesso no emprego da enzima está relacionado a correta dosagem de peróxido de hidrogênio, uma vez que pequenas variações podem promover ganhos de atividade significativos. Por fim, destaca-se que o uso da peroxidase de casca de raízes yacon se apresenta como uma alternativa para bioconversão de compostos aromáticos em efluentes e também para os demais processos que envolvam biocatálise.

REFERÊNCIAS

ACHAR, Raghu Ram et al. Caralluma umbellata Peroxidase: Biochemical Characterization and Its Detoxification Potentials in Comparison with Horseradish Peroxidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 801–812, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2250-1>>.

AL-KASSIM, Loola et al. Enzymatic removal of selected aromatic contaminants from wastewater by a fungal peroxidase from Coprinus macrorhizus in batch reactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 179–182, 1994.

ALMULAIKY, Yaaser Q.; AL-HARBI, Sami A. A novel peroxidase from Arabian balsam (Commiphora gileadensis) stems: Its purification, characterization and immobilization on a carboxymethylcellulose/Fe₃O₄ magnetic hybrid material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 767–774, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.119>>.

ALTIN, Sevgi et al. Purification, characterization, and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (Triticum aestivum ssp. vulgare). **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 9, p. 1949–1959, 2017.

ALTUNKAYA, Arzu; GÖKMEN, Vural. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (L. sativa). **Food Technol. Biotechnol.**, v. 49, n. 2, p. 249–256, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 21. ed. American Public Health Association, 2005. Disponível em: <<https://www.amazon.com/standard-methods-examination-water-wastewater/dp/08;>>.

ANGELINI, Vanina A. et al. Use of hairy roots extracts for 2,4-DCP removal and toxicity evaluation by Lactuca sativa test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 4, p. 2531–2539, 2014.

ANTONOPOULOS, Vasileios T. et al. Dechlorination of chlorophenols using extracellular peroxidases produced by Streptomyces albus ATCC 3005. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 1, p. 62–69, 2001.

BANSAL, N; KUMARI, L; KANWAR, S S. Peroxidase and its applications. *Int. J. Inst. Pharm. Life Sciences*, p. 1–28, 2012.

BARI, L et al. Purification and Characterization of Peroxidase From Anthracnose Disease Infected Papaya (*Carica papaya* L.). **Bangladesh Journal of Medical Biochemistry**, v. 6, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://www.banglajol.info/index.php/BJMB/article/view/17643>>.

BASHA, Shaik Akbar; PRASADA RAO, Ummiti JS. Purification and characterization of peroxidase from sprouted green gram (*Vigna radiata*) roots and removal of phenol and p-chlorophenol by immobilized peroxidase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3249–3260, ago. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.8173>>.

BERNARDS, Mark A. et al. Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato. **Plant Physiology**, v. 121, n. 1, p. 135–146, 1999. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.121.1.135>>.

BISSWANGER, Hans. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, v. 1, n. 1–6, p. 41–55, maio 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>>.

BOUACEM, Khelifa et al. Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 636–646, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.061>>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUSCA, Guido et al. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, n. 2–3, p. 265–288, 2008.

CAI, Feng et al. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.12.002>>.

CAMPOS, David; AGUILAR-GALVEZ, Ana; PEDRESCHI, Romina. Stability of fructooligosaccharides, sugars and colour of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) roots during blanching and drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1177–1185, 2016.

CARAMYSHEV, Alexei V. et al. Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.

26, p. 9888–9894, 2006.

CARDINALI, Angela et al. Purification and characterization of a cationic peroxidase from artichoke leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 7, p. 1417–1423, maio 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2882>>.

CAZA, Nicole et al. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. **Water Research**, v. 33, n. 13, p. 3012–3018, 1999.

CENTENO, Diana A.; SOLANO, Xuxan H.; CASTILLO, John J. A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 116, p. 33–38, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.03.005>>.

CHANCE, Britton; MAEHLI, A.C. [136] Assay of catalases and peroxidases. [S.l: s.n.], 1955. p. 764–775. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687955023008>>.

CHEN, Li Chun; CHUNG, Yun Chin; CHANG, Chen Tien. Characterisation of an acidic peroxidase from papaya (*Carica papaya* L. cv Tainung No. 2) latex and its application in the determination of micromolar hydrogen peroxide in milk. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2529–2535, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.106>>.

CHISARI, Marco; BARBAGALLO, Riccardo N.; SPAGNA, Giovanni. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3469–3476, 2007.

COOPER, V.A.; NICELL, J.A. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. **Water Research**, v. 30, n. 4, p. 954–964, abr. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0043135495002375>>.

DALAL, Sohel; GUPTA, Munishwar Nath. Purification and characterization of a peroxidase isozyme from indian turnip roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5545–5552, 2010.

DAS, Mrinal Kumar; SHARMA, Radhey Shyam; MISHRA, Vandana. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of Western Ghats (India): Purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 1–2, p. 63–70, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.03.010>>.

DE MOURA, Nelci A. et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2902–2910, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.006>>.

DEEPA, S. S.; ARUMUGHAN, C. Purification and characterization of soluble peroxidase from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 503–511, 2002.

DEMARCHE, Philippe et al. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 933–953, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.013>>.

DEVA, Ashutosh Nath et al. Extraction of peroxidase from waste *Brassica oleracea* used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 1148–1154, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2014.04.014>>.

DÍAZ NIETO, César Horacio et al. Development of a third generation biosensor to determine hydrogen peroxide based on a composite of soybean peroxidase/chemically reduced graphene oxide deposited on glassy carbon electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 263, p. 377–386, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2018.02.094>>.

DUNFORD, H; STILLMAN, J. S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, n. 3, p. 187–251, ago. 1976. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854500803161>>.

EL ICHI, Sarra et al. Characterization of structure and activity of garlic peroxidase (POX1B). **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 157–172, 2 jan. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00775-010-0714-2>>.

ELSAYED, Alshaimaa M. et al. Purification and biochemical characterization of peroxidase isoenzymes from *Ficus carica* latex. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. May, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.009>>.

ELY, Cyntia et al. Enhanced removal of phenol from biorefinery wastewater treatment using enzymatic and Fenton process. **Environmental Technology** (United Kingdom), v. 0, n. 0, p. 1–7, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1713220>>.

ELY, Cyntia et al. Optimization of Phenol Removal from Biorefinery Effluent Using Horseradish Peroxidase. **Journal of Environmental Engineering** (United States), v. 143, n. 12, p. 1–7, 2017.

ERDEM, Hacer Ulku et al. Purification and biochemical characterization of peroxidase isolated from white cabbage (*Brassica Oleracea* var. capitata f. alba). **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 10, p. 2099–2109, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2014.963868>>.

FANTE, L. et al. Study of enzyme inactivation using steam in yacon (*smallanthus sonchifolius*) roots. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 1, p. 16–24, 2013.

FEIZABADI, Mina et al. Improving stability of biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase by γ -aminobutyric acid and application in detection of H₂O₂. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 597–606, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.103>>.

FERNANDES, Mylena et al. Obtaining soybean peroxidase from soybean hulls and its application for detoxification of 2,4-dichlorophenol contaminated water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 3, p. 103786, jun. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.04.081>>.

FISKESJÖ, G.; LASSEN, C.; RENBERG, L. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified Allium test. **Chemico-Biological Interactions**, v. 34, n. 3, p. 333–344, 1981.

FISKESJÖ, Geirid. The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243–260, 1988.

FISKESJÖ, Geirid. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.

FODIL, Djamila et al. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: Purification and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 383–390, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.153>>.

FORTEA, M. I. et al. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1091–1096, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.105>>.

FRITZKE, Wikeff et al. Peroxidase of *Cedrela fissilis* leaves: Biochemical characterization

and toxicity of enzymatically decolored solution of textile dye Brilliant Sky-Blue G. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. December 2019, p. 101553, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101553>>.

GALENDE, Patricia Pérez et al. Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi–Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 1005–1011, nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.042>>.

GAO, Ruomei et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, mar. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302459898000725>>.

GENTA, Susana et al. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 2, p. 182–187, 2009.

GONG, Zhiqing et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1095–1099, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.012>>.

HAMID, Mohsina; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177–1186, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>>.

HAQ, Izharul et al. Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. **Chemosphere**, v. 169, p. 642–650, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.101>>.

HAQ, Izharul; RAJ, Abhay; MARKANDEYA. Biodegradation of Azure-B dye by *Serratia liquefaciens* and its validation by phytotoxicity, genotoxicity and cytotoxicity studies. **Chemosphere**, v. 196, p. 58–68, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.153>>.

HERMANN, M.; FREIRE, I.; PAZOS, C. Compositional Diversity of the Yacon Storage Root. Andean Roots and Tubers CIP Program Report. 1998.

HIDALGO-CUADRADO, Nazaret et al. Screening of postharvest agricultural wastes as alternative sources of peroxidases: Characterization and kinetics of a novel peroxidase from lentil (*Lens culinaris* L.) stubble. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 4765–4772, 2012.

- IKEHATA, Keisuke et al. Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two Coprinus species for aqueous phenol treatment. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 16, p. 1758–1770, 2005.
- JIMÉNEZ-ATIÉNZAR, Mercedes et al. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from peach mesocarp (*Prunus persica* L. cv. Babygold). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 9, p. 1682–1690, jul. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2886>>.
- JIN, Xinyu et al. A robust and stable nano-biocatalyst by co-immobilization of chloroperoxidase and horseradish peroxidase for the decolorization of azo dyes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 489–497, fev. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.5379>>.
- KAFI, A. K.M. et al. Improved peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase/Carbon Nanotube on a thiol-modified gold electrode. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 113, p. 67–74, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.11.006>>.
- KAMIMURA, Gengis Kami Ferro. Isolamento, purificação e caracterização da peroxidase de yacon (*Smallanthus sonchifolius*). p. 114, 2006.
- KARAM, Jean; NICELL, James A. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 141–153, jun. 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-4660%28199706%2969%3A2%3C141%3A%3AAID-JCTB694%3E3.0.CO%3B2-U>>.
- KENNEDY, K.; ALEMANY, K.; WARITH, M. Optimisation of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. **Water SA**, v. 28, n. 2, p. 149–158, 2002.
- KHAN, Shahnawaz Mohd et al. An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 301–307, fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.04.002>>.
- KHATUN, Shahanaz et al. Purification and characterization of peroxidase from moringa oleifera l. leaves. **BioResources**, v. 7, n. 3, p. 3237–3251, 2012.
- KLIBANOV, Alexander M.; MORRIS, Evan D. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p.

119–122, abr. 1981. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022981900697>>.

KOKSAL, Ekrem et al. Purification and characterization of peroxidase from sweet gourd (*Cucurbita moschata* Lam. Poiret). **International Journal of Food Properties**, v. 15, n. 5, p. 1110–1119, 2012.

KUMAR, P et al. Isolation and characterization of peroxidase from the leaves of *Ricinus communis*. v. 4, n. 4, p. 283–292, 2008.

KUMAR, Pradeep; KAMLE, Madhu; SINGH, Jagtar. Biochemical characterization of *Santalum album* (Chandan) leaf peroxidase. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 2, p. 153–159, 2011.

KURNIK, Katarzyna et al. Potato Pulp as the Peroxidase Source for 2,4-Dichlorophenol Removal. **Waste and Biomass Valorization**, 24 fev. 2017. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1007/s12649-017-9863-7>>.

LACHMAN, J. et al. Saccharides of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] tubers and rhizomes and factors affecting their content. **Plant, Soil and Environment**, v. 50, n. 9, p. 383–390, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970. Disponível em:
<<http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>>.

LAGO, Camila Carvalho; NOREÑA, Cacio Pelayo Zapata. Kinetic and Thermodynamic of Thermal Inactivation of the Peroxidase, Polyphenoloxidase and Inulinase Activities during Blanching of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3560–3568, 2014.

LAKSHMI, S. et al. Characterization of peroxidase enzyme and detoxification of phenols using peroxidase enzyme obtained from *Zea mays* L waste. **Applied Water Science**, v. 8, n. 7, p. 207, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13201-018-0820-9>>.

LIVERY, Christopher B. et al. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8471–8476, 2010.

- LEE, Chang Y; PENNESI, Arthur P; DICKSON, Michael H. Characterization of the Cauliflower Peroxidase Isoenzyme. **J. Agric. Food Chem.**, v. 32, n. 1, p. 18–21, 1984.
- LIU, Fuguo et al. Kinetic Characterization and Thermal Inactivation of Peroxidase in Aqueous Extracts from Sweet Corn and Waxy Corn. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2800–2807, 2013.
- LIU, Jian Zhong et al. Increased thermal and organic solvent tolerance of modified horseradish peroxidase. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 19, n. 4, p. 169–173, 2006.
- LUO, Haibo et al. Purification And Characterization Of Peroxidase From Fresh-Cut Zizania Latifolia. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 309–316, 2012.
- MARZOUKI, Saida Medjeldi et al. Kinetic Characterization of a Basic Peroxidase from Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 740–746, 2010.
- MOGHARRAB, Navid; GHOURCHIAN, Hedayatollah; AMININASAB, Mehriar. Structural stabilization and functional improvement of horseradish peroxidase upon modification of accessible lysines: Experiments and simulation. **Biophysical Journal**, v. 92, n. 4, p. 1192–1203, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.092858>>.
- MOHAMMADI, Shohreh et al. Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 8, p. 2215–2234, 2015.
- MORSI, Rana et al. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. **Science of the Total Environment**, v. 714, p. 136572, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136572>>.
- MOSCATTO, J. A.; FERREIRA, S. H. Prudêncio -; HAULY, M. C. O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate 1. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 4, p. 634–640, 2004.
- MOTAMED, Sepideh; GHAEMMAGHAMI, Farnoosh; ALEMZADEH, Iran. Turnip (*brassica rapa*) peroxidase: Purification and characterization. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 23, p. 10614–10618, 2009.
- NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>>.

NARAYAN, A. V.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S.M.S. Extraction and purification of ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 263–272, 2008.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Lehninger Biochemie. 5. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-08289-8>>. (Springer-Lehrbuch).

NEVES, Valdir Augusto; DA SILVA, Maraiza Aparecida. Polyphenol oxidase from yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2424–2430, 2007.

NICELL, J. A. et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 20, n. 5, p. 725–735, out. 1993. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/193-097>>.

OGOLA, Henry Joseph Oduor et al. Molecular characterization of a novel peroxidase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7509–7518, 2009.

OJANSIVU, Ilkka; FERREIRA, Celia Lucia; SALMINEN, Seppo. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 40–46, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.005>>.

OLIVEIRA, M. A.; NISHIMOTO, E. K. Evaluation of the development of yacon plants (*Polymnia sonchifolia*) and characterization of the carbohydrates by HPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 2, p. 215–220, 2004.

PADILHA, Vivianne Montarroyos; ROLIM, Priscilla Moura; OLIVEIRA, Michelle Galindo De. Drying time and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) enzymatic activity inhibition under chemical treatment. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 7, p. 2178–2184, 2009.

PANADARE, Dhanashree C.; RATHOD, Virendra K. Extraction of peroxidase from bitter gourd (*Momordica charantia*) by three phase partitioning with dimethyl carbonate (DMC) as organic phase. **Process Biochemistry**, v. 61, n. February, p. 195–201, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.028>>.

PANADARE, Dhanashree; RATHOD, Virendra K. Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. March, p. 431–437, 2018.

PANDEY, Veda P. et al. Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1713–1720, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.047>>.

PANDEY, Veda P.; DWIVEDI, Upendra N. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 168–173, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.10.006>>.

PATEL, Ashok Kumar et al. Biochemical and spectroscopic characterization of morning glory peroxidase from an invasive and hallucinogenic plant weed *Ipomoea carnea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9236–9245, 2008.

PEREIRA, Juciane de Abreu Ribeiro et al. Studies of chemical and enzymatic characteristics of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its flours. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 75–83, 2013.

PERUSSELLO, Camila Augusto et al. Thermophysical properties of yacon (*Smallanthus sonchifolius*): experimental determination and effect of moisture content. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 37, n. 1, p. 167–173, 2015.

QUINTANILLA-GUERRERO, F. et al. Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8605–8611, 2008.

ROJAS-REYES, José O. et al. Purification and characterization of peroxidase from avocado (*persea americana* mill, cv. hass). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1844–1853, 2014.

SAJITHA RAJAN, S.; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of the liverwort *Pallavicinia lyelli* (Hook.) S. Gray. cytosolic ascorbate peroxidase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 758–763, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.06.004>>.

SANTANA, Isabelle; CARDOSO, Marisa Helena. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**,

v. 38, n. 3, p. 898–905, 2008a. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000300050&lng=pt&tlng=pt>.

SARAIVA, Jorge A.; NUNES, Cláudia S.; COIMBRA, Manuel A. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase - Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1571–1579, 2007.

ŠEKULJICA, Nataša et al. Decolorization of anthraquinonic dyes from textile effluent using horseradish peroxidase: Optimization and kinetic study. **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

SEMINARIO, J; VALDERRAMA, M. El yacon: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Lima: Universidad Nacional de Cajamarca, 2003. Disponível em:
<<http://www.oneskyapp.com/blog/how-evernote-reached-four-million-users-in-china-within-1-year/>>.

SERRANO-MARTÍNEZ, A. et al. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 193–199, 2008.

SHAH, Shaheen; BORAH, Debajit; YADAV, R. N.S. Extraction and characterization of peroxidase from *Camellia sinensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 84, n. 2, p. 343–348, 2014.

SHUKLA, Ankita; GUNDAMPATI, Ravi Kumar; JAGANNADHAM, Medicherla V. Biochemical and biophysical characterization of a peroxidase isolated from *Euphorbia tirucalli* with antifungal activity. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 5, p. 236–248, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10242422.2016.1238463>>.

SINGH, Savita et al. Phenol remediation by peroxidase from an invasive mesquite: Turning an environmental wound into wisdom. **Journal of Hazardous Materials**, v. 334, p. 201–211, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.007>>.

STANISAVLJEVIĆ, M; NEDIĆ, L. Removal of phenol from industrial wastewaters by horseradish-*Cochlearia armoracia* L-peroxidase. **Facta universitatis-series: Working and ...**, v. 2, p. 345–349, 2004. Disponível em: <<http://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=0354-804X0404345S>>.

SUZUKI, Tatsuro et al. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, p. 219–224, 2006.

SUZUKI, Tatsuro et al. Characterization of Peroxidase in Tartary Buckwheat Seed. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 4, p. 571–575, 2012. Disponível em: <<http://japanlinkcenter.org/DN/JST.JSTAGE/fstr/18.571?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>.

TAO, Yi Ming et al. Peroxidase from jackfruit: Purification, characterization and thermal inactivation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, n. 2017, p. 898–905, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.007>>.

THENMOZHI, K.; NARAYANAN, S. Sriman. Horseradish peroxidase and toluidine blue covalently immobilized leak-free sol-gel composite biosensor for hydrogen peroxide. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 223–230, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.075>>.

VEERESH, Gali S.; KUMAR, Pradeep; MEHROTRA, Indu. Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: A review. **Water Research**, v. 39, n. 1, p. 154–170, 2005.

VEITCH, Nigel C. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.

VETAL, Mangesh D.; RATHOD, Virendra K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. March, p. 284–289, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.007>>.

VÍCTOR-ORTEGA, M. D.; OCHANDO-PULIDO, J. M.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A. Phenols removal from industrial effluents through novel polymeric resins: Kinetics and equilibrium studies. **Separation and Purification Technology**, v. 160, p. 136–144, 2016.

VILHENA, Stela Maria C.; CÂMARA, Francisco Luiz A.; KAKIHARA, Sergio T. O cultivo de yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 5–8, 2000.

VISHWASRAO, Chandrahas; CHAKRABORTY, Snehasis; ANANTHANARAYAN, Laxmi. Partial purification, characterisation and thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase isolated from Kalipatti sapota (*Manilkara zapota*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3568–3575, 2017.

VO, Hoang Nhat Phong et al. Removal and monitoring acetaminophen-contaminated hospital wastewater by vertical flow constructed wetland and peroxidase enzymes. **Journal of Environmental Management**, v. 250, n. August, p. 109526, nov. 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109526>>.

VOET, Donald; VOET, Judith G. *Biochemistry*. 2. ed. John Wiley & Sons, Inc, 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0307441295906584>>.

WAGNER, Monika; NICELL, James A. Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 485–495, fev. 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135400002761>>.

WANG, Shuai et al. Oxidative removal of phenol by HRP-immobilized beads and its environmental toxicology assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 234–239, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.022>>.

WU, Long et al. Enzymatic biosensor of horseradish peroxidase immobilized on Au-Pt nanotube/Au-graphene for the simultaneous determination of antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 933, p. 89–96, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.020>>.

WU, Yimin et al. Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. **Water Research**, v. 31, n. 11, p. 2699–2704, 1997.

YANG, Zhiman et al. Rapid degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid facilitated by acetate under methanogenic condition. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 146–151, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.069>>.

YEMENICIOĞLU, Ahmet; ÖZKAN, Mehmet; CEMEROĞLU, Bekir. Partial Purification and Thermal Characterization of Peroxidase from Okra (*Hibiscus esculentum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4158–4163, 1998. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980456o>>.

ZHANG, Hao et al. Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. **Process Biochemistry**, v. 66, n. September, p. 222–229, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.12.011>>.