



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGCAMB

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DA RAIZ YACON
Smallanthus sonchifolius EM CÁPSULAS DE
ALGINATO DE SÓDIO E SUA APLICAÇÃO NA
BIOCONVERSÃO DE 2,4 DICLOROFENOL**

MARIANA GOMES OLIVEIRA

LAGES, 2021

MARIANA GOMES OLIVEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DA RAIZ YACON (*Smallanthus sonchifolius*)
EM CÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO E SUA APLICAÇÃO NA
BIOCONVERSÃO DE 2,4 DICLOROFENOL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Everton Skoronski

Coorientadora: Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka

**LAGES
2021**

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

Oliveira, Mariana
IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DA RAIZ YACON
(*Smallanthus sonchifolius*) EM CÁPSULAS DE ALGINATO DE
SÓDIO E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE 2,4
DICLOROFENOL / Mariana Oliveira. -- 2021.
81 p.

Orientador: Everton Skoronski
Coorientadora: Aniela Kempka
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Lages, 2021.

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

MARIANA GOMES OLIVEIRA

**IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DA RAIZ YACON (*Smallanthus sonchifolius*)
EM CÁPSULAS DE ALGINATO DE SÓDIO E SUA APLICAÇÃO NA
BIOCONVERSÃO DE 2,4 DICLOROFENOL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Everton Skoronski

Coorientadora: Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka

BANCA EXAMINADORA

Orientador

Professor Dr. Everton Skoronski
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Coorientadora



Professora Dra. Aniela Pinto Kempka
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:



Professor Dra. Carla Ivane Ganz Vogel
Universidade do Estado de Santa Catarina



Professor Dra. Rosana Oliveira Henriques
Universidade Federal de Santa Catarina

Lages, 30 de julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Carlos Eduardo e Marilda que desde pequena me mostraram que eu era capaz de tudo, agradeço o suporte que me deram nesses dois anos de mestrado, conselhos e ensinamentos, esse título é graças a vocês.

Aos meus irmãos Mariah, Kadu e Maira que são fonte de carinho e amor, em especial a minha irmã Maira, por ser minha cúmplice em toda jornada, ser minha melhor amiga e por me inspirar a dar o melhor de mim sempre.

Ao meu sobrinho e afilhado Noah que é motivação e sinônimo de alegria em minha vida, me desculpo pelos dias de ausência, mas o resultado dessa caminhada é para você.

Aos meus amigos que foram essenciais durante esse processo, em especial as minhas amigas de laboratório e mestrado Júlia, Taciana e Thaís por estes dois anos de companheirismo, por terem me ajudado em todas as situações, sem vocês com certeza o caminho teria maiores desafios, agradeço imensamente por ter tido vocês comigo.

Ao meu orientador professor Dr. Everton Skoronski, não consigo descrever em palavras o que você representa, é minha inspiração de profissional e educador, agradeço pelos ensinamentos durante estes anos e por ter acreditado em mim desde a graduação, quero que saiba que minha admiração pela pessoa que você é não tem fim.

A minha coorientadora professora Dra. Anielia Pinto Kempka, a qual tenho grande admiração e que mesmo de longe se fez presente, e me auxiliou sem medir esforços durante as reuniões e em minha defesa.

Aos amigos do LABTRAT pelos anos de trabalho em conjunto e por todo auxílio, em especial Mylena Fernandes, Diego Hoefling e Diego Machado agradeço por toda ajuda e ensinamentos.

Agradeço a Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade e qualidade de ensino, à CAPES pela bolsa de dedicação exclusiva à pesquisa e possibilidade de desenvolver este estudo. Também agradeço a infraestrutura do Centro Multiusuário do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina (CMU/CCT/UDESC).

E a banca examinadora pela disponibilidade em avaliar e contribuir em meu trabalho. Neste mundo nada podemos fazer sozinhos, por isso, dedico por fim este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram nesta etapa.

*“Se vi mais longe foi por estar
sobre ombros de gigantes”*

Isaac Newton (1676)

RESUMO

A raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se evidencia como uma alternativa a fonte de enzimas peroxidase, por suas vantagens em relação a custo e seu fácil cultivo. Desta forma, este estudo teve como objetivo extrair, imobilizar e caracterizar a peroxidase obtida da raiz yacon para potencial aplicação na bioconversão de 2,4 diclorofenol em efluentes e avaliação do seu potencial toxicológico. A YPP imobilizada mostrou máxima atividade a 50 °C e pH 13, utilizando pirogalol como substrato padrão. Houve estabilidade térmica para temperatura de 50 °C até 45 min de incubação, para 60 °C manteve-se estável até 30 min, porém a atividade enzimática reduziu drasticamente quando incubada 70 °C. Foi identificado que o mecanismo das reações segue um modelo de *Ping-Pong* Bi-Bi. Os íons metálicos K⁺, Na⁺, Mg²⁺, apresentaram efeito inibitório para YPP imobilizada em destaque para o Cu²⁺ (90% de inibição) seguido do Zn²⁺ (80% de inibição), somente o Ca²⁺, não influenciou significativamente na atividade enzimática. Quando armazenada, em temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelamento, a solução enzimática apresentou melhor estabilidade e conservação de sua atividade sob refrigeração. Na bioconversão de 2,4 diclorofenol, a YPP imobilizada mostrou máxima atividade a 40 °C e pH 6,8. A melhor eficiência de bioconversão (+ de 80%) foi alcançada em uma concentração de peróxido de hidrogênio de 0,50 mM, após 360 minutos de reação. Quanto ao reuso das cápsulas com YPP imobilizada, constatou-se que há possibilidade de reuso em até 2 ciclos. Através do processo de fluxo contínuo foi possível constatar que a YPP imobilizada apresenta grande potencial de uso, mantendo, ao longo de três dias, aproximadamente 50% de remoção do 2,4 DCP. 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 *L. sativa* e *A. cepa* mas ainda assim, conferiu toxicidade. Os resultados sugerem que a peroxidase da casca da raiz yacon imobilizada via EDC/NHS apresenta potencial e pode ser uma alternativa a ser explorada em processos de biocatálise e na bioconversão de compostos fenólicos em efluentes.

Palavras-chave: Yacon. Peroxidase. Imobilização. 2,4 Diclorofenol. Toxicidade

ABSTRACT

Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) stands out as an alternative source of peroxidase enzymes, due to advantages such as low cost and easy cultivation. This study aimed to extract, immobilize and characterize peroxidase enzyme extracted from the yacon root, as well as to apply it in the bioconversion of 2,4 dichlorophenol, in effluent, and to evaluate its toxicological potential. The immobilized YPP showed maximum activity at 50 °C and pH 13, using pyrogallol as the standard substrate. There was thermal stability at a temperature of 50 °C up to 45 min of incubation, for 60 °C it remained stable up to 30 min, but the enzymatic activity drastically reduced when incubated at 70 °C. It was identified that the reaction mechanism follows a Ping-Pong Bi-Bi model. The metallic ions K⁺, Na⁺, Mg²⁺, showed an inhibitory effect for immobilized YPP, specially for Cu²⁺ (90% inhibition) followed by Zn²⁺ (80% inhibition), only Ca²⁺ did not significantly influence the enzymatic activity. When stored at room temperature, under refrigeration and under freezing, the enzymatic solution showed better stability and conservation of its activity under refrigeration. In the 2,4 dichlorophenol bioconversion, the immobilized YPP showed maximum activity at 40 °C and pH 6,8. The best bioconversion efficiency (+80%) was achieved at a hydrogen peroxide concentration of 0,50 mM, after 360 minutes of reaction. As for the reuse of capsules with immobilized YPP, it was found that there is a possibility of reuse in up to 2 cycles. Through the continuous flow process, it was possible to verify that the immobilized YPP has great potential use, maintaining, over three days, approximately 50% of 2,4 DCP removal. The toxicological effects of raw and treated effluent were evaluated using *Lactuca sativa L. var. Buttercrunch* and *Allium cepa* as bioindicators. The treated effluent showed a reduction in toxicity, when compared to the raw one, for the *L. sativa* and *A. cepa* but still, it conferred toxicity. The results suggest that yacon root peroxidase immobilized by EDC/NHS has potential and may be an alternative to be explored in biocatalysis and in the bioconversion of phenolic compounds in effluents.

Keywords: Yacon. Peroxidase. Immobilization. 2,4 dichlorophenol. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Cápsulas de alginato úmidas e secas, sem e com a YPP immobilizada.....	35
Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura das cápsulas de alginato sem e com a YPP immobilizada via EDC/NHS.....	36
Figura 3 – Análise térmica das cápsulas de alginato sem e com a YPP immobilizada	38
Figura 4 – Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier das cápsulas de alginato sem e com e a YPP immobilizada.....	39
Figura 5 – Influência do pH na atividade da YPP immobilizada.....	41
Figura 6 – Influência da temperatura na atividade da YPP immobilizada.....	42
Figura 7 – Estabilidade térmica da YPP immobilizada.....	43
Figura 8 - 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 9 – Influência de íons metálicos na atividade da YPP immobilizada.....	45
Figura 10 - Estabilidade da YPP immobilizada frente à estocagem sob congelamento (0 a -5°C)	46
Figura 11 - Estabilidade da YPP immobilizada frente à estocagem sob refrigeração (4 a 6°C)	47
Figura 12 - Estabilidade da YPP immobilizada frente à estocagem sob temperatura ambiente (20°C)	48
Figura 13 - Aspecto visual das cápsulas de alginato com a YPP immobilizada via EDC/NHS, em 4 quinzenas de estocagem	49
Figura 14 - Influência da massa das cápsulas de alginato com YPP immobilizada via EDC/NHS na bioconversão de 2,4 DCP ao longo do tempo.....	58
Figura 15 - Influência do pH na bioconversão de 2,4 DCP pela YPP immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS.	59
Figura 16 – Influência da temperatura na bioconversão de 2,4 DCP pela YPP immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS.	60
Figura 17 – Influência da concentração de H ₂ O ₂ na bioconversão de 2,4 DCP pela YPP immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS	61
Figura 18 – Aspecto visual dos meios reacionais, antes e após a bioconversão do 2,4 DCP pela YPP immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS.....	62
Figura 19 - Processo de tratamento de 2,4 DCP operado em fluxo contínuo e com uso da YPP immobilizada em cápsulas de alginato	63
Figura 20 - Sementes germinadas de alface (<i>Lactuca sativa L. var. Buttercrunch</i>) após efeito dos tratamentos	65
Figura 21 - Microscopias das células de <i>Allium cepa</i> submetidas as soluções testes antes e após a bioconversão do 2,4 DCP com a YPP immobilizada.....	67
Figura 22 - Desenvolvimento das cebolas (<i>Allium cepa</i>) submetidas as soluções teste antes e após a bioconversão do 2,4 DCP com a YPP immobilizada	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetros e umidade das cápsulas de alginato, sem e com a peroxidase imobilizada.....	35
Tabela 2 – Resultados BET com cápsula de alginato e cápsula com YPP imobilizada.....	40
Tabela 3 - Concentração remanescente de 2,4 DCP e equivalente em bioconversão para cada ciclo de reuso das cápsulas de alginato com YPP imobilizada via EDC/NHS.....	61
Tabela 4 - Concentração de 2,4 DCP nos quartis resultantes do processo em fluxo contínuo e com uso da YPP imobilizada em cápsulas de alginato.....	64
Tabela 5 - Resultados do ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>Buttercrunch</i>)	64
Tabela 6 – Número de sementes germinadas e desenvolvimento da raiz e caule.....	65
Tabela 7 – Índice mitótico das raízes de A. cepa após exposição aos diferentes tratamentos...	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
APHA	American Public Health Association
BET	Brunauer-Emmett-Teller
EDC	N-3-Dimetila Monopropil Etilcarbodiimide Hidroclorido
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HRP	Peroxidase da raiz forte
<i>L. sativa</i>	<i>Lactuca sativa</i>
MES	Sal Hemissódico de Ácido 2- N- Morfolino Etassulfônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NHS	N-Hydroxysuccinimide
PEG	Polietilenoglicol
TGA	Análise Termogravimétrica
YPP	Peroxidase purificada da Yacon
2,4 DCP	2,4 diclorofenol

SUMÁRIO

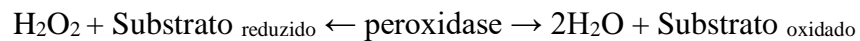
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS.....	20
1.1.1 Objetivo Geral.....	20
1.1.2 Objetivos Específicos.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3 EXTRAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO EM CÁPSULAS DE ALGINATO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DA PEROXIDASE OBTIDA DA CASCA DA RAIZ YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	26
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.2.1 Materiais.....	28
3.2.2 Matéria prima para extração da peroxidase	28
3.2.3 Extração da peroxidase, imobilização e caracterização das cápsulas	29
3.2.3.1 Extração da peroxidase a partir da casca da raiz yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)....	29
3.2.3.2 Purificação parcial do extrato enzimático.....	29
3.2.3.3 Imobilização da peroxidase via EDC/NHS	29
3.2.4 Caracterização das cápsulas	30
3.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
3.2.4.3 Termogravimétrica (TGA).....	31
3.2.4.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	31
3.2.4.5 Brunauer-Emmett-Teller (BET).....	31
3.2.5 Caracterização Bioquímica.....	32
3.2.5.1 Medida da atividade enzimática e atividade específica da peroxidase imobilizada	32
3.2.5.2 Influência do pH na atividade específica a peroxidase imobilizada	32
3.2.5.3 Influência da temperatura na atividade específica e estabilidade térmica da peroxidase imobilizada	33
3.2.5.4 Influência da concentração dos substratos na atividade específica da peroxidase imobilizada e estudo cinético	33
3.2.5.5 Influência dos íons metálicos na atividade específica da peroxidase imobilizada.....	34
3.2.5.6 Estabilidade da peroxidase imobilizada frente à estocagem.....	34
3.2.6 Análise Estatística dos dados experimentais	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

3.3.1 Caracterização das cápsulas	35
3.3.1.1 Caracterização de diâmetro e umidade.....	35
3.3.2 Influência do pH na atividade da YPP imobilizada	40
3.3.3 Influência da temperatura na atividade e estabilidade térmica da YPP imobilizada	41
3.3.3.1 Influência da temperatura na atividade da YPP imobilizada.....	41
3.3.3.2 Estabilidade térmica da YPP imobilizada.....	43
3.3.4 Influência da concentração dos substratos na atividade da YPP imobilizada e estudo cinético.....	43
3.3.5 Influência de íons metálicos na atividade da YPP imobilizada	45
3.3.6 Estabilidade da peroxidase imobilizada frente a estocagem.....	46
3.4 CONCLUSÃO.....	49
4 BIOCONVERSÃO DE 2,4 DICLOROFENOL COM USO DA PEROXIDASE DA RAIZ YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) IMOBILIZADA EM CÁPSULAS DE ALGINATO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....	50
4.1 INTRODUÇÃO	50
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.2.1 Aplicação da YPP imobilizada no tratamento de efluente sintético	52
4.2.1.1 Determinação da concentração de 2,4 diclorofenol	52
4.2.1.2 Cinética de bioconverção do 2,4 diclorofenol	52
4.2.1.3 Influência do pH e da temperatura na bioconversão do 2,4 diclorofenol.....	53
4.2.1.4 Influência da concentração de H ₂ O ₂ na bioconversão de 2,4 diclorofenol.....	53
4.2.1.5 Avaliação de potencial de reuso das cápsulas.....	54
4.2.2 Processo contínuo	54
4.2.3 Ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de (<i>Lactuca sativa L. var. Buttercrunch</i>)	55
4.2.4 Ensaio de citotoxicidade em cebolas (<i>Allium cepa</i>).....	56
4.2.5 Análise estatística dos dados experimentais	57
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.3.1 Cinética de bioconversão do 2,4 diclorofenol	57
4.3.2 Influência do pH e temperatura na bioconversão de 2,4 diclorofenol.....	58
4.3.3 Influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão de 2,4 diclorofenol	60
4.3.4 Reuso das cápsulas na bioconversão de 2,4 diclorofenol	61
4.3.5 Processo Contínuo de tratamento de 2,4 DCP com a YPP imobilizada	62

4.3.6 Fitotoxicidade do meio reacional antes e após a bioconversão com a YPP immobilizada	63
4.3.7 Ensaio de citotoxicidade do meio reacional antes e após a bioconversão com a YPP immobilizada	66
4.4 CONCLUSÃO	68
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Peroxidases (EC 1.11.1.7) são heme proteínas que reduzem o peróxido de hidrogênio enquanto catalisam a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos (BILAL et al., 2016). Identificadas como oxidorreduções, as peroxidases tem sido amplamente utilizadas e catalisam a reação redox subsequente (LAVERY et al., 2010):



Classificada em duas famílias, vegetal e animal, (ELSAYED et al., 2018) são encontradas em plantas, vertebrados, micróbios e fungos, assim, peroxidases podem ser distribuídas em três classes principais (KUMAR et al., 2011), sendo a classe III, a que será abordada neste estudo. A classe III é composta por peroxidases secretoras de plantas que possuem um grupo prostético ferriprotoporfina IX. Pode-se destacar que a mesma, devido a suas multifunções e especificidade aos substratos, encontra-se em diversas aplicações comerciais (KUMAR et al., 2011), como na construção de biossensores e kits para diagnósticos (CENTENO; SOLANO; CASTILLO, 2017; KAFI et al., 2018), na biotransformação de compostos orgânicos, no tratamento de efluentes industriais contendo corante (FRITZKE, 2019), tratamento de efluentes industriais contendo fenol (SOUZA, 2020), entre outros processos.

Diversas fontes de peroxidase de origem vegetal já foram descritas na literatura, pode-se citar a peroxidase das folhas de cedro *Cedrela fissilis* (FRITZKE, 2019), da folha de tamareira *Phoenix dactylifera* (SAUD AL-BAGMI et al., 2019a), bulbos de jaca *Artocarpus heterophyllus* (TAO et al., 2018), dentre outras. Porém, a que possui comercialização é a peroxidase da raiz forte (*Azadirachta indica*), conhecida como HRP (KUMAR et al., 2011), uma peroxidase de fácil extração e alta disponibilidade, com uso de nível laboratorial ao industrial, inclusive no tratamento de efluentes industriais contaminados com fenol (BILAL et al., 2016).

Compostos fenólicos são conhecidos como poluentes prioritários devido seu efeito mutagênico e sua toxicidade em baixas doses (WANG et al., 2015), esses compostos tendem a persistir e acumular-se no ambiente e na cadeia alimentar (VÍCTOR-ORTEGA; OCHANDO-PULIDO; MARTÍNEZ-FÉREZ, 2016). Compõe os principais subprodutos industriais (petróleo, químicos e plásticos) e agrícolas e podem ser encontrados em águas superficiais, bem como em amostras alimentares e clínicas (ISPAS et al., 2010). O fenol não é facilmente

biodegradável, e ainda, é relatado tóxico e inibidor de crescimento para diversos microrganismos, mesmo para aqueles que a espécie tem a capacidade de metabolizá-lo como substrato de crescimento (CARABAJAL et al., 2016b). A degradação enzimática de fenóis em formas menos tóxicas tem sido sugerida como método de tratamento, assim, diversas enzimas que catalisam a oxidação de fenóis têm sido utilizadas para este fim, como a HRP (ISPAS et al., 2010). Contudo, devido ao seu alto custo e utilização comercial em outros processos, se torna inviável para aplicação no tratamento de efluentes, devido a este fato, outras fontes de peroxidases vegetais tem sido estudadas para esta finalidade (DEVA et al., 2014).

Na busca por enzimas alternativas, a raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se evidencia. Nativa dos Andes e cultivada por seus tubérculos, comumente é utilizada na forma de alimento na América do Sul (VALENTOVÁ, K. ULRICHOVÁ, 2003). Após estudos de extração, purificação e caracterização da enzima, notou-se que a peroxidase da yacon apresenta características adequadas para aplicação no tratamento de efluentes fenólicos (SOUZA, 2020). Para que enzimas possam ser utilizadas em processos de tratamento contínuo, é interessante o uso dela na forma imobilizada para otimização e redução de perdas (MATEO et al., 2007). A aplicação de enzimas imobilizadas tem ganho maior espaço nos estudos científicos devido ao seu baixo impacto nos ecossistemas e baixo custo (MATTO; HUSAIN, 2009).

Destaca-se que não existem estudos definitivos sobre a aplicação da peroxidase de yacon imobilizada no tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos, desta forma, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a enzima peroxidase obtida das cascas da raiz yacon na forma imobilizada, caracterizá-la de forma bioquímica e estrutural, aplicá-la na bioconversão de fenol em efluente e por fim avaliar toxicidade do efluente tratado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do estudo foi extrair, imobilizar e caracterizar a peroxidase obtida da raiz yacon, aplicar na bioconversão de fenol em efluente e avaliar o potencial toxicológico do efluente tratado.

1.1.2 Objetivos Específicos

I- Avaliar o desempenho da peroxidase obtida da yacon no tratamento de efluentes na forma imobilizada;

II- Atribuir um ganho em termos de estabilidade operacional e de estocagem por meio de técnica de imobilização nas enzimas peroxidase da yacon;

III- Estudar a influência da estocagem das enzimas imobilizadas no tratamento de efluentes;

IV- Avaliar o efeito do tratamento enzimático na toxicidade dos efluentes submetidos ao contato com a peroxidase da yacon, a partir de testes de fitotoxicidade e citotoxicidade;

V- Determinar o número de ciclos de reuso da peroxidase na bioconversão de fenol em efluentes;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Peroxidases (heme proteínas) são enzimas (EC 1.11.1.7) que catalisam a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos na presença de peróxidos (PANDEY et al., 2017a). 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, H; STILLMAN, 1976). 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).

A enzima peroxidase com utilização consolidada é a HRP (*Azoreobrykon ananias*), extraída da raiz forte. A HRP é a enzima mais estudada devido a sua disponibilidade, sua fácil extração e o aumento da sua aplicação potencial que vai dos níveis laboratoriais até o industrial. Aplicações mais recentes da HRP incluem, efluentes contendo compostos fenólicos, síntese orgânica, eliminação de compostos tóxicos da água, desintoxicação de efluentes industriais, finalidade analítica e tratamento de câncer (BILAL et al., 2016). No entanto, devido ao seu alto custo, torna-se inviável para aplicação no tratamento de efluentes em larga escala, por este motivo peroxidases de outras fontes vêm sendo estudadas (DEVA et al., 2014). As peroxidases de plantas e microrganismos podem ser mais baratas que a peroxidase da raiz forte, o que torna sua aplicação promissora no tratamento de efluentes (MACIEL et al., 2007).

O Quadro 1 apresenta algumas das peroxidases já estudadas, bem como sua fonte de origem e características de pH e temperatura relacionadas a um determinado substrato.

Quadro 1 - Peroxidases de diferentes fontes vegetais, melhores faixas de pH, temperatura e substrato utilizado.

Matéria Vegetal	pH	Temperatura	Substrato	Referência
Folhas de Tamareira (<i>Phoenix dactylifera</i>)	4,5	75°C	Guaiacol	(SAUD AL-BAGMI et al., 2019a)
Folhas de Algaroba (<i>Prosopis juliflora</i>)	5,0 a 7,0	40°C	Guaiacol	(SINGH et al., 2017)
Folhas de Nim (<i>Azadirachta indica</i>)	5,0	40°C	Guaiacol	(PANDEY et al., 2017b)
Folha de Leiteiro-vermelho (<i>Euphorbia conitifolia</i>)	6,0	50°C	Guaiacol	(KUMAR et al., 2011)
Folhas de Cedro (<i>Cedrela fissilis</i>)	5,0 a 6,0	40°C	Guaiacol	(FRITZKE, 2019)
Folhas de Couve (<i>Brassica olearacea var. capitata</i>)	5,5	55°C	Guaiacol	(KHARAT MOL; PANDIT, 2013)
Casca de Laranja (<i>Citrus cinenses</i>)	6,0	30°C	Guaiacol	(VETAL; RATHOD, 2015)
Casca da Árvore Bálamo da Arábia (<i>Commiphora gileadensis</i>)	7,0	55°C	Guaiacol	(ALMULA IKY; AL-HARBI, 2019)
Raízes de Nabo (<i>Brassica rapa subsp. Rapa</i>)	5,5 a 6,0	50 a 60°C	ABTS	(QUINTA NILLAGUERRER O et al., 2008a)
Raízes de Feijão Verde (<i>Vigna radiata</i>)	5,5	40°C	o-Dianisidina	(BASHA; RAO, 2017)

Bulbos de Jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	5,5	55 a 60°C	o-Fenilenodiamina	(TAO et al., 2018)
Caule de Leucena (<i>Leucaena leucocephala</i>)	5,0	55°C	Guaiacol	(PANDEY; DWIVEDI, 2011)
Melão de São Caetano (<i>Momordica charantia</i>)	3,0	40°C	-	(MATTO; HUSAIN, 2009)
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)	6,0 a 8,0	30 a 40°C	Guaiacol	(ALTUNK AYA; GÖKMEN, 2011)

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Observa-se que, para a maioria das matrizes vegetais relatadas no Quadro 1, os pHs de melhor atuação da peroxidase estão entre 5 e 6. Em relação a temperatura, também se observa que a faixa de atividade ótima fica em torno de 40°C, porém algumas peroxidases são resistentes a maiores temperaturas sem sofrer significativa perda de atividade.

A atividade enzimática é a velocidade com que uma enzima transforma o substrato em produto. As condições ótimas para a catálise por diferentes peroxidases não são idênticas. Sua atividade depende em grande parte de fatores ambientais, como pH e temperatura, portanto identificar essas faixas é essencial para alcançar a melhor eficiência enzimática (SAUD AL-BAGMI et al., 2019b). Como foi visto no Quadro 1, diversas peroxidases de fontes vegetais, vêm sendo caracterizadas e tendo sua aplicação estudada, uma vez que a especificidade relacionada aos substratos e as propriedades dessas enzimas justificam sua aplicação (VETAL; RATHOD, 2015).

A raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*) é nativa dos Andes, cultivada por seus tubérculos e é utilizada para alimentação, inclusive na América do Sul (VALENTOVÁ, K. ULRICHOVÁ, 2003). Essa raiz com cerca de 90% de umidade (b.u), possui características biológicas que a fizeram ganhar atenção a nível mundial, como seu fácil cultivo, alta concentração de antioxidantes, adaptação a climas variáveis e ainda dispor de propriedades nutritivas e medicinais (PERUSSELLO et al., 2015). Porém, quando se trata de alimentação, a enzima podem causar o escurecimento da raiz e, desta forma, os estudos nessa área são voltados, sobretudo, para a sua inativação (FANTE et al., 2013a; LAGO; NOREÑA, 2014).

As enzimas peroxidases catalisam reações com alta especificidade e eficiência, porém esses processos podem ser prejudicados devido à cinética desfavorável entre a enzima e o poluente. Também a aplicação industrial generalizada é dificultada pela falta de estabilidade operacional em longo prazo, armazenamento e sua reutilização. Essas desvantagens podem ser superadas através da imobilização enzimática (MATTO; HUSAIN, 2009). O aumento de métodos de imobilização gera uma significativa aplicação de oxirredutases em diversos processos tecnológicos, pois esses métodos tornam as enzimas mais resistentes a mudanças de parâmetros ambientais ou compostos interferentes (GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014). Para isto, é importante selecionar a matriz sólida apropriada para imobilização, algumas matrizes já são utilizadas como o alginato, carvão ativado, espumas de poliuretano e kappa-carragenana (CARABAJAL et al., 2016a). O encapsulamento de enzimas em alginato atrai muita atenção devido a sua adequação como suporte à imobilização de enzimas e sua fácil preparação. As cápsulas de alginato fornecem uma boa resistência mecânica, baixo custo e alta eficiência para degradação de compostos orgânicos de origem e natureza diferentes (BOUCHERIT; ABOUSEOUD; ADOUR, 2013; WON et al., 2005). Pesquisadores vêm conduzindo experimentos usando alginato para imobilização de peroxidases, e os ensaios apresentam excelentes resultados em termos de estabilidade, reutilização e remoção de poluentes em efluentes de águas residuárias (DAÂSSI et al., 2014; MATTO; HUSAIN, 2009).

Ao referir-se a poluentes orgânicos, o grupo dos fenóis e seus derivados são os principais subprodutos industriais (petróleo, químicos e plásticos) e agrícolas que podem ser encontrados em águas superficiais bem como em amostras alimentares e clínicas (ISPAS et al., 2010). Conhecidos como poluentes prioritários devido seu efeito mutagênico e sua toxicidade em baixas doses (WANG et al., 2015), os fenóis clorados, como o 2,4 diclorofenol, ou 2,4 DCP, é um exemplo de composto encontrado em herbicidas utilizados na agricultura que gera grande preocupação (YANG et al., 2017).

A bioconversão enzimática de compostos fenólicos vem sendo estudada há anos e foi proposta pela primeira vez em 1981. Desde então, seu uso é melhorado para aumento de eficiência, técnicas e viabilidade econômica, além de ser testado em efluentes de diversas origens e compostos (SOUZA, 2020). Há diversas vantagens em um tratamento de efluentes baseado em enzimas sobre os tratamentos biológicos, químicos e físicos convencionais. Na maioria dos casos, os processos de tratamento físico-químicos não são muito seletivos em número de poluentes removidos e podem se tornar caros para resíduos de alta resistência, portanto esses tratamentos são economicamente mais viáveis para águas residuais diluídas. As enzimas atuam com maior especificidade, o que permite que o tratamento seja direcionado ao

poluente. No tratamento, a enzima catalisa a oxidação de compostos aromáticos com o peróxido de hidrogênio, o qual gera radicais que acoplam-se para formar oligômeros maiores que são praticamente insolúveis em água e podem ser facilmente separados por filtração ou sedimentação, o qual torna esse tipo de tratamento o mais recomendado para remoção de fenol (CAZA et al., 1999; ISPAS et al., 2010).

Considerando a avaliação da toxicidade em efluentes tratados com peroxidases, a maioria dos estudos avaliam este efeito com plantas, pois estas apresentam vantagens em relação ao custo e agilidade, comparados a ensaios realizados com animais e/ou microrganismos. Os estudos mostraram que os resultados da avaliação apresentam redução na toxicidade do efluente ao utilizar a peroxidase em seu tratamento. Destaca-se também que as espécies mais utilizadas na avaliação de fitotoxicidade e citotoxicidade são, respectivamente o Alface (*Lactuca sativa*) e a cebola (*Allium cepa*), pelo seu rápido crescimento, fácil manuseio e sensibilidade a compostos químicos, podendo ser aplicados também em estudos com efluentes contendo fenol (SOUZA, 2020).

3 EXTRAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO EM CÁPSULAS DE ALGINATO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DA PEROXIDASE OBTIDA DA CASCA DA RAIZ YACON (*Smallanthus sonchifolius*)

RESUMO

A raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se evidencia como uma fonte alternativa de enzimas peroxidase, por suas vantagens em relação a custos e fácil cultivo. Desta forma, este estudo teve como objetivo extrair, imobilizar e caracterizar a peroxidase obtida da raiz yacon para potencial aplicação em processos de tratamento industriais. A YPP imobilizada mostrou máxima atividade a 50 °C e pH 13, utilizando pirogalol como substrato padrão. Houve estabilidade térmica para temperatura de 50 °C até 45 min de incubação, para 60 °C manteve-se estável até 30 min, porém a atividade enzimática reduziu drasticamente quando incubada 70 °C. Foi identificado que o mecanismo das reações segue um modelo de *Ping-Pong* Bi–Bi. Os íons metálicos K⁺, Na⁺, Mg²⁺, apresentaram efeito inibitório para YPP imobilizada em destaque para o Cu²⁺ (90% de inibição) seguido do Zn²⁺ (80% de inibição), somente o Ca²⁺, não influenciou significativamente na atividade enzimática. Quando armazenada, em temperatura ambiente, sob refrigeração e sob congelamento, a solução enzimática apresentou melhor estabilidade e conservação de sua atividade sob refrigeração. Os resultados sugerem que a peroxidase de casca de yacon imobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS apresenta potencial e pode ser uma alternativa a ser explorada em processos de biocatálise. A peroxidase da casca da raiz de Yacon, imobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS apresenta potencial de aplicação sendo uma alternativa à HRP no tratamento de águas, efluentes e no desenvolvimento de biossensores, além de outros processos de biocatálise

Palavras-chave: Yacon. Peroxidase. Imobilização. Alginato de Sódio

3.1 INTRODUÇÃO

Peroxidases (heme proteínas) são enzimas oxirredutases, que catalisam a oxidação de diversos tipos de substratos, como fenóis, utilizando o peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos como acceptor final de elétrons (ELY; KEMPKA; SKORONSKI, 2016; QUINTANILLA-GUERRERO et al., 2008b). As peroxidases possuem aplicação industrial como no tratamento de efluentes e processamento de alimentos e também em

processos clínicos e de biotecnologia (BASHA; PRASADA RAO, 2017). A enzima extraída da raiz forte (*Azorella rustica*), conhecida como HRP, é a peroxidase mais comumente utilizada no mercado, e seu uso varia desde o desenvolvimento de biossensores até sua incorporação em kits de diagnósticos clínicos, inviabilizando economicamente o seu uso em larga escala para o tratamento de efluentes (CENTENO; SOLANO; CASTILLO, 2017). Assim, pesquisas vem sendo desenvolvidas, explorando novas fontes de peroxidases com menor custo e fácil disponibilidade (BASHA; PRASADA RAO, 2017).

Na busca por enzimas alternativas, a raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se evidencia. Nativa dos Andes, é cultivada por seus tubérculos e utilizada como alimento na América do Sul (VALENTOVÁ, K. ULRICHOVÁ, 2003). Com efeitos potenciais de melhora na saúde humana, a yacon é recomendada para quem sofre de diabetes e disfunções intestinais e renais, visto que possui propriedades prebióticas e antioxidantes (LAGO; NOREÑA, 2014). A raiz é conhecida pelo seu rápido escurecimento, que ocorre devido a presença de compostos fenólicos e as enzimas peroxidase e polifenoloxidase (PADILHA et al., 2009). Desta forma, os estudos da raiz yacon são voltados, sobretudo, para a inativação enzimática (FANTE et al., 2013b; LAGO; NOREÑA, 2014). Em seu cultivo, são observadas algumas vantagens em seu cultivo como adaptabilidade a diversas condições climáticas. Vinculado aos benefícios gerados a saúde da população, a yacon representa um vegetal a ser explorado com potenciais aplicações agrícolas, tecnológicas e científicas (SANTANA; CARDOSO, 2008). Sendo assim, após consultados estudos de extração, purificação e caracterização da enzima, notou-se que a peroxidase da yacon apresenta características adequadas para aplicação no tratamento de efluentes (SOUZA, 2020).

Contudo, as peroxidases podem ter seu desempenho afetado por alguns fatores como altas temperaturas, ambientes ácidos e interação enzima efluente (ASAD et al., 2011; KALAIARASAN; PALVANNAN, 2014). Outros aspectos como reutilização e armazenamento das enzimas também afetam seu uso, ademais em escala industrial, essas desvantagens podem ser suprimidas através da imobilização enzimática (MATTO; HUSAIN, 2009). A imobilização faz possível a obtenção de enzimas mais estáveis e que possam ser reutilizadas, além de adquirir maior resistência a alterações ambientais (GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014). Diversas matrizes sólidas vem sendo utilizadas para este processo, dentre essas, o alginato de sódio apresenta-se como uma matriz adequada para imobilização, a qual ainda oferece uma boa resistência mecânica a enzima (CARABAJAL et al., 2016b; WON et al., 2005).

Destaca-se que não há estudos definitivos sobre a caracterização da peroxidase de yacon imobilizada, assim, o presente trabalho teve como objetivo extrair, imobilizar e caracterizar de forma bioquímica e estrutura, a peroxidase obtida das cascas da raiz yacon.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Os principais reagentes utilizados foram: Alginato de Sódio (Sigma Aldrich), peróxido de hidrogênio 30% (Química Moderna), ácido cítrico (Neon), ácido clorídrico (Neon), fosfato de sódio monobásico (Neon), fosfato de sódio bibásico (Neon), fosfato de potássio monobásico (Dinâmica), fosfato de potássio bibásico (Dinâmica), cloreto de sódio (Neon), cloreto de cálcio (Neon), cloreto de amônio (Neon), EDC (Sigma Aldrich), hidróxido de sódio (Biotec), hidróxido de amônio (Alphatec), glicina (Vetec), NHS (Sigma Aldrich), Pirogalol (Reatec), MES (Sigma Aldrich), sulfato de amônio (Neon), sulfato de potássio (Dinâmica), sulfato de sódio (Biotec), sulfato de cálcio (Dinâmica), sulfato de cobre (Neon), sulfato de zinco (Dinâmica), sulfato de magnésio (Neon), PEG 6000 (Dinâmica), persulfato de sódio (Sigma Aldrich), 4- aminoantipirina (Reatec) e 2,4 diclorofenol (Sigma Aldrich).

Os principais equipamentos utilizados foram: espectrofotômetro (Prove 100), centrífuga de bancada (Kasvi), banho de agitação orbital (Ultronique/Eco sonics), bomba a vácuo (Solab SL60), estufa (Cienlab S-350), pHmetro digital (Kasvi), geladeira (Consul), freezer (Consul), mixer (Electrolux), shaker (Solab SL222), vórtex (Kasvi), termomix (Kasvi), bomba de infusão peristáltica (Icatu da Samtronic), coluna de vidro (Sigma Aldrich) e microscópio de bancada (Zeiss).

3.2.2 Matéria prima para extração da peroxidase

A Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) foi adquirida no comércio local de Lages/SC onde foram procuradas raízes com características similares para compra, após isto, foram imediatamente armazenadas em saco plástico sob refrigeração (5°C) até o uso, a yacon foi deixada de molho em água destilada por 15 minutos, após este período foram secas com papel toalha e descascadas. Não foi necessário descascá-las em forma e tamanho específico pois posteriormente seriam trituradas.

3.2.3 Extração da peroxidase, imobilização e caracterização das cápsulas

3.2.3.1 Extração da peroxidase a partir da casca da raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

A extração da peroxidase, foi realizada utilizando uma relação 1:1 (m v⁻¹) de cascas e solução tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0. As cascas e a solução tampão foram homogeneizadas com um *mixer*, e a mistura filtrada em papel filtro (Whatman n°1) e uma camada de gaze de algodão, com auxílio de uma bomba a vácuo, sendo removidas as partículas sólidas. Posterior a filtragem, o extrato foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, para retirada do material insolúvel, e armazenado a 5°C (SAUD AL-BAGMI et al., 2019b).

3.2.3.2 Purificação parcial do extrato enzimático

Para purificação parcial do extrato enzimático, foi utilizado 14 % de polietilenoglicol 6000 (PEG) e 10 % de sulfato de amônio, em relação ao volume de extrato. Inicialmente, o extrato foi mantido a 100 rpm/5°C e, na sequência foi adicionado o sulfato de amônio seguido do PEG até que ambos fossem dissolvidos (cerca de 2 horas). Após este processo, a amostra foi armazenada a 5°C por 24h. Após este, foi retirada a espuma remanescente do extrato, e o líquido total então foi centrifugado a 4000 rpm até restar somente um líquido de coloração clara. O extrato parcialmente purificado foi armazenado a 5°C (PANDEY et al., 2017b).

3.2.3.3 Imobilização da peroxidase via EDC/NHS

As cápsulas de alginato foram obtidas a partir de uma solução de 3,5% (m v⁻¹) de alginato de sódio, homogeneizada a 50°C, resfriada e gotejada, com o uso de uma seringa hipodérmica com agulha (0,7x 25 mm) em uma solução de cloreto de cálcio 4% (m/v). As cápsulas foram mantidas em agitador magnético com baixa rotação até o completo gotejamento de toda a solução de alginato de cálcio. Na sequência, as cápsulas foram armazenadas na própria solução de cloreto de cálcio a 5°C.

Para o preparo do suporte de imobilização, utilizou-se uma metodologia que objetiva a ligação covalente entre o grupamento carboxila do suporte de alginato de cálcio e o grupo amina da enzima (MERCK MILLIPORE, 1995). Para tanto, utilizou-se a via EDC (N-3-dimetil monopropil etilcarbodiimide hidrocloreto) /NHS (N-Hidroxisuccinimida). A partir de um volume conhecido de cápsulas de alginato de cálcio, foram adicionados 7,0 mL de H₂O

ultrapura, 2,5 mL de solução tampão de sal hemissódico de ácido 2- N- morfolino etassulfônico (MES) 200mM (pH 6) e 250 µL de solução de NHS (200mM). A mistura foi mantida em ultrassom de baixa frequência 30 min. Após, foi adicionada 250 µL da solução de EDC (80mM) e a mistura, mantida em agitação (200 rpm) por 2h. Ao final das etapas, as cápsulas foram lavadas por imersão com uma solução tampão MES 50mM (pH 6).

Para imobilização da enzima, foram misturadas as cápsulas obtidas da etapa anterior, H₂O ultrapura, solução tampão MES 200mM (pH 6) e o extrato da peroxidase parcialmente purificado, na proporção de 2:1:1. A mistura foi mantida em agitação orbital (200 rpm), a 20°C, 4h. As cápsulas, contendo a peroxidase imobilizada, foram lavadas com H₂O ultrapura e armazenadas a 5°C somente as cápsulas em um *becker*.

3.2.4 Caracterização das cápsulas

3.2.4.1 Caracterização do diâmetro e umidade

Para a determinação do diâmetro médio das cápsulas de alginato com e sem enzima imobilizada na condição úmida, foram separadas três cápsulas as quais foram selecionadas aleatoriamente, totalizando 3 cápsulas com e 3 sem enzima imobilizada. O diâmetro de cada cápsula foi determinado com o uso régua e feito o cálculo de média aritmética.

Para a determinação da massa seca média das cápsulas, em cadinhos de porcelana previamente secos em estufa a 100°C por 1 hora e subsequente pesagem, foram inseridas 10 unidades das cápsulas, em triplicata. Em seguida, os cadinhos com as cápsulas foram pesados e levados à estufa a 100°C, onde permaneceram por 24 horas. Após este período, foram inseridos em dessecador por 15 minutos e novamente pesados, possibilitando a determinação da umidade das cápsulas. As 10 cápsulas secas de cada grupo (com e sem enzima imobilizada) foram aleatoriamente separadas em 3 grupos de 3, para a medição individual dos seus diâmetros em condição seca e calculado média aritmética.

3.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no equipamento Jeol/modelo JSM 6701F, a qual foi utilizada para caracterizar a morfologia das cápsulas com e sem a peroxidase imobilizada. Foi realizado o revestimento em ouro em um BAL-TEC Sputter Coater (SCD 050) por 120 s. A ampliação foi de 40, 100 e 1000 vezes. A MEV foi conduzida em um laboratório

do centro multiusuário do centro de ciências tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina (CMU/CCT/UDESC) em Joinville/SC.

3.2.4.3 Termogravimétrica (TGA)

Determinação da perda de massa em função do aumento da temperatura. A análise foi realizada empregando o equipamento TGA701 Thermogravimetric Analyzer da marca LECO. A temperatura foi elevada de 25 °C para 300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de gás Nitrogênio 5.0 (N₂). A TGA foi conduzida em um laboratório externo (LABSATC) em Criciúma/SC.

3.2.4.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras das cápsulas com e sem a enzima imobilizada foram preparadas a partir da dispersão em pastilhas de KBr, no equipamento INVENIO-S Marca: Bruker. Os espectros de FTIR (4000 a 400 cm⁻¹) foram efetuados com uma resolução de 4 cm⁻¹, realizando 32 varreduras e determinando as transmitâncias, para visualização dos grupos funcionais. O FTIR foi conduzido em um laboratório do centro multiusuário do centro de ciências tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina (CMU/CCT/UDESC) em Joinville/SC.

3.2.4.5 Brunauer-Emmett-Teller (BET)

A análise de Brunauer-Emmett-Teller foi realizada nas cápsulas com e sem a enzima imobilizada. Onde foi determinado área superficial, volume total e diâmetro dos poros, através da técnica de adsorção de nitrogênio em baixas temperaturas. A amostra foi preparada com ativação a 45 °C por 2 horas, e posteriormente resfriada até 25 °C para realização da análise. Após a preparação, a análise foi realizada em um equipamento da marca Quantachrome, modelo Quadrasorb evo, com o software de processamento QuadraWin. O gás adsorvente utilizado é o gás Nitrogênio 5.0. O BET foi conduzido em um laboratório externo (LABSATC) em Criciúma/SC.

3.2.5 Caracterização Bioquímica

3.2.5.1 Medida da atividade enzimática e atividade específica da peroxidase imobilizada

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com o protocolo de (CHANCE; MAEHLI, (1955), por meio da oxidação do substrato pirogalol no produto purpurogalina ($\epsilon = 2.47 \text{ l/mM cm}$). Foram misturados, 3,5 mL de H₂O ultrapura, 0,533 mL de solução tampão fosfato de potássio 100 M (pH 6), 0,266 mL de peróxido de hidrogênio 35% (H₂O₂), 0,533 mL de pirogalol e 0,3g (peso úmido) contendo a peroxidase imobilizada. A mistura foi homogeneizada em *vórtex* e, na sequência, foi realizado o monitoramento espectrofotométrico no comprimento de onda de 420 nm. Para o branco, foi utilizada H₂O ultrapura em substituição ao extrato enzimático. Uma unidade de atividade de peroxidase (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mg de purpurogalina em 20 s, pH 6 e 20 °C. A variação de absorbância foi utilizada para o cálculo da atividade específica, conforme a Equação 1.

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

Onde, V_{ensaio} representa o volume total do ensaio (5 mL) e m_{enzima} se refere a massa úmida das cápsulas com extrato enzimático imobilizado (0,3 g de cápsulas). 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 e C é a cubeta utilizada em cm.

3.2.5.2 Influência do pH na atividade específica da peroxidase imobilizada

Para verificar a influência do pH na atividade da peroxidase imobilizada, foram utilizados o tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1 M / fosfato de sódio 0,2 M) para os pHs entre 2,2 e 8 e o tampão Sörensen (glicina 0,1 M / cloreto de sódio 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M) para os pHs entre 10 e 13. O ensaio foi realizado como descrito item 3.2.4.1, fazendo a substituição da solução tampão fosfato de potássio, pela solução tampão McIlvaine ou Sörensen, adequada ao pH estudado. Cada ensaio de atividade foi realizado em triplicata com uma prova em branco (GAO et al., 1998). Os resultados de atividade enzimática foram convertidos para

atividade relativa (%), sendo 100% de atividade para o ensaio de maior atividade e os demais resultados ponderados em relação ao 100%.

3.2.5.3 Influência da temperatura na atividade específica e estabilidade térmica da peroxidase imobilizada.

Para determinar a influência da temperatura na atividade específica da peroxidase imobilizada, foram realizados ensaios de atividade específica conforme descrito no item 3.2.5, porém com a mistura incubada nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 °C até que fosse atingido o equilíbrio. Cada ensaio foi realizado em triplicata com uma prova em branco. Os resultados de atividade enzimática foram convertidos para atividade relativa (%), sendo 100% de atividade para o ensaio de maior atividade e os demais resultados ponderados em relação ao 100%.

A estabilidade térmica da YPP foi verificada através da incubação das cápsulas contendo a peroxidase imobilizada, imersas em água ultrapura, nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C por 60 min. Em intervalos de 15 min, foi determinada a atividade remanescente, definida como a diferença entre a atividade enzimática antes da incubação e após a incubação, e expressa em percentual (PANDEY et al., 2017a).

3.2.5.4 Influência da concentração dos substratos na atividade específica da peroxidase imobilizada e estudo cinético

Para a verificação da influência da concentração dos substratos na atividade específica da peroxidase imobilizada, foi determinada a atividade específica para diferentes concentrações de pirogalol e de peróxido de hidrogênio, por se tratar de um catalisador cuja atividade depende de dois substratos. Para o pirogalol, foram avaliadas as concentrações de 1,04; 2,08; 4,16; 8,32; 20,8; 41,6 e 83,20 mM, mantendo-se as concentrações de peróxido hidrogênio em 2,08; 4,16; 20,8; 41,6; 104; 208 e 416 mM para cada concentração de pirogalol indicada anteriormente. Além das concentrações de pirogalol e peróxido de hidrogênio, as demais condições experimentais seguiram a descrição do item 3.2.4.1.

No estudo cinético, foram calculados os valores das constantes do modelo de Michaelis-Menten (K_m e $v_{máx}$) utilizando software SigmaPlot 12.0 (Systat), o qual para ambos os substratos foram calculados a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk. O mecanismo de

oxidação, baseado em cinética de dois substratos, foi avaliado por meio das curvas obtidas para as diferentes concentrações de substrato.

3.2.5.5 Influência dos íons metálicos na atividade específica da peroxidase imobilizada

A influência de íons metálicos sobre a atividade específica da peroxidase imobilizada foi avaliada utilizando soluções 10 mM de sais de sulfato contendo como cátions: K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+} (TAO et al., 2018). Foram preparadas soluções estoque destes íons e no preparo para solução de pirogalol para medida de atividade enzimática conforme 3.2.4.1 ao invés da dissolução do pirogalol em água, foi dissolvido em cada solução estoque referente a cada biocatalisador. Os resultados de atividade enzimática foram convertidos para atividade relativa (%), sendo 100% de atividade para o ensaio controle e os demais resultados ponderados em relação ao 100%.

3.2.5.6 Estabilidade da peroxidase imobilizada frente à estocagem

A atividade específica da peroxidase livre e da imobilizada foram avaliadas em relação à estocagem. Para tanto, alíquotas contendo 0,3 g de cápsulas foram armazenadas sozinhas em *ependorfs* nas condições: temperatura da sala (20°C), geladeira (4-6°C) e freezer (0°C a -5°C), por um período de 2 meses. Durante este período, em intervalos de 15 dias, verificou-se a atividade enzimática remanescente na solução conforme item 3.2.4.1. Os resultados de atividade enzimática foram convertidos para atividade relativa (%), sendo 100% o de maior atividade e os demais resultados ponderados em relação ao 100%.

3.2.6 Análise Estatística dos dados experimentais

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e a análise estatística dos resultados experimentais foi realizada por meio do teste de Tukey, com 95% de confiabilidade, utilizando o software SigmaPlot 12.0. (Systat).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização das cápsulas

3.3.1.1 Caracterização de diâmetro e umidade

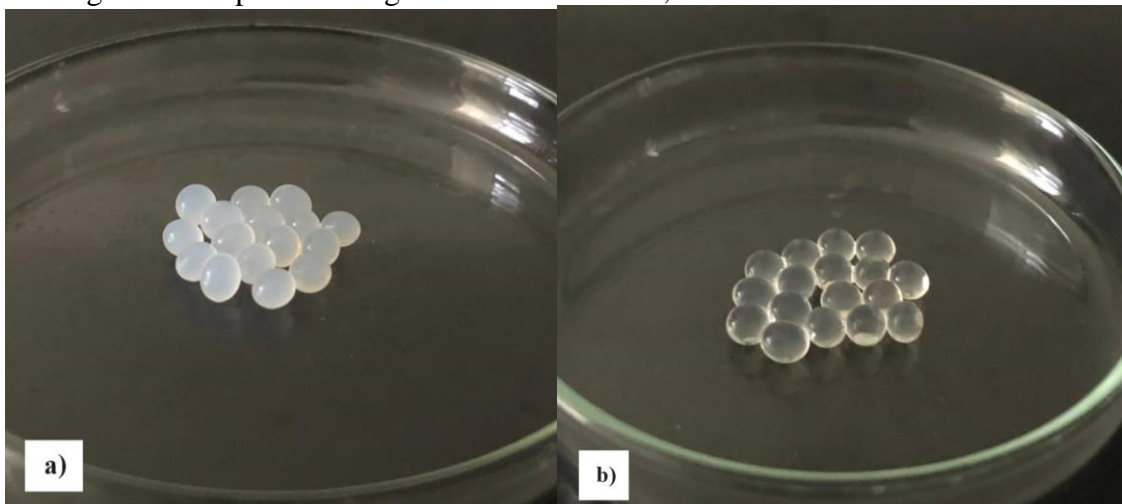
As cápsulas de alginato possuem mais de 94% de água em sua composição, e conseqüentemente, menor diâmetro seco (Tabela 1). Comparando as cápsulas de alginato e com as que possuem YPP imobilizada, observa-se que a imobilização não gera um aumento da umidade das cápsulas, mas de seu diâmetro, em 0,28 mm em média. Na Figura 1 pode se observar as duas cápsulas, com e sem YPP imobilizada, úmidas e secas.

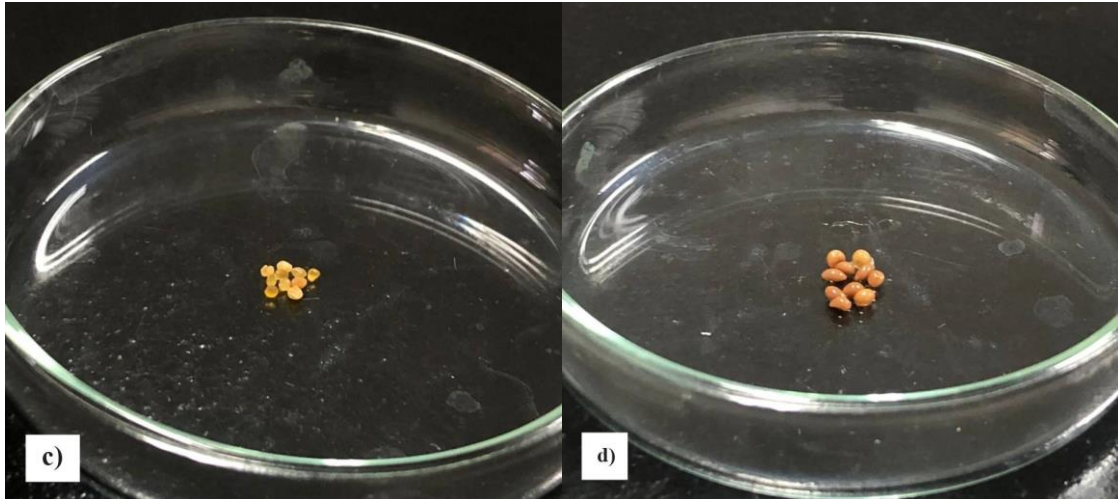
Tabela 1 – Diâmetros e umidade das cápsulas de alginato, sem e com a peroxidase imobilizada

Cápsulas	Diâmetro úmido (mm)	Diâmetro seco (mm)	Umidade (%)
Cápsula de alginato (Figura 1 – a)	3,67±0,01	1,71±0,010	94,60±0,58
Cápsula de alginato com YPP imobilizada via EDC/NHS (Figura 1 – b)	3,95±0,02	1,98±0,007	94,01±0,56

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 1 – Cápsulas de alginato úmidas e secas, sem e com a YPP imobilizada.



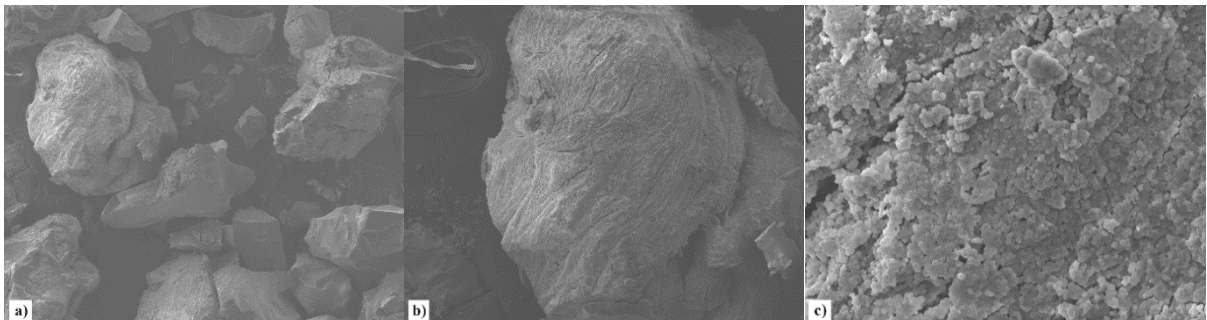


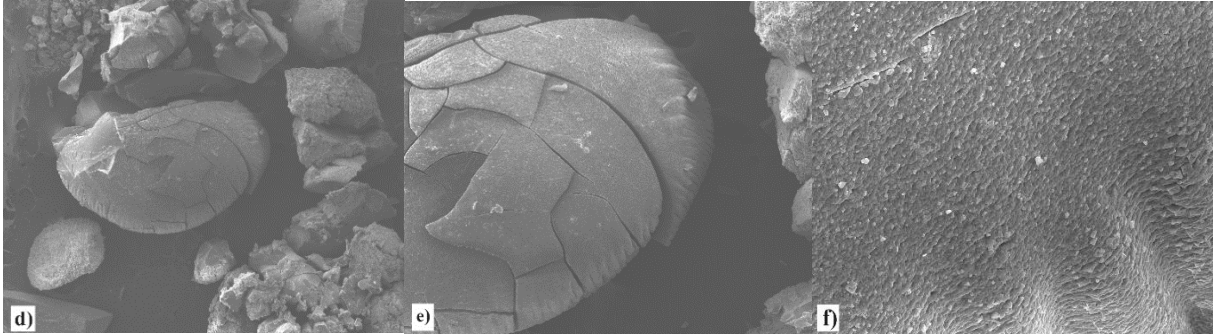
Nota: **a)** cápsula de alginato úmida; **b)** cápsula de alginato com YPP imobilizada úmida; **c)** cápsula de alginato sódio seca em estufa; **d)** cápsula de alginato com YPP imobilizada seca em estufa; Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.3.1.2 Análise da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na MEV (Figura 2) que mostra a estrutura das cápsulas, verifica-se que após a imobilização (Figuras 2d, 2e, 2f), a estrutura apresenta-se menos porosa e mais homogênea. Esta característica se dá pela forma de imobilização (via EDC/NHS), que pode ser associada a reticulação promovida por este tipo de imobilização, a qual faz a conexão das cadeias dos polímeros, alterando assim, seu emaranhamento (OLIVEIRA, 2016). Também se observa que as cápsulas apresentam um aspecto enrugado, o qual pode ser devido à desidratação a que foram submetidas antes da análise. Destaca-se que a metodologia escolhida para imobilização enzimática pode alterar a estrutura das cápsulas de alginato de cálcio, porém, esta alteração não é prejudicial ao processo.

Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura das cápsulas de alginato sem e com a YPP imobilizada via EDC/NHS.



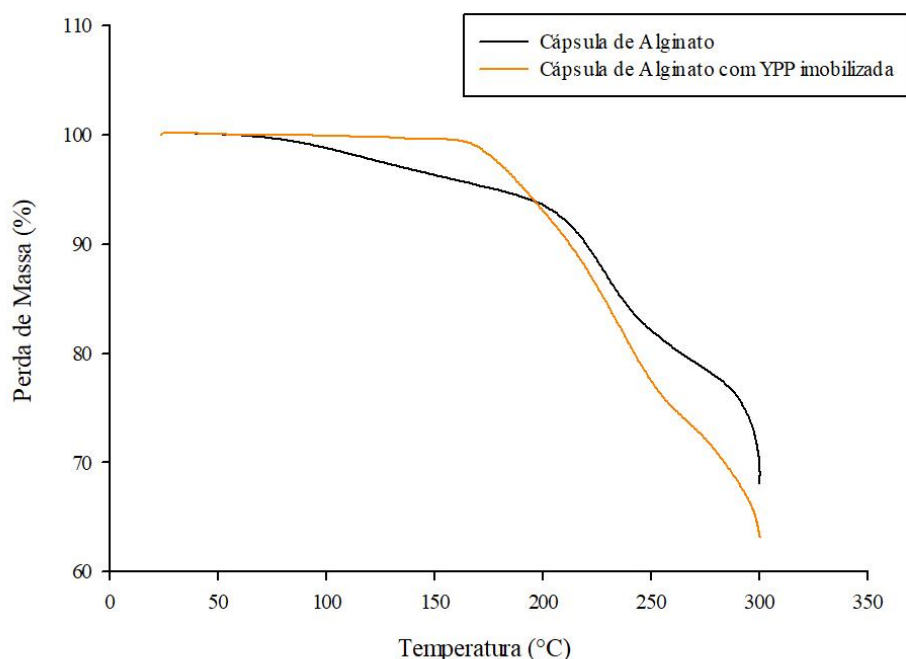


Nota: **a)** Cápsula de alginato em 40X; **b)** Cápsula de alginato em 100X; **c)** Cápsula de alginato em 1000X; **d)** Cápsula de alginato com a YPP imobilizada em 40X; **e)** Cápsula de alginato com a YPP imobilizada em 100X; **f)** Cápsula de alginato com a YPP imobilizada em 1000X. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.3.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

No TGA da amostra (Figura 3), a perda de massa total obtida para a cápsula de alginato sem a peroxidase imobilizada foi de 31,95 %. Até a temperatura de 182,84 °C, a amostra perdeu 5,19 % de massa, entre as temperaturas de 182,84 °C e 287,89 °C ocorre o primeiro evento de massa expressivo (18,25 %). Ainda, na temperatura de 287,89 °C observa-se o início de um novo evento de perda de massa, este se estendendo até a temperatura de 300 °C, que é a temperatura final do teste. Para as cápsulas com a YPP imobilizada a perda de massa total obtida para a amostra foi de 36,78 %. Na temperatura de 148,65 °C ocorre o primeiro evento de perda de massa (27,44 %), se estendendo até a temperatura de 273,27 °C. Entre as temperaturas de 273,27 °C e 300 °C têm-se a ocorrência de um novo evento de perda de massa.

Figura 3 – Análise térmica das cápsulas de alginato sem e com a YPP immobilizada



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

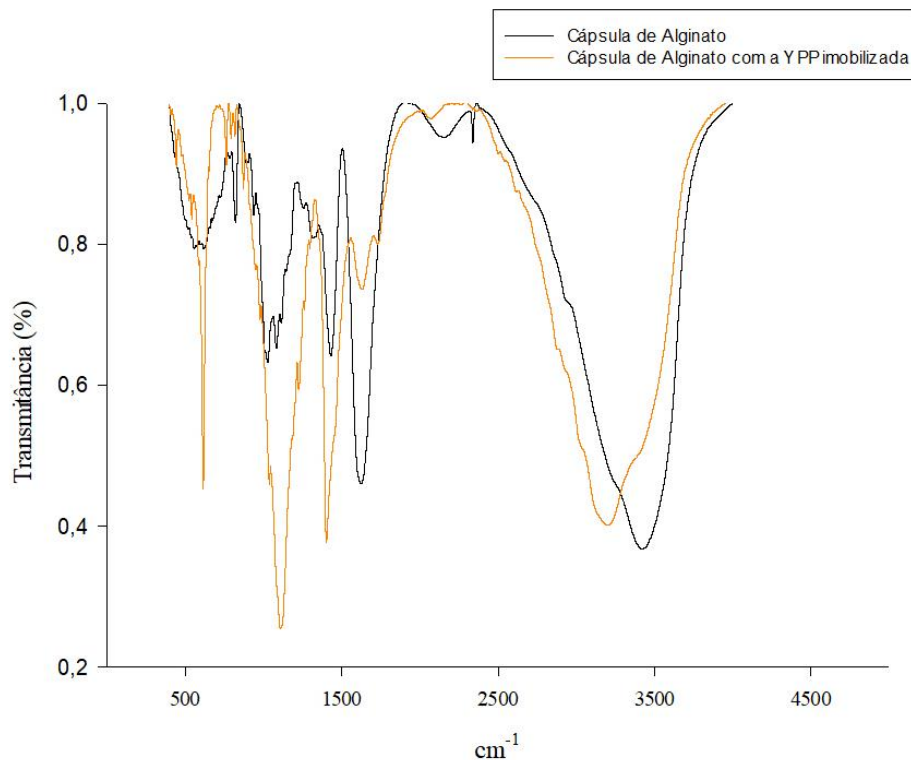
As perdas de massa ocorreram basicamente em duas regiões, a primeira de até 200°C a qual caracteriza as perdas de massa relacionadas à desidratação e proteínas e a segunda região acima de 200°C que está relacionada a decomposição de compostos orgânicos, como o alginato (BARBOSA et al., 2020). Os resultados do TGA para as cápsulas de alginato com a YPP immobilizada mostram um aumento na perda de massa da primeira região, que indicam uma maior quantidade de umidade e a presença da enzima na amostra. Quando comparadas as cápsulas somente com alginato, pode-se observar que a maior perda de massa foi para as cápsulas com a YPP immobilizada o que indica que a presença de água favoreceu a atividade catalítica. Resultados similares foram encontrados por (QUEIROZ et al., 2018), onde a peroxidase immobilizada obteve uma maior perda de massa em comparação com a matriz sólida, que pode estar associada à maior preservação da camada de hidratação da enzima que está relacionada à manutenção de sua atividade catalítica.

3.3.1.4 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho (FTIR) das cápsulas de alginato sem e com YPP immobilizada, estão mostrados na Figura 4. Comparando os espectros de FTIR, a posição dos

picos de absorção e intensidade de absorção foi alterada. Além disso, as bandas entre 500 e 1500 cm^{-1} se intensificam, indicando maior número de ligações simples, o que confirma que houve mudança após a imobilização da YPP. As bandas entre 3300 e 3400 são atribuídas à vibração de alongamento de OH. A banda amida I, que se situa na região de 1600 e 1700 cm^{-1} , é a estrutura proteica mais útil para a espectroscopia de infravermelho, uma vez que envolve vibrações de estiramento C=O de grupos peptídicos (HALIM; YUSOF; SARBON, 2016), demonstrando a presença da enzima imobilizada. A banda amida II (inclinação no plano N-H e modo de estiramento C–N) e a banda amida III (modo de plano do grupo CONH) são observadas a 1556 e entre 1400 cm^{-1} , respectivamente, e as bandas em torno de 1076 cm^{-1} são atribuídas ao oxigênio da ponte assimétrica e ao estiramento de C-O. Segundo (ŞAHİN, 2019), em estudo envolvendo peroxidase imobilizada também via EDC/NHS, ocorreu um comportamento similar a YPP imobilizada, principalmente nas bandas entre 500 e 1500 cm^{-1} e a banda amida II que confirma a presença da enzima no suporte de imobilização.

Figura 4 – Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier das cápsulas de alginato sem e com e a YPP imobilizada



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.3.1.5 Análise de Brunauer-Emmett-Teller (BET)

A análise de BET é conhecida por ser um fator importante de influência na atividade catalítica que é medida pela adsorção de nitrogênio os resultados para as cápsulas de alginato e as cápsulas com a YPP imobilizada podem ser observados na Tabela 2. Uma maior área superficial de BET fornece mais ativos locais e melhor propriedade de absorção para o catalisador, o qual melhora a atividade catalítica (YU et al., 2016). Portanto, o resultado apresentado é vantajoso pelos valores obtidos com as cápsulas contendo a YPP imobilizada, pois foram maiores tanto na área superficial, quanto no volume e raio médio de poros, quando comparados a cápsula contendo somente o alginato.

Tabela (2) – Resultados BET com cápsula de alginato e cápsula com YPP imobilizada

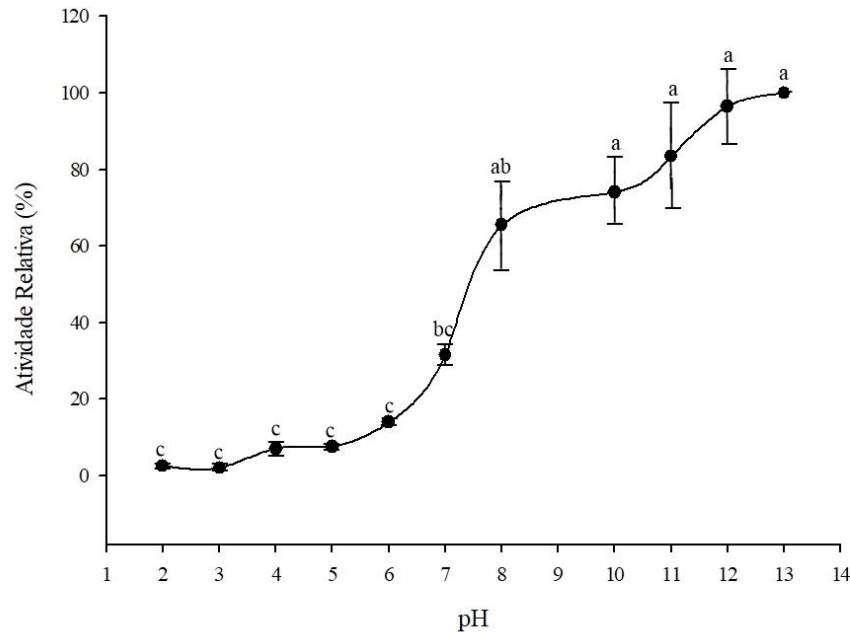
	Área superficial (m ² /g)	Volume total de poros* (cm ³ /g)	Raio médio de poros (Å)
Cápsulas de alginato de sódio	0,263	0,00030	22,887
Cápsulas com a YPP imobilizada	0,634	0,00191	37,584

Nota: * Para cápsula de alginato, poros menores que 883,5 Å de raio a P/P0 = 0,98902; para cápsula com YPP imobilizada, poros menores que 1224,2 Å de raio a P/P0 = 0,99211 Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.3.2 Influência do pH na atividade da YPP imobilizada

A influência do pH na atividade da YPP está mostrada na Figura 5. Pode-se observar um perfil de aumento da atividade relativa, da acidez para a basicidade, com atividade máxima em pHs acima de 8, com o pirogalol como substrato. Não houve diferença significativa ($P > 0.05$) entre as médias de atividade para os pHs 8, 10, 12 e 13, com resultados. Desta forma, efluentes que apresentam características alcalinas poderiam ser tratados com utilização da YPP imobilizada, como efluente de suinocultura na remoção de amônia (pH <10) (HE et al., 2016), efluente de branqueamento de papel (pH 11) (JOHAKIMU et al., 2016), entre outros.

Figura 5 – Influência do pH na atividade da YPP imobilizada



**Letras diferentes nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, há diferença significativa entre as médias. Letras iguais nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, não há diferença significativa entre as médias. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Peroxidases de outras fontes, também estudadas na forma imobilizada, apresentaram pHs ótimos variados. Como exemplos se pode citar a peroxidase de *Azadirachta indica* (PANDEY et al., 2017a) e a peroxidase de *Momordica charantia* (MATTO; HUSAIN, 2009) que apresentaram atividade máxima em pH 5. A peroxidase da *Armoracia rusticana* apresentou atividade máxima em pH 8 (PRODANOVIC et al., 2015). Já a peroxidase de *Zingiber officinale* também apresentou atividade ótima em pH 5, porém esta manteve a atividade em mais 80% até o pH 9 (ALI; HUSAIN, 2018). Destaca-se que em estudo envolvendo a peroxidase da Yacon de forma livre, o pH de máxima atividade também foi relatado alcalino, sendo o valor de pH 11 e com atividade relativa superior a 60% em pH 12 (SOUZA, 2020).

3.3.3 Influência da temperatura na atividade e estabilidade térmica da YPP imobilizada

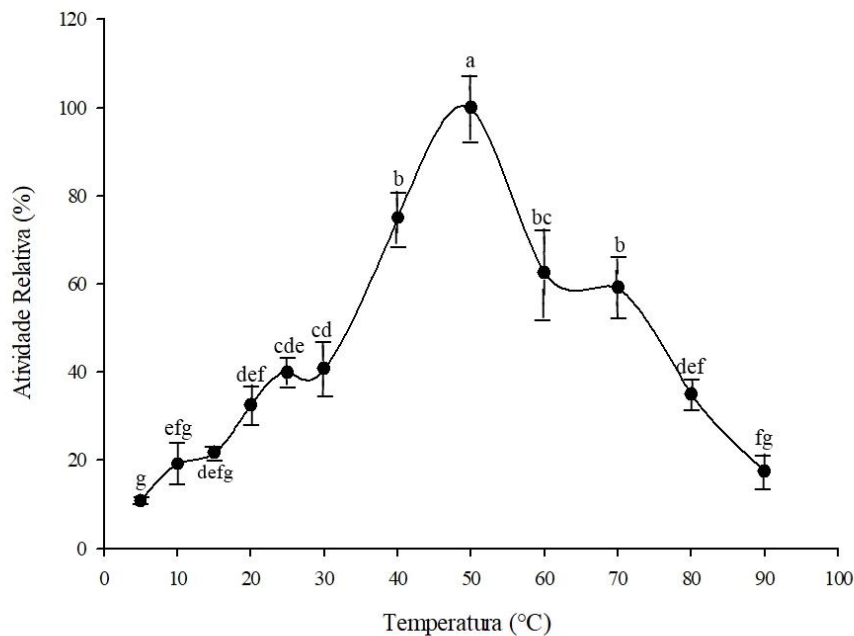
3.3.3.1 Influência da temperatura na atividade da YPP imobilizada

A atividade máxima da YPP imobilizada foi observada em 50 °C, conforme mostrado na Figura 6, valor este que difere estatisticamente dos demais ($P < 0.05$). Nas temperaturas de

40°C, 60°C e 70°, a YPP permanece com atividade relativa superior a 50% no intervalo de 40 a 70 °C. Para peroxidases de *Azadirachta indica*, *Momordica charantia* e *Zingiber officinale* imobilizadas em cápsulas de quitosana, concavalina A e cápsulas de alginato e goma de guar misturadas a hidrogel de agarose e alginato, respectivamente, a máxima atividade foi obtida a 40 °C (ALI; HUSAIN, 2018; MATTO; HUSAIN, 2009; PANDEY et al., 2017a). Para a peroxidase de *Vigna radiata*, a máxima atividade também foi em 40 °C, porém, a mesma manteve atividade relativa superior a 50% para 50°C, 60°C e 70°C (BASHA; PRASADA RAO, 2017). Ely et al. (2017), estudando a HRP e utilizando pirogalol como substrato padrão, obtiveram 50°C como temperatura de máxima atividade.

Deste modo, efluentes que apresentam temperaturas elevadas poderiam ser tratados com a utilização da YPP imobilizada como efluente de indústria têxtil (40 a 50 °C) (BELTRAME, 2000), efluente da indústria de celulose branqueada kraft (55 °C) (PADILHA-CABRERA; PIRES, 2014) entre outros.

Figura 6 – Influência da temperatura na atividade da YPP imobilizada



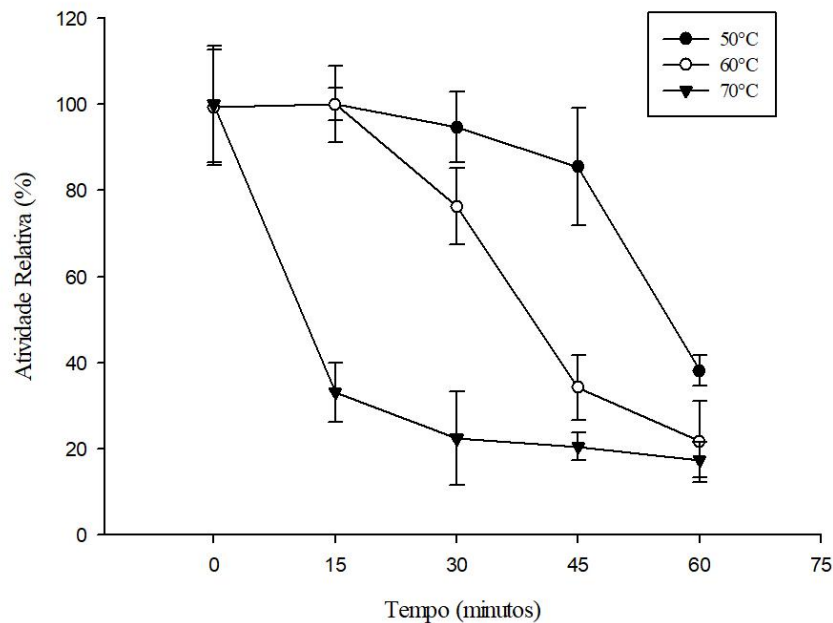
**Letras diferentes nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, há diferença significativa entre as médias. Letras iguais nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, não há diferença significativa entre as médias. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.3.3.2 Estabilidade térmica da YPP imobilizada

Os resultados da estabilidade térmica da YPP imobilizada estão mostrados na Figura 7. Verifica-se que para 50°C, a peroxidase permaneceu com a atividade enzimática estável por 45 min, não havendo diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os resultados do tempo zero até o tempo de 50 min. Para 60°C, a YPP manteve-se estável até 30 min, e a 70°C, a YPP não apresentou estabilidade, restando apenas 33,2% da atividade enzimática em 15 min.

Sendo a YPP imobilizada termo sensível, mesmo obtendo uma boa eficiência catalítica nos primeiros minutos à 60 °C, quando permanece nesta temperatura por períodos maiores do que 15 min, a sua estrutura conformacional modifica, desfavorecendo a catálise da oxidação do pirogalol. Desta forma aplicação da YPP imobilizada se limita a processos mantenham a temperatura de 50°C, temperatura esta onde ela apresenta velocidade máxima de reação.

Figura 7 – Estabilidade térmica da YPP imobilizada



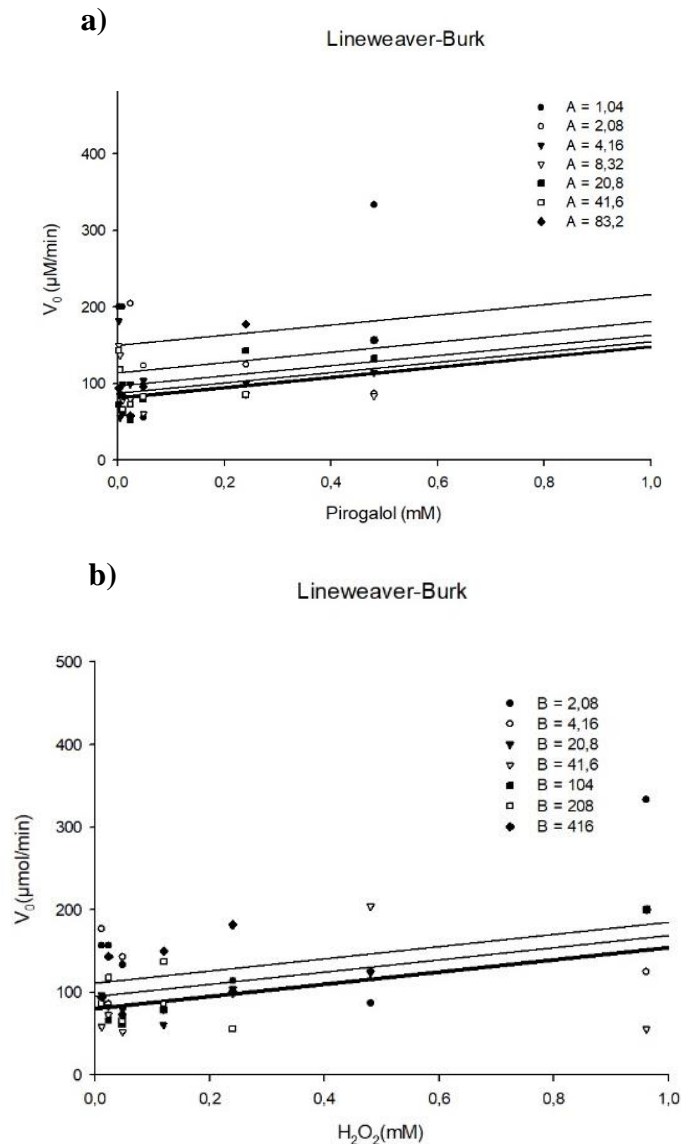
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

3.3.4 Influência da concentração dos substratos na atividade da YPP imobilizada e estudo cinético

Nas catálises enzimáticas que possuem a presença de dois substratos, dois mecanismos gerais são possíveis para entendermos as interações entre enzima e substrato: sequenciais ou *Ping-Pong* (GALENDE et al., 2015). Os gráficos de duplos-recíprocos das taxas iniciais de

oxidação de pirogalol da YPP imobilizada em cápsulas de alginato de cálcio, sem estar em taxas inibitórias, proporcionaram linhas aproximadamente paralelas, o qual propõe um mecanismo de *Ping-Pong* Bi-Bi (Figura 8) (NELSON; COX, 2001; VOET; VOET, 1995). A presença de concentração em excesso de H_2O_2 pode fazer com que a enzima passe para um estado reversivelmente inativo, ou seja, a enzima pode ser inibida pelo excesso de H_2O_2 (VEITCH, 2004). A partir dos resultados encontrados, a YPP imobilizada apresentou K_m de 0,85 mM para o peróxido e de 1,4 mM para o pirogalol, valores que indicam uma maior afinidade pelo primeiro substrato.

Figura 8 - 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.

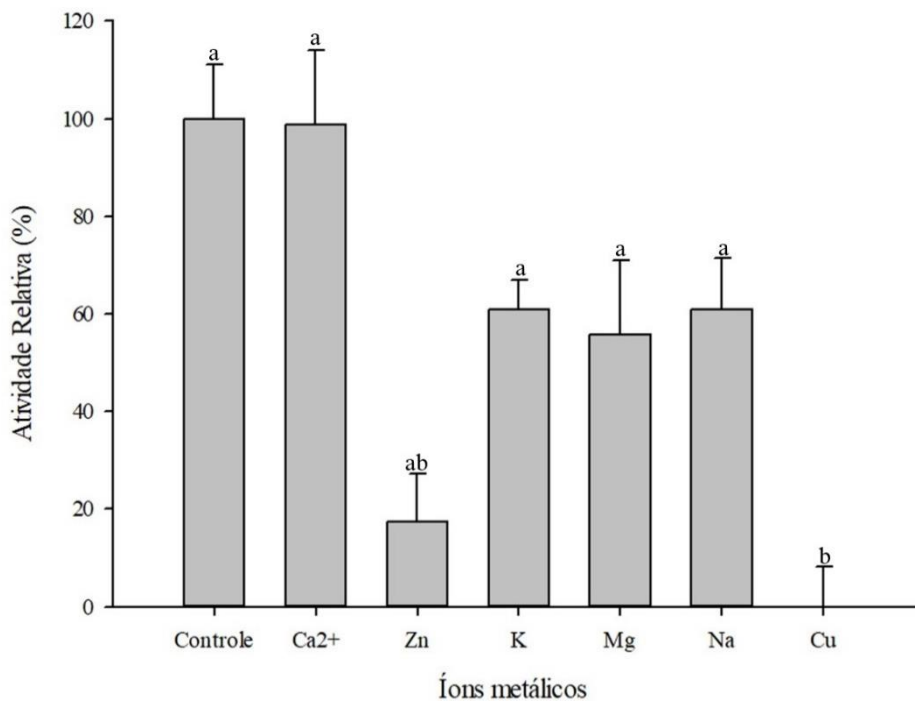


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.3.5 Influência de íons metálicos na atividade da YPP imobilizada

Avaliando o efeito dos íons metálicos na atividade da YPP imobilizada (Figura 9), observa-se que, com exceção do Ca^{2+} , único cujo valor de atividade enzimática é igual estatisticamente ($P > 0.05$) a atividade do controle, os demais íons testados exerceram efeito inibitório sobre a YPP imobilizada, e diferem estatisticamente ($P < 0,05$) do controle. Para o Cu^{2+} , houve uma acentuada perda de atividade enzimática (maior do que 90%), seguido do Zn^{2+} , com perda de atividade enzimática de aproximadamente 80%. Para o K^+ , Mg^{2+} e Na^+ , a atividade relativa permaneceu entre 50 e 60%. Souza (2020), também verificou inibição da YPP livre pelo Cu^{2+} (SOUZA, 2020), além desta inibição também ser relatada em outras peroxidases como de *Ficus carica* (ELSAYED et al., 2018) e *Cedrela fissilis* (FRITZKE, 2019). Como observado nos resultados para o Zn^{2+} e o Cu^{2+} devido as propriedades bioquímicas da YPP imobilizada, os mesmos interferiram em seu desempenho, a inibindo, devido à características desses íons em se ligar a aminoácidos do sítio ativo da enzima e participar da catálise como cofatores ou inibidores.

Figura 9 - Influência de íons metálicos na atividade da YPP imobilizada

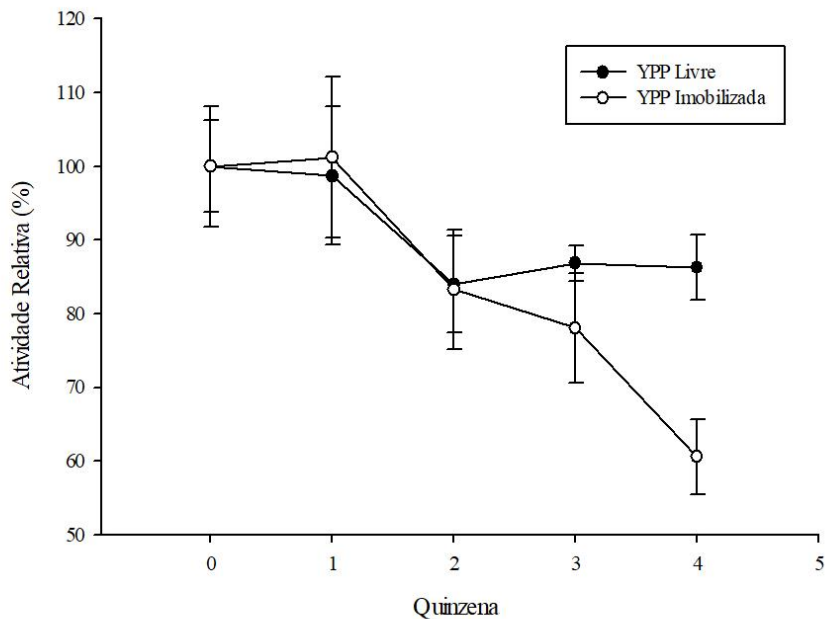


**Letras diferentes nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, há diferença significativa entre as médias. Letras iguais nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, não há diferença significativa entre as médias. Fonte: Elaborada pela autora (2021).

3.3.6 Estabilidade da peroxidase imobilizada frente a estocagem

Para a estocagem da YPP livre e imobilizada sob congelamento (0 a -5°C) (Figura 10), observa-se que até a segunda quinzena, embora tenha havido uma perda de atividade, ambas as YPP mantiveram mais de 80% da atividade enzimática inicial. Contudo, a partir da terceira quinzena, a YPP imobilizada mostrou uma perda de atividade enzimática, atingindo valor próximo a 60% na quarta quinzena, e a YPP livre manteve a sua atividade até a quarta quinzena. Este comportamento para a atividade da YPP imobilizada pode ser devido ao processo de congelamento e descongelamento da cápsula, que podem ter causado algum dano estrutural na enzima. Mesmo assim, a YPP manteve mais de 60% da atividade enzimática em dois meses de estocagem sob congelamento.

Figura 10 - Estabilidade da YPP imobilizada frente à estocagem sob congelamento (0 a -5°C)

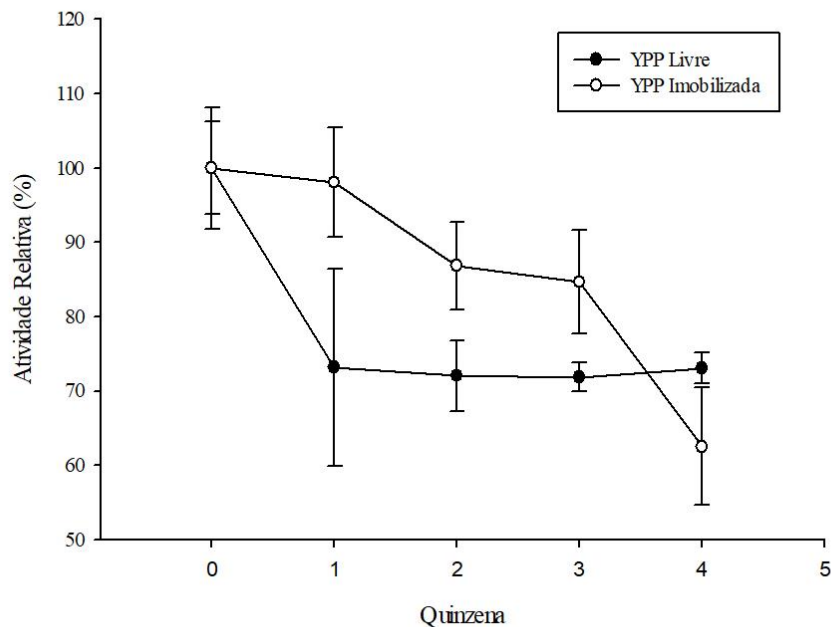


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Quando estocada sob e refrigeração (4 a 6°C), a YPP imobilizada destaca-se pela estabilidade da atividade enzimática até a terceira quinzena, mantendo mais de 80% de sua atividade enzimática inicial, e cujos valores não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) da atividade enzimática do tempo zero. A perda significativa de atividade ocorreu somente na quarta quinzena, porém, a YPP imobilizada ainda manteve 60% de sua atividade inicial, valor

este igual ao obtido para o mesmo tempo com a estocagem sob congelamento. A YPP livre apresentou maior perda inicial, com a permanência de aproximadamente 70% de sua atividade inicial e manteve este valor até a quarta quinzena. Desta forma, verifica-se ser possível utilizar esta forma de estocagem para a YPP imobilizada, o que é positivo, visto que não é necessário manter a enzima em condições de congelamento, pois a refrigeração e o congelamento, na quarta semana, apresentam os mesmos resultados. Assim, a forma de transporte da YPP é facilitada, sendo necessária apenas a refrigeração.

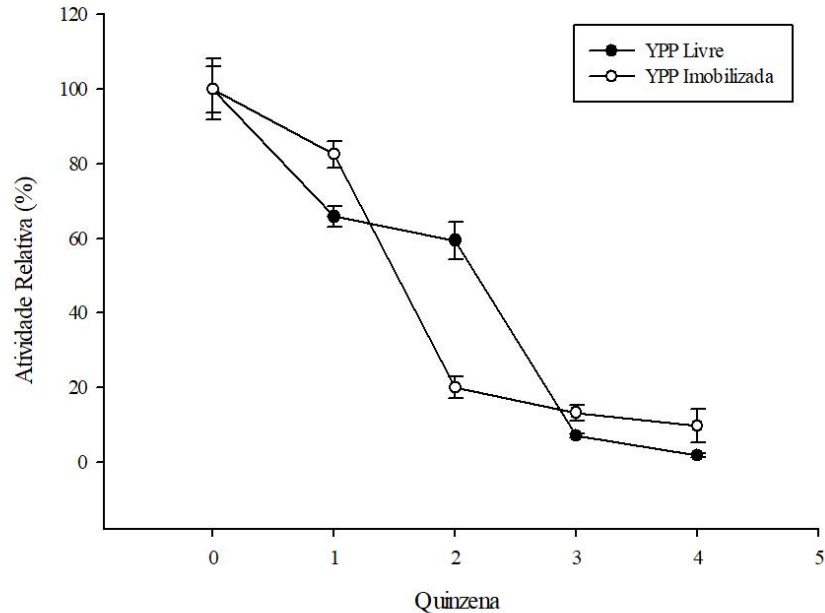
Figura 11 – Estabilidade da YPP imobilizada frente à estocagem sob refrigeração (4 a 6°C)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Para a estocagem em temperatura ambiente (20°C), a YPP imobilizada e a YPP livre apresentaram grandes perdas de atividade enzimática, com um remanescente de apenas 10% ao final das quatro quinzenas. A estocagem à temperatura ambiente de algumas soluções, como tampões e sais inorgânicos, por longos períodos podem ter contaminação que gera o crescimento microbiano, que pode levar à degradação ou inatividade das proteínas (BISSWANGER, 2014).

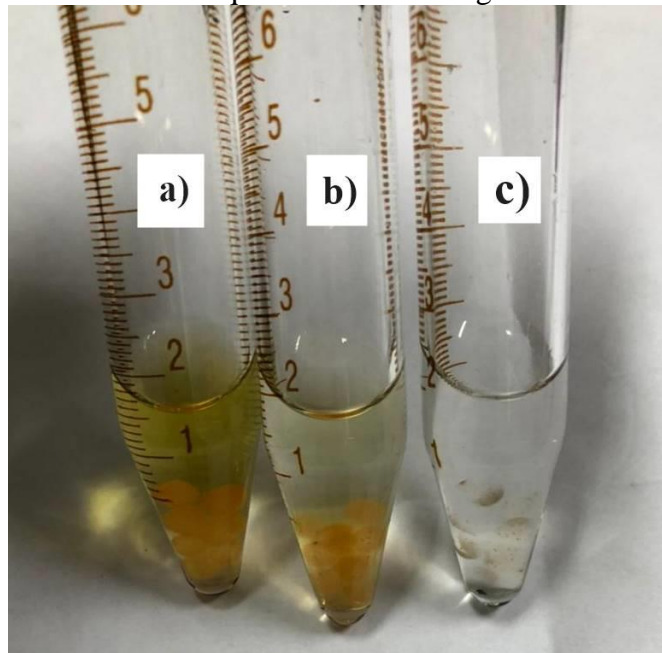
Figura 12 – Estabilidade da YPP imobilizada frente à estocagem sob temperatura ambiente (20°C)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A diferença visual das cápsulas de alginato de cálcio com a YPP imobilizada via EDC/NHS, após em 4 semanas de estocagem pode ser observada na Figura 13. Verifica-se que para a YPP imobilizada, após o descongelamento, ocorre a migração de componentes da imobilização para o meio, deixando a fração líquida amarelada. Para a YPP estocada sob refrigeração, verifica-se que também ocorre esta migração, porém em menor proporção. ou se ocorre, não é perceptível. Para a YPP mantida sob temperatura ambiente, verifica-se alguns pontos escuros nas cápsulas, o que pode caracterizar o desenvolvimento de fungos. Assim, os resultados da estocagem mostram a refrigeração como a melhor alternativa de armazenamento para a YPP imobilizada.

Figura 13 – Aspecto visual das cápsulas de alginato com a YPP immobilizada via EDC/NHS, em 4 quinzenas de estocagem



Nota: **a)** cápsula de alginato com YPP immobilizada via EDC/NHS estocada sob congelamento (0 a -5°C); **b)** cápsula de alginato com YPP immobilizada via EDC/NHS estocada sob refrigeração (4 a 6°C); **c)** cápsula de alginato com YPP immobilizada via EDC/NHS estocada em temperatura ambiente (20°). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.4 CONCLUSÃO

A peroxidase extraída da casca da raiz de Yacon e immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS mostrou atividade máxima em pHs básicos e em temperatura de 50°C . A YPP immobilizada apresentou estabilidade térmica também em 50°C . Para os íons metálicos, houve inibição para todos os íons testados, exceto o cálcio, sendo mais expressiva para o cobre seguido do zinco, havendo, portanto, limitação do seu uso em águas ou efluentes que contenham estes íons. O mecanismo de reação é o Pig-Pong Bi-Bi. Como método de estocagem, pode-se utilizar a refrigeração em geladeira convencional, com a manutenção de, aproximadamente 60% da atividade inicial em até 4 quinzenas. A peroxidase da casca da raiz de Yacon, immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS apresenta potencial de aplicação em processos cujas características sejam próximas as de atividade máxima da enzima, como pH 13 e 50°C sendo uma alternativa à HRP para aplicação no tratamento de águas, efluentes e no desenvolvimento de biossensores, além de outros processos de biocatálise.

4 BIOCONVERSÃO DE 2,4 DICLOROFENOL COM USO DA PEROXIDASE DA RAIZ YACON (*Smallanthus sonchifolius*) IMOBILIZADA EM CÁPSULAS DE ALGINATO E AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

RESUMO

Compostos fenólicos são um dos principais subprodutos industriais encontrados em efluentes, sua toxicidade em baixas concentrações, baixa degradabilidade sendo de difícil tratamento nas estações, o torna um contaminante de grande preocupação. Desta forma, este estudo teve como objetivo aplicar a enzima peroxidase da raiz yacon imobilizada via EDC/NHS, na bioconversão de 2,4 diclorofenol em efluente sintético e avaliação do seu potencial toxicológico. Na bioconversão de 2,4 DCP, a YPP imobilizada mostrou máxima atividade a 40 °C e pH 6,8. A melhor eficiência de bioconversão (+ de 80%) foi alcançada em uma concentração de peróxido de hidrogênio de 0,50 mM, após 360 minutos de reação. Quanto ao reuso das cápsulas com YPP imobilizada, constatou-se que há possibilidade de reuso em até 2 ciclos. Através do processo de fluxo contínuo foi possível constatar que a YPP imobilizada apresenta grande potencial de uso, mantendo, ao longo de três dias, aproximadamente 50% de remoção do 2,4 DCP. 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 *L. sativa* e *A. cepa* mas ainda assim, conferiu toxicidade. Os resultados sugerem que a peroxidase da casca da raiz yacon imobilizada via EDC/NHS apresenta potencial e pode ser uma alternativa a ser explorada na bioconversão de compostos fenólicos em efluentes.

Palavras-chave: Yacon. Peroxidase. Imobilização. 2,4 Diclorofenol. Toxicidade.

4.1 INTRODUÇÃO

Moléculas orgânicas classificadas como poluentes emergentes são compostos presentes em uma variada gama de insumos e produtos, entre eles o fenol que é um dos principais subprodutos industriais encontrados em efluentes líquidos de diversas indústrias de plásticos, resinas, fármacos, têxteis, entre outras (SAMPAIO et al., 2013). O destaque para os compostos fenólicos, é devido sua toxicidade em baixas concentrações, bioacumulação e baixa degradabilidade, a contaminação por fenol pode ocorrer pela inalação, ingestão, contato com

os olhos ou absorção pela derme (MAGDY; GAR ALALM; EL-ETRIBY, 2021; XAVIER, 2012). O grupo dos fenóis clorados, como o 2,4 diclorofenol, ou 2,4 DCP, é um exemplo de composto alarmante, encontrado em herbicidas utilizados na agricultura (YANG et al., 2017). Apesar do uso do 2,4 DCP ser de grande importância econômica, o impacto ambiental gerado, associado a problemas na saúde humana causa grandes preocupações. A avaliação de sua toxicidade nos últimos anos o classificou como possível carcinogênico, devido a estes fatos, técnicas vêm sendo aplicadas para gestão ambiental do 2,4 DCP (FERNANDES et al., 2020).

Métodos convencionais de tratamento para remoção do 2,4 DCP, os quais incluem extração, adsorção em matrizes sólidas, oxidação química ou bacteriana, processos oxidativos avançados entre outros (BRATKOVSKAJA; VIDZIUNAITE; KULYS, 2004), oferecem desvantagens em relação a custo, eficiência e geração de subprodutos perigosos (VILLEGAS et al., 2016). A degradação enzimática de fenóis em formas menos tóxicas tem sido sugerida para o tratamento, assim diversas enzimas que catalisam a oxidação de fenóis têm sido utilizadas para este fim como a enzima HRP (ISPAS et al., 2010), mas devido seu alto custo para uso em escala industrial, enzimas alternativas vem sendo estudadas com esta finalidade. Neste contexto, a raiz yacon (*Smallanthus sonchifolius*) se evidencia, nativa dos Andes e cultivada por seus tubérculos é utilizada em sua maioria na forma de alimentação, inclusive na América do Sul, a qual chama atenção por seu fácil cultivo e adaptabilidade a diferentes climas (PERUSSELLO et al., 2015; VALENTOVÁ, K. ULRICHOVÁ, 2003). Além do mais, a utilização de enzimas na forma imobilizada confere diversas vantagens ao tratamento, pois a matriz sólida atua como proteção para a enzima contra fatores extremos de pH e temperatura, ainda sendo possível seu reuso no processo, atribuindo uma maior eficiência e baixo custo ao tratamento (UMANG J. TRIVEDI, 2006).

Após o procedimento de bioconversão dos compostos fenólicos, é essencial a avaliação toxicológica do tratado, as espécies mais utilizadas para isto são a *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, na fitotoxicidade e citotoxicidade respectivamente, devido ao seu fácil manuseio, baixo custo e sensibilidade a produtos químicos, podendo ser aplicadas em uma série de contaminantes, inclusive os derivados fenólicos (SOUZA, 2020).

Destaca-se que não há estudos sobre a bioconversão do 2,4 DCP a partir do uso da peroxidase de yacon imobilizada, assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação da peroxidase da yacon para bioconversão de efluente contendo 2,4 DCP e avaliar a toxicidade da água tratada.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Aplicação da YPP imobilizada no tratamento de efluente sintético

A partir destes resultados será possível identificar as condições ideais de tratabilidade, bem como o efeito de cada variável na remoção do 2,4 DCP.

4.2.1.1 Determinação da concentração de 2,4 diclorofenol

Para determinação de 2,4 DCP presente nas amostras, em um *vial* de vidro de 10mL foram adicionados 3mL de água destilada; 120 μ L da amostra; 50 μ L de uma solução tampão de amônio de pH 10; 50 μ L de persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50g L^{-1}); e 50 μ L de 4-aminoantipirina ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ 20g L^{-1}), nesta sequência. Após 10 minutos de reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-vis (Merck; Modelo Prove 100)., a um comprimento de onda de 504nm (APHA, 2005).

4.2.1.2 Cinética de bioconversão do 2,4 diclorofenol

A avaliação da bioconversão de 2,4 DCP no tempo, mediada pela YPP imobilizada, foi realizada por meio da aplicação de diferentes concentrações de cápsulas (0; 0,3; 0,65; 1; 1,3; 1,65 e 2g úmida) 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 20 °C. O início da contagem do tempo se deu com a adição do peróxido de hidrogênio (0,63 mM), amostras foram coletadas nos tempos de 0, 60, 120, 240 e 360 minutos 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 Prove 100). Os resultados foram expressos por meio da relação entre a concentração inicial de 2,4 DCP no efluente (C_0) e a concentração remanescente ao final dos intervalos de tempo avaliados (C).

4.2.1.3 Influência do pH e da temperatura na bioconversão do 2,4 diclorofenol

Para análise de influência do pH na atividade enzimática imobilizada, relativa ao substrato pirogalol, utilizou-se tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1 M / fosfato de sódio 0,2 M) para pHs 3 e 6,8 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 10 e 13, esses valores foram escolhidos para abranger uma faixa de pH intermediário e extremo, desta forma, os pH's foram corrigidos para os valores na mistura de 50mL de 2,4 DCP 50mg L⁻¹, foram adicionados a enzima imobilizada e o H₂O₂ em diferentes *Erlenmeyers* e depois de 6h no *Shaker* a 110 rpm foi coletado amostras em triplicata e analisado a concentração de 2,4 DCP remanescente, conforme descrito no item 4.2.1.2. E 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).

A análise de influência da temperatura foi determinada a partir da mistura de 50mL de 2,4 DCP 50mg L⁻¹, a enzima imobilizada e o H₂O₂ em um *Erlenmeyer* em diferentes temperaturas (20; 40; 60 e 80°C) até que atingisse o equilíbrio térmico, depois de 6h no *Shaker* a 110 rpm foi coletado amostras em triplicata e analisado a concentração de 2,4 DCP, conforme descrito no item 4.2.1.2. E 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).

4.2.1.4 Influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão de 2,4 diclorofenol

Além dos efeitos do peróxido de hidrogênio na velocidade inicial da reação, também se avaliou o efeito de diferentes concentrações (0; 0,25; 0,50; 0,63 e 1 mM) no resultado do efluente tratado. Para isso, em efluente sintético (2,4 DCP 50 mg/L e pH 7,0) foi adicionada as cápsulas com a YPP imobilizada e por fim o H₂O₂. A solução foi mantida em agitação orbital em equipamento tipo *shaker* (20 °C) por 6h. Ao término do período, amostras foram coletas e conduzidas para análise da concentração remanescente de 2,4 DCP, conforme descrito no item 4.2.1.2. 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).

4.2.1.5 Avaliação de potencial de reuso das cápsulas

Para determinar o número de ciclos pelos quais as cápsulas de alginato de sódio com a peroxidase imobilizada podem ser reutilizadas para bioconversão de 2,4 DCP da água, 1,65g de cápsulas úmidas foram inseridas em *Erlenmeyers* de 125mL, para onde posteriormente, foram transferidos 50mL das soluções do contaminante na concentração de 50mg L⁻¹. Na sequência, os *Erlenmeyers* foram vedados com *parafilm* e mantidos em agitação a 21°C e 110rpm, por 24 h. Cada condição foi realizada em triplicata. Após o término do período de contato, a concentração inicial e final de 2,4 DCP foi analisada conforme os procedimentos descritos no item 4.2.1.2. As cápsulas utilizadas no ciclo anterior, foram reinsertas em *Erlenmeyers* limpos, e 50mL de soluções novas de 50mg L⁻¹ de 2,4 DCP foram transferidos aos recipientes. O mesmo procedimento foi seguido até a saturação das cápsulas, momento em que não havia mais diferença na concentração de 2,4 DCP antes e após o tratamento.

4.2.2 Processo contínuo

Com o objetivo de simular um processo contínuo para a bioconversão da água contendo o 2,4 DCP na concentração de 50mg L⁻¹, por meio do contato direto com a peroxidase imobilizada nas cápsulas de alginato de sódio, foram utilizadas 6 g de cápsulas úmidas, inseridas em uma coluna de vidro de 8 mL, a qual foi acoplada a uma bomba de infusão peristáltica linear, na posição vertical. A vazão de bombeamento da água contaminada foi programada para 8mL h⁻¹. Antes do início do processo de bombeamento da água contaminada para a coluna, foi realizada a purga do equipamento. Alíquotas da solução de saída foram retiradas a cada 24 h, com duração total de 144 horas (6 dias). As amostras foram divididas em 3 quartis de 48 horas cada, os quais foram utilizados para os testes de toxicidade. A concentração de 2,4 DCP foi analisada conforme a descrição do item 4.2.1.2, 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).

Após o término do ensaio, o mesmo procedimento foi novamente realizado, no entanto, foi bombeada água destilada no lugar da água contaminada, representando o branco da amostra e objetivando a análise de possível toxicidade das cápsulas.

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

Para o ensaio de fitotoxicidade, foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa L. var. Buttercrunch*) com 100% de germinação e 99,9% de pureza (Feltrin® Sementes). O teste foi executado conforme o método “Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test” (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996). Foi utilizada uma série de cinco placas de Petri contendo uma camada de papel filtro, previamente esterilizadas, para cada tratamento. Os tratamentos considerados neste ensaio foram: controle (água destilada), água contaminada com 2,4 DCP, água resultante da bioconversão contínua do 2,4 DCP pela peroxidase imobilizada, e água destilada obtida no fluxo contínuo, chamadas soluções teste.

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. Após este período, o número médio de sementes germinadas (\overline{GS}) foi verificado e o comprimento médio da raiz (\overline{RL}) e do caule (\overline{SL}) foi determinado no *Software ImageJ 5.3c*. Estas variáveis possibilitaram o cálculo dos parâmetros percentuais de Efeito de Germinação (GE), Inibição do Crescimento da Raiz (RGI), Inibição do Crescimento do Caule (SGI) e Índice de Germinação (GI), conforme as equações (2), (3), (4) e (5), respectivamente.

$$GE(\%) = \frac{\overline{GS}}{N^{\circ} \text{ total de sementes}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

$$RGI(\%) = \frac{\overline{RL}_{\text{controle}} - \overline{RL}_{\text{tratamento}}}{\overline{RL}_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

$$SGI(\%) = \frac{\overline{SL}_{\text{controle}} - \overline{SL}_{\text{tratamento}}}{\overline{SL}_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

$$GI(\%) = \frac{\overline{RL}_{\text{tratamento}} \times \overline{GS}_{\text{tratamento}}}{\overline{RL}_{\text{controle}} \times \overline{GS}_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

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

Para o ensaio de citotoxicidade, os bulbos de cebolas ($2n = 16$ cromossomos) utilizados no teste foram adquiridos no comércio local de Lages - SC. Para o ensaio, foram selecionados bulbos com diâmetro aproximado de 2,5 cm. Inicialmente, as cascas externas marrons e as raízes secas do anel primordial dos bulbos foram cuidadosamente removidas. Os bulbos prontos foram mantidos mergulhados em água para evitar ressecamento (FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ; LASSEN; RENBERG, 1981). Os bulbos 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 três bulbos. As soluções testes 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 três bulbos, crescidos em cada amostra, uma ponta da raiz foi retirada e um total de três lâminas por tratamento foram elaboradas. As lâminas foram preparadas por meio da fixação e lise das raízes em uma mistura de 9 partes de ácido acético 45% e 1 parte de ácido clorídrico 1N a 50 °C por 5 min, seguidas de esmagamento com solução de orceína acética a 2% (FISKESJÖ, 1985). Desta forma, as células da raiz de cada cebola foram avaliadas em microscópio ótico, a uma magnitude de 400X, de modo que a contagem das células em divisão celular pôde ser realizada, por meio da análise de imagens capturadas pelo *Software ZEN – ZEISS Efficient Navigation* (FISKESJÖ, 1985; HAQ et al., 2017). Para a determinação do Índice Mitótico (IM) foram marcadas entre 300 e 500 células por lâmina, e o cálculo seguiu como descrito pela equação (6) (FISKESJÖ, 1985; HAQ et al., 2017).

$$IM(\%) = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde A é o número total de células em divisão (prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase), dado em unidade e B é o número total de células contadas por condição, dado em unidade.

4.2.5 Análise estatística dos dados experimentais

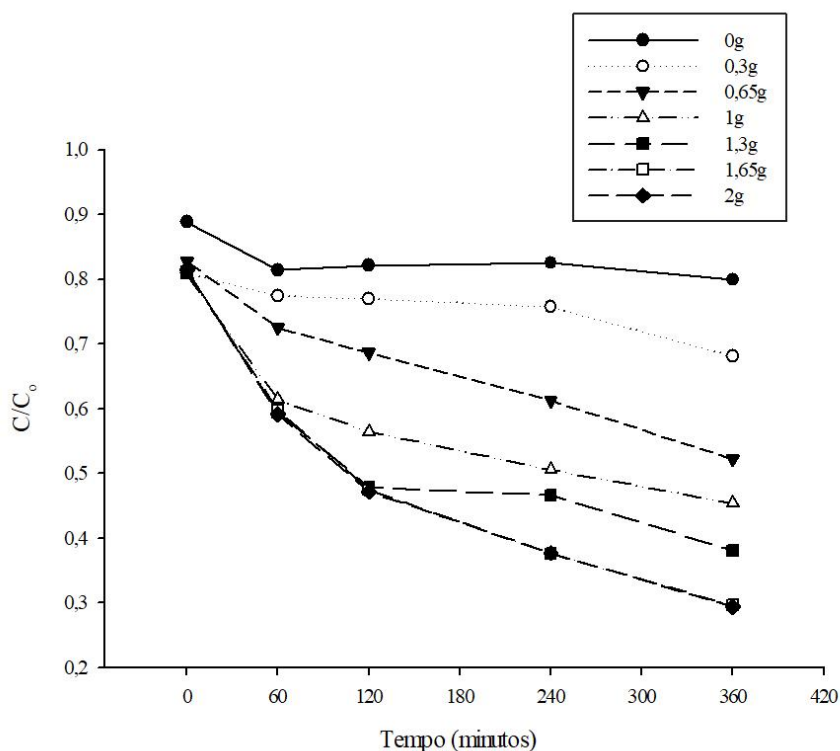
Os experimentos foram realizados em triplicatas. A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada por meio do teste de Tukey, onde foram comparados os valores das médias, aplicando a regressão dos dados serão verificados os efeitos isolados e de interação entre as variáveis, indicando o nível de 95% de confiabilidade. O software SigmaPlot 12.0 (Systat) foi utilizado para executar os cálculos necessários.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Cinética de bioconversão do 2,4 diclorofenol

As massas das cápsulas de alginato contendo a YPP imobilizada via EDC/NHS que levaram aos melhores resultados de bioconversão foram 1,65g e 2g de cápsulas (Figura 14), com índices de bioconversão do 2,4 DCP de 70,42% e 70,61%, respectivamente, ao final de 360 min de reação (as curvas estão sobrepostas). Desta forma, para as demais etapas do estudo, foi utilizada 1,65g de cápsulas contendo a YPP imobilizada, devido à estatística mostrar que não há diferença significativa ($P > 0,05$) entre as conversões quando usado 1,65g e 2g. Ainda, a menor quantidade de enzima, pode afetar no custo do tratamento, tornando-o mais barato, embora este estudo de custos ainda não seja o objeto da pesquisa. O tempo de reação foi fixado em 360 minutos.

Figura 14 - Influência da massa das cápsulas de alginato com YPP immobilizada via EDC/NHS na bioconversão de 2,4 DCP ao longo do tempo

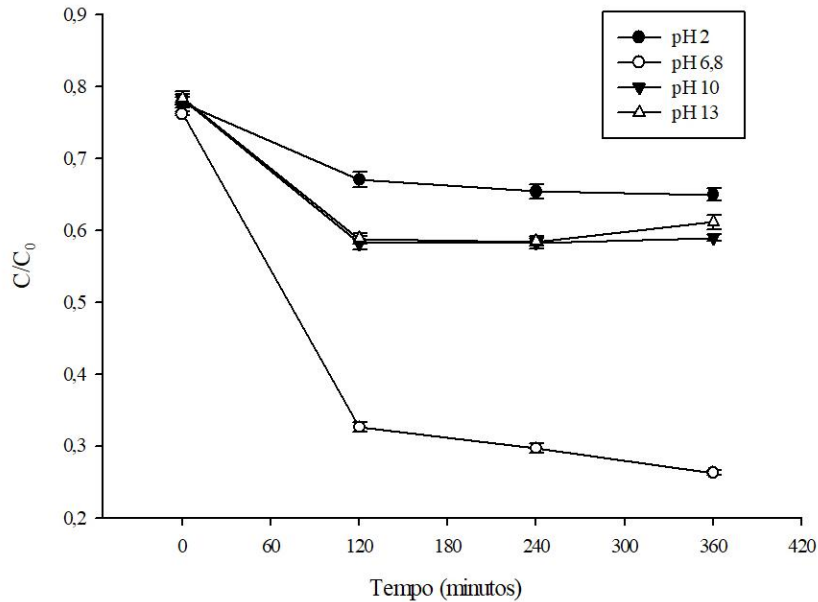


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.3.2 Influência do pH e temperatura na bioconversão de 2,4 diclorofenol

Para influência do pH na bioconversão do 2,4 DCP (solução de 50 mg L^{-1}), cujos perfis estão mostrados na Figura 15, a maior bioconversão foi observada em pH 6,8, com valor de 74% e estatisticamente diferente ($P < 0,05$), dos demais. A bioconversão em meio de pH 2 apresentou o menor valor, abaixo de 40%. Verifica-se que, embora a faixa de pH de máxima atividade da YPP immobilizada seja de 8 a 13 (determinado anteriormente), para a conversão do 2,4 DCP, o pH 6,8 apresentou o melhor resultado. Isso justifica-se devido a diferença dos substratos, pois para a faixa de pH de 8 a 13, o substrato utilizado foi o considerado padrão para peroxidases (pirogalol) e, nesta etapa, o substrato passa a ser o 2,4 DCP, o que muda as características bioquímicas da enzima.

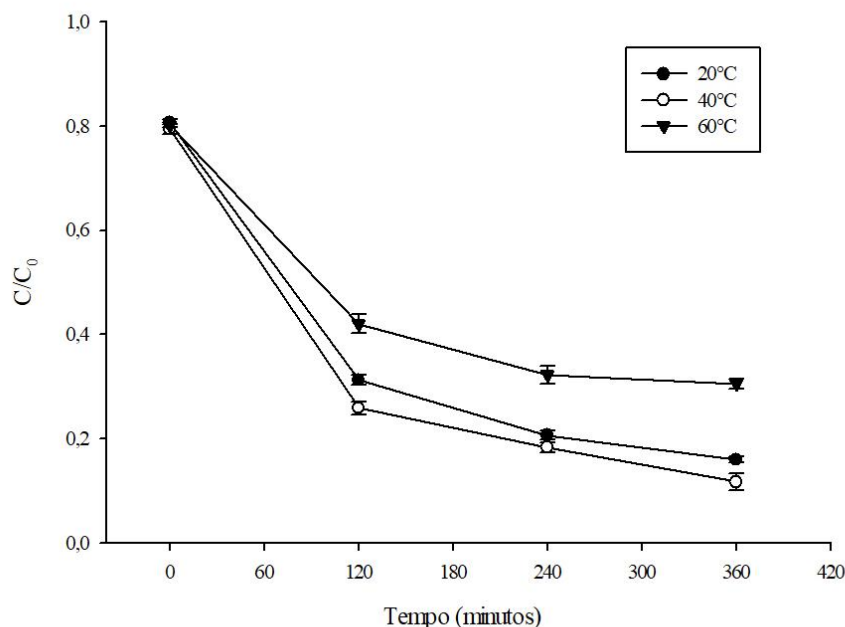
Figura 15 – Influência do pH na bioconversão de 2,4 DCP pela YPP immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Para a influência da temperatura na bioconversão 2,4 DCP (solução de 50 mg L⁻¹), cujos perfis estão mostrados na Figura 16, verifica-se que o melhor resultado foi obtido nas temperaturas de 20°C e 40°C, com aproximadamente 90%, sendo os valores de remoção iguais estatisticamente ($P > 0,05$). Para 60°C, a YPP immobilizada também apresentou bioconversão satisfatória, chegando a 70%. Esta queda na bioconversão, quando o meio reacional é submetido 60°C, pode ser justificada pela perda de estabilidade da enzima, nesta temperatura (avaliada anteriormente). Os resultados da influência da temperatura, aliados ao pH 6,8, oportunizam a sua aplicação em tratamentos de águas contaminadas com 2,4 DCP *in situ* e *ex-situ*.

Figura 16 – Influência da temperatura na bioconversão de 2,4 DCP pela YPP immobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS



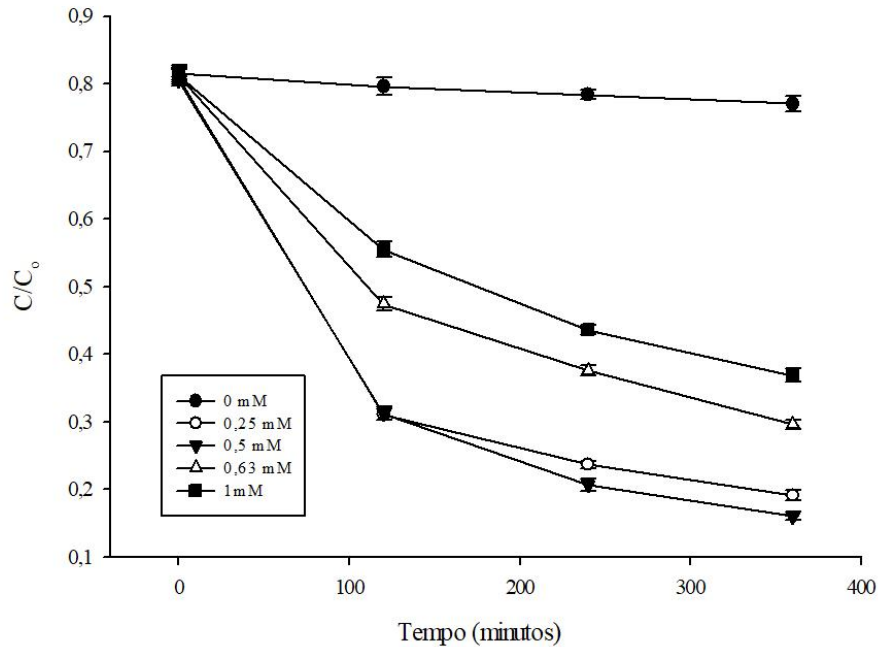
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Em estudo anterior, realizado com a YPP livre, foram obtidos resultados similares de pH e temperatura para a bioconversão de 2,4 DCP, sendo pH7 e 37,5°C (SOUZA, 2020). Para a peroxidase de soja (*Glycine max*), foi relatado melhor pH em 6,5 e 50°C para remoção do 2,4 DCP (FERNANDES et al., 2020).

4.3.3 Influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão de 2,4 diclorofenol

Para influência da concentração de H₂O₂ na bioconversão do 2,4 DCP (solução de 50 mg L⁻¹), cujos perfis estão mostrados na Figura 17, verifica-se que 0,25 e 0,50 mM de H₂O₂ proporcionaram as maiores bioconversões, com resultados iguais estatisticamente entre si ($P > 0,05$) e acima de 80%. Souza (2020), para a YPP livre obteve a maior bioconversão do 2,4-DCP com 0,63 mM de H₂O₂. Para as demais concentrações testadas (exceto o experimento com ausência de H₂O₂), verifica-se que houve bioconversão, porém, menor. Verifica-se também que as maiores bioconversões foram obtidas para as menores concentrações de H₂O₂, o que demonstra que o excesso deste substrato pode inibir a enzima e prejudicar o processo, além de torná-lo mais oneroso.

Figura 17 – Influência da concentração de H_2O_2 na bioconversão de 2,4 DCP pela YPP imobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.3.4 Reuso das cápsulas na bioconversão de 2,4 diclorofenol

As condições do teste de reuso das cápsulas de alginato com a YPP imobilizada via EDC/NHS foram: 50 mg L^{-1} de 2,4 DCP 1,65g de cápsulas, 50 mM de H_2O_2 , pH 6,8 e 40°C. Os resultados de concentração de 2,4 DCP remanescentes (após cada ciclo) e o equivalente percentual em remoção estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração remanescente de 2,4 DCP e equivalente em bioconversão para cada ciclo de reuso das cápsulas de alginato com YPP imobilizada via EDC/NHS

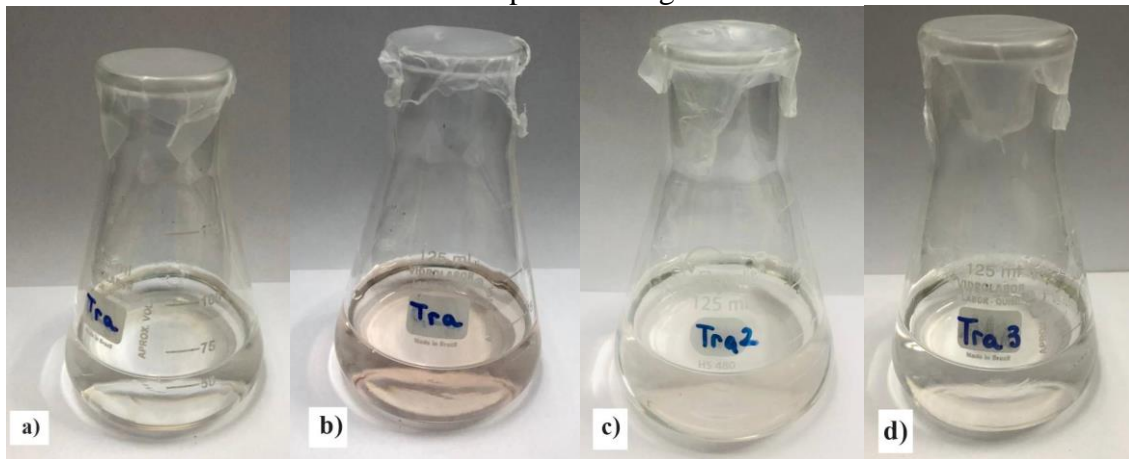
Ciclos	2,4 DCP (50mg L^{-1})	Equivalente em bioconversão (%)
1°	12,07 ± 0,32	75,86
2°	30,10 ± 0,20	39,80
3°	40,16 ± 0,80	19,68
4°	47,24 ± 0,13	5,52

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os resultados demonstram que há possibilidade de reuso das cápsulas com a YPP imobilizada, contudo, ocorre perda do percentual de bioconversão ao longo dos ciclos. A

recomendação é de reuso por 2 ciclos devido a perda da capacidade catalítica da enzima. O aspecto visual dos meios reacionais, antes e após a bioconversão do 2,4 DCP pela YPP imobilizada estão mostrados na Figura 18.

Figura 18 - Aspecto visual dos meios reacionais, antes e após a bioconversão do 2,4 DCP pela YPP imobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS

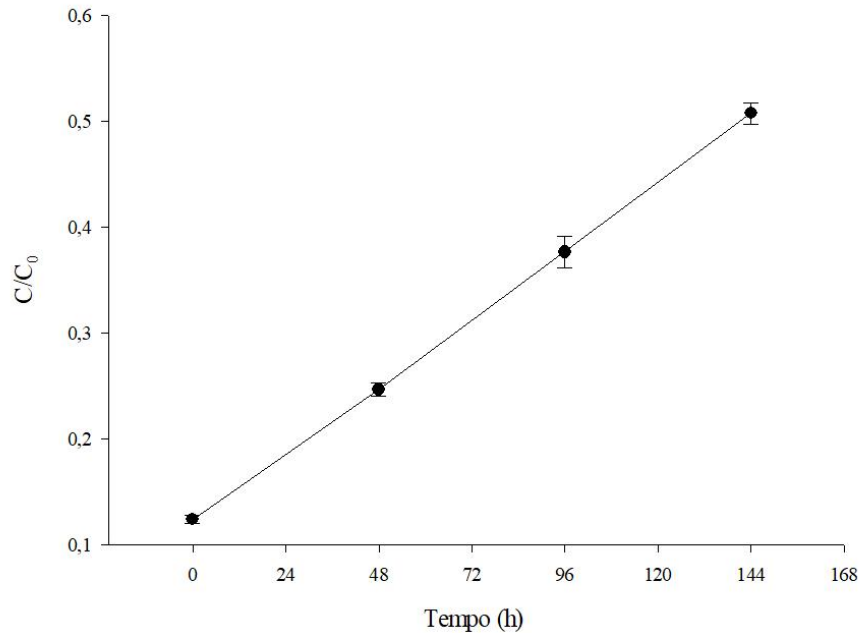


Nota: **a)** Meio reacional sem tratamento; **b)** 1º ciclo de tratamento com YPP imobilizada; **c)** 2º ciclo de tratamento com reuso da YPP imobilizada; **d)** 3º ciclo de tratamento com reuso da YPP imobilizada. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.3.5 Processo Contínuo de tratamento de 2,4 DCP com a YPP imobilizada

Os resultados do processo de tratamento de 2,4 DCP operado em fluxo contínuo e com uso da YPP imobilizada, estão mostrados na Figura 19, expressos pela relação entre a concentração final e inicial do 2,4 DCP no decorrer de 144 h.

Figura 19 – Processo de tratamento de 2,4 DCP operado em fluxo contínuo e com uso da YPP imobilizada em cápsulas de alginato.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Ao longo do tempo do experimento, a relação de C/C_0 aumentou de forma progressiva, a concentração inicial de 2,4 DCP era de $48,705 \pm 0,367 \text{ mg L}^{-1}$. Este aumento pode ser justificado pela possível saturação das cápsulas de alginato com a YPP imobilizada via EDC/NHS. O processo contínuo demonstra a simulação de um processo real de tratamento. Assim, é possível constatar que a YPP imobilizada apresenta grande potencial de uso, mantendo, ao longo de três dias, aproximadamente 50% de remoção do 2,4 DCP.

4.3.6 Fitotoxicidade do meio reacional antes e após a bioconversão com a YPP imobilizada

No ensaio de fitotoxicidade foi utilizado os três quartis resultantes do processo de fluxo contínuo, por meio de sua passagem em fluxo ascendente pela coluna de cápsulas de YPP imobilizada. As concentrações de 2,4 DCP de cada quartil estão na Tabela 4. O ensaio foi então realizado com água destilada, chamado controle, a água contendo o 2,4 DCP (50 mg L^{-1}), os três quartis e água destilada que também ficou em fluxo contínuo na presença das cápsulas de YPP imobilizada.

Tabela 4 - Concentração de 2,4 DCP nos quartis resultantes do processo em fluxo contínuo e uso da YPP imobilizada em cápsulas de alginato

Quartil	Concentração de 2,4-DCP (mg L ⁻¹)
1°	12,324±0,297
2°	18,818±0,738
3°	25,365±0,513

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Os resultados do ensaio de fitotoxicidade estão mostrados na Tabela 5. Para o efeito de germinação, a água contendo o 2,4 DCP foi a que apresentou o menor percentual, e para as demais soluções teste, todos os resultados ficaram acima de 90%. Para inibição do crescimento da raiz somente o grupo controle não apresentou toxicidade, já para inibição de crescimento do caule, grupo controle, H₂O e 1° quartil não conferiram toxicidade ao caule. Já para índice de germinação somente os grupos controle (100%) e H₂O (quase 90%) obtiveram bons resultados.

Tabela 5 – Resultados do ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa* L. var. *Buttercrunch*).

	Controle	B	1Q	2Q	3Q	H ₂ O
Efeito de Germinação (%)	94,00	86,00	90,00	100,00	96,00	100
Inibição do Crescimento da Raiz (%)	0,00	52,219	26,622	48,002	72,992	15,836
Inibição do Crescimento do Caule (%)	0,00	34,370	0,00	20,06	72,99	0,00
Índice de Germinação (%)	100,00	43,714	68,694	55,312	27,581	89,537

Nota: 1Q, 2Q e 3Q correspondem às amostras dos quartis do fluxo contínuo com 2,4 DCP e H₂O a água destilada que ficou em contato com as cápsulas imobilizadas submetida a fluxo contínuo. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Ao analisar os resultados de sementes germinadas, comprimento do caule e da raiz (Tabela 6), a resposta obtida para o número de sementes germinadas foi acima de 9,0 para todos os grupos de tratamento em exceto para o bruto, porém nenhum tratamento diferiu estatisticamente entre si ($P > 0,05$). Para o comprimento do caule e da raiz o bruto e o 3° quartil (3Q) tiveram os menores valores, os quais condiz com os resultados encontrados na tabela anterior. Grupo controle, H₂O e 1° quartil não possuíram diferença estatística ($P > 0,05$) para o comprimento do caule e da raiz. O aspecto visual das sementes após o ensaio de fitotoxicidade estão mostrados na Figura 20.

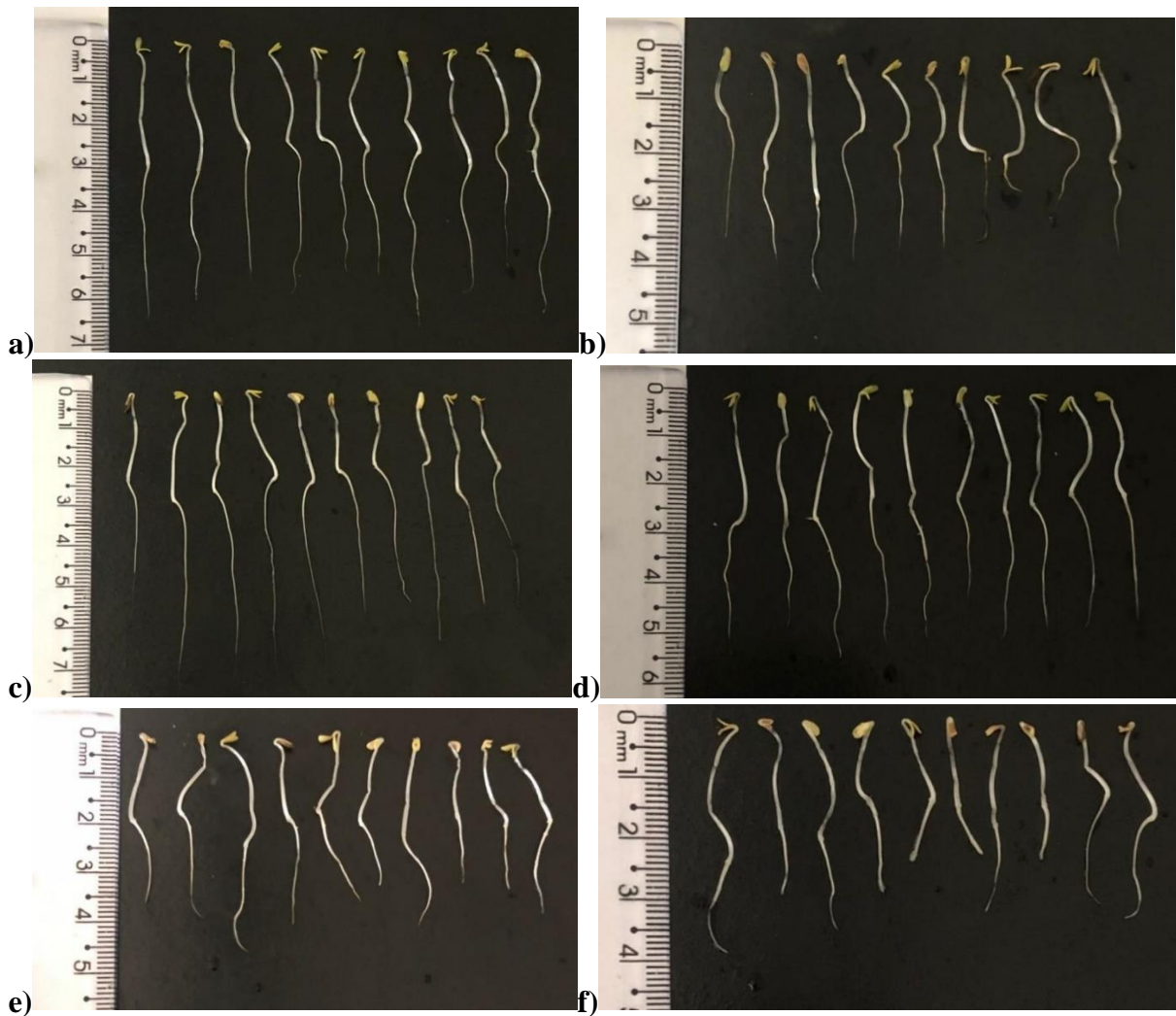
Tabela 6 – Número de sementes germinadas e desenvolvimento da raiz e caule

	Controle	B	1Q	3Q	2Q	H ₂ O
Semente Germinadas	9,4±0,5 ^a	8,6±1,5 ^a	9,0±0,4 ^a	9,2±0,5 ^a	10,0±0,0 ^a	10,0±0,0 ^a
Comprimento do Caule	1,8±0,7 ^{ab}	1,2±0,6 ^{cd}	1,8±0,8 ^a	1,0±0,5 ^d	1,4±0,6 ^{bc}	1,9±0,7 ^a
Comprimento da Raiz	2,6±1,3 ^{ab}	1,2±0,7 ^c	1,9±1,0 ^b	0,7±0,4 ^d	1,3±0,6 ^c	2,2±1,1 ^a

Nota: 1Q, 2Q e 3Q correspondem às amostras dos quartis do fluxo contínuo com 2,4 DCP e H₂O a água destilada que ficou em contato com as cápsulas imobilizadas submetida a fluxo contínuo. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

**Letras diferentes nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, há diferença significativa entre as médias. Letras iguais nas linhas indicam que, no nível de significância de 5%, não há diferença significativa entre as médias.

Figura 20 – Sementes germinadas de alface (*Lactuca sativa L. var. Buttercrunch*) após efeito dos tratamentos



Nota: a) controle da amostra; b) água contendo o 2,4 DCP; c) primeiro quartil do fluxo contínuo; d) segundo quartil do fluxo contínuo; e) terceiro quartil do fluxo contínuo; f) H₂O proveniente do processo em fluxo contínuo realizado com água destilada no lugar da solução de 2,4 DCP. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.3.7 Ensaio de citotoxicidade do meio reacional antes e após a bioconversão com a YPP imobilizada

O ensaio de citotoxicidade, utilizando *Allium cepa*, foi realizado com água destilada, chamado controle, a água contendo o 2,4 DCP (50 mg L⁻¹), os três quartis (cujas concentrações de 2,4 DCP estão mostrados na Tabela 4 e água destilada que também ficou em fluxo contínuo na presença das cápsulas de YPP imobilizada. De acordo com o índice mitótico, mostrado na Tabela 7, as concentrações remanescentes de 2,4 DCP nos quartis que foram tratados com as cápsulas de YPP imobilizada, geraram toxicidade para as cebolas, pois mesmo uma alteração pequena de 2,4 DCP já causa grande diferença no desenvolvimento e em suas células. O 1º quartil obteve um índice mitótico similar ao controle, mesmo assim, somente o grupo controle e H₂O não tiveram diferença estatística entre si (P>0,05), os outros grupos todos diferiram estatisticamente.

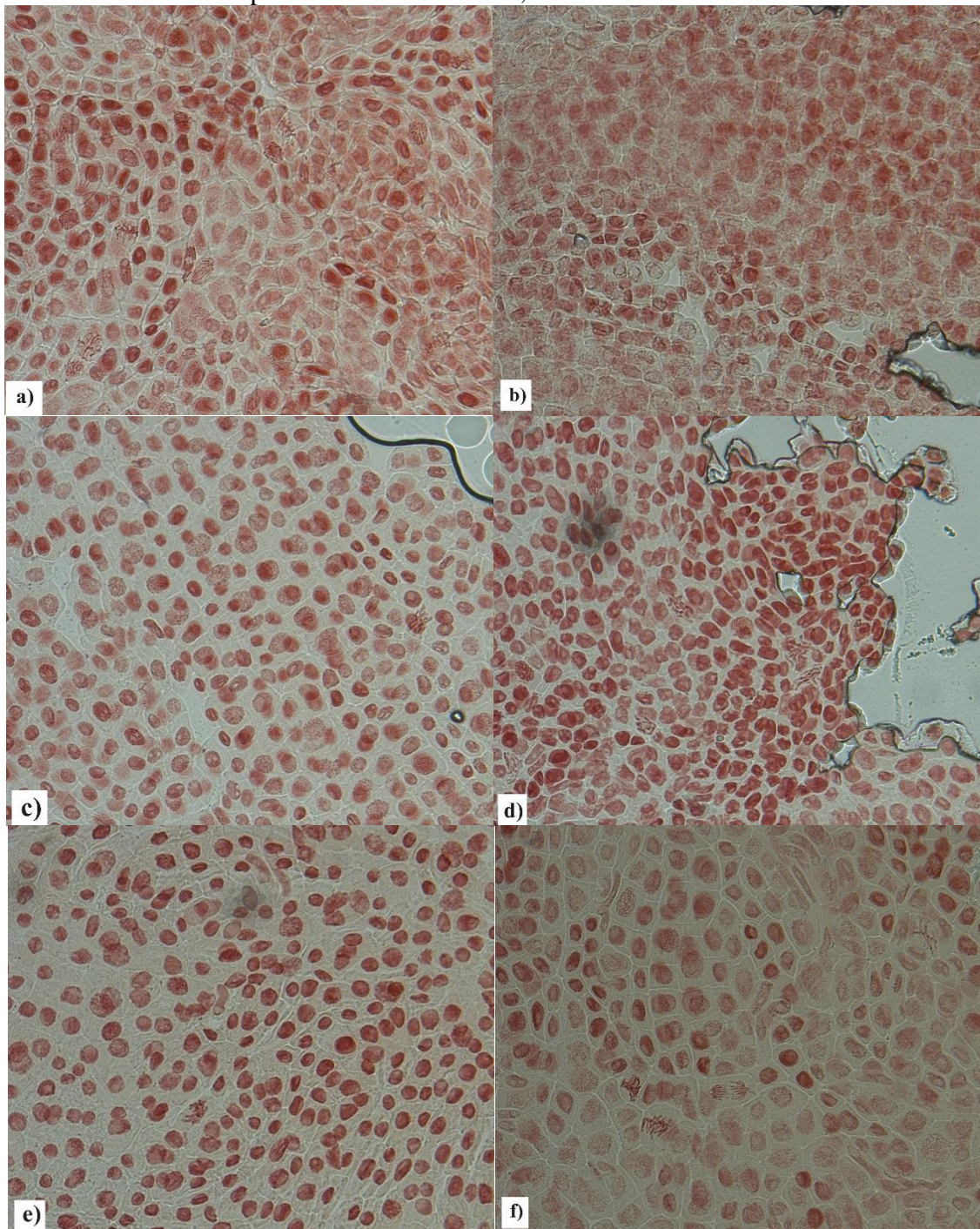
Tabela 7 – Índice mitótico das raízes de *A. cepa* após exposição aos diferentes tratamentos.

Tratamento	MI (%)
Controle	66,63 ± 1,66 ^a
Bruto	23,13 ± 0,80 ^e
1Q	59,71 ± 1,22 ^b
2Q	41,24 ± 2,69 ^c
3Q	28,41 ± 1,03 ^d
H ₂ O	68,84 ± 1,1 ^a

Nota: Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Na Figura 21 estão mostradas as microscopias das células após o contato das raízes com os respectivos tratamentos (soluções testes). Pode-se observar nas figuras o aspecto das células e fases de mitose, na figura 21b, que tiveram contato com a água contendo o 2,4 DCP, observa-se as células que mais diferem do grupo controle e quase não apresentam mitose.

Figura 21 – Microscopias das células de *Allium cepa* submetidas as soluções testes antes e após a bioconversão do 2,4-DCP com a YPP imobilizada.

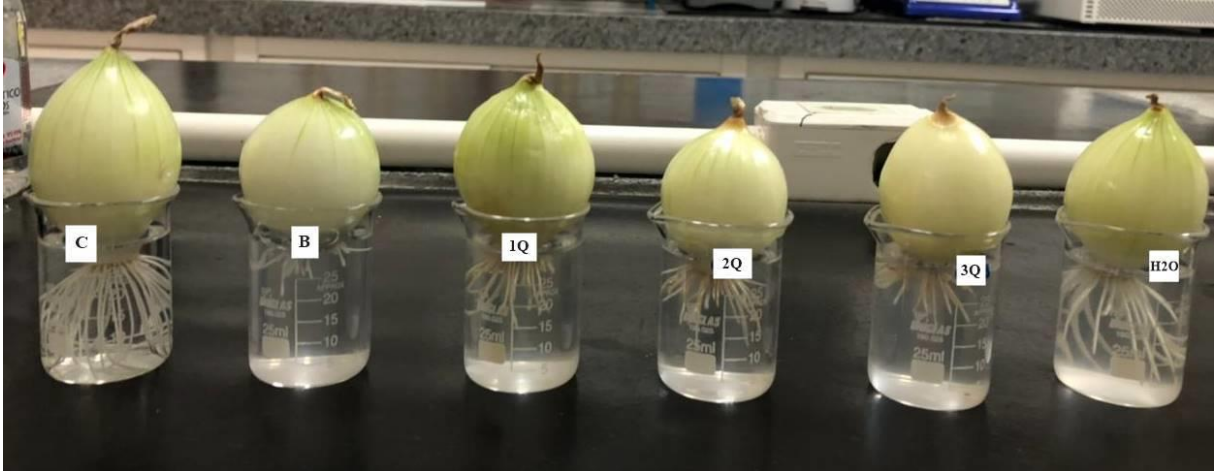


Nota: **a)** controle da amostra; **b)** água contendo o 2,4 DCP; **c)** primeiro quartil do fluxo contínuo; **d)** segundo quartil do fluxo contínuo; **e)** terceiro quartil do fluxo contínuo; **f)** H₂O proveniente do processo em fluxo contínuo realizado com água destilada no lugar da solução de 2,4 DCP. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Além das microscopias, é possível observar o efeito que cada solução teste desencadeou no desenvolvimento das cebolas *Allium cepa* (Figura 22), onde se percebe a similaridade entre

o grupo controle e H₂O como foi observado no índice mitótico e menor comprimento e quantidade das raízes do B (água contendo o 2,4 DCP) seguido pelo 3Q (terceiro quartil).

Figura 22 – Desenvolvimento das cebolas (*Allium cepa*) submetidas as soluções teste antes e após a bioconversão do 2,4 DCP com a YPP imobilizada



Nota: C é o controle da amostra; B é a água contendo o 2,4 DCP; 1Q é o primeiro quartil; 2Q é o segundo quartil; 3Q é o terceiro quartil; H₂O é proveniente do processo em fluxo contínuo realizado com água destilada no lugar da solução de 2,4 DCP. Fonte: Elaborado pela autora (2021).

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados alcançados com a utilização da YPP imobilizada em cápsulas de alginato na bioconversão de 2,4 DCP demonstram a necessidade de definição, por meio de ensaios experimentais, dos parâmetros que maximizam a conversão, levando a maior eficiência para o processo de tratamento de efluentes. A YPP imobilizada apresentou melhor bioconversão do substrato em pH 6,8 e 40°C, condições que favorecem a aplicação no tratamento de efluentes reais e na biorremediação, *ex situ*. Segundo os ensaios de toxicidade pode-se constatar que o efluente tratado com a YPP imobilizada, junto com as cápsulas conferiu toxicidade ao meio. A bioconversão de poluentes emergentes por meio do uso de enzimas é algo a ser explorado e, assim como para o 2,4 DCP, a YPP apresenta um potencial de aplicação para várias outras moléculas classificadas como fenólicas, presentes em efluentes industriais e em águas superficiais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se constatar que a YPP imobilizada em cápsulas de alginato via EDC/NHS é efetiva na bioconversão de compostos fenólicos e possui características viáveis para sua utilização em processos de tratamento de efluentes, por apresentar condições de uso e armazenamento fáceis de serem aplicadas no tratamento de efluentes industriais. Desta forma, é importante que sejam realizados mais estudos com intuito de otimizar os processos de imobilização e de confecção das cápsulas para que se possa obter uma maior resistência, viabilizando assim mais ciclos de reuso das cápsulas contendo a YPP imobilizada e mais afinidade a íons metálicos. Em conclusão, destaca-se que o uso da peroxidase da casca da raiz yacon na forma imobilizada se evidencia como uma alternativa para processos que envolvam biocatálise e na bioconversão de compostos fenólicos em efluentes.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para próximos trabalhos, considerando os resultados obtidos neste estudo:

- Avaliar possíveis melhoras no processo de imobilização, para potencializar os ciclos de reuso das cápsulas com YPP imobilizada;
- Avaliar possíveis melhoras nas cápsulas com a YPP imobilizada para que não haja toxicidade no efluente tratado;
- Avaliar a influência de outros íons metálicos, buscando encontrar algum que intensifique a atividade da YPP imobilizada;
- Aplicar a YPP imobilizada em diferentes efluentes reais contendo fenol e outros efluentes, por exemplos têxtis;
- Adequar a utilização da YPP imobilizada com o processo real de tratamento de uma indústria, buscando gerar um efluente tratado que se enquadre nas normas.

REFERÊNCIAS

ALI, M.; HUSAIN, Q. Guar gum blended alginate/agarose hydrogel as a promising support for the entrapment of peroxidase: Stability and reusability studies for the treatment of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 463–471, 2018.

ALMULAIKY, Y. Q.; AL-HARBI, S. 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, jul. 2019.

ALTUNKAYA, A.; GÖKMEN, V. Purification and characterization of Polyphenol Oxidase, Peroxidase and Lipoxygenase from Freshly Cut Lettuce (*L. sativa*). **Food Technol. Biotechnol**, p. 249–256, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21. ed. [s.l.] American Public Health Association, 2005.

APHA. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater)**. 21. ed. [s.l.: s.n.].

ASAD, S. et al. Phosphate buffer effects on thermal stability and H₂O₂-resistance of horseradish peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 566–570, maio 2011.

BARBOSA, G. S. DA S. et al. Immobilization of Low-Cost Alternative Vegetable Peroxidase (*Raphanus sativus* L. peroxidase): Choice of Support/Technique and Characterization. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3668, 12 ago. 2020.

BASHA, S. A.; PRASADA RAO, U. J. 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.

BELTRAME, L. T. C. **Caracterização de efluente têxtil e proposta de tratamento**. [s.l.] UFRN, 2000.

BILAL, M. et al. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 836–842, dez. 2016.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, p. 41–55, maio 2014.

BOUCHERIT, N.; ABOUSEOUD, M.; ADOUR, L. Degradation of direct azo dye by Cucurbita pepo free and immobilized peroxidase. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 6, p. 1235–1244, jun. 2013.

BRATKOVSKAJA, I.; VIDZIUNAITE, R.; KULYS, J. Oxidation of Phenolic Compounds by Peroxidase in the Presence of Soluble Polymers. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 9, p. 985–992, set. 2004.

CARABAJAL, M. et al. Removal of Phenol by Immobilization of *Trametes versicolor* in Silica-Alginate-Fungus Biocomposites and Loofa Sponge. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 2, p. 180–188, 2016a.

CARABAJAL, M. et al. Removal of Phenol by Immobilization of *Trametes versicolor* in Silica-Alginate-Fungus Biocomposites and Loofa Sponge. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 44, n. 2, p. 180–188, fev. 2016b.

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

CENTENO, D. A.; SOLANO, X. H.; CASTILLO, J. J. A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 116, p. 33–38, ago. 2017.

CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. In: [s.l.: s.n.]. p. 764–775.

DAÂSSI, D. et al. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 90, p. 71–78, maio 2014.

DEVA, A. N. 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.

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.

ELSAYED, A. M. et al. Purification and biochemical characterization of peroxidase isoenzymes from *Ficus carica* latex. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 1–9, out. 2018.

ELY, C. 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.

ELY, C.; KEMPKA, A. P.; SKORONSKI, E. Peroxidases application in the wastewater treatment. **Revista Virtual de Quimica**, v. 8, n. 5, p. 1537–1549, 2016.

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, 2013a.

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, 2013b.

FERNANDES, M. 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.

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

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.

FRITZKE, W. **PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA PEROXIDASE EXTRAÍDA DAS FOLHAS DE CEDRO (*Cedrela fissilis*)**. [s.l.] UDESC, 2019.

GALENDE, P. P. 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.

GAO, R. 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.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 8995–9018, 2014.

HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 24–33, maio 2016.

HAQ, I. 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.

HE, K. et al. Treatment of Alkaline Stripped Effluent in Aerated Constructed Wetlands: Feasibility Evaluation and Performance Enhancement. **Water**, v. 8, n. 9, p. 386, 6 set. 2016.

ISPAS, C. R. et al. Multifunctional biomagnetic capsules for easy removal of phenol and bisphenol A. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1961–1969, mar. 2010.

JOHAKIMU, J. K. et al. Preliminary techno-economic assessment of recovering water and caustic soda from alkaline bleach plant effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 139, p. 914–921, dez. 2016.

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, jun. 2018.

KALAIARASAN, E.; PALVANNAN, T. Removal of phenols from acidic environment by horseradish peroxidase (HRP): Aqueous thermostabilization of HRP by polysaccharide additives. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 2, p. 625–634, 2014.

KHARATMOL, P.; PANDIT, A. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica oleracea* var. capitata). **J Biochem Tech**, 2013.

KUMAR, R. et al. Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1350–1357, jun. 2011.

LAGO, C. C.; NOREÑA, C. P. Z. 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.

LAVERY, C. B. et al. Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8471–8476, 11 ago. 2010.

MACIEL, H. P. F. et al. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1067–1071, out. 2007.

MAGDY, M.; GAR ALALM, M.; EL-ETRIBY, H. K. Comparative life cycle assessment of five chemical methods for removal of phenol and its transformation products. **Journal of Cleaner Production**, v. 291, p. 125923, abr. 2021.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, maio 2007.

MATTO, M.; HUSAIN, Q. Decolorization of textile effluent by bitter melon peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate-starch beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2–3, p. 1540–1546, 2009.

MERCK MILLIPORE. **Microsphere Coupling – Two-step EDC/Sulfo NHS Covalent Coupling Procedure for Estapor® Carboxyl-modified Dyed Microspheres**, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Biochemie**. 5. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.

OLIVEIRA, R. **Desenvolvimento de géis e esponjas de quitosana e blendas quitosana/gelatina em ácido adípico**. [s.l.] USP, 2016.

PADILHA-CABRERA, Y. R.; PIRES, C. . **ESTRATÉGIAS PARA ADAPTAÇÃO DE LODO AERÓBIO MESOFÍLICO PARA TERMOFÍLICO UTILIZANDO EFLUENTE**

DE CELULOSE BRANQUEADA KRAFT. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...** Florianópolis: 2014

PADILHA, V. M. et al. Avaliação do tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2178–2184, 17 jul. 2009.

PANDEY, V. P. et al. Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1713–1720, 2017a.

PANDEY, V. P. et al. Chitosan immobilized novel peroxidase from *Azadirachta indica*: Characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1713–1720, nov. 2017b.

PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. 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, fev. 2011.

PERUSSELLO, C. A. et al. Thermophysical properties of yacon (*Smallanthus sonchifolius*): experimental determination and effect of moisture content. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 37, n. 1, p. 167, 6 jan. 2015.

PRODANOVIC, O. et al. Tyramine modified alginates via periodate oxidation for peroxidase induced hydrogel formation and immobilization. **Reactive and Functional Polymers**, v. 93, p. 77–83, 2015.

QUEIROZ, M. et al. IMOBILIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE RAIZ FORTE EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Química Nova**, 2018.

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

QUINTANILLA-GUERRERO, F. et al. Chemical modification of turnip peroxidase with methoxypolyethylene glycol enhances activity and stability for phenol removal using the immobilized enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 8058–8065, 2008b.

ŞAHİN, S. Horseradish Peroksidaz Enziminin TiO₂-COOH Nanopartiküller Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının Box-Behnken Metodu ile Optimize Edilmesi. **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, p. 904–916, 30 dez. 2019.

SAMPAIO, M. J. et al. Photocatalytic activity of TiO₂-coated glass raschig rings on the degradation of phenolic derivatives under simulated solar light irradiation. **Chemical Engineering Journal**, v. 224, p. 32–38, maio 2013.

SANTANA, I.; CARDOSO, M. H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 898–905, jun. 2008.

SAUD AL-BAGMI, M. 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, 2019a.

SAUD AL-BAGMI, M. 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. 2019b.

SINGH, S. 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, jul. 2017.

SOUZA, D. H. **EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PEROXIDASE DE *Smallanthus sonchifolius* E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE 2,4 DICLOROFENOL**. [s.l.] UDESC, 2020.

TAO, Y. M. et al. Peroxidase from jackfruit: Purification, characterization and thermal inactivation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 898–905, 2018.

UMANG J. TRIVEDI, A. S. B. AND J. (JESSE) Z. Investigation of Phenol Removal using Sol-Gel/Alginate Immobilized Soybean Seed Hull Peroxidase. v. 84, n. April, p. 239–247, 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**. Washington, D.C.: [s.n.].

- VALENTOVÁ, K. ULRICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, v. 147, p. 11, 2003.
- VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.
- VETAL, M. D.; RATHOD, V. 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.
- 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.
- VILLEGAS, L. G. C. et al. A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. **Current Pollution Reports**, v. 2, n. 3, p. 157–167, 7 set. 2016.
- VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 1995.
- WANG, Y. et al. Enhanced tolerance and remediation to mixed contaminants of PCBs and 2,4-DCP by transgenic alfalfa plants expressing the 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 269–275, abr. 2015.
- WON, K. et al. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2149–2154, maio 2005.
- XAVIER, J. L. N. **Aplicação de técnicas eletroquímicas na degradação de poluentes orgânicos refratários**. [s.l.] UFRGS, 2012.
- YANG, Z. et al. Rapid degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid facilitated by acetate under methanogenic condition. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 146–151, maio 2017.
- YU, Y. et al. Peroxidase-like activity of FeVO₄ nanobelts and its analytical application for optical detection of hydrogen peroxide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 233, p. 162–172, out. 2016.