

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Imobilização Multipontual das Peroxidases da Casca da Soja e Chuchu em Suportes Alternativos de Pó de Sabugo de Milho e Celulose Bacteriana.

Doutorando: JULIO CÉSAR VINUEZA GALÁRRAGA

***Orientador:* Prof. Dr. RUBENS MONTI**

ARARAQUARA, SP

2012

Imobilização Multipontual das Peroxidases da Casca da Soja e Chuchu em Suportes Alternativos de Pó de Sabugo de Milho e Celulose Bacteriana.

Doutorando: JULIO CÉSAR VINUEZA GALÁRRAGA

***Orientador:* Prof. Dr. RUBENS MONTI**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

ARARAQUARA, SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

V794i Vinueza Galárraga, Julio César
Imobilização multipontual das peroxidases da casca da soja e chuchu em suportes alternativos de pó de sabugo de milho e celulose bacteriana / Julio César Vinueza Galárraga. – Araraquara, 2012
118 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Rubens Monti

1. Peroxidase. 2. Imobilização. 3. Pó sabugo de milho.. 4. Celulose bacteriana. 5. Fenóis em águas residuais. I. Monte, Rubens, orient.. II. Título.

CAPES: 50700006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Dedico a Iawe, por conceder-me sabedoria e força em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais, Guillermo Vinueza Figueroa (†) e Maria Victoria Galárraga Silva, que sempre me apoiaram e o mais importante, me ensinaram diversas lições que não podem ser encontradas em livros.

À minha filha Samantha Carolina, que trouxera alegria e felicidade à minha vida e mesmo que longe de mim é a força para continuar em frente.

Aos meus irmãos e sobrinhos, que sempre acreditaram em mim.

Dedico ainda àqueles que pude conviver diariamente, bem como àqueles que estavam distantes, familiares e eternos amigos, pelas orações e pelo apoio emocional constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram da realização deste trabalho.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Monti, por sua competência, dedicação, atenção, respeito e, sobretudo, pelo apoio desde o início desta caminhada.

Aos Doutores José Manuel Guisan e César Mateo, pela sua colaboração como co-orientadores no Instituto de Catálises e Petróleo Química do CSIC na Espanha.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Campus Araraquara, pelo conhecimento transmitido durante o curso de Doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, pelo estímulo e ajuda sempre demonstrada.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, pela atenção, paciência e colaboração durante todo o período do doutorado.

Aos funcionários dos distintos Laboratórios Experimentais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela amizade e enorme auxílio na realização do trabalho experimental.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus Araraquara, pelo auxílio na obtenção do material bibliográfico.

Às secretárias do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara, pela presteza e competência com a que sempre fizeram as suas tarefas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundación Carolina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de estudo outorgadas, à FUNDUNESP pelo auxílio financeiro ao projeto e ao PROEX pelo auxílio para viagem à congresso.

À minha namorada Christiane e a toda sua família, pelo apoio, carinho e atenção brindados em todos os momentos da finalização desta tese.

Finalmente, agradeço aos meus amigos: Andréia, Caio, Fernando, Ederlan, Delfina, Gustavo, Juliana e a todos os colegas pela troca de conhecimentos, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

RESUMO

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são hemoproteínas que catalisam processos redox e durante a oxidação são gerados radicais livres, formando produtos poliaromáticos insolúveis em água, facilitando sua remoção do meio aquoso. O objetivo deste trabalho foi extrair as peroxidases da casca de soja e do chuchu, realizar aminação na superfície da estrutura terciária das enzimas e imobilizarem estas enzimas nos suportes alternativos de celulose vegetal (pó de sabugo de milho) e de celulose bacteriana ativada e utilizar os derivados obtidos para descoloração do azul de bromofenol 0.01 mM. A quantidade de proteínas nos extratos foram determinada por Bradford com valores médios de 0,235 mg mL⁻¹ para soja e 0,290 mg mL⁻¹ para o chuchu, a atividade específica de peroxidase foi determinada com ABTS 1 mM em presença de H₂O₂ 100 mM em $\lambda= 430\text{nm}$, obtendo-se os valores médios de 86,06 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e 9,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectivamente, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0. Aminação das peroxidases solúveis foram feitas em tampão etilenodiamina pH 4,75 e carbodiimida, 10 e 50 mM, a funcionalização das celulosas e imobilização covalente multipontual foram semelhantes às descritas para agarose (Guisan).¹⁹ As peroxidases aminadas 10 e 50 mM foram imobilizadas covalentemente nos suportes ativadas SM-glioxil e CB-glioxil. Para a descoloração do azul de bromofenol 0.01 mM, utilizou-se os derivados estabilizados em presença de H₂O₂ em $\lambda= 590\text{nm}$. Os derivados foram reutilizados por cinco ciclos, mantendo-se a propriedade catalítica, sugerindo que estes derivados são uma alternativa de baixo custo, não só para o tratamento de águas residuais como também com potenciais usos em outros processos industriais.

Palavras-chave: Peroxidases, imobilização multipontual, pó de sabugo de milho, celulose bacteriana, descoloração de águas residuais

ABSTRACT

The peroxidases (EC 1.11.1.7) are hemoproteins that catalyze redox processes; during the oxidation the generated free radicals are forming poly-aromatic products insoluble in water, facilitating their removal from aqueous medium. The objective of this study was to extract peroxidases from the coat soybean and the chuchu (*Sechium edule L*), to make amination on the tertiary structure of the enzymes surface, and immobilize these enzymes in the alternative supports of plant cellulose (powdered corn cob) and active bacterial cellulose, to use the derivatives obtained for the discoloration of the bromophenol blue 0.01 mM. The amount of protein in the extracts were determined by Bradford methods, with average values of 0,235 mg mL⁻¹ for soybean and 0,290 mg mL⁻¹ for chuchu peroxidases, the specific activity of peroxidase was determined with ABTS 1 mM in the presence of H₂O₂ 100 mM in $\lambda = 430\text{nm}$, obtaining the mean values of 86,06 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ and 9,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectively, in sodium acetate buffer 100mM, pH 4,0. Amination of soluble peroxidases were made in buffer ethylenediamine pH 4,75 and carbodiimide, 10 and 50mM, the functionalization of cellulose and multipoint covalent immobilization were similar to those described for agarose (Guisan).¹⁹ The amino peroxidases 10 and 50 mM were covalently immobilized on activated supports SM-glioxil and CB-glioxil. For discoloration of bromophenol blue 0.01 mM, we used derivatives of stabilized in H₂O₂ presence in $\lambda = 590\text{nm}$. The derivatives were reused for five recycling maintaining the catalytic property, suggesting that these products are a low cost alternative, not only for the treatment of wastewater as well as potential uses in other industrial processes.

Keywords: Peroxidases, multipoint immobilization, corn cob powdered, bacterial cellulose, wastewater discoloration.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

		Pg.
Figura 1.	Diagrama do mecanismo de polimerização do fenol	11
Figura 2.	Representação dos tipos de imobilização de enzimas mais utilizados	13
Figura 3.	Microscopia eletrônica de gel de agarose	16
Figura 4.	Estrutura química da agarose. A) Monômero de agarose; B) Representação do poro da agarose	18
Figura 5.	Esquema da estabilização de enzimas multiméricas com utilização de macromoléculas polifuncionais	19
Figura 6.	Pó de sabugo de milho utilizado como suporte para imobilização de enzimas	21
Figura 7.	Imagens de microscopia óptica do sabugo de milho	21
Figura 8.	Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do pó de sabugo de milho	22
Figura 9.	Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis	22
Figura 10.	Diferenças entre as fibras de celulose bacteriana	23

CAPÍTULO II

Figura 1.	Diagrama do mecanismo de polimerização do fenol	42
Figura 2.	Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis	44
Figura 3.	SDS–PAGE. (A) padrão massa molecular, (B) peroxidase comercial horseradish, (C) peroxidase da casca da soja, (D) peroxidase do chuchu. PAGE. (E) peroxidase comercial horseradish, (F) peroxidase da casca da soja, (G) peroxidase do chuchu	50
Figura 4.	Porcentagens de inativação das peroxidases da soja solúveis: ■ nativa; ● aminada 10 mM e ▲ aminada 50 mM, frente a	51

temperatura de 60°C

- Figura 5.** Porcentagens de inativação das Peroxidases do chuchu solúveis: ■ natural; ▲ aminada 10 mM; ●aminada 50 mM, frente a 45°C de temperatura 51
- Figura 6.** Porcentagens de inativação dos derivados CB-glioxil das peroxidases da soja: ■ aminada 10 mM e ▲ minada 50 mM, frente a temperatura de 60°C. 33
- Figura 7.** Porcentagens de inativação dos derivados CB-glioxil das peroxidases do chuchu: ■ aminada 10 mM e ▲ minada 50 mM, frente a temperatura de 45°C. 54

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Porcentagens de inativação das peroxidases da soja solúveis: ■ nativa; ● aminada 10 mM e ▲aminada 50 mM, frente a temperatura de 60°C 79
- Figura 2.** Porcentagens de inativação dos derivados SM-glioxil-peroxidases: ■ aminada 10 mM e ▲ minada 50 mM, frente a temperatura de 60°C 81

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Porcentagens de inativação das Peroxidases do chuchu solúveis: ■ nativa; ▲ aminada 10 mM; ●aminada 50 mM, frente a temperatura de 45°C 103
- Figura 2.** Porcentagens de inativação dos derivados SM-glioxil das peroxidases aminadas do chuchu: ■ aminada 10 mM e ▲ minada 50 mM, frente a temperatura de 45°C 105

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Comparações entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos 13

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Porcentagens de atividade específica recuperada após a aaminação das peroxidases da casca da soja e do chuchu 49
- Tabela 2.** Atividade enzimática no processo de imobilização das peroxidases da soja e do chuchu aminadas em suporte CB-glioxil 52
- Tabela 3.** Porcentagens de inativações das peroxidases da casca de soja nativa, aminadas e imobilizadas, frente a diferentes pHs em 120 horas de tratamento 55
- Tabela 4.** Porcentagens de descoloração do azul de bromofenol 0,01mM, com os derivados CB-glioxil-peroxidases aminadas 10 mM e 50 mM, em presença de H₂O₂, em 5 ciclos de 60 minutos. 56

CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Atividade específica recuperada após a aaminação da peroxidase da casca da soja 78
- Tabela 2.** Atividade enzimática no processo de imobilização das peroxidases da soja aminadas em suporte SM-glioxil. 80
- Tabela 3.** Porcentagens de inativações das peroxidases da casca de soja nativa, aminadas e imobilizadas, frente a diferentes pHs em 120 horas de tratamento 82
- Tabela 4.** Porcentagens de descoloração do azul de bromofenol 0,02mM, com os derivados SM-glioxil-peroxidases aminadas 10 mM e 50 mM, em presença de H₂O₂, em 5 ciclos de 60 minutos 82

CAPÍTULO IV

Tabela 1.	Porcentagem da atividade específica recuperada depois da aminação da peroxidase do chuchu	103
Tabela 2.	Porcentagens de atividade enzimática no processo de Imobilização das peroxidases aminadas da soja no suporte SM-glioxil	104
Tabela 3.	Porcentagens de inativações das peroxidases nativa, aminadas e imobilizadas do chuchu, frente a diferentes pHs, em 96 horas de tratamento	106
Tabela 4.	Porcentagens de descoloração do azul de bromofenol 0,01mM, com os derivados SM-glioxil das peroxidases do chuchu aminadas 10 mM e 50 mM, em presença de H ₂ O ₂ , em 5 ciclos de 60 minutos	107

LISTA DE ABREVIATURA

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfônico)
AH2	Substrato doador de elétron
6-APA	Ácido amino-penicilínico
CB	Celulose bacteriana
CB-Gli-Ch-NH ₂ 10 mM	Peroxidase do chuchu aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana
CB-Gli-Ch-NH ₂ 50 mM	Peroxidase do chuchu aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana
CB-Gli-S-NH ₂ 10 mM	Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana
CB-Gli-S-NH ₂ 50 mM	Peroxidase da soja aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana
EC 1.11.1.1	NADH Peroxidase
EC 1.11.1.7	Peroxidases
EC 1.11.1.9	Glutathione peroxidase
EDA	Etilenodiamina
EDAC	1-etil-3-(dimetilamino-propil) carbodiimida
Ei	CompostoI
Eii	CompostoII
HRP	Horseradish peroxidase; peroxidase do rabanete
kDa	Kilodalton
MANAE	monoaminoetil- <i>N</i> -aminoetil
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido desidrogenase.
NH ₂	Grupo amino

PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PEI	Polietilenoimina
SM	Sabugo de milho
SBP	Peroxidase da soja
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato sódico
SM-Gli-Ch-NH ₂ 10 mM	Peroxidase do chuchu aminada 10mM imobilizada em sabugo de milho
SM-Gli-Ch-NH ₂ 50 mM	Peroxidase do chuchu aminada 50mM imobilizada em sabugo de milho
SM-Gli-S-NH ₂ 10 mM	Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte sabugo de milho
SM-Gli-S-NH ₂ 50 mM	Peroxidase da soja aminada 50 mM imobilizada em suporte sabugo de milho
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURA	xii
Capítulo I	16
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos gerais	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
Capítulo II	33
<i>IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL E ESTABILIZAÇÃO DAS PEROXIDASES AMINADAS DA CASCA DA SOJA E DO CHUCHU EM CELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE ALTERNATIVO</i>	33
1. RESUMO	34
2. ABSTRACT	35
3. INTRODUÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. Material	40
4.2. Métodos	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	54
7. AGRADECIMENTOS	55
Capítulo III	61
<i>IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL E ESTABILIZAÇÃO DA PEROXIDASE AMINADA DA CASCA DA SOJA, EM PÓ DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE ATIVADO</i>	61
1. RESUMO	62
2. ABSTRACT	63
3. INTRODUÇÃO	64
4. MATERIAL E MÉTODOS	67

4.1. Material.....	67
4.2. Métodos	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÕES.....	78
7. AGRADECIMENTOS	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Capítulo IV.....83

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL DA PEROXIDASE AMINADA DO CHUCHU EM SUPORTE PÓ DE SABUGO DE MILHO ATIVADO.....83

1. RESUMO	84
2. ABSTRACT	85
3. INTRODUÇÃO.....	85
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
4.1. Material:.....	90
4.2. Métodos:	90
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
6. CONCLUSÕES.....	99
7. AGRADECIMENTOS	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

As enzimas, conhecidas como os catalisadores biológicos, são macromoléculas de origem protéica envolvidas em numerosas transformações químicas. São polímeros lineares e não ramificados, compostos de vinte aminoácidos diferentes. A alta especificidade, tanto nas reações que catalisam como na seleção dos substratos, é sua característica mais marcante. As principais características que diferenciam as enzimas de outros catalisadores são: a diminuição da energia de ativação necessária para levar até o final de uma reação; sua especificidade; e a capacidade de regular as catálises por vários compostos naturais.⁹⁹ Dentro da variedade de reações possíveis, nos ocuparemos, principalmente, das enzimas que participam em processos de óxido-redução. Essas enzimas são conhecidas como óxido-redutases.

As enzimas têm especificidade por uma ou várias moléculas de uma mesma família, denominadas de substratos. Os substratos são reconhecidos especificamente e transformados quimicamente em produtos com uma velocidade de 10^8 a 10^{20} vezes maior que em ausência da enzima, frente às mesmas condições. A capacidade catalítica enzimática varia consideravelmente. Uma molécula de enzima é capaz de transformar entre 0.5 e 6000000 de moléculas de substrato em um segundo, velocidade que pode ser alterada pela presença de inibidores ou ativadores. Por diversas técnicas bioquímicas, as enzimas podem ser extraídas dos organismos que as sintetizam. Após a extração, elas podem ser trabalhadas “in vitro” e incorporadas aos sistemas de interesse.^{2,7,25,27,94}

Uma das óxido-redutases mais utilizadas na indústria dos alimentos é a peroxidase. Trata-se de uma glicoproteína que contém um grupo heme no sítio ativo. Ela decompõe o peróxido de hidrogênio em presença de um doador de hidrogênio.⁶⁸ As peroxidases estão amplamente distribuídas no reino animal e vegetal e têm sido encontradas em todas as plantas superiores investigadas.⁶⁹ A peroxidase tem a

habilidade de catalisar a polimerização, seguido de uma precipitação ou decantação dos compostos aromáticos provenientes das soluções aquosas.

A utilização de enzimas imobilizadas em géis é bastante descrita na literatura, e geralmente apresenta vantagens operacionais como: possibilidade de reutilização; reações em batelada ou contínua; rápida interrupção da hidrólise; formação controlada; e fácil separação do produto.³ No entanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática, mas o método mais usado é o da imobilização por ligações covalentes. O procedimento de imobilização a ser utilizado deverá estar de acordo com a finalidade do produto e com as características próprias da enzima a ser utilizada.

A imobilização de enzimas e células é um campo para o qual as perspectivas foram ampliadas recentemente. Com os avanços da bioquímica, biologia molecular e química orgânica, a técnica não só se favoreceu como também se mostrou uma ferramenta útil nas indústrias de alimentos,⁹¹ além de estar entre as áreas de pesquisas mais relevantes na atualidade, e o progresso neste campo tornou possível a produção de biossensores.⁸⁰

A atividade industrial desenvolvida pelo homem tem causado a eliminação de grandes quantidades de compostos tóxicos, os quais afetam a flora e a fauna das regiões envolvidas, motivo pelo qual é importante eliminar contaminantes dos resíduos industriais. Os compostos aromáticos tais como o fenol, 2-clorofenol, 2-metoxifenol, resorcinol, entre outros, formam a maior classe de agentes contaminantes em águas residuais de várias indústrias químicas e de alimentos.⁵⁶

Os fenóis são considerados como contaminantes altamente tóxicos. A presença destes compostos em águas de irrigação se manifesta através do dano a tecidos vegetais, provocando pigmentações anormais, assim como também se pode chegar a observar colorações incomuns em carne bovina e pescados.

O ingresso destes compostos nos lençóis aquíferos se traduz na alteração da cadeia alimentícia que gera o crescimento anormal de algas e da flora aquática. Com isso, há uma maior demanda bioquímica de oxigênio, que por não ser suprida leva a morte da fauna aquática. Para o homem, significa um potencial de risco importante devido à exposição contínua a estes compostos, que podem provocar a morte do indivíduo. Um dos métodos para sua remoção inclui a polimerização usando enzimas redox.^{2,14,19,36,38,39,56,97}

Devido a uma ampla utilização das peroxidases, há um interesse crescente por novas fontes destas enzimas e por métodos de imobilização de enzimas e proteínas. O Brasil possui ampla variedade de vegetais que são fontes inesgotáveis de enzimas.^{95,96}

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo principal extrair e caracterizar parcialmente as peroxidases da casca da soja e do chuchu (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). Também objetivou obter nova fonte destas enzimas e imobilizar covalentemente em suportes de celulose vegetal (pó de sabugo de milho) e celulose bacteriana, além de ensaiar as descolorações do azul de bromofenol com os derivados estabilizados formados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Imobilizar de forma multipontual as peroxidases extraídas da casca da soja e do chuchu nos suportes alternativos, pó de sabugo de milho e celulose bacteriana, e propôr uma aplicação dos derivados enzimáticos estabilizados resultantes.

2.2. Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar peroxidases da casca de soja e do chuchu.
- Realizar imobilizações multipontuais de peroxidases da soja e do chuchu nos diferentes suportes, por diferentes metodologias por ligações covalentes.
- Determinar agentes de estabilização a serem aplicados.
- Determinar eficiência da atividade e da estabilidade dos derivados ativos e comparar estes dados entre os derivados obtidos.
- Propôr uma utilidade de interesse industrial para o material selecionado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

3.1. Peroxidases

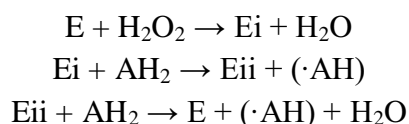
As peroxidases são hemoproteínas que catalisam reações de oxidação-redução de substâncias orgânicas e inorgânicas utilizando peróxido de hidrogênio. Estas enzimas contêm ferriprotoporfirina IX como grupo prostético, sua massa molar varia de 30 a 150 kDa. O termo “peroxidase” abrange enzimas específicas como NADH peroxidase (EC 1.11.1.1) e glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9), bem como enzimas não específicas, simplesmente definidas como peroxidases.³³ A Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica as tem classificado dentro da subclasse das Óxido-reduzidas como EC 1.11.1.7 (Internacional Union of Biochemistry, 1984).

As peroxidases são encontradas tanto em animais como em vegetais.^{13,69} Para as plantas, estas enzimas desempenham funções como defesa contra patógenos e estresse mecânico, biossíntese e degradação de lignina, remoção de peróxido de hidrogênio e oxidação de xenobióticos tóxicos.⁵⁷ As peroxidases vegetais, como a *horseradish peroxidase* (HRP), possuem aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos com um grupamento heme ligado não covalentemente em sua estrutura protéica e têm uma massa molecular de 44 kDa. Enquanto que as peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-783 resíduos de aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente a estrutura protéica.⁵⁷ Outro exemplo é o da peroxidase da casca da soja (SBP), que possui massa molecular de 37 kDa²⁵ e a do chuchu com massa molecular ± 25kDa.

A peroxidase tem sido utilizada tanto na biotecnologia quanto nas várias outras áreas da ciência: para estabelecimento de diagnósticos clínicos e avaliação de processos patológicos;^{23,26,32,35,40,79} em análise de controle de qualidade de alimentos;^{41,58,83,94} na construção de biossensores para análise qualitativa e quantitativa de formulações

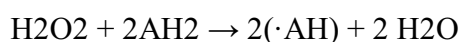
farmacêuticas e cosméticas; e em outras análises que envolvem a presença ou a formação de peróxidos e outros processos enzimáticos.^{21,65,81,95,96,101}

A atividade enzimática é determinada, usualmente, mediante a formação de um produto colorido. Uma característica essencial do mecanismo de ação de peroxidases é o seu ciclo catalítico, que envolve distintas formas intermediárias da enzima¹⁰¹ e pode ser representada pelo ciclo de reações a seguir:



No passo inicial, a enzima férrica nativa é oxidada por peróxido de hidrogênio ou outro peróxido para formar um intermediário instável chamado Composto I (E_i), com a conseqüente redução do peróxido. Então, o Composto I oxida um substrato doador de elétron (AH₂) para formar o Composto II (E_{ii}), liberando um radical livre. Posteriormente, o Composto II é reduzido por um segundo substrato, regenerando Fe (III) e produzindo outro radical livre.

A reação enzimática geral apresenta-se a continuação:



As peroxidases são utilizadas para o tratamento de compostos aromáticos contaminantes em águas procedentes de diferentes fontes, mas principalmente, usa-se a peroxidase de *Horseradish* (HRP) para a remoção de contaminantes fenólicos, assim como também usados para remover anilinas aromáticas, hidroxiquinoleína e carcinogênicos como benzidinas e naftilaminas.⁹⁸ Porém, por ser uma enzima importada, seu custo é alto. A partir da década de 80 se propôs o uso de fungos da podridão branca como alternativa para realizar a descoloração de efluentes.⁷¹ Estes organismos possuem um sistema enzimático extracelular de caráter não específico, capaz de romper uma grande quantidade de enlaces e degradar diferentes compostos

orgânicos. Dentre as enzimas constituintes do complexo multi-enzimático destes fungos, encontram-se a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, que têm demonstrado serem eficientes no tratamento de efluentes industriais coloridos.⁷² Com a peroxidase do chayote, tem sido possível eliminar fenol e alguns dos seus derivados de águas artificialmente contaminadas a baixas concentrações.⁹⁷ Isto incentiva sua utilização na eliminação de compostos mais complexos, como os corantes de tecidos, que podem ser potencialmente perigosos devido seu alto grau de toxicidade quando são degradados no ambiente.

A capacidade de redução de peróxidos por substratos doadores de elétrons torna as peroxidases úteis em várias aplicações industriais e analíticas. A peroxidase de soja (SBP) é uma enzima substancialmente mais termoestável do que a peroxidase do rabanete⁴⁴ e vem se destacando desde a década de 90 em biociência, biocatálise, biorremediação e em diagnóstico clínico. Na área de biorremediação, embora a maioria dos trabalhos aponte ao uso da peroxidase do rabanete (HRP),^{22,52,54,73} ela é estudada para a detoxificação de águas contaminadas, principalmente por compostos fenólicos e clorados. Assim, atualmente, outras fontes de peroxidases como da soja (SBP) e do chuchu tem-se mostrado uma alternativa.^{237,38,97,101}

O chayote (*Sechium edule L.*) é uma espécie nativa da América Central, do sul do México e Guatemala, onde se encontra a maior diversidade genética, assim como também a presença de materiais em estado silvestre. Pode-se encontrar o chayote amplamente distribuído desde o nível do mar até mais de 2.000 m de altitude sobre o nível do mar e ele é reconhecido como de grande importância na alimentação das culturas pré-colombinas que habitaram o México e a Guatemala.⁵⁵

O Estado de São Paulo produz por ano 100.000 toneladas de chuchu (chayote), em 2.000 hectares de plantio, distribuído por 21 regiões agrícolas e 56 municípios. A

produção está bem concentrada nas regiões agrícolas de Bragança Paulista, São Paulo e Registro. Em cada uma destas regiões, os municípios que são grandes produtores: Amparo na Região Agrícola de Bragança-Paulista; Iguape em Registro; e São Paulo na Região Agrícola de São Paulo. Estes municípios juntos concentram 77% da produção paulista.⁶⁴

3.2. Contaminação por fenóis

Os fenóis são compostos orgânicos e a sua estrutura consiste de um anel aromático unido a um ou mais grupos hidroxila. Os fenóis simples são líquidos ou sólidos, de cheiros característicos, pouco hidrossolúveis e muito solúveis em solventes orgânicos.⁷⁷ O composto mais representativo deste grupo é o fenol (C_6H_6O).

O fenol forma-se naturalmente durante a decomposição de substâncias protéicas, mas a maior parte do fenol presente no meio ambiente é de origem antropogênica. Este composto químico de alta toxicidade é muito utilizado nas indústrias e as suas principais aplicações são:

- Fabricação de resinas fenólicas em indústria plástica.
- Fabricação de desinfetantes (derivados clorados do fenol).
- Fabricação de herbicidas, inseticidas e fungicidas (cresóis).
- Como constituinte de pinturas, tintas, germicidas e agentes de impregnação de madeiras (pentaclorofenol).
- Antioxidantes nas indústrias da borracha (metilfenóis).
- Reagente de sínteses orgânicas: ácido salicílico, fenolftaleína, ácido pícrico, benzeno, clorofenóis, ciclohexanol e diversas drogas farmacológicas.
- Na indústria têxtil, para os processos de: tintura, retirada da goma, impermeabilização de seda e impressão de tecidos.⁴

Estes compostos aromáticos, os fenóis e seus derivados, são a maior classe de poluentes encontrados em efluentes de indústrias químicas e alimentícias.⁵⁶

Alguns fenóis são carcinogênicos e podem ser acumulados na cadeia alimentar. Devido à toxicidade, os fenóis são regulados em muitos países e devem ser removidos dos efluentes antes do despejo no ambiente.³⁶ Na presença de H_2O_2 , o qual age como receptor de elétrons, peroxidases podem catalisar a polimerização oxidativa destes fenóis, anilinas e outros aromáticos em oligômeros insolúveis - **Figura 1**.¹⁹ Estes oligômeros insolúveis podem, então, ser removidos usando sedimentação simples ou sistemas de filtração.³⁹ Como foi citado, grande parte dos trabalhos de detoxificação de efluentes contaminados com fenóis, cresóis e fenóis clorados utiliza HRP. E, recentemente, peroxidases de outras fontes, como de soja e chayote (chuchu),^{14,38,37,97} têm sido sugeridos como alternativas à HRP.

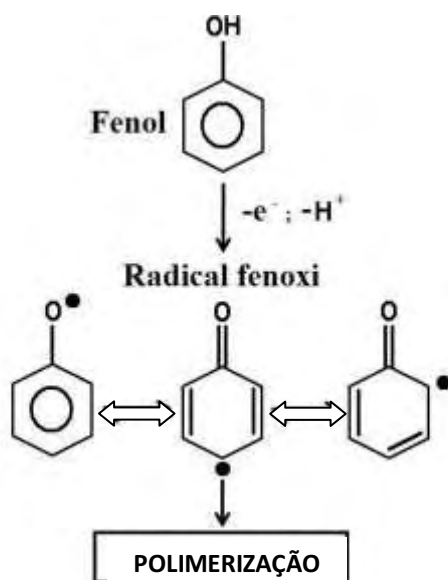


Figura 1. Diagrama do mecanismo de polimerização do fenol (Lapiente, 2000).

3.3. Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são definidas como “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida de espaço, com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente”. O termo enzima imobilizada foi adotado pela primeira vez na Conferência de Engenharia Enzimática, em Hennicker, New Hampshire, Estados Unidos, em 1971.

A imobilização de biocatalizadores tem atraído a atenção para sua utilização prática em bioprocessos. Em geral, biocatalisadores imobilizados são estáveis e de fácil manuseio quando comparados às suas formas livres. Uma das mais importantes características é que podem ser usados repetidamente nas hidrólises em “batch” ou nos sistemas com fluxo contínuo. Vários métodos de imobilização de biocatalizadores têm sido desenvolvidos e, atualmente, são utilizados extensivamente.²⁴ No entanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática, o procedimento de imobilização a ser utilizado deverá estar de acordo com a finalidade do produto e com as características próprias da enzima que será utilizada. A **Tabela 1** mostra algumas comparações entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos.

Tabela 1. Comparações entre as características das enzimas e dos catalisadores químicos.

Características	Enzimas	Catalisadores químicos
Especificidade ao substrato	Alta	Baixa
Natureza da estrutura	Complexa	Simple
Sensibilidade à temperatura	Alta	Baixa
Condições de reação	Suaves	Drástica (geralmente)
Custo de obtenção	Alto	Moderado
Consumo de energia	Baixo	Alto
Formação de subprodutos	Baixa	Alta

Separação catalisador/produto	Difícil e cara*	Simples
Atividade em temperatura ambiente	Alta	Baixa
Presença de cofatores	Sim	Não
Estabilidade	Baixa*	Alta
Energia de ativação	Baixa	Alta
Velocidade de reação	Alta	Baixa

*enzimas solúveis. Fonte: Zanin e Moraes (2004).

De acordo com Brena & Batista-Viera (2006), o histórico do desenvolvimento dos procedimentos de imobilização pode ser dividido em três fases:

1.- No início do século 19, no ano 1815, o uso empírico de imobilização de microorganismos para produção de ácido acético e tratamento de águas residuais;

2.- Nos anos 1960, a produção de *L*-aminoácidos e isomerização da glicose através de imobilização de uma enzima.

3.- Nos anos 1985-1995, a imobilização de múltiplas enzimas, incluindo cofatores regeneradores e imobilização de células para a produção de *L*-aminoácidos a partir de ceto-ácidos em reatores de membrana. Entretanto, ainda na década de 1970, a enzima penicilina-G-acilase passou a ser imobilizada e utilizada na produção de ácido amino-penicilínico (6-APA), que é precursor de penicilinas semi-sintéticas. Isso aconteceu na Inglaterra e, ao mesmo tempo, nos Estados Unidos. Iniciou-se a produção de xarope de alto teor de frutose a partir da isomerização de glicose com a enzima glicose isomerase imobilizada. Atualmente, estes processos estão plenamente ativos e comprovam a eficiência da utilização de enzimas imobilizadas.⁹³

A **Figura 2** mostra esquemas de procedimentos de imobilização que podem ocorrer através de métodos reversíveis e irreversíveis, como ligação covalente,

adsorção, deposição física para uso em meios orgânicos, aprisionamento em géis ou microcápsulas, membranas ou sistemas de fases orgânico/aquoso ou aquoso/aquoso.

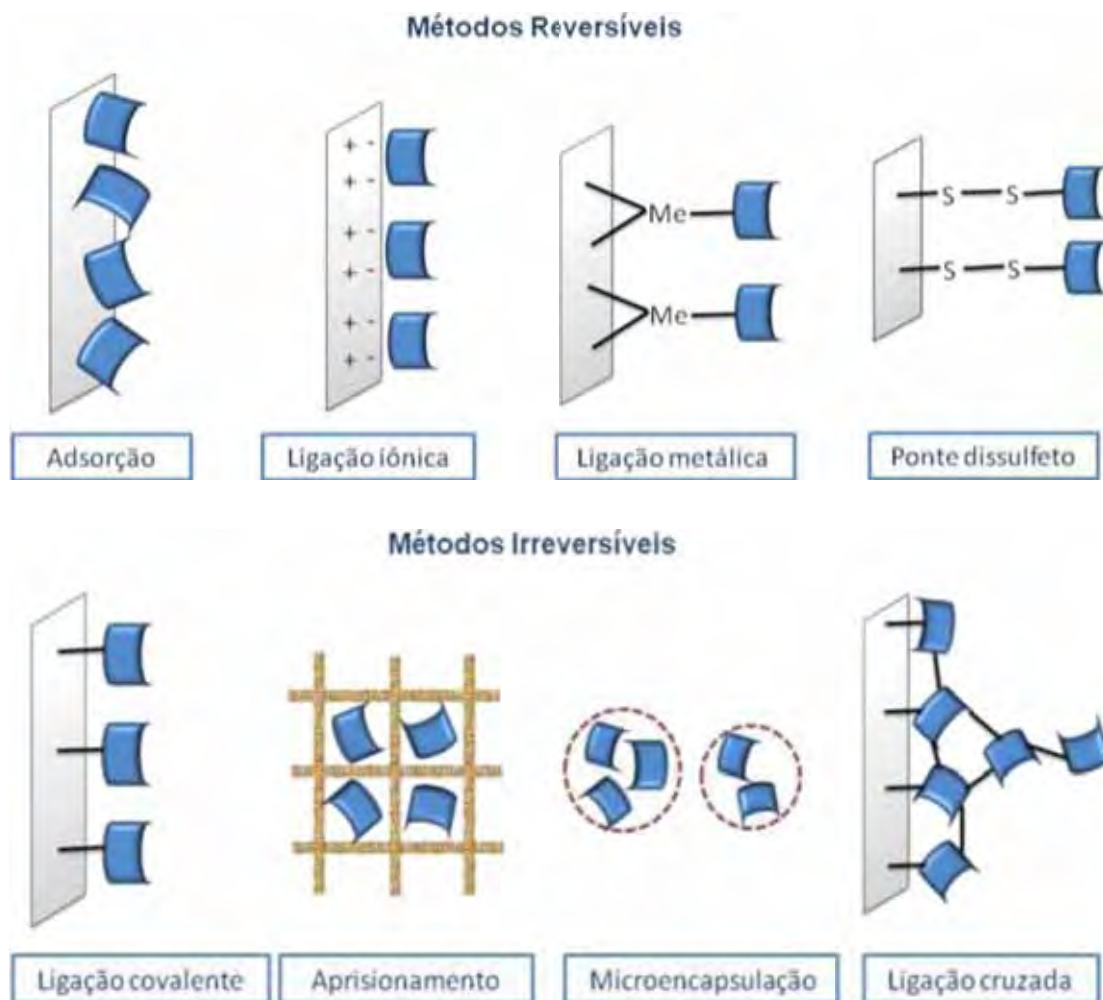


Figura 2. Representação dos tipos de imobilização de enzimas mais utilizados.

A utilização de enzimas imobilizadas em diferentes suportes está descrita na literatura e, geralmente, apresenta vantagens operacionais como: possibilidade de reutilização nas reações em batelada ou contínua; rápida interrupção da hidrólise; formação controlada; e fácil separação do produto - **Tabela 2.**^{3,27,31,47,49,60,61,88,96,97} No entanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática.

Tabela 2. Comparação entre os métodos de imobilização

Características	Ligações cruzadas	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Metálica	Ligação Covalente	Oclusão
Preparação	Intermediário	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força da ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediário
Atividade	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Recuperação do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara	Impossível
Custo	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário
Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediário	Intermediário	Alta	Baixa
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Proteção microbiana	Intermediário	Não	Não	Não	Não	Sim

Fonte: FUKUI, 1990; POWELL, 1996; BICKERSTAFF, 1997.

Técnicas de imobilização geralmente melhoram as propriedades das enzimas. Entre essas técnicas podemos citar a estabilização pela imobilização randômica, rigidificação da estrutura 3D, estabilização de enzimas multiméricas, modificações químicas das enzimas imobilizadas, geração de um microambiente hiper-hidrofílico, hiper-ativação (por exemplo, de lipases), modulação da enantiosseletividade (também no caso de lipases) e redução da inibição.³¹ Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da molécula da enzima imobilizada, como também induzir uma maior resistência a pequenas alterações conformacionais causadas por aquecimento, solventes orgânicos, agentes desnaturantes, entre outros.⁸⁷

Atualmente, alguns produtos são produzidos através de enzimas imobilizadas, como: ácido-6-aminopenicilínico, acrilamida, ácido S-2-cloropropiônico, diltiazem, ácido *L*-aspártico, esteróides, *L*-alanina, R-glicidil butirato, *L*-tert-leucina, D(-)

hidroxifenilglicina, *L*-carnitina, ácido *L*-hidroxinicotínico, aspartame, ácido *L*-málico, *L*-aminoácidos, ácido *L*-ascórbico, *R*-glicidol e frutose.⁶⁶ Entretanto, o maior desafio para a utilização de enzimas imobilizadas em escala industrial é justamente o “scale up”, porém o reator de hidrólise pode ser operado em “batch” com ou sem agitação, ou em modo contínuo em uma coluna.

Existem estratégias que permitem imobilizar proteínas multipontualmente por três vias diferentes de resíduos: amino-terminal, resíduos de lisina e grupos carboxílicos. Estes são os resíduos mais frequentemente encontrados sobre a superfície das proteínas⁸⁵ e a técnica de imobilização está entre as áreas de pesquisa mais relevantes na atualidade.

De maneira geral, não há um material de suporte ou método de imobilização ideal para fornecer um padrão de imobilização,⁹² o que determinará este suporte serão suas características e a forma de ligação entre a enzima e ele. De qualquer maneira, suas características físicas e químicas, solubilidade, resistência, segurança, custos de produção e rendimento da reação devem ser considerados.⁹ Assim, é possível encontrar na literatura os mais diferentes tipos de suporte para imobilizações enzimáticas, covalentemente ou reversíveis, e diferentes metodologias para a estabilização dos derivados.

A imobilização multipontual de uma enzima consiste na formação de várias ligações covalentes entre uma molécula de enzima e vários grupos ativos do suporte.¹⁰ A ligação da enzima ao suporte dá-se entre grupos amino da enzima e grupos aldeído alifáticos pequenos do suporte. A imobilização multipontual covalente da enzima pode melhorar fortemente a estabilidade, a atividade e a seletividade da enzima. Muitas enzimas industriais têm sido altamente estabilizadas por ligação covalente multipontual. Obviamente, a formação de ligações deste tipo, quando adicionadas intensamente em

diferentes regiões da superfície da enzima, pode promover diversos efeitos funcionais da enzima, como a inativação enzimática.²⁸

A agarose (Figuras 3 e 4) é um polissacarídeo natural extraído de algas vermelhas, e sua estrutura química permite que géis muito resistentes sejam formados. Estes géis têm uma estrutura macro-reticular com uma malha muito aberta, que pode ser modificada simplesmente variando-se a concentração de agarose. Esta estrutura é mantida por ligação de hidrogênio, mas a ausência de grupos iônicos faz com que seja neutra e inerte.⁶⁷

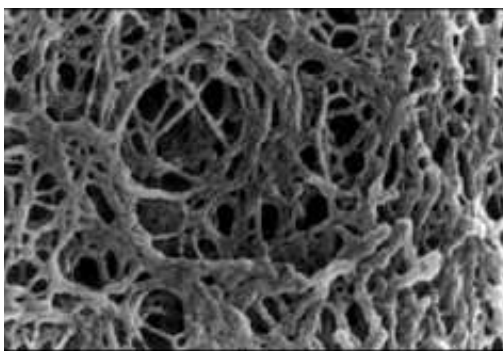


Figura 3 - Microscopia eletrônica de gel de agarose (Fonte: DNA Engineering/Agarose Gel Electrophoresis).¹⁷

A agarose também possui hidroxilas livres nas quais podem ser ligados “braços” químicos para a imobilização das enzimas, produzindo suportes glioxil-agarose, amino-agarose (ou monoaminoetil-*N*-aminoetil – MANAE) ou glutaraldeído-agarose. Estes estudos tiveram início com o pesquisador Dr. José Manuel Guisan, na Espanha em 1988. Essas transformações químicas não são possibilidades exclusivas da agarose, podem ser realizadas em outros tipos de suporte,³⁰ como na celulose vegetal do sabugo de milho e na celulose bacteriana.

Sobre os suportes agarose-glioxil, a imobilização ocorre através das regiões da superfície da enzima, que possui maior densidade de grupos amino primários, e não através do grupo amino mais reativo, como ocorre na maioria das outras técnicas de imobilização.⁵² Para que ocorra a imobilização, faz-se reagir os grupos amino primários da proteína com o suporte agarose previamente ativado, de modo que na superfície apresentem uma mono-capa de aldeídos ligeiramente afastados da parede do suporte e totalmente expostos ao meio reacional.²⁹ Em um primeiro passo, ocorre a formação de enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre os ϵ -NH₂ das lisinas e os grupos aldeídos do suporte. Os aminoácidos lisinas são normalmente abundantes na superfície protéica, quando estão expostos ao meio e, quando estão desprotonados, são muito reativos como nucleófilos. Para que ocorra esta reação, torna-se necessário trabalhar com pH próximo ou superior ao pKa dos grupos ϵ -NH₃⁺ (pH 10.05).

Esta primeira interação entre a enzima e o suporte ocorre pelo menos através de dois pontos e a enzima deve se auto-orientar rumo ao suporte para sua região mais rica em grupos amino reativos.⁵² Isto leva a formação de uma união fraca e reversível. Em um seguinte passo, reduzem-se as bases de Schiff a enlaces amino secundários com boroidreto de sódio. Esta redução permite, além de estabilizar o enlace enzima-suporte, converter todos os grupos aldeído remanescentes em grupos hidroxilas, dando lugar a uma matriz inerte e hidrofílica.³ Segundo Guisan, quando não se faz o bloqueio dos grupos reativos remanescentes, poderá ocorrer um número de reações indesejadas ou não controladas, de tal forma que desestabiliza a proteína, o que leva à inativação da enzima.⁴⁸

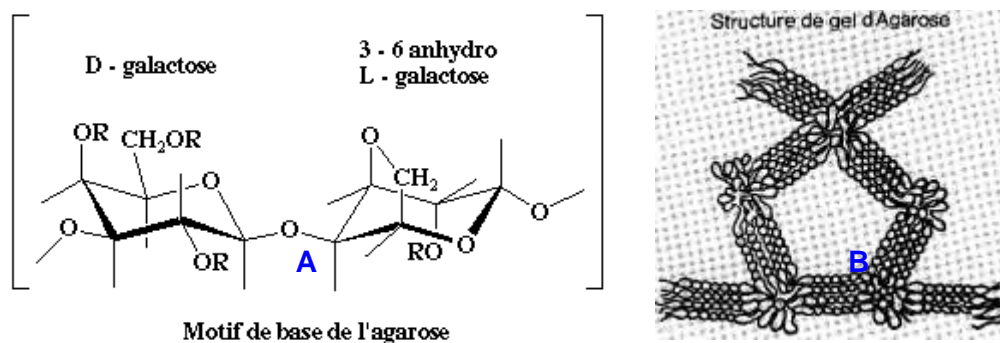


Figura 4. Estrutura química da agarose. A) Monômero de agarose; B) Representação do poro da agarose (Fontes: <http://ead.univ-angers.fr>).

Existem estratégias que permitem a estabilização de enzimas multiméricas, como a que ocorre com a adição de glutaraldeído às enzimas previamente imobilizadas. Neste procedimento, a molécula de glutaraldeído liga-se ao grupo amino das lisinas e esta molécula ligada ao grupo amino primário do suporte, estabelece uma ligação covalente multipontual. Seu uso também é possível em suportes epóxi-acrílicos, como o Sepabeads, antes ou após a adsorção das enzimas.^{43,44,90} Pessela et al. (2005) relataram que suportes recobertos com polietilenoimina (PEI) permitem uma significativa estabilização de enzimas multiméricas.

Outra técnica que pode ser utilizada para a estabilização de enzimas multiméricas é o uso de macromoléculas polifuncionais que mantêm a integridade das subunidades da enzima (**Figura 5**). Dextranas comerciais atuam bem nesta técnica de pós-imobilização. As dextranas oxidadas por periodato produzem uma estrutura poli-aldeídica adequada para reagir com os grupos amino das proteínas. A reação entre os poli-aldeídos e a proteína ocorre através da formação de bases de Schiff, e então a reação é finalizada com a redução por boroidreto, no qual as bases de Schiff são

reduzidas a grupos amino secundários e os poli-aldeídos são convertidos em poli-alcoóis.^{20,34}

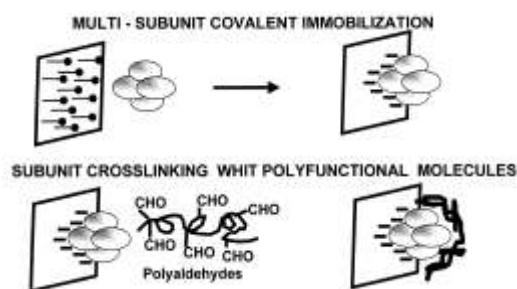


Figura 5. Esquema da estabilização de enzimas multiméricas com utilização de macromoléculas polifuncionais (Fonte: FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al. 1999).

A modificação química dos grupos carboxílicos de superfície (carboxil terminal, ácido aspártico e ácido glutâmico) com 1-etil-3-(dimetilamino-propil) carbodiimida (EDAC), na presença de etilenodiamina (EDA), também é utilizada na estabilização de enzimas. Nesta reação ocorre a formação de uma amida entre o grupo carboxílico ativado da proteína e o grupo amino do EDA, o que forma um grupo amino primário livre. Este novo grupo amino apresenta um valor de pK ao redor de 9,2, sendo mais reativo que os grupos amino dos resíduos de lisina da superfície da proteína. Além disso, o grau de modificação pode ser controlado pela concentração de EDAC usado durante a reação.^{45,59}

Betancor et al. (2005) descreveram um procedimento de cobertura da enzima imobilizada com aldeído dextrana para prevenir a inativação das enzimas em sistemas que necessitam de agitação forte e bolhas de gás, embora admitam que possam ocorrer problemas estéricos.

Outra metodologia para aperfeiçoar a estabilidade conformacional de uma enzima é sua imobilização em suportes ativadas com grupos epóxidos.^{50,51,62} Este suporte apresenta as seguintes vantagens:

Permite que “braços” espaçadores curtos sejam ligados;

- Uma camada simples e muito densa de grupos epóxidos estáveis e reativos pode ser facilmente preparada;
- Os grupos epóxidos permitem a imobilização por diferentes grupos da superfície da enzima (amino, tiol, fenol, imidazol, hidroxila);
- A reação enzima-suporte pode ser facilmente interrompida através do bloqueio dos grupos epóxi com diferentes reagentes.

3.4. Suportes alternativos para imobilização

O sabugo de milho é a parte central da espiga na qual os grãos estão presos, que é o resíduo gerado após o milho ser debulhado. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg (70% base úmida) são formados pelo sabugo.⁹¹ Estruturalmente, o sabugo é formado por quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina constitui, aproximadamente, 4,1% do sabugo de milho em peso; a palha grossa, 33,7%; o anel lenhoso, 60,3%; e a medula, 1,9%. Todo esse material, depois de moído, transforma-se no pó de sabugo de milho -

Figura 6.



Figura 6. Pó de sabugo de milho utilizado como suporte para imobilização de enzimas.

Devido às características de dureza e resistência à abrasão, os componentes do sabugo serviram de base ao início de suas aplicações nas indústrias.¹⁰⁴

As **Figuras 7 e 8** apresentam a estrutura fibrosa do sabugo de milho, analisadas por microscopia eletrônica.

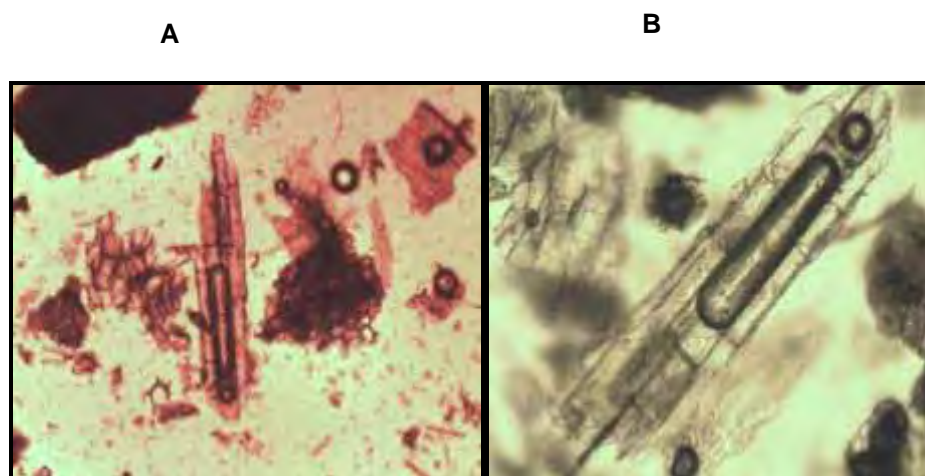


Figura 7. Imagens de microscopia óptica do sabugo de milho. (A): Panorâmica; (B) Objetiva (aumento 10x) (Fonte: BENEDETTI, 2009).

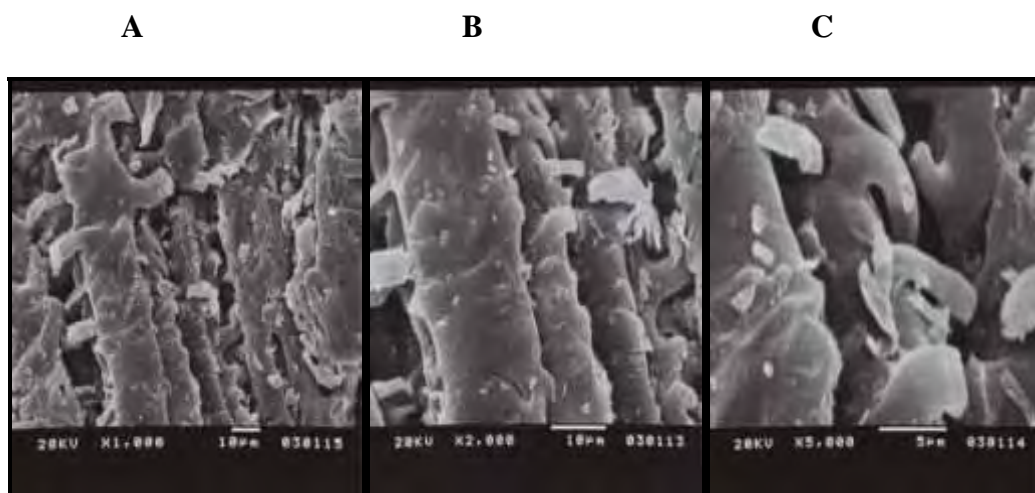


Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do sabugo de milho – (A)1.000 X, (B) 2.000 X, (C) 5.000 X (Fonte: BENEDETTI, 2009).

As fibras lignocelulósicas apresentam hidroxilas reativas acessíveis, podendo reagir com outros grupos funcionais polares, como, por exemplo, os presentes nas resinas fenólicas.⁸⁹

A celulose é um biopolímero linear de unidades β - (1,4)-D glucopiranososa (**Figura 9**) e é um componente estrutural da parede celular das plantas em forma de microfibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e de 100 a 40.000 nm de comprimento e que forma uma rede com outros carboidratos.¹⁶

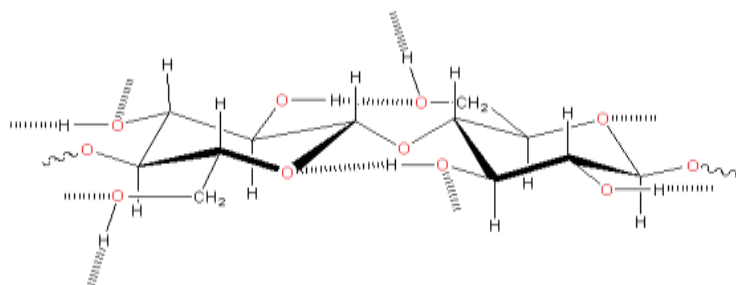


Figura 9. Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis (DONINI, et al,2010).¹⁸

Algumas bactérias como a *Gluconacetobacter. xylinus*.¹⁸ e *Acetobacter xylinum* produzem celulose.^{12,42,74} A celulose de plantas e a celulose bacteriana têm a mesma estrutura química, porém, diferentes propriedades físico-químicas e de tamanho como mostrado na **Figura 10**.^{18,76} As bactérias geralmente produzem celulose como um componente extracelular para proteção de agentes mecânicos e químicos, assim como para facilitar a adesão de células e tecidos hóspedes.^{75,84}

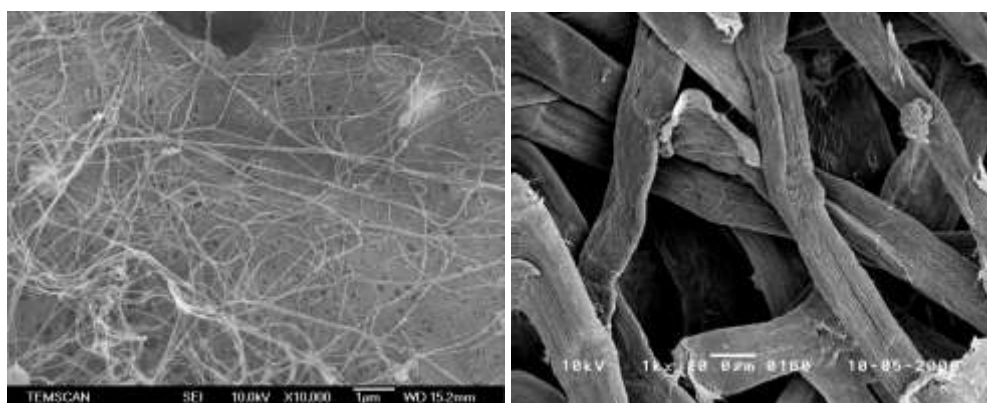


Figura 10. Diferenças entre as fibras de celulose bacteriana (a) e vegetal (b).¹⁸

Pelo fato da celulose vegetal do sabugo de milho e da celulose bacteriana apresentarem hidroxilas livres reativas, estão sendo muito usadas em vários processos biotecnológicos.^{5,6,46,78} A estas hidroxilas podem-se ligar braços químicos para a imobilização de enzimas, produzindo diferentes suportes como o SM-glioxil e CB-glioxil.^{30,102}

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLERCREUTZ, P. Immobilized enzymes. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. (Ed.). **Enzymes in food processing**. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 5, p. 103-119.
2. ALONSO-CALDERÓN, A. I. A. J. et al. Eliminación de fenol, 2-clorofenol y colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando a la peroxidasa de chayote. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, v. 4, n.2, p.278 -284, 2008.
3. ARSLAN, F.; TÜMTÜRK, H.; ÇAYKARA, T.; SEN, M.; GÜVEN, O. The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. **Food Chem.**, v. 70, p. 33-38, 2000.
4. ATANOR. Fenoles y sus aplicaciones, Buenos Aires, 2010. Extraído el 15 de Noviembre 2011, de

http://www.atanor.com.ar/esp/negocios_domesticos/quimicos/productos/fenol.php
5. BARUD, H.S.; RIBEIRO, C.A.; CRESPI, M.S.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F.C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Thermal characterization of bacterial. Cellulose–phosphate composite membranes. **J. of Thermal Analy and Calorime.**, v. 87, n. 3, p. 815–818, 2007.
6. BARUD, H. S. R.; ASSUNÇÃO, M. N.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose–silica organic–inorganic hybrids. **J Sol-Gel Sci Technol.**, v 46, n.3, p. 363–367, 2008.
7. BENEDETTI, A.C.E.P. Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase. 2009. 109f. Tese doutorado (Doutorado em Ciências dos Alimentos)- Faculdade de ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.
8. BETANCOR, L.; FUENTES, M.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 32, p. 97-101, 2005.
9. BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of enzymes and cells. In: BICKERSTAFF, G. F. (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 1997. p. 1-11.
10. BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6. p.124 - 147.

11. BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: GUISÁN, J. M. (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006. cap. 2, p. 15-30.
12. BROWN, Jr.V; WILLISON, J. H. M. e RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, 1976.
13. BRUNETTI, I. L., FARIA-OLIVEIRA, O.M.N. Sistemas quimioluminescentes com peroxidases (EC.1.11.1.7) e suas aplicações. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.
14. CAZA, N.; BEWTRA, J.K.; BISWAS, N.; TAYLOR, K.E. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. **Water Research**, v. 33, p. 3012-3018, 1999.
15. CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998
16. DELMER, D. P. & AMOR, Y. Cellulose Biosynthesis, **The Plant Cell**, v. 7, p. 987-1000, 1995.
17. DNA ENGINEERING/AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS. Disponível em: <http://openwetware.org/wiki/BE.109:DNA_engineering/Agarose_gel_electrophoresis>. Acesso em: 16 nov. 2010.
18. DONINI, ÍA. N.; DE SALVI, D.T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecl. Quím.**, v. 35 – n.4, p. 165 - 178, 2010.
19. DUNFORD, H.B.; STILLMAN, J.S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, p. 187-251, 1976.
20. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 7, p. 181-189, 1999.
21. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of Zucchini (*Cucúrbita pepo*). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 412-418, 2000.

22. FERRER, I.; DEZOTTI, M.; DURÁN, N. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.577. 1991.
23. FUCHS, J.; HUFLEJT, M.; ROTHFUSS, L.; WILSON, D.; CARCAMO, G.; PACKER, L. Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *Journal Investigative Dermatology*, v. 93, n. 6, p. 769-773, 1989.
24. FUKUI, S.; TANAKA, A. Immobilization. In: GERHARTZ, W. (Ed.). **Enzymes in industry: production and applications**. New York: VCH, 1990. p. 63-76.
25. GILLIKIN, J.W.; GRAHAM, J.S. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidases from the seed coat of Glycine max. **Plant Physiol**, v. 96, p. 214-220, 1991.
26. GLAZE, W. H. Reaction products of ozone: a review. *Environmental Science and Technology*, v. 21, n. 3, p. 224-227, 1987.
27. GOULART, A.J.; BENEDETTI, A.C.; TÁVANO, O.L.; MARQUES, D.P.; CONTIERO, J.; CARMONA, E.C. e MONTI, R. Multipoint Immobilization of invertase on Agarose: Stability and Kinetic Properties. *Current Trends in Biotechnol. and Pharma*, v.2, n.3, p 462- 470, 2008.
28. GRAZÚ, V.; GALLEGRO, F.L.; MONTES, T.; ABIAN, O., GONZÁLEZ, R.; HERMOSO, J.A., GARCIA, J.L., MATEO, C.; GUISÁN, J.M. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. **Journal Process Biochemistry**, v. 45, p.390-398, 2010.
29. GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375- 382. 1988.
30. GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. **Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose – Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment**. In: *Immobilization of enzymes and cells*. BICKERSTAFF, G. F. Totowa: Humana Press, v.31, p.277-287, 1997.
31. GUISÁN, J. M.. **Immobilization of enzymes as the XXI century begins: An already solved problem or still an exciting challenge**. In: *Immobilization of enzymes and cells*. appud GUISÁN, J. M.. Totowa: Humana Press, 2006. v.1, p.1-13.
32. HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 57(suppl.), n. 5, p. 715S-725S, 1993.
33. HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

34. HIDALGO, A.; BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEG0, F.; MORENO, R.; BERENQUER, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M. Design of an immobilized preparation of catalase from *Thermus thermophilus* to be used in a wide range of conditions. Structural stabilization of a multimeric enzyme. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, p. 278-285, 2003.
35. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides, IARC, Lyon, France 36, 1985.
36. KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.
37. KENNEDY, K.; ALEMANY, K.; WARITH, M. Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol. **Water Research**, v. 28, p. 149-158, 2002.
38. KINSLEY, C.; NICELL, J.A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 139-146, 2000.
39. KLIBANOV, A.M.; TU, T.M.; SCOTT, K.P. Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal conversion waste waters. **Science**, v. 221, p. 259- 261, 1983.
40. KOKÇAM, I.; NAZIROGLU, M. Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. *Clinica Chimica Acta*, v. 289, n. 1-2, p. 23-31, 1999.
41. LAPUENTE, R. Tesis: **Estudio voltamétrico y espectroscópico de los polímeros creados por oxidación electroquímica de fenol sobre electrodos metálicos**. Universidad de Alicante. Tese de Doutorado do Departamento de Física Química. Facultad de Ciencias. España. 2000.
42. LEGGE, R. L. Microbial cellulose as a speciality chemical. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 2, p. 303-319, 1990.
43. LÓPEZ-GALLEG0, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **J. Biotechnol.**, v. 119, p. 70-75, 2005.
44. LÓPEZ-GALLEG0, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Preparation of a robust biocatalyst of D-amino acid oxidase on sephabeads supports using the glutaraldehyde crosslinking method. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, n. 7, p. 750-756, 2005.
45. LÓPEZ-GALLEG0, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved

stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, p. 1-10, 2005.

46. MARINS, J. A.; SOARES, B. G.; DAHMOUCHE, K.; RIBEIRO, S.J. L.; BARUD, H.; BONEMER, D. Structure and properties of conducting bacterial cellulose-polyaniline nanocomposites. **Cellulose**, v.18, n.5, p. 1-10, 20011.

47. MARQUES, D. P.; PESSELA, B. C.; BETANCOR, L.; MONTI. R.; CARRASCOSA A.V.; ROCHA. J.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LORENTE. G. Hydrolysis of protein by immobilized and stabilized trypsin. **Biotechnol. Prog** v.27, n.3, p.677-683, 2011.

48. MATEO, C.; ABIÁN, O., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PEDROCHE, J., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., Y GUISÁN, J. M. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnol Prog**, v. 18, p. 629-634, 2002.

49. MATEO, C.; MONTI, R.; PESSELA, B.C.C.; FUENTES, M.; TORRES, R.; GUISÁN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition of promoted by glucose: Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnol. Prog**. v.20, p.1259-1262, 2004.

50. MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl-agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 274-280, 2005.

51. MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, p. 456-462, 2005.

52. MATHEUS, P.R.; ABAD, J.M.; NAVARRO, P.; BELANDRIA, O.M.;HERNÁNDEZ, N.; FERNÁNDEZ, V.M. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). **Avances en Química**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009.

53. McELDOON, J. P.; DORDICK, J. S. Unusual Thermal Stability of Soybean Peroxidase. **Biotechnol. Prog**. v. 12, n. 4, p. 555–558, 1996.

54. NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. **Water Research.**, v. 26, n. 1, p. 49-54, 1992.
55. NEWSTROM, L.E. Evidence for the Origin of Chayote, *Sechium edule* (Cucurbitaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 410-428, 1991.
56. NICELL, J.A.; BEWTRA, J.K.; BISWAR, N.; TAYLOR, E. Reactor development for peroxidases catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, v. 27, p. 1629-1639, 1993.
57. O'BRIEN, P. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.
58. ODEBODE, A. C.; OSO, B. A. Enzyme activities during post-harvest storage of kolanut (*Cola nitida*. Schoot and Endlicher). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v. 210, n. 5, p. 555-556, 1995.
59. Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization: recent experimental progress. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, p. 137-149, 2003.
60. PAULA, F.C.; CAZETTA, M.L.; MONTI, R. e CONTIERO, J. Screening of supports for *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* inulinase immobilization. **Current Trends in Biotechnol and Pharma**, v.1, n.1, p. 34-40, 2007.
61. PAULA, F.C.; CAZETTA, M.L.; MONTI, R. e CONTIERO, J. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* . **Food Chemistry**. v.111, p. 691-695, 2008.
62. PESSELA, B. C. C. ; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUIÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition. Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, n. 2-3, p. 199-205, 2003.
63. PESSELA, B. C. C.; BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; TORRES, R.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M.; MATEO, C. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, p. 295-299, 2005.
64. PBMH & PIF - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS. Normas de Classificação de Chuchu. São Paulo: CEAGESP, 2006. (Documentos, 30).

65. PODGORNIK, H.; GRGIC, I.; PERDIH, A. Decolorization rate of dyes using lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**, v. 38, n. 6, p. 1353-1359, 1999.
66. POWELL, L. W. Immobilized enzymes. In: GODFREY, T.; WEST, S. (Ed.). **Industrial enzymology**. New York: Macmillan Press, 1996. cap. 2.14, p. 265-272.
67. PRODUCTOS: AGAROSA .Disponível em:
<http://www.hispanagar.net/esp/agarose.htm>. Acesso em: 16 nove. 2010.
68. REGALADO, C.; GARCÍA, B.; DUARTE, M. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**. v.3, n. 1, p. 243-256, 2004.
69. REED, G. Peroxidase. In: **Enzyme s in food processing**. Academic Press, New York, 1975, p. 243 – 7.
70. REN, D.; PENNER, N. A.; SLENTZ, B. E.; MIRZAEI, H.; REGNIER, F. Evaluating Immobilized Metal Affinity Chromatography for the Selection of Histidine-Containing Peptides in Comparative Proteomics. **Journal of Proteome Research.**, v. 2, n. 3, p. 321-329, 2003.
71. RODRÍGUEZ, E., PICKARD, M., VAZQUEZ-DUHALT, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38, 27-31.
72. RODRÍGUEZ, F. M., BERMÚDEZ, R. e MORRIS, H. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp*. *Rev. Iberoam. Micol.* 20, 164-168.
73. ROJAS, M. F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-RUIZ, P.A. Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. **Proc. Bioche.**, v. 39, p. 1455–1464, 2004.
74. RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 205-212, 2002.
75. RÖMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSCHÄPE, H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 4, p. 273-285, 2003.
76. ROSS, P.; MAYER, R. & BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 55, n.1, p. 35-58, 1991.
77. SÁNCHEZ, M.; LÓPEZ, P. (2008). Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos. pp. 5. Extraído el 27 de Noviembre, 2010, de <http://eprints.ucm.es/8131/1/T30542.pdf>.

78. SANTA MARIA, L.C.; SANTOS, A.L.C.; OLIVEIRA, P.C.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose. **Materials Letters**, v. 63, n. 9-10, p. 797-799, 2009.
79. SCHALLREUTER, K.; WOOD, J. Free radical reduction in the human epidermis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 5, p. 519-532, 1989.
80. SEKINE, Y.; HALL, E.A. A lactulose sensor based on coupled enzyme reactions with a ring electrode fabricated from tetrathiafulvalen-tetracyanoquinodimethane. **Biosens. Bioelectron.**, v. 13, n. 9, p.995-1005, 1998.
81. SERGEYEVA, T. A.; LAVRIK, N. V.; RACHKOV, A. E.; KAZANTSEVA, Z. I.; PILETSKY, S. A.; EL'SKAYA, A. V. Hydrogen peroxide-sensitive enzyme sensor based on pthalocyanine thin film. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 3, p.289-297, 1999.
82. SEPABEADS EC. Disponível em:
<http://www.resindion.com/sepabeadsec/sepabeadsec.html> Acesso em: 16 nov. 2010.
83. SIMIC, M. G.; KAREL, M. (Eds). Autoxidation in Foods and Biological systems. New York: Plenum Press, 1979.
84. SPIERS, A.J.; BOHANNON, J.; GEHRIG, S.M.; RAINEY, P. B. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 15-27, 2003.
85. SRERE, P. A.; UYEDA, K. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. **Method. Enzymol.**, v. 44, p. 11-19, 1976.
86. STRUCTURE DU GEL D'AGAROSE. Disponível em:
<<http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE/2FIGURES/3AFFINITE/2Sephareose/11Sephareose.htm>>. Acesso em: 16 nov. 2010.
87. TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNANDEZ LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 352-360, 2003.
88. TAVANO, O.L.; PESSELA, B.C.C.; GOULART, A.J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J.M. e MONTI, R. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnol.**, v. 22, p. 262-275, 2008.
89. TITA, S.P.S.; PAIVA, J.M.F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas

com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia**, v. 12, n 4, p. 228-239, 2002.

90. TORRES, R.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; PALOMO, J. M.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. A novel heterofunctional epoxy-amino Sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: immobilization-stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 1056-1060, 2003.

91. TSAI, W.T.; CHANG, C.Y.; WANG, S.Y.; CHANG, C.F.; CHIEN, S.F.; SUN, H.F. Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresouce Technology**, v. 78, p. 203-208, 2000.

92. TÜMTÜRK, H.; ARSLAN, F.; DISLI, A.; TUFAN, Y. Immobilization of invertase attached to a granular dimmer acid-co-alkyl polyamine. **Food Chem.**, v. 69, p. 5-9, 2000.

93. UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley, 1998. 454 p.

94. VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 15, n. 1, p. 49-127, 1981.

95. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O; ANGNES, L. Zucchini crude extract-palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Analytica Chimica Acta**, v. 398, n. 2-3, p. 145-151, 1999.

96. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, F. O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v. 52, n. 4, p. 681-689, 2000.

97. VILLEGAS-ROSAS, M.L.O.; GEISLER, G.; HANDAL-SILVA, A.; GONZÁLEZ-VERGARA, E. Inmovilización de una peroxidasa de chayote [*sechium edule* (jacq.) sw] y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 19, n. 2, p. 73-81, 2003.

98. WAGNER, M. & NICELL, J. A. 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research*, 36,4041-4052

99. WHITAKER, J. R. "Principles of Enzymology for the Food Sciences" 2a Ed. Marcel Dekker. New York. Cap. 26. pp.565-577, **1994**.

100. WOND, D.W.S. **Food enzyme: structure and mechanism**. New York: Chapman and Hall 1995, p. 327-332.

101. WRIGHT, H.; NICELL, A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 69-79, 1999.
102. WU, S. C.& LIA, Y.K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **J. of Mole Cataly B: Enzyma**, v. 54, p 103–108, 2008.
103. ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 4, p. 35-85.
104. ZIGLIO, B.R.; BEZERRA, J.R.M.V.; BRANCO, I.G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaborações de pães com sabugo de milho. **Rev. Ciên Exat e Natu**, v. 9, p. 117-128, 2007.

Capítulo II

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL E ESTABILIZAÇÃO DAS
PEROXIDASES AMINADAS DA CASCA DA SOJA E DO CHUCHU EM
CELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE ALTERNATIVO

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL E ESTABILIZAÇÃO DAS PEROXIDASES AMINADAS DA CASCA DA SOJA E DO CHUCHU EM CELULOSE BACTERIANA COMO SUPORTE ALTERNATIVO

VINUEZA, J.C. (PG)⁽¹⁾; BARUD, H.S. ⁽²⁾; MONTI, R. (PQ)⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

⁽²⁾Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara – Instituto de Química

1. RESUMO

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são hemoproteínas que catalisam processos redox. Durante a oxidação são gerados radicais livres, que formam produtos poliaromáticos insolúveis em água, o que facilita sua remoção do meio aquoso. Os objetivos deste trabalho foi extrair as peroxidases da casca de soja e do chuchu, realizar aminação na superfície da estrutura terciária das enzimas, imobilizar estas enzimas no suporte de celulose bacteriana altamente ativado e utilizar os derivados obtidos para descoloração do azul de bromofenol. A quantidade de proteínas no extrato foi determinada por Bradford com valores médios de 0,235 mg mL⁻¹ para soja e 0,290 mg mL⁻¹ para o chuchu. A atividade específica de peroxidase foi determinada com ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfônico) 1 mM em presença de H₂O₂ 100 mM em $\lambda = 430\text{nm}$, obtendo-se os valores médios de 86,06 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e 9,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectivamente, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0. As aminações das peroxidases solúveis foram feitas em tampão etilenodiamina pH 4,75 e carbodiimida, 10 e 50 mM, a funcionalização da celulose bacteriana e imobilização covalente multipontual foi semelhante à descrita para agarose (Guisan).¹⁹ As peroxidases aminadas 10 e 50 mM foram imobilizadas covalentemente no suporte ativado CB-glioxil, com atividade recuperada de 82% para o derivado CB-Gli-S-NH₂ 50 mM e 92% para o derivado CB-Gli-Ch-NH₂ 50 mM. Para a descoloração do azul de bromofenol, utilizou-se os derivados estabilizados em presença de H₂O₂ em $\lambda = 590\text{nm}$. Utilizando-se os derivados obtidos na descoloração do azul de bromofenol 0,01mM, obteve-se em 60 min, 100% de descoloração com os quatro derivados das peroxidases aminadas, foram reutilizados por cinco ciclos mantendo-se em média 40% a propriedade catalítica. Isto sugere que estes derivados são uma alternativa de baixo custo, não só para o tratamento de águas residuais como também com potenciais usos em outros processos industriais.

Palavras-chave: Peroxidases, imobilização, celulose bacteriana, fenóis em águas residuais.

2. ABSTRACT

Peroxidases (EC 1.11.1.7) are haemoproteins that catalyze redox processes, generating free radicals during the oxidation and polyaromatic products insoluble in water, facilitating its removal from the aqueous medium. The objective of this research was to extract the peroxidases of soybean hulls and chayote, insert amine groups in the amino acids of the tertiary structure surface of enzymes, immobilize these enzymes in bacterial cellulose support highly activated and use the derivatives obtained for discoloration of bromophenol blue. The amount of protein in the extract was determined by Bradford method's, with average values of 0.235 mg mL^{-1} for soybeans and 0.290 mg mL^{-1} for the chayote; specific activity of peroxidases was determined with ABTS (2,2'-bis-Azin (3-ethyl-6-sulfonic benzotiazoline) 1 mM in the presence of $100 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ at $\lambda=430\text{nm}$, yielding average values of $86.06 \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ and $9.04 \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively, in sodium acetate buffer 100 mM , $\text{pH } 4.0$. Amination of soluble peroxidases were realized in ethylenediamine buffer $\text{pH } 4.75$ and carbodiimide 10 and 50 mM . Functionalization of bacterial cellulose and multipoint covalent immobilization was similar to that described to agarose (Guisan, 1988). Aminated peroxidases 10 and 50 mM were covalently immobilized on the support CB-glyoxyl, with recovered activity of 82% to the derivative CB-Gly-S-NH₂ 50 mM and 92% for the derivative CB-Gly-Ch-NH₂ 50 mM . To achieve the bromophenol blue discoloration it was used derivatives stabilized in the presence of H_2O_2 at $\lambda=590\text{nm}$. It was obtained total discoloration of bromophenol blue 0.01 mM in 60 min , using the four amino derivatives of peroxidases. The derivatives were reused for five cycles maintaining an average of 40% of catalytic properties, suggesting that these products are a low cost alternative, not only for wastewater treatment as well as for other industrial processes.

Keywords: Peroxidases, enzyme immobilization, bacterial cellulose, phenols in wastewater.

3. INTRODUÇÃO

As peroxidases, classificadas como EC 1.11.1.7, são encontradas tanto em animais como em vegetais.^{9,13,48} Para as plantas, estas enzimas desempenham função de defesa contra patogênicos e estresse mecânico, biossíntese e degradação de lignina, remoção de peróxido de hidrogênio e oxidação de xenobióticos tóxicos.⁴¹ As peroxidases vegetais, como a peroxidase do rabanete (HRP), possuem aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 44 kDa , sendo que o grupamento heme está ligado não covalentemente na estrutura protéica. Entretanto, as peroxidases

de mamíferos são maiores (576-783 resíduos de aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente a estrutura protéica.⁴¹ A atividade de peroxidase presente nos tegumentos das sementes de soja, a qual possui massa molecular de 37 kDa¹⁷, varia entre os cultivares de soja e serve como técnica alternativa ou complementar na identificação de diferentes variedades. A capacidade de redução de peróxidos por substratos doadores de elétrons torna as peroxidases úteis em várias aplicações industriais e analíticas.^{14,49} A peroxidase de soja (SBP) é uma enzima substancialmente mais termoestável do que a peroxidase de rabanete³⁶ e vem se destacando desde a década de 90 em biociência, biocatálise, biorremediação e em diagnóstico clínico. Na área de biorremediação, sabe-se que a maioria dos trabalhos aponta o uso da peroxidase do rabanete (HRP)^{16,35,38,50} para a detoxificação de águas contaminadas por compostos fenólicos e clorados. Mas, atualmente, outras fontes de peroxidases como da soja e do chuchu tem-se mostrado como uma alternativa.^{2,23,24,60,61}

O chayote (*Sechium edule L.*) é uma espécie nativa da América Central, especificamente do sul do México e Guatemala, países nos quais se encontra a maior diversidade genética e a presença de materiais em estado silvestre. Pode se encontrar amplamente distribuído em uma variedade ampla de altitude, desde o nível do mar até mais de 2.000 m sobre o nível do mar. Também é reconhecido que o fruto foi importante na alimentação das culturas pré-colombinas que habitaram México e Guatemala.³⁹

O Estado de São Paulo produz por ano 100.000 toneladas de chuchu (chayote), em 2.000 hectares de plantio, distribuído por 21 regiões agrícolas e 56 municípios. A produção está bem concentrada nas regiões agrícolas de Bragança Paulista, São Paulo e Registro. Em cada uma dessas regiões, os municípios que são os grandes produtores

são: Amparo na Região Agrícola de Bragança-Paulista, Iguape em Registro e São Paulo na Região Agrícola de São Paulo, que juntos concentram 77% da produção paulista.⁴⁶

A atividade industrial desenvolvida pelo homem faz com que grandes quantidades de compostos tóxicos sejam eliminadas afetando à flora e fauna das regiões envolvidas. Os compostos aromáticos, tais como o fenol e seus derivados, são a maior classe de agentes contaminantes em águas residuais de várias indústrias químicas e de alimentos.^{13,25,27,38,40} Um dos métodos para sua remoção inclui a polimerização usando enzimas redox, na presença de H_2O_2 , que age como receptor de elétrons. As peroxidases podem catalisar a polimerização oxidativa destes fenóis, anilinas e outros aromáticos, em oligômeros insolúveis,¹⁴ que por sua vez podem ser removidos usando simples sedimentação ou sistemas de filtração - **Figura 1.**²⁵

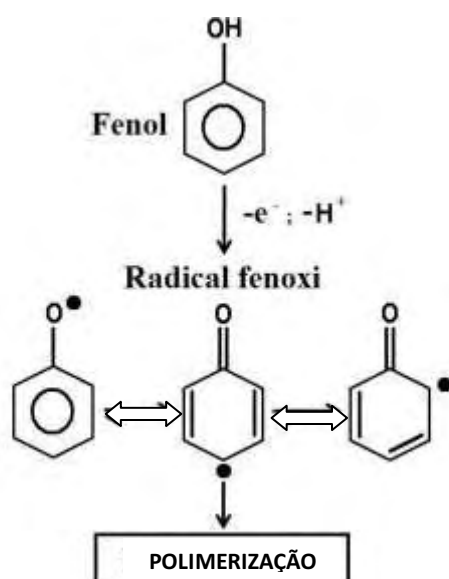


Figura 1. Diagrama do mecanismo de polimerização do fenol (Lapiente, 2000).

A utilização de enzimas imobilizadas em diferentes suportes está descrita na literatura e, geralmente, apresenta vantagens operacionais como: possibilidade de reutilização nas reações em batelada ou contínua; rápida interrupção da hidrólise; formação controlada; e fácil separação do produto.^{3,18,21,31,33,44,45,58,59,60} No entanto, não

existe um método ideal de imobilização enzimática. Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da molécula da enzima imobilizada, e ainda induzir a uma maior resistência às pequenas alterações conformacionais causadas por temperaturas elevadas, por solventes orgânicos, por agentes desnaturantes, entre outros.⁵⁷ Existem estratégias que permitem imobilizar proteínas multipontualmente por três vias diferentes de resíduos: amino-terminal, resíduos de lisina e grupos carboxílicos. Estes estudos tiveram início com o pesquisador Dr. José Manuel Guisan, na Espanha, em 1988. Essas transformações químicas não são possibilidades exclusivas da agarose, podendo ser realizadas em outros tipos de suporte.^{20,29,59,60}

Sobre os suportes agarose-glioxil, a imobilização ocorre através das regiões da superfície da enzima, que possui maior densidade de grupos amino primários, e não através do grupo amino mais reativo, como ocorre na maioria das outras técnicas de imobilização.³⁴ Para que ocorra a imobilização, faz-se reagir os grupos amino primários da proteína com o suporte agarose previamente ativado, de modo que na superfície apresentem uma mono-capa de aldeídos ligeiramente afastados da parede do suporte e totalmente expostos ao meio reacional.¹⁹ Em um primeiro passo, ocorre a formação de enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre os ϵ -NH₂ das lisinas e os grupos aldeídos do suporte. Os aminoácidos lisinas são normalmente abundantes na superfície protéica, quando estão expostos ao meio e, quando estão desprotonados, são muito reativos como nucleófilos. Para que ocorra esta reação, torna-se necessário trabalhar com pH próximo ou superior ao pKa dos grupos ϵ -NH₃⁺ (pH 10.05).

Esta primeira interação entre a enzima e o suporte ocorre pelo menos através de dois pontos e a enzima deve se auto-orientar rumo ao suporte para sua região mais rica em grupos amino reativos.³⁴ Isto leva a formação de uma união fraca e reversível. Em um seguinte passo, reduzem-se as bases de Schiff a enlaces amino secundários com

boroidreto de sódio. Esta redução permite, além de estabilizar o enlace enzima-suporte, converter todos os grupos aldeído remanescentes em grupos hidroxilas, dando lugar a uma matriz inerte e hidrofílica.³ Segundo Guisan, quando não se faz o bloqueio dos grupos reativos remanescentes, poderá ocorrer um número de reações indesejadas ou não controladas, de tal forma que desestabiliza a proteína, o que leva à inativação da enzima.³²

A celulose é um biopolímero lineal de unidades β - (1,4)-D glucopiranososa (**Figura 2**), é um componente estrutural da parede celular das plantas em forma de microfibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e de 100 a 40.000 nm de comprimento, que forma uma rede com outros carboidratos.¹¹

Algumas bactérias como a *Gluconacetobacter xylinus*¹² e *Acetobacter xylinum* produzem celulose.^{8,28,51} A celulose de plantas e a celulose bacteriana têm a mesma estrutura química, porém, diferentes propriedades fisicoquímicas.⁵³ As bactérias geralmente produzem celulose como um componente extracelular para proteção de agentes mecânicos e químicos, assim como para facilitar a adesão de células e tecidos hóspedes.^{52,56}

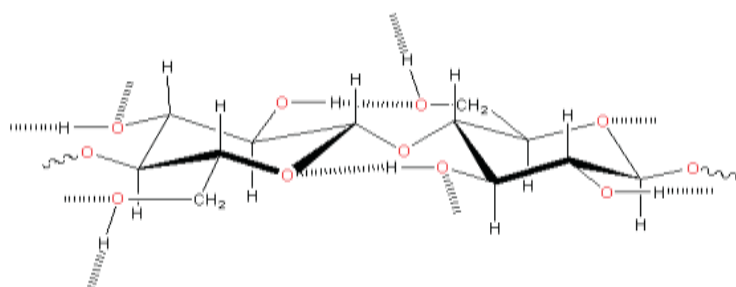


Figura 2. Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis.¹²

Pelo fato da celulose bacteriana apresentar hidroxilas livres reativas, ela esta sendo muito usada em vários processos biotecnológicos.^{4,5,30,54} A estas hidroxilas

podem-se ligar braços químicos para a imobilização de enzimas, produzindo diferentes suportes como o CB-glioxil.^{20,62}

A estrutura terciária das enzimas pode ser submetida a modificações químicas nos grupos carboxílicos de superfície (carboxil terminal, ácido aspártico e ácido glutâmico) com 1-etil-3-(dimetilamino-propil) carbodiimida (EDAC), na presença de etilenodiamina (EDA), promovendo estabilização. Nesta reação ocorre a formação de uma amida entre o grupo carboxílico ativado da proteína e o grupo amino do EDA, o que forma um grupo amino primário livre. Este novo grupo amino apresenta um valor de pka ao redor de 9,2, sendo mais reativo que os grupos amino dos resíduos de lisina da superfície da proteína. Além disso, o grau de modificação pode ser controlado pela concentração de EDAC usado durante a reação.^{29,42}

Devido a uma ampla utilização das peroxidases em diversos setores industriais, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo principal extrair a peroxidase da casca da soja, imobilizar de forma multipontual e covalentemente em suporte pó de sabugo de milho e ensaiar descoloração de azul de bromofenol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Utilizou-se casca de soja, proveniente da UNISOJA da FCF-UNESP/Araraquara, e chuchu comercial, para a extração das enzimas peroxidases. A celulose bacteriana utilizada foi doada pelo Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da UNESP/Araraquara, para ser utilizado como suporte alternativo.

4.2. Métodos

4.2.1. Extração da enzima peroxidase

Adicionou-se água destilada na razão de 1:10 (gramas de casca de soja por mL de água destilada) e em seguida triturou-se em liquidificador por 5 minutos. O chuchu foi cortado em cubos pequenos com cerca de 2 cm por lado e triturado em liquidificador por 5 minutos. Os extratos foram filtrados em gaze para retirada de impurezas, para posterior centrifugação a 4⁰C por 20 minutos a 7.552 g.

4.2.2. Determinação proteína

A concentração de proteínas nos extratos enzimáticos foram determinadas pelo método de Bradford.⁷

4.2.3. Aminoação da enzima

A aminoação das enzimas peroxidases solúveis nativas foram feitas com solução EDA (Etilenodiamina- Sigma)1M a pH 4,75, na razão 1:1 (mililitros do extrato enzimático por mililitros de solução de EDA), e carbodiimida sólida (Sigma), em diferentes concentrações de 10 mM e 50 mM. Depois, a solução foi dialisada com água destilada por 18 horas a 4°C.⁹ O extrato dialisado foi usado para imobilização nos diferentes suportes.

4.2.4. Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas das peroxidases livres, nativas e aminadas, no processo de imobilização, das peroxidases imobilizadas, como também nos processos

de inativação, foram determinadas utilizando-se como substrato 2,5 mL de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfônico) Sigma] 1mM em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; 25 µL de H₂O₂ 100mM em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; 10 µL do extrato enzimático ou 10 µL da suspensão com o derivado enzimático, o acompanhamento da reação foi seguida no espectrofotômetro FEMTO 700S em $\lambda=430$ nm.^{37,47}

As atividades tanto das peroxidases livres como das imobilizadas foram realizadas a 25°C e no seu pH ótimo igual a 4,0.

4.2.5. Atividade enzimática específica

A atividade específica das peroxidases foi calculada através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína, com coeficiente de extinção molar de $31.100 \text{ M}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o cátion radical do ABTS⁺.

4.2.6. SDS-PAGE

A eletroforese em condição desnaturante foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS, de acordo com o método de LAEMMLI (1970),²⁶ usando-se acrilamida 8%. As bandas protéicas foram visualizadas com corante Brilliant G- colloidal concentrate (Sigma).

4.2.7. PAGE

A eletroforese em condição não desnaturante, foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS,²⁶ sem TEMED e sem tampão de ruptura usando-se acrilamida 8%. As bandas protéicas foram visualizadas com guaiacol em presença de H₂O₂.

4.3. Preparação dos suportes e ativação:

A celulose bacteriana foi funcionalizada seguindo os mesmos métodos utilizados para os suportes de agarose.¹⁹ Pelo fato da CB apresentar hidroxilas livres reativas, podem ser ligados braços químicos para a imobilização das enzimas, produzindo suportes CB-glioxil.^{19,32} A uma alíquota de 20 g de celulose bacteriana hidratada (CB) foi adicionado 6 mL de água milliQ, 9,52 mL de uma solução NaOH 1,7 N, previamente a frio, contendo 0,2714 g de NaBH₄ (boroidreto de sódio) e sob agitação suave gotejou-se lentamente 6,86 mL de glicidol (2,3- epóxi-propanol), mantido em banho de gelo. A suspensão manteve-se 18 horas sob suave agitação em recipiente aberto em temperatura de 25⁰C. A suspensão foi filtrada e lavada sob vácuo com água destilada, abundantemente. Desta maneira, as matrizes ativadas passam a apresentar grupos ativos gliceril em sua estrutura.

A seguir, as matrizes foram submetidas à oxidação na presença de periodato de sódio (NaIO₄) 100 mmol. L⁻¹, sob agitação suave, por 90 minutos, reagindo para formação de grupos glioxil (aldeídos). Transcorrido esse tempo, o resíduo ativado foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada.

4.4. Preparo de derivados enzimáticos

As peroxidases aminadas foram colocadas em contato com os suportes glioxil-CB. Foram utilizados 4 mL das soluções enzimáticas aminadas, diluídas em 16 mL de tampão bicarbonato de sódio 0,1M pH 10. Desta solução, retirou-se 1 mL como enzima controle, o restante foi adicionado a 2 g do suporte.. A suspensão foi mantida a 25 ⁰C sob agitação constante suave e, em intervalos regulares de tempo, foram retiradas duas alíquotas da suspensão, uma para análise da atividade enzimática de peroxidase na

suspensão e outra para ser centrifugada e analisar a atividade enzimática de peroxidase no sobrenadante, juntamente com a solução enzimática controle, para acompanhamento das atividades enzimáticas. Após o processo de imobilização, aos derivados foi acrescentado boroidreto de sódio (1mg/mL de suspensão) e mantido por 30 minutos sob agitação suave, para redução dos grupos ativado remanescentes no suporte e das bases de Schiff, após a ligação da enzima. Em seguida, o derivado assim obtido foi lavado com água destilada e estocado a 4^oC. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.5. Temperatura de inativação

As temperaturas de inativação foram testadas entre 45°C e 65°C, tanto para as enzimas solúveis como para os derivados, até a inativação do 90% da atividade da enzima. Foram preparadas as amostras suspendendo-se 0,300 g do derivado em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M e 2,0 mL dos extratos enzimáticos, colocaram-se as amostras nos diferentes banhos, a cada determinada fração de tempo, pegou-se 10 µL das suspensões para medir a atividade, pelo método descrito para atividade enzimática. Estas atividades foram comparadas a atividade inicial a 25°C e expressas em porcentagem.

4.6. pH ótimo do extrato e dos derivados

Para a determinação das condições ótimas de pH do extrato e os derivados, utilizaram-se tampões citrato de sódio, 0,1M (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0), fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0; 8,0;) e bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0; 10).

4.7. Descoloração do azul de bromofenol

Os derivados CB-glioxil-peroxidases de casca de soja e do chuchu aminadas e estabilizados foram ensaiados na descoloração do azul de bromofenol. Foram colocados 0,300 g de cada derivado no reator e adicionados 4,0 mL de azul de bromofenol 0,01 mM, acrescentados de 100 uL de H₂O₂ 100 mM, manteve-se sob agitação suave por 60 minutos, fazendo o acompanhamento de leituras no espectrofotômetro FEMTO 700S cada 10 minutos, em $\lambda=590$ nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais presentes nos extratos obtidos pela metodologia descrita neste trabalho foi de: 0,235 mg mL⁻¹ para soja e 0,290 mg mL⁻¹ para o chuchu, e a atividade específica de peroxidase foi de 86,06 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e 9,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectivamente, em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0. As enzimas peroxidases aminada 10 mM mantiveram 88% da atividade e as aminadas 50 mM mantiveram 100% para peroxidase da soja e 52% para peroxidase do chuchu, da atividade inicial da peroxidase nativa (**Tabela 1**). As atividades tanto das peroxidases nativas como das aminadas foram realizadas a 25°C e no seu pH ótimo 4,0.

TABELA 1. Porcentagens de atividade específica recuperada após a aminação das peroxidases da casca da soja e do chuchu.

PEROXIDASES	Nativa	Aminada 10 mM	Aminada 50 mM
SOJA	100	88	100
CHUCHU	100	88	52

As eletroforeses dos extratos da casca da soja e do chuchu mostram as diferentes peroxidases, observam-se as bandas protéicas através da eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) e as bandas de atividade reveladas com guaiacol em presença de peróxido de hidrogênio, na eletroforese não desnaturante (PAGE) - **Figura 3**.

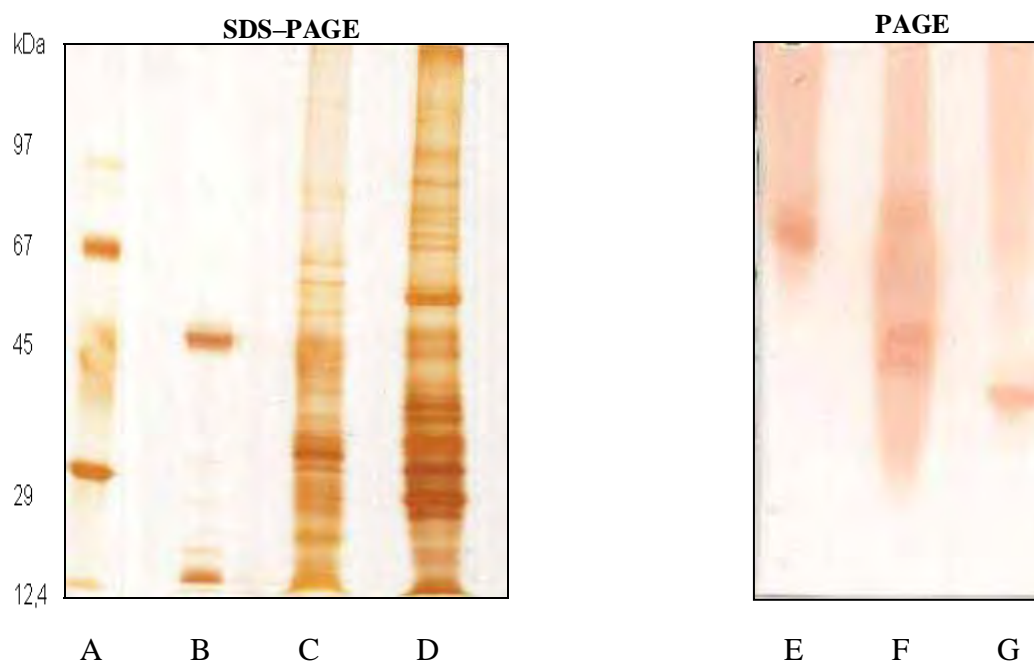


Figura 3. SDS-PAGE. (A) padrão massa molecular, (B) peroxidase comercial de rabanete, (C) peroxidase da casca da soja, (D) peroxidase do chuchu. PAGE. Reveladas com guaiacol em presença de H_2O_2 : (E) peroxidase comercial de rabanete, (F) peroxidase da casca da soja, (G) peroxidase do chuchu.

Na eletroforese PAGE sem adição de mercapto-etanol, para manter as enzimas sem desnaturar, pode-se observar que as peroxidases da soja e do chuchu têm outras bandas de atividade, isto nos demonstra que não é apenas uma enzima, podendo conter isoenzimas que podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas.

A inativação da enzima peroxidase da soja nativa e da aminada 10 mM à temperatura de $60^{\circ}C$ foi semelhante entre elas, mantendo 75% da sua atividade em 120 horas de tratamento, enquanto que a aminada 50 mM, após 120 horas apresentou apenas

10% da atividade. Isto demonstra que a maior aminação altera a estrutura tridimensional da enzima e, por este motivo, o centro catalítico fica comprometido e a estabilidade da enzima diminui (Figura 4).

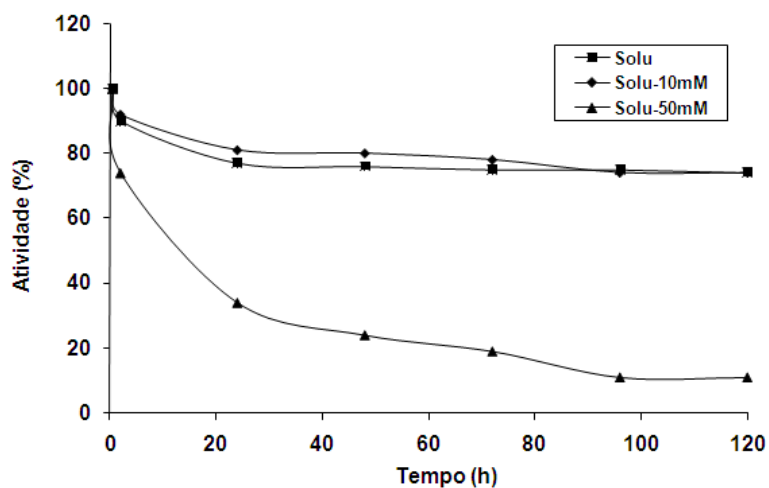


FIGURA 4. Porcentagem relativa da atividade residual das peroxidases da soja solúveis: ■ nativa; ● aminada 10 mM e ▲ aminada 50 mM, frente à temperatura de 60°C.

A peroxidase do chuchu é menos estável em temperaturas elevadas que a peroxidase da soja, por este motivo a sua inativação frente à temperatura foi feita a 45°C. A enzima nativa manteve os 54% da sua atividade inicial em 120 horas de tratamento, enquanto que a aminada 10 mM nas 120 horas diminuiu para 22% da atividade. A enzima aminada a 50 mM perdeu toda a sua atividade, demonstrando que a enzima mais aminada tem maior mudança na sua estrutura tridimensional, modificando o centro catalítico e por este motivo perde a estabilidade da enzima (Figura 5).

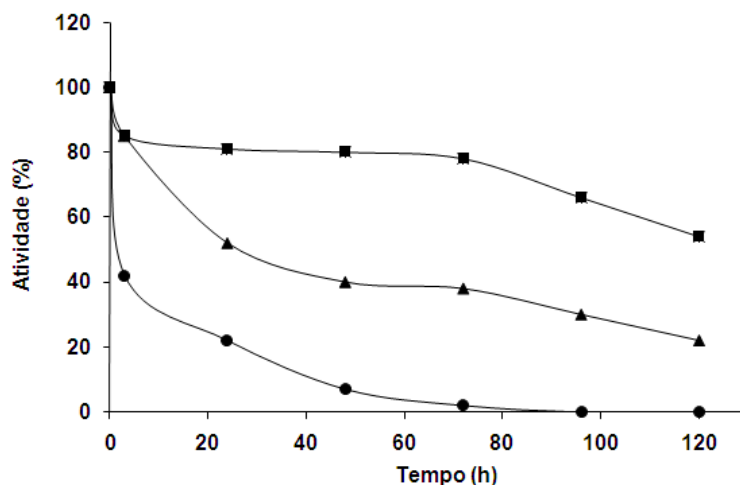


FIGURA 5. Porcentagem relativa da atividade residual das peroxidases solúveis do chuchu: ■ natural; ▲ aminada 10 mM; ● aminada 50 mM, frente à temperatura de 45°C.

Os resultados da imobilização multipontual das peroxidases da casca da soja e do chuchu no suporte celulose bacteriana ativado com grupos glioxil, apresentados neste trabalho, foram conseguidos seguindo os protocolos descritos por Guisán para agarose-glioxil.¹⁹

Determinou-se que 0,235 mg de proteínas da soja e 0,290 mg de proteínas do chuchu, presentes nos extratos enzimáticos com atividade de peroxidase por grama de suporte ativado, foram as concentrações que permitiu a máxima recuperação de atividade. A imobilização covalente multipontual das peroxidases sobre suportes CB-glioxil a pH 10,0 foi desenvolvida através das zonas aminadas da superfície tridimensional. Em pH 10,0 estas amins estão desprotonadas permitindo o ataque nucleofílico dos grupos amino sobre os aldeídos do suporte, formando os derivados CB-glioxil-S-NH₂10mM; CB-glioxil-S-NH₂50mM; CB-glioxil-Ch-NH₂10mM; CB-glioxil-Ch-NH₂50mM.

Resultados obtidos neste trabalho mostram que as peroxidases aminadas a 50mM têm rendimentos de imobilização maiores que as aminadas a 10 mM. Isto deve-se à maior quantidade de grupos amino reativos na enzima³⁴ para formar enlaces com

os grupos carboxilas do suporte CB, 92% para soja e 69% para chuchu, sendo que a atividade recuperada foi de 82% e 92% respectivamente, em três horas de processo de imobilização (**Tabela 2**). Valores similares de imobilização e atividade foram apresentados em outros estudos de imobilização de peroxidases.^{2,60}

TABELA 2. Atividade enzimática no processo de imobilização das peroxidases da soja e do chuchu aminadas em suporte CB-glioxil.

IMOBILIZAÇÃO DAS PEROXIDASE DA CASCA DA SOJA E DO CHUCHU			
Derivado	% de imobilização	% suspensão	% recuperado
CB-Gli-S-NH ₂ 10 mM	47	82	25
CB-Gli-S-NH ₂ 50 mM	92	71	82
CB-Gli-Ch-NH ₂ 10 mM	35	91	62
CB-Gli-ChNH ₂ 50 mM	69	73	92

CB-Gli-Ch-NH₂ 10 mM Peroxidase do chuchu aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-Ch-NH₂ 50 mM Peroxidase do chuchu aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-S-NH₂ 10 mM Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana;CB-Gli-S-NH₂ 50 mM Peroxidase da soja aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana.

Verificou-se que a atividade recuperada do derivado CB-glioxil-S-NH₂50mM é 57% maior que o derivado CB-glioxil-S-NH₂10mM e o derivado CB-glioxil-Ch-NH₂50mM é 30% maior que o derivado CB-glioxil-Ch-NH₂10mM. Este fato deve-se ao processo de aminação dos grupos glutamatos e aspartatos das enzimas nativas, o que aumenta o número de aminas na superfície da enzima, conseqüentemente elevando o número de ligações peptídicas entre a enzima e o suporte CB-glioxil (Tabela 2). Caso similar acontece quando às enzimas são adicionadas cadeias de histidinas.³⁵ A aminação da enzima se fez necessária e propiciou a ligação da enzima ao suporte, enquanto que

não foi possível a obtenção de imobilização, quando se utilizou a enzima nativa, embora se experimentasse suportes ativadas diferentemente.

Foi possível observar que o derivado CB-glioxil-S-NH₂10mM, foi o que apresentou melhor estabilidade, a 60 °C por um período de 120 horas, mantendo 82% da atividade inicial, o derivado com a enzima aminada 50mM manteve 57% da atividade inicial (Figura 6).

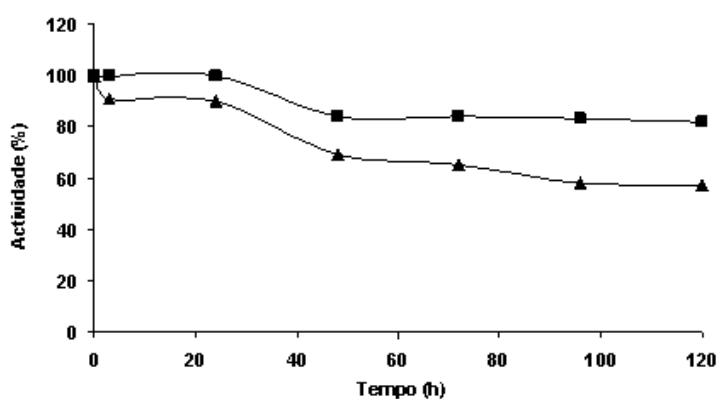


FIGURA 6. Porcentagem relativa da atividade residual dos derivados CB-glioxil das peroxidases da soja: ■ aminada 10 mM e ▲ minada 50 mM, frente a 60°C de temperatura.

O derivado CB-glioxil-Ch-NH₂10mM de carbodiimida foi o que apresentou melhor estabilidade, a 45 °C por um período de 120 horas, mantendo 28 % da atividade inicial, enquanto que o derivado com a enzima aminada 50mM manteve 20 % da atividade inicial, o que demonstra a melhora da estabilidade frente a enzima aminada livre (**Figura 7**).

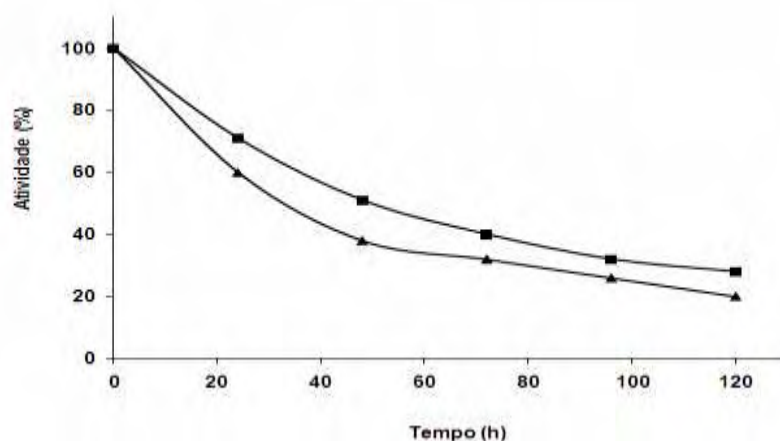


FIGURA 7. Porcentagem relativa da atividade residual dos derivados CB-glioxil das peroxidases do chuchu: ■ aminada 10 mM e ▲ aminada 50 mM, frente a 45°C de temperatura.

As peroxidases de soja e chuchu com maior grau de aaminação ligaram-se ao suporte com alta afinidade e velocidade, formando desta forma, maior número de enlaces covalentes. Entretanto, a estabilidade foi menor, provavelmente pela mudança conformacional espacial nativa, levando a uma estrutura um pouco mais rígida, motivo pelo qual o centro catalítico pode estar comprometido (Figura 4 e 5).

A inativação das peroxidases nativas, aminadas e dos derivados obtidos, frente a distintos pHs, foi ensaiada por um período de 120 horas. Nestes experimentos, podemos observar que os quatro derivados mantêm o melhor desempenho no pH 7,0, mas os dois derivados aminados com 50mM de carbodiimida são os que apresentaram uma maior estabilidade e, conseqüentemente, maior atividade. Cabe ressaltar que o derivado CB-Gli-Ch-NH₂ 50 mM aumentou a atividade em mais de 100% nos pHs 5,0 até 10,0 devido possivelmente a um melhor arranjo do centro catalítico da enzima no suporte. O menor desempenho destes derivados foram no pH 3,0 (**Tabela3**).

TABELA 3. Porcentagem relativa da atividade residual das peroxidases da casca de soja nativa, aminadas e imobilizadas, frente a diferentes pHs em 120 horas de tratamento.

Forma	pH 3	pH 5	pH 7	pH 10
Nativa da soja	76	67	100	100
Nativa do chuchu	18	64	17	82
Soja-Aminada 10 mM	76	90	95	92
Chuchu-Aminada 10 mM	17	42	66	63
Soja-Aminada 50 mM	67	100	100	95
Chuchu-Aminada 50 mM	8	77	58	49
CB-Gli-S-NH ₂ 10 mM	67	56	89	74
CB-Gli-Ch-NH ₂ 10 mM	40	63	99	82
CB-Gli-S-NH ₂ 50 mM	70	89	82	76
CB-Gli-Ch-NH ₂ 50 mM	28	161	286	155

CB-Gli-Ch-NH₂ 10 mM Peroxidase do chuchu aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-Ch-NH₂ 50 mM Peroxidase do chuchu aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-S-NH₂ 10 mM Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-S-NH₂ 50 mM Peroxidase da soja aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana.

Na **tabela 4** são apresentados resultados de descoloração do azul de bromofenol, utilizando derivados estabilizados, sob agitação suave por 60 minutos, na qual se observa descoloração de 100% com os quatro derivados estudados no primeiro ciclo de uso. Os derivados estabilizados foram reutilizados em cinco ciclos, e os resultados mostraram que, por três ciclos, a atividade do CB-Gli-S-NH₂ 50 mM mantém o 100% da atividade de descoloração e os outros derivados mantêm cerca de 50%. Após o terceiro ciclo, os derivados diminuem a atividade de descoloração, provavelmente

diminuindo sua capacidade enzimática de descoloração, esta perda acontece uma vez que os polímeros formados no processo de descoloração são adsorvidos à enzima.^{38,50}

TABELA 4. Porcentagens de descoloração do azul de bromofenol 0,01mM, com os derivados CB-glioxil-peroxidases aminadas 10 mM e 50 mM, em presença de H₂O₂, em 5 ciclos de 60 minutos.

DESCOLORAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL 0,01 mM					
Derivados / Ciclos	1°	2°	3°	4°	5°
CB-Gli-S-NH ₂ 10 mM	100	94	77	68	32
CB-Gli-S-NH ₂ 50 mM	100	100	100	93	74
CB-Gli-Ch-NH ₂ 10 mM	100	79	50	34	21
CB-Gli-Ch-NH ₂ 50 mM	100	93	78	48	33

CB-Gli-Ch-NH₂ 10 mM Peroxidase do chuchu aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-Ch-NH₂ 50 mM Peroxidase do chuchu aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-S-NH₂ 10 mM Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte celulose bacteriana; CB-Gli-S-NH₂ 50 mM Peroxidase da soja aminada 50mM imobilizada em suporte celulose bacteriana.

Os derivados obtidos neste trabalho têm a mesma capacidade e tendência de descolorar o azul de bromofenol por processos de oxido-redução.^{1,6,10} Valores similares foram obtidos com a enzima peroxidase do chayote,^{2,60} aplicada na remoção dos corantes têxteis que também são de natureza poliazó, o que demonstra a capacidade e velocidade que têm estas enzimas para atuar na oxidação dos grupos fenólicos. O tratamento enzimático oferece um alto grau de especificidade, operações sob condições suaves e alta velocidade de reação.^{2,10,24,43,55,60}

As peroxidases são utilizadas para o tratamento de compostos aromáticos contaminantes em águas provenientes de diferentes fontes. Principalmente a peroxidase do rabanete (HRP) tem sido usada para a remoção de contaminantes fenólicos, assim como também são capazes de remover anilinas aromáticas, hidroxiquinoleína e carcinogênicos como benzidinas y naftilaminas.^{22,40,55,61} Mas, por ser uma enzima de

importância, seu custo comercial é alto. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a possibilidade de utilização dos derivados CB-glioxil-peroxidase da casca de soja aminadas, com ciclos de pelo menos de três vezes, diminuindo os custos da aplicação de enzimas.

6. CONCLUSÕES

Peroxidases da casca da soja e do chuchu foram imobilizadas multipontualmente no suporte de celulose bacteriana ativada pelo método do glioxil desenvolvido pelo Dr. Guisán.

A aaminação das enzimas se fez necessário e propiciou a ligação da enzima ao suporte, enquanto que não foi possível a obtenção de imobilização quando se utilizou a enzima nativa. Embora se experimentasse diferentes suportes ativados, as peroxidases enriquecidas em grupos aminos permitem aperfeiçoar sua imobilização multipontual sobre suportes CB-glioxil.

O maior fator de estabilização conseguiu-se quando a enzima aminada 10mM imobilizou-se orientada sobre o suporte através dos novos grupos aminos introduzidos, e posteriormente incubada a pH 10.0 para otimizar a união covalente multipontual entre todos os resíduos aminos desta região da enzima e todos os grupos glioxil do suporte.

Os derivados estabilizados das peroxidases aminadas mostraram propriedades catalíticas similares às suas correspondentes enzimas solúveis nativas. Os dois derivados obtidos, CB-glioxil-peroxidases da soja e chuchu aminadas, apresentaram ótimas atividades no processo de descoloração do azul de bromofenol, demonstrando que é possível utilizar estes derivados no tratamento de efluentes ou águas contaminadas que contenham fenóis ou grupos fenólicos, pela facilidade do seu alto grau oxidante na presença de H_2O_2 .

Este trabalho indica que tanto a enzima peroxidase da casca de soja como do chuchu imobilizadas em celulose bacteriana altamente ativada, são uma excelente alternativa, de baixo custo, e com grande viabilidade para ser usada em lugar da peroxidase de rabanete não imobilizada, uma vez que os derivados obtidos, apresentaram ótima estabilidade frente a temperaturas e pHs extremos. Além do tratamento de águas residuais oriundas de processos industriais, no futuro e com mais pesquisa, principalmente na purificação das enzimas, elas poderão ser utilizadas também em kits de diagnósticos, substituindo os que usam a peroxidase do rabanete (HRP).

7. AGRADECIMENTOS

CAPES, FUNDACIÓN CAROLINA, FUNDUNESP

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALARCON, B. et al. O pka de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.
2. ALONSO-CALDERÓN, A. I. A. J. et al. Eliminación de fenol, 2-clorofenol colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando a la peroxidasa de chayote. **Revista Latinoamericana de Recursos Naturales**, v. 4, n.2, p.278 -284, 2008.
3. ARSLAN, F. et al. The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. **Food Chem.**, v. 70, p. 33-38, 2000.
4. BARUD, H.S. et al. Thermal characterization of bacterial. Cellulose–phosphate composite membranes. **J. of Thermal Analy and Calorime.**, v. 87, n. 3, p. 815–818, 2007.
5. BARUD, H. S. R. et al. Bacterial cellulose–silica organic–inorganic hybrids. **J Sol-Gel Sci Technol.**, v 46, n.3, p. 363–367, 2008
6. BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydrate reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366, 1989.

7. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254,1976.
8. BROWN, Jr.V; WILLISON, J. H. M. AND RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, 1976.
9. BRUNETTI, I. L.; FARIA, O.M.N. Sistemas quimioluminescentes com peroxidases (EC.1.11.1.7) e suas aplicações. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.
10. DAVIS, S.; BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Biodegradation**, v.5, p.13. 1994.
11. DELMER, D. P. & AMOR, Y. Cellulose Biosynthesis, **The Plant Cell**, v. 7, p. 987-1000, 1995.
12. DONINI, ÍA. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecl. Quím.**, v. 35 – n.4, p. 165 - 178, 2010
13. DUARTE M. et al. Renoval of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. **J. of Chem Technol and Biotechnol.**, v.78, n1, p.43-45, 2002.
14. DUNFORD, H.B.; STILLMAN, J.S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, p. 187-251, 1976.
15. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. et al. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 517-523, 1995.
16. FERRER, I. et al. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.577. 1991.
17. GILLIKIN, J.W.; GRAHAM, J.S. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidases from the seed coat of *Glycine max*. **Plant Physiol**, v. 96, p. 214-220, 1991.
18. GOULART, A.J. et al. Multipoint Immobilization of invertase on Agarose: Stability and Kinetic Properties. **Current Trends in Biotechnolo and Pharma**, v.2, n.3, p 462-470, 2008.
19. GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375- 382. 1988.

20. GUISÁN, J. M. et al. **Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose – Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment.** In: Immobilization of enzymes and cells. BICKERSTAFF, G. F. Totowa: Humana Press, v.31, p.277-287, 1997.
21. GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge. In: GUISÁN, J.M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells.** Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 1 13.
22. KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.
23. KENNEDY, K.; ALEMANY, K.; WARITH, M. Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorephenol. **Water Research**, v. 28, p. 149-158, 2002.
24. KINSLEY, C.; NICELL, J.A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 139-146, 2000.
25. KLIBANOV, A.M.; TU, T.M.; SCOTT, K.P. Peroxidase catalyzed removal of phenoos from coal conversion waste waters. **Science**, v. 221, p. 259- 261, 1983.
26. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
27. LAPUENTE, R. Tesis: **Estudio voltamétrico y espectroscópico de los polímeros creados por oxidación electroquímica de fenol sobre electrodos metálicos.** Universidad de Alicante. Tese de Doutorado do Departamento de Física Química. Facultad de Ciencias. España. 2000.
28. LEGGE, R. L. Microbial cellulose as a speciality chemical. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 2, p. 303-319, 1990.
29. LÓPEZ-GALLEGO, et al., R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, p. 1-10, 2005.
30. MARINS, J. A. et al. Structure and properties of conducting bacterial cellulose-polyaniline nanocomposites. **Cellulose**, v.18, n.5, p. 1-10, 20011.
31. MARQUES, D. P. et al. Hydrolysis of protein by immobilized and stabilized trypsin. **Biotechnol. Prog** v.27, n.3, p.677-683, 2011.
32. MATEO, C. et al. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnol Prog**, v. 18, p. 629-634, 2002.

33. MATEO, C. et al. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition of promoted by glucose: Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnol. Prog.** v.20, p.1259-1262, 2004.
34. MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert y hydrophilic support for immobilization y high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280. 2006
35. MATHEUS, P.R. et al. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). **Avances en Química**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009.
36. McELDOON, J. P.; DORDICK, J. S. Unusual Thermal Stability of Soybean Peroxidase. **Biotechnol. Prog.** v. 12, n. 4, p. 555–558, 1996.
37. MUÑOZ, C. et al. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation ID activationof molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p. 2166-2174, 1997.
38. NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. Phenol removal from aqueous solutios by peroxidase-catalyzed reaction using additives. **Water Research.**, v. 26, n. 1, p. 49-54, 1992.
39. NEWSTROM, L.E. Evidence for the Origin of Chayote, *Sechium edule* (Cucurbitaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 410-428, 1991.
40. NICELL, J.A. et al. Reactor development for peroxidases catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, v. 27, p. 1629-1639, 1993.
41. O'BRIEN, P. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.
42. Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization: recent experimental progress. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, p. 137-149, 2003.
43. ORTEGA TOVAR M. A. **Eliminación de compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus L. var. Purple top white globe*)**. Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos., UAQ-Querétaro México, 2001.
44. PAULA, F.C. et al. Screening of supports for *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* inulinase immobilization. **Current Trends in Biotechnol and Pharma**, v.1, n.1, p. 34-40, 2007.

45. PAULA, F.C. et al. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Food Chemistry**, v.111, p. 691-695, 2008.
46. PBMH & PIF - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS. Normas de Classificação de Chuchu. São Paulo: CEAGESP, 2006. (Documentos, 30).
47. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
48. REED, G. Peroxidase. In: **Enzyme s in food processing**. Academic Press, New York, 1975, p. 243 – 7.
49. REGALADO, C.; GARCÍA, B.; DUARTE, M. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n. 1, p. 243-256, 2004.
50. ROJAS, M. F. et al. Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. **Proc. Bioche.**, v. 39, p. 1455–1464, 2004.
51. RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 205-212, 2002.
52. RÖMLING, U. et al. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, n. 4, p. 273-285, 2003.
53. ROSS, P.; MAYER, R. & BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 55, n.1, p. 35-58, 1991.
54. SANTA MARIA, L.C. et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose. **Materials Letters**, v. 63, n. 9-10, p. 797-799, 2009.
55. SIDDIQUE, M. H. et al. Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. **Wat. Res.**, v. 27, p.883, 1993.
56. SPIERS, A.J. et al. Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 15-27, 2003.
57. TARDIOLI, P. W. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 352-360, 2003.
58. TAVANO, O.L. et al. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnol**, v. 22, p. 262-275, 2008.

59. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, F. O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v. 52, n. 4, p. 681-689, 2000.
60. VILLEGAS-ROSAS, M.L.O. et al. Inmovilización de una peroxidasa de chayote [*sechium edule* (jacq.) sw] y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 19, n. 2, p. 73-81, 2003.
61. WRIGHT, H.; NICELL, A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 69-79, 1999.
62. WU, S. C.& LIA, Y.K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **J. of Mole Cataly B: Enzyma**, v. 54, p 103–108, 2008.

Capítulo III

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL E ESTABILIZAÇÃO DA
PEROXIDASE AMINADA DA CASCA DA SOJA, EM PÓ DE SABUGO
DE MILHO COMO SUPORTE ATIVADO

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL E ESTABILIZAÇÃO DA PEROXIDASE AMINADA DA CASCA DA SOJA, EM PÓ DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE ATIVADO

VINUEZA, J.C. (PG)⁽¹⁾; LOUREIRO, R. M. (IC)⁽¹⁾; SANTOS, A. F. (PG)⁽²⁾; MONTI, R. (PQ)⁽¹⁾

⁽¹⁾ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Univ Estadual Paulista, Campus de Araraquara.

⁽²⁾ Instituto de Química, UNESP-Univ Estadual Paulista, Campus de Araraquara.

1. RESUMO

As peroxidases (EC 1.11.1.7) catalisam processos redox e durante a oxidação são gerados radicais livres, que formam produtos poliaromáticos insolúveis em água, o que facilita sua remoção do meio aquoso. O objetivo deste trabalho foi extrair a peroxidase da casca de soja, realizar aminação na superfície da estrutura terciária, imobilizar a enzima aminada em suporte pó de sabugo de milho altamente ativado e utilizar o derivado obtido para descoloração do azul de bromofenol. A quantidade de proteínas no extrato foi determinada por Bradford com valores médios de $0,235 \pm 0,011 \text{ mg mL}^{-1}$, e a atividade específica de peroxidase foi determinada com ABTS 1 mM em presença de H_2O_2 100 mM em $\lambda = 430 \text{ nm}$, obtendo-se os valores médios de $86,06 \pm 1,52 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0. A aminação da peroxidase solúvel foi feita com etilenodiamina e carbodiimida, 10 e 50 mM e a funcionalização do pó de sabugo de milho e imobilização covalente multipontual foi semelhante à descrita para agarose por Guisán¹³. A atividade específica da peroxidase aminada 10mM manteve 88% e a aminada 50mM, 100% da atividade inicial. As peroxidases aminadas 10 e 50 mM foram imobilizadas covalentemente no suporte ativado pó de sabugo de milho-glioxil, com atividade recuperada de 74% e 86%, respectivamente. Para a descoloração do azul de bromofenol, utilizou-se os derivados estabilizados em presença de H_2O_2 em $\lambda = 590 \text{ nm}$. Utilizando-se os derivados obtidos na descoloração do azul de bromofenol 0,02mM, obteve-se em 30 min, 93% de descoloração com o derivado da peroxidase aminada 10 mM e 89 % para o derivado com a peroxidase aminada 50 mM, e foram reutilizados por três ciclos mantendo-se em 60% a propriedade catalítica, o que sugere que estes derivados da peroxidase da casca da soja são uma alternativa de baixo custo, não só para o tratamento de águas residuais como podem ter potencial uso em outros processos industriais.

Palavras-chave: Peroxidases, imobilização multipontual de enzimas, pó de sabugo de milho, diminuição de fenóis em águas residuais.

2. ABSTRACT

Peroxidases (EC 1.11.1.7) catalyze redox processes, and during the oxidation free radicals are generated, forming insoluble polyaromatic products, facilitating their removal from the aqueous medium. The objective of this research was to extract peroxidase from soybean hulls, perform amination on the surface of tertiary structure, to immobilize the enzyme aminated on support of corncob powder highly activated and use the derivative obtained for discoloration of bromophenol blue. The amount of protein in the extract was determined according Bradford method with average values of $0.235 \pm 0.011 \text{ mg mL}^{-1}$, and the specific activity of peroxidase was determined with ABTS 1 mM in the presence of 100 mM H_2O_2 at $\lambda=430\text{nm}$, yielding average values of $86.06 \pm 1.52 \text{ mmol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ in sodium acetate buffer 100 mM, pH 4.0. Amination of peroxidase was performed with soluble carbodiimide and ethylenediamine, 10 and 50 mM, and the functionalization of the corncob powder and multipoint covalent immobilization was similar to that described by Guisan for agarose. The specific activity of aminated 10 mM peroxidase retained 88% and the aminated 50 mM retained 100% of initial activity. The peroxidases aminated 10 and 50 mM were covalently immobilized on support corncob powder-glyoxyl with activity recovered of 74% and 86% respectively. For discoloration of bromophenol blue was used to derivatives stabilized in the presence of H_2O_2 at $\lambda=590\text{nm}$. Obtained derivatives were used in the discoloration of 0.02 mM bromophenol blue. After 30 min, 93% of discoloration was achieved with the derivative corncob-glyoxyl-aminated peroxidase 10 mM, and 89% for that with 50 mM. These derivatives remained at 60% the catalytic properties when used for three times, suggesting that the peroxidase from soybean hulls is a low cost alternative enzyme, not only for the treatment of wastewater, but it also has potential for use in other industrial processes.

Keywords: Peroxidases, multipoint immobilization of enzymes, powdered corncobs, reduction of phenols in wastewater

3. INTRODUÇÃO

As peroxidases, classificadas como EC 1.11.1.7, são encontradas tanto em animais como em vegetais.^{5,7,36} Para as plantas, estas enzimas desempenham função de defesa contra patogênicos e estresse mecânico, biossíntese e degradação de lignina, remoção de peróxido de hidrogênio e oxidação de xenobióticos tóxicos.³⁰ As peroxidases vegetais, como a peroxidase do rabanete (HRP), possuem aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 44 kDa, sendo que o grupamento heme está ligado não covalentemente na estrutura protéica. Entretanto, as peroxidases de mamíferos são maiores (576-783 resíduos de aminoácidos) e apresentam o grupamento heme ligado covalentemente à estrutura protéica.³⁰ A atividade de peroxidase presente nos tegumentos das sementes de soja, a qual possui massa molecular de 37 kDa¹¹, varia entre os cultivares de soja e serve como técnica alternativa ou complementar na identificação de diferentes variedades. A capacidade de redução de peróxidos por substratos doadores de elétrons torna as peroxidases úteis em várias aplicações industriais e analíticas.^{8,37} A peroxidase de soja (SBP) é uma enzima substancialmente mais termoestável do que a peroxidase de rabanete²⁶ e vem se destacando desde a década de 90 em biociência, biocatálise, biorremediação e em diagnóstico clínico. Na área de biorremediação, sabe-se que a maioria dos trabalhos aponta o uso da peroxidase do rabanete (HRP)^{10,25,28,38} para a detoxificação de águas contaminadas por compostos fenólicos e clorados. Mas, atualmente, outras fontes de peroxidases como da soja e do chuchu tem-se mostrado como uma alternativa.^{17,18,46}

A atividade industrial desenvolvida pelo homem faz com que grandes quantidades de compostos tóxicos sejam eliminadas, o que afeta a flora e fauna das regiões envolvidas. Os compostos aromáticos, tais como o fenol e seus derivados, são a maior classe de agentes contaminantes em águas residuais de várias indústrias químicas

e de alimentos.^{7,19,28,31} Um dos métodos para sua remoção inclui a polimerização usando enzimas redox, na presença de H₂O₂, o qual age como receptor de elétrons. As peroxidases podem catalisar a polimerização oxidativa destes fenóis, anilinas e outros aromáticos, em oligômeros insolúveis,⁸ que por sua vez podem ser removidos usando simples sedimentação ou sistemas de filtração.¹⁹

A utilização de enzimas imobilizadas em diferentes suportes está descrita na literatura e, geralmente, apresenta vantagens operacionais como: possibilidade de reutilização nas reações em batelada ou contínua; rápida interrupção da hidrólise; formação controlada; e fácil separação do produto.^{2,12,15,21,23,33,34,41,44,45} No entanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática. Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da molécula da enzima imobilizada, e ainda induzir a uma maior resistência às pequenas alterações conformacionais causadas por temperaturas elevadas, por solventes orgânicos, por agentes desnaturantes, entre outros.⁴⁰ Existem estratégias que permitem imobilizar proteínas multipontualmente por três vias diferentes de resíduos: amino-terminal, resíduos de lisina e grupos carboxílicos. Estes estudos tiveram início com o pesquisador Dr. José Manuel Guisan, na Espanha, em 1988. Essas transformações químicas não são possibilidades exclusivas da agarose, podendo ser realizadas em outros tipos de suporte.^{14,20,44,45}

Sobre os suportes agarose-glioxil, a imobilização ocorre através das regiões da superfície da enzima, que possui maior densidade de grupos amino primários, e não através do grupo amino mais reativo, como ocorre na maioria das outras técnicas de imobilização.²⁴ Para que ocorra a imobilização, faz-se reagir os grupos amino primários da proteína com o suporte agarose previamente ativado, de modo que na superfície apresentem uma mono-capa de aldeídos ligeiramente afastados da parede do suporte e totalmente expostos ao meio reacional.¹³ Em um primeiro passo, ocorre a formação de

enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre os ϵ -NH₂ das lisinas e os grupos aldeídos do suporte. Os aminoácidos lisinas são normalmente abundantes na superfície protéica, quando estão expostos ao meio e, quando estão desprotonados, são muito reativos como nucleófilos. Para que ocorra esta reação, torna-se necessário trabalhar com pH próximo ou superior ao pKa dos grupos ϵ -NH₃⁺ (pH 10.05). Esta primeira interação entre a enzima e o suporte ocorre pelo menos através de dois pontos e a enzima deve se auto-orientar rumo ao suporte para sua região mais rica em grupos amino reativos.²⁴ Isto leva a formação de uma união fraca e reversível. Em um seguinte passo, reduzem-se as bases de Schiff a enlaces amino secundários com boroidreto de sódio. Esta redução permite, além de estabilizar o enlace enzima-suporte, converter todos os grupos aldeído remanescentes em grupos hidroxilas, dando lugar a uma matriz inerte e hidrofílica.³ Segundo Guisan, quando não se faz o bloqueio dos grupos reativos remanescentes, poderá ocorrer um número de reações indesejadas ou não controladas, de tal forma que desestabiliza a proteína, o que leva à inativação da enzima.²²

O sabugo de milho é a parte central da espiga na qual os grãos estão presos, que é o resíduo gerado após o milho ser debulhado. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg (70% base úmida) são formados pelo sabugo.⁴³ Estruturalmente, o sabugo é formado por quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina constitui, aproximadamente, 4,1% do sabugo de milho em peso; a palha grossa, 33,7%; o anel lenhoso, 60,3%; e a medula, 1,9%. Todo esse material, depois de moído, transforma-se no pó de sabugo de milho.⁴⁷

As fibras lignocelulósicas apresentam hidroxilas reativas acessíveis, podendo reagir com outros grupos funcionais polares como, por exemplo, os presentes nas resinas fenólicas.⁴² Pelo fato do pó de sabugo de milho apresentar hidroxilas livres

reativas, o que favorece ligações de braços químicos imprescindíveis na imobilização de enzimas, é possível produzir suportes pó de sabugo de milho-glioxil.^{13,22}

A estrutura terciária das enzimas pode ser submetida a modificações químicas nos grupos carboxílicos de superfície (carboxil terminal, ácido aspártico e ácido glutâmico) com 1-etil-3-(dimetilamino-propil) carbodiimida (EDAC), na presença de etilenodiamina (EDA), promovendo estabilização. Nesta reação, ocorre a formação de uma amida entre o grupo carboxílico ativado da proteína e o grupo amino do EDA, formando um grupo amino primário livre. Este novo grupo amino apresenta um valor de pka ao redor de 9,2, sendo mais reativo que os grupos amino dos resíduos de lisina da superfície da proteína. Além disso, o grau de modificação pode ser controlado pela concentração de EDAC usado durante a reação.^{20,31} Devido a uma ampla utilização das peroxidases em diversos setores industriais, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo principal extrair a peroxidase da casca da soja, e imobilizar de forma multipontual e covalentemente em suporte pó de sabugo de milho, além de ensaiar descoloração de azul de bromofenol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Utilizou-se casca de soja, proveniente da UNISOJA da FCF-UNESP/Araraquara para a extração da enzima peroxidase, e o pó de sabugo de milho, doado pela empresa RASUL-Indústria e Comércio de Rações LTDA BR-369, Km 39 - ANDIRÁ - PR - Brasil, para ser utilizado como suporte de baixo custo.

4.2. Métodos

4.2.1. Extração da enzima e dosagem de proteína

Extração da enzima peroxidase da casca da soja (SBP): adicionou-se água destilada na razão de 1:10 (gramas de casca de soja por mL de água miliQ) e em seguida triturou-se em liquidificador por 5 minutos. Após a trituração o extrato foi filtrado em gaze para posterior centrifugação a 4⁰C por 20 minutos a 7.552 g. para retirada de impurezas.

4.2.2. Determinação proteína

A concentração de proteínas nos extratos enzimáticos foram determinadas pelo método de Bradford.⁴

4.2.3. Aminoação da enzima

Aminoação da enzima peroxidase solúvel nativa foi feita com tampão EDA (Etilenodiamina- Sigma)1M a pH 4,75, na razão 1:1, e carbodiimida sólida (Sigma), até concentração final de 10 mM e 50 mM.⁹ O extrato dialisado estará pronto para ser imobilizado nos diferentes suportes.

4.2.4. Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas das peroxidases livres, nativas e aminadas, no processo de imobilização, das peroxidases imobilizadas, como também nos processos de inativação, foram determinadas utilizando-se como substrato 2,5 mL de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfônico) Sigma] 1mM em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; 25 µL de H₂O₂ 100mM em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; 10 µL do extrato enzimático ou 10 µL da suspensão com o derivado enzimático, o acompanhamento da reação foi seguida no espectrofotômetro FEMTO 700S em $\lambda=430$ nm.^{27,35}

As atividades, tanto das peroxidases livres como das imobilizadas, foram realizadas a 25°C e no seu pH ótimo igual a 4,0.

4.2.5. Atividade enzimática específica

A atividade específica das peroxidases foi calculada através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína, coeficiente de extinção molar de 31.100 $M^{-1} L^{-1} cm^{-1}$ para o cátion radical do ABTS⁺.

4.3. Preparação dos suportes e ativação:

Realizou-se um pré-tratamento: para cada 100g de pó de sabugo de milho (SM) adicionou-se 1L de NaOH 2M, mantidos sob agitação suave, por 24 horas, a temperatura ambiente, e após este período, foram filtrados em papel sob vácuo e lavados abundantemente com água destilada. O pó de sabugo de milho foi trabalhado seguindo os mesmos métodos utilizados para os suportes de agarose.¹³ A celulose vegetal do sabugo de milho (SM) apresenta hidroxilas livres reativas, nessas hidroxilas podem ser ligados braços químicos para a imobilização das enzimas, produzindo suportes glioxil-SM.^{13,22} A uma alíquota de 20 g de SM ativado, foi adicionado 6 mL de água milliQ, 9,52 mL de uma solução NaOH 1,7 N, previamente a frio, contendo 0,2714 g de NaBH₄ (boroidreto de sódio) e, sob agitação suave, gotejou-se lentamente 6,86 mL de glicidol (2,3- epóxi-propanol), mantido em banho de gelo. A suspensão manteve-se 18 horas sob suave agitação em recipiente aberto em temperatura de 25⁰C. A suspensão foi filtrada e lavada sob vácuo com água destilada abundantemente. Desta maneira, as matrizes ativadas passam a apresentar grupos ativos gliceril em sua estrutura.

Depois, os grupos gliceril do sabugo de milho foram submetidos à oxidação na presença de periodato de sódio (NaIO₄) 100 mmol. L⁻¹, sob agitação suave, por 90

minutos, reagindo para formação de grupos glioxil(aldeídos). Transcorrido esse tempo, o resíduo obtido foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada.

4.4. Preparo de derivados enzimáticos:

As peroxidases aminadas foram colocadas em contato com os suportes glioxil-SM. Foram utilizados 4 mL das soluções enzimáticas aminadas, com uma concentração de proteína de $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ e diluídas em 16 mL de tampão bicarbonato de sódio $0,1 \text{ M}$ pH 10. Desta solução retirou-se 1 mL como enzima controle, o restante foi adicionado a 2g do suporte. A suspensão foi mantida a 25°C sob agitação constante suave, e em intervalos regulares de tempo foram retiradas duas alíquotas da suspensão, uma para análise da atividade enzimática de peroxidase na suspensão e outra para ser centrifugada e analisar a atividade enzimática de peroxidase no sobrenadante, juntamente com a solução enzimática controle, para acompanhamento das atividades enzimáticas no processo de imobilização. Após o processo de imobilização, aos derivados foi acrescentado boroidreto de sódio (1 mg/mL de suspensão) e mantido por 30 minutos sob agitação suave, para a redução dos grupos ativos remanescentes no suporte e redução das bases de Schiff, após a ligação da enzima. Em seguida, o derivado assim obtido foi lavado com água milliQ e estocado a 4°C . Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.5. Temperatura de inativação:

As temperaturas de inativação foram testadas entre 45°C e 65°C , tanto para as enzimas solúveis como para os derivados, até a inativação do 90% da atividade da enzima. Prepararam-se as amostras suspendendo $0,300 \text{ g}$ do derivado em $3,0 \text{ mL}$ de tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ M}$ e $2,0 \text{ mL}$ dos extratos enzimáticos, colocaram-se as amostras nos diferentes banhos, a cada fração de tempo tomaram-se $10 \mu\text{L}$ das

suspensões para medir a atividade, pelo método descrito para atividade enzimática. Estas atividades foram comparadas contra a atividade inicial a 25°C e expressas em porcentagem.

4.6. pH ótimo do extrato e dos derivados:

Para a determinação das condições ótimas de pH do extrato e os derivados, utilizaram-se tampões citrato de sódio, 0,1M (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0), fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0; 8,0;) e bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0; 10).

4.7. Descoloração do azul de bromofenol:

Os derivados SM-glioxil-peroxidases de casca de soja aminadas e estabilizados foram ensaiados na descoloração do azul de bromofenol. Foram colocados 0,300 g de cada derivado no reator e adicionados 4,0 mL de azul de bromofenol 0,01 mM, acrescentados 100 uL de H₂O₂ 100mM, manteve-se sob agitação suave por 60 minutos, fazendo o acompanhamento de leituras no espectrofotômetro FEMTO 700S cada 10 minutos, em $\lambda=590$ nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais presentes no extrato de casca de soja obtido pela metodologia descrita neste trabalho foi de $0,235 \pm 0,011 \text{ mg mL}^{-1}$, e a atividade específica de peroxidase foi de $86,06 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0. A enzima peroxidase aminada 10 mM manteve-se com 88% da atividade e a aminada 50 mM com 100% da atividade inicial da peroxidase nativa (**Tabela 1**).

A inativação da enzima peroxidase nativa e da aminada 10 mM, à temperatura de 60°C , foi semelhante, mantendo 75% da sua atividade em 120 horas de experimentação, enquanto que a aminada 50 mM, após 120 horas, apresentou apenas 10% da atividade, o que demonstra que a maior aminação altera a estrutura tridimensional da enzima e por este motivo o centro catalítico fica comprometido e a estabilidade da enzima diminui (**Figura 1**).

Tabela 1. Atividade específica recuperada após a aminação da peroxidase da casca da soja.

PEROXIDASES	Atividade específica (%)
Nativa	100
Aminada 10 mM	88
Aminada 50 mM	100

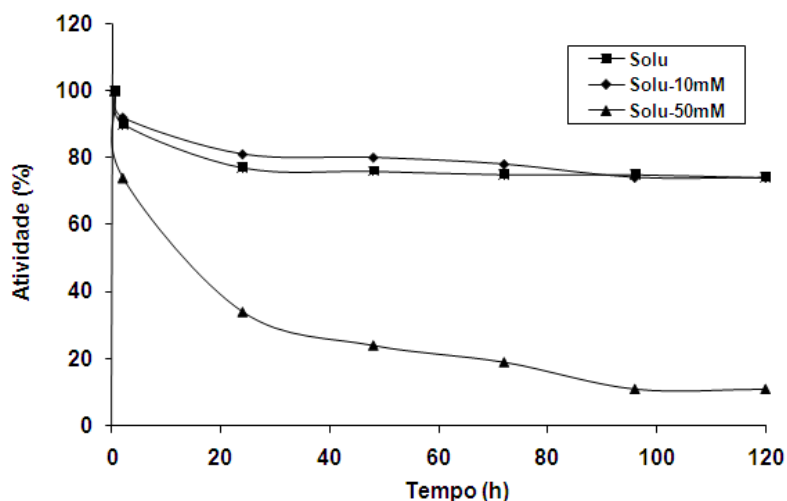


Figura 1. Porcentagem relativa da atividade residual das peroxidases solúveis da soja: ■ nativa; ● aminada 10 mM e ▲ aminada 50 mM, frente a temperatura de 60°C.

Os resultados da imobilização multipontual das peroxidases da casca da soja no suporte sabugo de milho (SM) ativado, apresentados neste trabalho, foram conseguidos seguindo os protocolos descritos por Guisán para agarose-glioxil¹³

Determinou-se que 0,235 mg de proteínas presentes no extrato enzimático, com atividade de peroxidase por grama de suporte ativado, foi a concentração que permitiu a máxima recuperação de atividade. A imobilização covalente multipontual das peroxidases sobre suportes SM-glioxil a pH 10,0 foi desenvolvida através das zonas aminadas da superfície tridimensional. Em pH 10,0, estas amins estão desprotonadas permitindo o ataque nucleofílico dos grupos amino sobre os aldeídos do suporte, formando os derivados - SM-glioxil-NH₂10mM e SM-glioxil-NH₂50mM. Resultados obtidos neste trabalho mostram rendimentos de 74% de imobilização de peroxidase aminada 10 mM e 86% para a aminada 50 mM, sendo que a atividade recuperada foi de 57% e 69% respectivamente, em três horas de processo de imobilização (**Tabela 2**).

Valores similares de imobilização e atividade foram apresentados em outros estudos de imobilização de peroxidases.⁴⁵ Verificou-se que a atividade recuperada do

derivado SM-glioxil-NH₂50mM é 21% maior que o derivado SM-glioxil-NH₂10mM. Este fato deve-se ao processo de aminação dos grupos glutamatos e aspartatos da enzima nativa, que aumentam o número de aminas na superfície da enzima, e consequentemente elevam o número de ligações peptídicas entre a enzima e o suporte SM-glioxil (**Tabela 2**). Caso similar acontece quando às enzimas são adicionadas cadeias de histidinas.²⁶

Tabela 2. Porcentagem das atividades enzimática nos diferentes passos do processo de imobilização das peroxidases da soja aminadas no suporte SM-glioxil

Derivado	imobilizado	suspensão	recuperado
	%	%	%
SM-Gli-NH ₂ 10 mM	74	76	57
SM-Gli-NH ₂ 50 mM	86	70	69

SM-Gli-S-NH₂ 10 mM Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte sabugo de milho
 SM-Gli-S-NH₂ 50 mM Peroxidase da soja aminada 50 mM imobilizada em suporte sabugo de milho

Foi possível observar que o derivado SM-glioxil-peroxidase aminada com 10 mM, foi o que apresentou melhor estabilidade, a 60 °C por um período de 120 horas, mantendo 92% da atividade inicial, enquanto que o derivado com a enzima aminada 50mM manteve 66% da atividade inicial. A peroxidase de soja com maior grau de aminação ligou-se ao suporte com alta afinidade e velocidade, formando desta forma, maior número de enlaces covalentes. Entretanto a estabilidade foi menor, provavelmente pela mudança conformacional espacial nativa, o que leva a uma estrutura um pouco mais rígida, motivo pelo qual o centro catalítico pode estar comprometido (**Figura 2**).

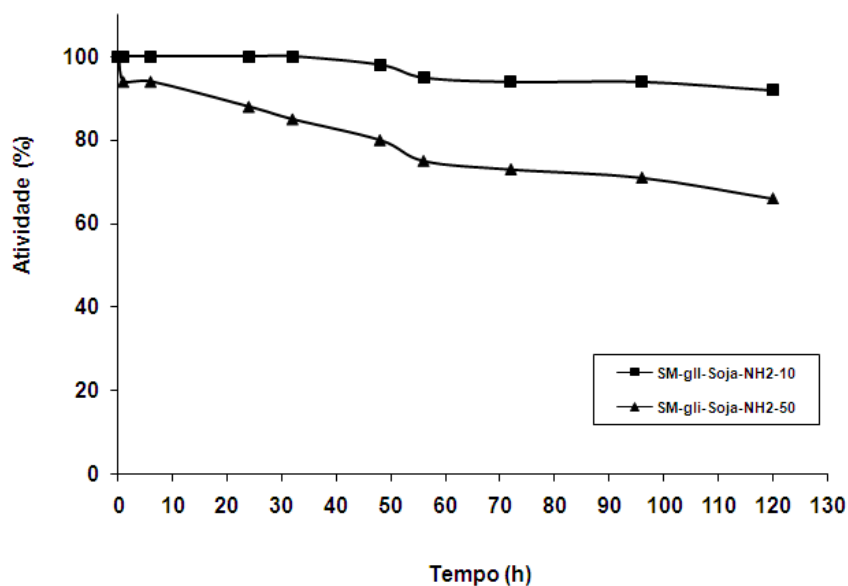


Figura 2. Porcentagem relativa da atividade residual dos derivados SM-glioxil-peroxidases: ■ aminada 10 mM e ▲ minada 50 mM, frente a temperatura de 60°C.

A inativação da peroxidase nativa, aminadas e dos derivados obtidos, frente a distintos pHs, foi ensaiada por um período de 120 horas. Nestes experimentos, podemos observar que o derivado com a enzima aminada 10 mM foi o melhor, retendo aproximadamente 100% da atividade inicial nos pHs entre 3 e 10, enquanto que o derivado da peroxidase aminada 50 mM, reteve atividades nos pHs 3 e 10 acima de 90% e ao redor de 80% nos pHs 5 e 7 (**Tabela 3**). A aminação da enzima se fez necessária e propiciou a ligação da enzima ao suporte, enquanto que não foi possível a obtenção de imobilização ao se utilizar a enzima nativa, embora tenham sido experimentados suportes ativados diferentemente.

Tabela 3. Porcentagens relativa da atividade residual das peroxidases da casca de soja nativa, aminadas e imobilizadas, frente a diferentes pHs em 120 horas de tratamento.

Forma	pH 3	pH 5	pH 7	pH 10
Nativa	76	67	100	100
Aminada 10 mM	76	90	95	92
SM-Gli-NH ₂ 10 mM	96	95	100	100
Aminada 50 mM	67	100	100	95
SM-Gli-NH ₂ 50 mM	96	82	81	91

SM-Gli-S-NH₂ 10 mM Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte sabugo de milho

SM-Gli-S-NH₂ 50 mM Peroxidase da soja aminada 50 mM imobilizada em suporte sabugo de milho

Na **tabela 4** são apresentados resultados de descoloração do azul de bromofenol, utilizando derivados estabilizados, sob agitação suave por 60 minutos, na qual se observa descoloração de 85% com o derivado SM-glioxil-peroxidase aminada 10 mM e 89 % com o derivado SM-glioxil-peroxidase aminada 50 mM. Os derivados estabilizados foram reutilizados em cinco ciclos, e os resultados mostraram que por três ciclos a atividade mantém-se ao redor de 60%. Após o terceiro ciclo, os derivados diminuem a atividade de descoloração, provavelmente reduzindo sua capacidade enzimática de descoloração, esta perda acontece uma vez que os polímeros formados no processo de descoloração são adsorvidos á enzima.^{28,38}

Tabela 4. Porcentagens de descoloração do azul de bromofenol 0,02mM, com os derivados SM-glioxil-peroxidases aminadas 10 mM e 50 mM, em presença de H₂O₂, em 5 ciclos de 60 minutos.

Derivado/ciclos	1°	2°	3°	4°	5°
SM-Gli-NH ₂ 10 mM	85	76	57	41	10
SM-Gli-NH ₂ 50 mM	89	89	65	47	10

SM-Gli-S-NH₂ 10 mM Peroxidase da soja aminada 10mM imobilizada em suporte sabugo de milho

SM-Gli-S-NH₂ 50 mM Peroxidase da soja aminada 50 mM imobilizada em suporte sabugo de milho

Os dois derivados obtidos neste trabalho, têm a mesma capacidade e tendência de descolorar o azul de bromofenol, por processos de oxido-redução.^{1,6,10} Valores similares foram obtidos com a enzima peroxidase do chayote,⁴⁵ aplicada na remoção dos corantes têxteis que também são de natureza poliazó, demonstrando a capacidade e velocidade que têm estas enzimas para atuar na oxidação dos grupos fenólicos. O tratamento enzimático oferece um alto grau de especificidade, operações sob condições suaves e alta velocidade de reação.^{6,10,18,32,39,45}

As peroxidases são utilizadas para o tratamento de compostos aromáticos contaminantes em águas provenientes de diferentes fontes. Principalmente a peroxidase de rabanete (HRP) tem sido usada para a remoção de contaminantes fenólicos, assim como também são capazes de remover anilinas aromáticas, hidroxiquinoleína e carcinogênicos como benzidinas y naftilaminas.^{16,29,39,46} Mas, por ser uma enzima de importância, seu custo comercial é alto. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a possibilidade de utilização dos derivados SM-glioxil-peroxidase da casca de soja aminadas, com ciclos de pelo menos de três vezes, diminuindo os custos da aplicação de enzimas.

6. CONCLUSÕES

O resultado principal deste estudo foi imobilizar a peroxidase de casca de soja multipontualmente no suporte SM-glioxil. Os derivados estabilizados das peroxidases aminadas mostraram propriedades catalíticas muito similares às suas correspondentes enzimas solúveis nativas. Os dois derivados obtidos, SM-glioxil-peroxidases da soja aminadas, apresentaram ótimas atividades no processo de descoloração do azul de bromofenol, demonstrando-nos que poderão ser utilizados no tratamento de efluentes ou águas contaminadas que contenham fenóis ou grupos fenólicos, pela facilidade do seu alto grau oxidante na presença de H_2O_2 .

Este trabalho demonstra que a enzima peroxidase da casca de soja imobilizada em pó de sabugo de milho altamente ativado, é uma excelente alternativa, de baixo custo, e com grande viabilidade para ser usada em lugar da peroxidase de rabanete não imobilizada, uma vez que os derivados obtidos apresentaram ótima estabilidade frente a temperaturas e pHs extremos. Além do tratamento de águas residuais oriundas de processos industriais, poderá ser utilizada também em kits de diagnósticos substituindo os que usam a peroxidase do rabanete (HRP).

7. AGRADECIMENTOS

CAPES, FUNDACIÓN CAROLINA, FUNDUNESP

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALARCON, B. et al. O pka de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.
2. ARSLAN, F. et al. The effect of gel composition on the adsorption of invertase on poly(acrylamide/maleic acid) hydrogels. **Food Chem.**, v. 70, p. 33-38, 2000.
3. BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydrite reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366, 1989.
4. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
5. BRUNETTI, I. L.; FARIA, O.M.N. Sistemas quimioluminescentes com peroxidases (EC.1.11.1.7) e suas aplicações. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.
6. DAVIS, S.; BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Biodegradation**, v.5, p.13. 1994.
7. DUARTE M. et al. Renoval of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. **J. of Chem Technol and Biotechnol**, v.78, n1, p.43-45, 2002.
8. DUNFORD, H.B.; STILLMAN, J.S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, p. 187-251, 1976.
9. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RESELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; GUISÁN, J.M. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 517-523, 1995.
10. FERRER, I. et al. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.577. 1991.
11. GILLIKIN, J.W.; GRAHAM, J.S. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidases from the seed coat of Glycine max. **Plant Physiol**, v. 96, p. 214-220, 1991.
12. GOULART, A.J. et al. Multipoint Immobilization of invertase on Agarose: Stability and Kinetic Properties. Current Trends in **Biotechnolo and Pharma**, v.2, n.3, p 462-470, 2008.

13. GUIŚÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375- 382. 1988.
14. GUIŚÁN, J. M. et al. **Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose – Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment**. In: Immobilization of enzymes and cells. BICKERSTAFF, G. F. Totowa: Humana Press, v.31, p.277-287, 1997.
15. GUIŚÁN, J.M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge. In: GUIŚÁN, J.M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 1 13.
16. KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.
17. KENNEDY, K.; ALEMANY, K.; WARITH, M. Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorephenol. **Water Research**, v. 28, p. 149-158, 2002.
18. KINSLEY, C.; NICELL, J.A. Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 139-146, 2000.
19. KLIBANOV, A.M.; TU, T.M.; SCOTT, K.P. Peroxidase catalyzed removal of phenols from coal conversion waste waters. **Science**, v. 221, p. 259- 261, 1983.
20. LÓPEZ-GALLEGO, et al., R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, p. 1-10, 2005.
21. MARQUES, D. P. et al. Hydrolysis of protein by immobilized and stabilized trypsin. **Biotechnol. Prog** v.27, n.3, p.677-683, 2011.
22. MATEO, C. et al. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnol Prog**, v. 18, p. 629-634, 2002.
23. MATEO, C. et al. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition of promoted by glucose: Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnol. Prog**. v.20, p.1259-1262, 2004.
24. MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert y hydrophilic support for immobilization y high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280. 2006
25. MATHEUS, P.R. et al. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro

modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). **Avances en Química**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009.

26. McELDOON, J. P.; DORDICK, J. S. Unusual Thermal Stability of Soybean Peroxidase. **Biotechnol. Prog.** v. 12, n. 4, p. 555–558, 1996.

27. MUÑOZ, C. et al. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p. 2166-2174, 1997.

28. NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. **Water Research.**, v. 26, n. 1, p. 49-54, 1992.

29. NICELL, J.A. et al. Reactor development for peroxidases catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, v. 27, p. 1629-1639, 1993.

30. O'BRIEN, P. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.

31. Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization: recent experimental progress. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, p. 137-149, 2003.

32. ORTEGA TOVAR M. A. **Eliminación de compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. var. Purple top white globe)**. Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos., UAQ-Querétaro México, 2001.

33. PAULA, F.C. et al. Screening of supports for *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* inulinase immobilization. **Current Trends in Biotechnol and Pharma**, v.1, n.1, p. 34-40, 2007.

34. PAULA, F.C. et al. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Food Chemistry**. v.111, p. 691-695, 2008.

35. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

36. REED, G. Peroxidase. In: **Enzymes in food processing**. Academic Press, New York, 1975, p. 243–7.

37. REGALADO, C.; GARCÍA, B.; DUARTE, M. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**. v.3, n. 1, p. 243-256, 2004.

38. ROJAS, M. F. et al. Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. **Proc. Bioche.**, v. 39, p. 1455–1464, 2004.

39. SIDDIQUE, M. H. et al. Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. **Wat. Res.**, v. 27, p.883, 1993.
40. TARDIOLI, P. W. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 352-360, 2003.
41. Tavano, O.L. et al. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnol**, v. 22, p. 262-275, 2008.
42. TITA, S.P.S.; PAIVA, J.M.F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia**, v. 12, n 4, p. 228-239, 2002.
43. TSAI, W.T.; CHANG, C.Y.; WANG, S.Y.; CHANG,C.F.; CHIEN, S.F.; SUN, H.F. Preparation of activated carbons form corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresouce Technology**, v. 78, p. 203-208, 2000.
44. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, F. O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v. 52, n. 4, p. 681-689, 2000.
45. VILLEGAS-ROSAS, M.L.O. et al. Inmovilización de una peroxidasa de chayote [*sechium edule* (jacq.) sw] y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 19, n. 2, p. 73-81, 2003.
46. WRIGHT, H.; NICELL, A. Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 69-79, 1999.
47. ZIGLIO, B.R. et al. Elaborações de pães com sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, p. 117-128, 2007.

Capítulo IV

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL DA PEROXIDASE AMINADA
DO CHUCHU EM SUPORTE PÓ DE SABUGO DE MILHO ATIVADO

IMOBILIZAÇÃO MULTIPONTUAL DA PEROXIDASE AMINADA DO CHUCHU EM SUPORTE PÓ DE SABUGO DE MILHO ATIVADO

VINUEZA, J.C. (PG)⁽¹⁾; SANTOS, A.(PG)⁽²⁾; MONTI, R. (PQ)⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara – Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

⁽²⁾Universidade Estadual Paulista – Campus Araraquara – Instituto de Química

1. RESUMO

As peroxidases são hemoproteínas que catalisam reações de oxidação e redução de substâncias orgânicas e inorgânicas utilizando peróxido de hidrogênio. Durante a oxidação, são gerados radicais livres, que formam produtos poliaromáticos insolúveis em água, o que facilita sua remoção do meio aquoso. O objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar parcialmente a peroxidase do chuchu (*Secchium edule* L.), imobilizar no suporte pó de sabugo de milho e descolorir o azul de bromofenol. A quantidade de proteínas no extrato foi determinada por Bradford. A aminação das peroxidases solúveis foram feitas com EDA e carbodiimida, 10 mM e 50 mM. Determinou-se a atividade enzimática com ABTS 1 mM em presença de H₂O₂ 100 mM em $\lambda = 430$ nm. Funcionalização do sabugo de milho e imobilização covalente multipontual foi a metodologia utilizada para agarose (Guisán)¹². Descoloração do azul de bromofenol, utilizando os derivados em presença de H₂O₂ em $\lambda = 590$ nm. A atividade específica da peroxidase do chuchu foi 9,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ em pH 4,0, a peroxidase aminada 10 mM manteve 88% da atividade e a aminada 50 mM 52% da atividade. As peroxidases aminadas 10 e 50 mM foram imobilizadas covalentemente no suporte ativado de sabugo de milho-glioxil, com atividade recuperada de 85% e 100%, respectivamente. Utilizando os derivados obtidos na descoloração do azul de bromofenol 0,01 mM, obteve-se em 60 min, 70% de descoloração com o derivado da peroxidase aminada 10 mM e 51 % para o derivado com a peroxidase aminada 50 mM. A peroxidase do chuchu é uma alternativa de baixo custo, não só para o tratamento de águas residuais como também em outros processos industriais.

Palavras-chave: Peroxidases, imobilização, multipontual, pó de sabugo de milho

2. ABSTRACT

The peroxidases are hemoproteins that catalyze oxidation-reduction reactions of organic and inorganic substances, using hydrogen peroxide and during the oxidation are generated free radicals, forming poly-aromatic products insoluble in water, facilitating its removal from aqueous medium. The objective of this study was to extract and partial characterize the chayote peroxidase (*Sechium edule* L.), immobilize on corncob powder support and discolor the bromophenol blue. The amount of protein in the extract was determined by Bradford methods. The peroxidases soluble aminations were made with EDA and carbodiimide, 10 mM e 50 mM. The enzymatic activity was determined with ABTS 1 mM in the presence of H₂O₂ 100 mM in $\lambda=430$ nm. The functionalization of the corncob powder and multipoint covalent immobilization was the agarose methodology (Guisan)¹² The discoloration of bromophenol blue was carried on using derivatives in the H₂O₂ presence in $\lambda= 590$ nm. The specific activity of chayote peroxidase was 9,04 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ in pH 4,0, the amino peroxidase 10 mM maintained 88% of the activity and the amino peroxidase 50 mM 52% of the activity. The amino peroxidases 10 and 50 mM were covalently immobilized on the support SM-glixil activated, with activity recovered of the 85% and 100% respectively. Using the derivatives obtained in the discoloration of bromophenol blue 0,01 mM, obtained in 60 min, 70% of discoloration with the derived amino peroxidase 10 mM and 51 % with the derived amino peroxidase 50 mM. The peroxidase chayote is a low cost alternative, not only for the treatment of wastewater but also for other industrial processes.

Keywords: Peroxidases, multipoint immobilization, corncob powdered

3. INTRODUÇÃO

As peroxidases são hemoproteínas que catalisam reações de oxidação-redução de substâncias orgânicas e inorgânicas utilizando peróxido de hidrogênio. Estas enzimas contém ferriprotoporfirina IX como grupo prostético, sua massa molar varia de 30 a 150 kDa. O termo “peroxidase” abrange enzimas específicas como NADH peroxidase (EC 1.11.1.1) e glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9), bem como enzimas não específicas, simplesmente definidas como peroxidases.¹⁵ As peroxidases classificadas como E.C. 1.11.1.7 são encontradas tanto em animais como em vegetais.^{5,7,35} Para as plantas, estas enzimas desempenham várias funções como: defesa contra patógenos e estresse

mecânico, biossíntese e degradação de lignina, remoção de peróxido de hidrogênio e oxidação de xenobióticos tóxicos.²⁸ As peroxidases vegetais, como a peroxidase do rabanete (HRP), possuem aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos com um agrupamento heme ligados não covalentemente em sua estrutura protéica, com uma massa molecular de 44 kDa, enquanto que as peroxidases de mamíferos são muito maiores (576-783 resíduos de aminoácidos) e apresentam o agrupamento heme ligado covalentemente a estrutura protéica.²⁸

A capacidade de redução de peróxidos por substratos doadores de elétrons torna as peroxidases úteis em várias aplicações industriais e analíticas.^{8,36} A maioria dos trabalhos aponta para o uso da peroxidase do rabanete (HRP)^{10,23,25,37} na detoxificação de águas contaminadas, principalmente por compostos fenólicos e clorados. Porém, atualmente, a peroxidase do chuchu ou chayote tem-se mostrado uma alternativa.^{2,44,}

O chayote (*Sechium edule L.*) é uma espécie nativa da América Central, especificamente do sul do México e Guatemala, países nos quais se encontra a maior diversidade genética e a presença de materiais em estado silvestre. Pode se encontrar amplamente distribuído em uma variedade ampla de altitude, desde o nível do mar até mais de 2.000 m sobre o nível do mar. Também é reconhecido que o fruto foi importante na alimentação das culturas pré-colombinas que habitaram México e Guatemala.

O Estado de São Paulo produz por ano 100.000 toneladas de chuchu (chayote), em 2.000 hectares de plantio, distribuído por 21 regiões agrícolas e 56 municípios. A produção está bem concentrada nas regiões agrícolas de Bragança Paulista, São Paulo e Registro. Em cada uma dessas regiões, os municípios que são os grandes produtores são: Amparo na Região Agrícola de Bragança Paulista, Iguape em Registro e São Paulo na Região Agrícola de São Paulo, que juntos concentram 77% da produção paulista.³³

A atividade industrial desenvolvida pelo homem faz com que grandes quantidades de compostos tóxicos sejam eliminadas afetando à flora e fauna das regiões envolvidas. Os compostos aromáticos, tais como o fenol e seus derivados, são a maior classe de agentes contaminantes em águas residuais de várias indústrias químicas e de alimentos.^{7,17,25,27} Um dos métodos para sua remoção inclui a polimerização usando enzimas redox, na presença de H₂O₂, que age como receptor de elétrons. As peroxidases podem catalisar a polimerização oxidativa destes fenóis, anilinas e outros aromáticos, em oligômeros insolúveis,⁸ que por sua vez podem ser removidos usando simples sedimentação ou sistemas de filtração.¹⁷

Com a peroxidase do chayote tem sido possível eliminar fenol e alguns dos seus derivados de águas artificialmente contaminadas a baixas concentrações,⁴¹ isto nos motiva a utilizá-la na eliminação de compostos mais complexos, como são os corantes de tecidos, os quais podem ser potencialmente perigosos devido seu alto grau de toxicidade ao serem degradados no ambiente.

A utilização de enzimas imobilizadas em diferentes suportes está descrita na literatura e, geralmente, apresenta vantagens operacionais como: possibilidade de reutilização nas reações em batelada ou contínua; rápida interrupção da hidrólise; formação controlada; e fácil separação do produto.^{2,11,14,19,21,31,32,40,41,44} No entanto, não existe um método ideal de imobilização enzimática. Ligações covalentes multipontuais podem aumentar a rigidez da molécula da enzima imobilizada, e ainda induzir a uma maior resistência às pequenas alterações conformacionais causadas por temperaturas elevadas, por solventes orgânicos, por agentes desnaturantes, entre outros.³⁹ Existem estratégias que permitem imobilizar proteínas multipontualmente por três vias diferentes de resíduos: amino-terminal, resíduos de lisina e grupos carboxílicos. Estes estudos tiveram início com o pesquisador Dr. José Manuel Guisan, na Espanha, em 1988. Essas

transformações químicas não são possibilidades exclusivas da agarose, podendo ser realizadas em outros tipos de suporte.^{13,18,43,44}

Sobre os suportes agarose-glioxil, a imobilização ocorre através das regiões da superfície da enzima, que possui maior densidade de grupos amino primários, e não através do grupo amino mais reativo, como ocorre na maioria das outras técnicas de imobilização.²² Para que ocorra a imobilização, faz-se reagir os grupos amino primários da proteína com o suporte agarose previamente ativado, de modo que na superfície apresentem uma mono-capa de aldeídos ligeiramente afastados da parede do suporte e totalmente expostos ao meio reacional.¹² Em um primeiro passo, ocorre a formação de enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre os ϵ -NH₂ das lisinas e os grupos aldeídos do suporte. Os aminoácidos lisinas são normalmente abundantes na superfície protéica, quando estão expostos ao meio e, quando estão desprotonados, são muito reativos como nucleófilos. Para que ocorra esta reação, torna-se necessário trabalhar com pH próximo ou superior ao pKa dos grupos ϵ -NH₃⁺ (pH 10.05). Esta primeira interação entre a enzima e o suporte ocorre pelo menos através de dois pontos e a enzima deve se auto-orientar rumo ao suporte para sua região mais rica em grupos amino reativos.²² Isto leva a formação de uma união fraca e reversível. Em um seguinte passo, reduzem-se as bases de Schiff a enlaces amino secundários com boroidreto de sódio. Esta redução permite, além de estabilizar o enlace enzima-suporte, converter todos os grupos aldeído remanescentes em grupos hidroxilas, dando lugar a uma matriz inerte e hidrofílica.³ Segundo Guisan, quando não se faz o bloqueio dos grupos reativos remanescentes, poderá ocorrer um número de reações indesejadas ou não controladas, de tal forma que desestabiliza a proteína, o que leva à inativação da enzima.²⁰

O sabugo de milho é a parte central da espiga na qual os grãos estão presos, que é o resíduo gerado após o milho ser debulhado. Para cada 100 kg de espigas de milho,

aproximadamente 18 kg (70% base úmida) são formados pelo sabugo.⁴² Estruturalmente, o sabugo é formado por quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. A palha fina constitui, aproximadamente, 4,1% do sabugo de milho em peso; a palha grossa, 33,7%; o anel lenhoso, 60,3%; e a medula, 1,9%. Todo esse material, depois de moído, transforma-se no pó de sabugo de milho.⁴⁵

As fibras lignocelulósicas apresentam hidroxilas reativas acessíveis, podendo reagir com outros grupos funcionais polares como, por exemplo, os presentes nas resinas fenólicas.⁴¹ Pelo fato do pó de sabugo de milho apresentar hidroxilas livres reativas, o que favorece ligações de braços químicos imprescindíveis na imobilização de enzimas, é possível produzir suportes pó de sabugo de milho-glioxil.^{12,20}

A estrutura terciária das enzimas pode ser submetida a modificações químicas nos grupos carboxílicos de superfície (carboxil terminal, ácido aspártico e ácido glutâmico) com 1-etil-3-(dimetilamino-propil) carbodiimida (EDAC), na presença de etilenodiamina (EDA), promovendo estabilização. Nesta reação, ocorre a formação de uma amida entre o grupo carboxílico ativado da proteína e o grupo amino do EDA, formando um grupo amino primário livre. Este novo grupo amino apresenta um valor de pka ao redor de 9,2, sendo mais reativo que os grupos amino dos resíduos de lisina da superfície da proteína. Além disso, o grau de modificação pode ser controlado pela concentração de EDAC usado durante a reação.^{18,29}

Devido a uma ampla utilização das peroxidases em diversos setores industriais, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo principal, extrair a peroxidase do chuchu (Chayote), e imobilizar multipontual e covalentemente em suporte pó de sabugo de milho e ensaiar a descoloração do azul de bromofenol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material:

Extrato enzimático do chuchu. Pó de sabugo de milho ativado, doado pela empresa RASUL-Indústria e Comércio de Rações LTDA BR-369, Km 39 - ANDIRÁ - PR - Brasil, para ser utilizado como suporte de baixo custo.

4.2. Métodos:

4.2.1. Extração da enzima e dosagem de proteína:

Cortou-se o chuchu em cubos pequenos de 2 cm por lado, triturou-se em liquidificador por 5 minutos, filtrou-se e recolheu-se o filtrado para posterior centrifugação a 4^oC, por 20 minutos, a 7.552, para retirada de impurezas.

4.2.2. Determinação da proteína

A concentração de proteínas nos extratos enzimáticos foram determinadas pelo método de Bradford.⁴

4.2.3. Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas das peroxidases livres e imobilizadas foram determinadas utilizando-se como substrato 2,5 mL de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etil benzotiazolina-6-sulfônico) Sigma] 1 mM em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; 25 µL de H₂O₂ 100mM em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,0; 10 µL do extrato enzimático ou 10 µL da suspensão com o derivado enzimático, o acompanhamento da reação foi seguida no espectrofotômetro FEMTO 700S em $\lambda=430$ nm.^{24,34}

As atividades tanto das peroxidases livres como das imobilizadas foram realizadas a 25°C e no seu pH ótimo igual a 4,0.

4.2.4. Atividade enzimática específica

A atividade específica das peroxidases foi calculada através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína, coeficiente de extinção molar de 31.100 $M^{-1} L^{-1} cm^{-1}$ para o cátion radical do ABTS⁺.

4.2.5. Aminoação da enzima

A aminoação das enzimas peroxidases solúveis nativas foram feitas com solução EDA (Etilenodiamina- Sigma) 1M a pH 4,75, na razão 1:1 (mililitros do extrato enzimático por mililitros de solução de EDA), e carbodiimida sólida (Sigma), em diferentes concentrações de 10 mM e 50 mM, então, a solução foi dialisada com água destilada por 18 horas a 4°C. O extrato dialisado estará pronto para ser imobilizado nos diferentes suportes.⁹

4.3. Preparação dos suportes e ativação

A funcionalização do pó de sabugo de milho foi idêntica a utilizada para os suportes de agarose.¹² À uma alíquota de 20 g de sabugo de milho (SM), foi adicionado 6 mL de água milliQ, 9,52 mL de uma solução NaOH 1,7 N, previamente a frio, contendo 0,2714 g de NaBH₄ (boridreto de sódio) e, sob agitação suave, gotejou-se lentamente 6,86 mL de glicidol (2,3- epóxi-propanol), mantido em banho de gelo. A suspensão manteve-se 18 horas sob suave agitação em recipiente aberto, em temperatura de 25°C. A suspensão foi filtrada e lavada sob vácuo com água destilada

abundantemente. Desta maneira, as matrizes ativadas passam a apresentar grupos ativos gliceril em sua estrutura.

Depois, estas foram submetidas à oxidação na presença de periodato de sódio (NaIO_4) 100 mmol. L^{-1} , sob agitação suave, por 90 minutos, reagindo para formação de grupos glioxil(aldeídos). Transcorrido esse tempo, o resíduo funcionalizado foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada.

4.4. Preparo de derivados enzimáticos

As peroxidases aminadas foram colocadas em contato com o suporte glioxil-SM. Foram utilizados 4 mL ($0,15 \text{ mg mL}^{-1}$) das soluções enzimáticas diluídas em 16 mL de tampão bicarbonato de sódio $0,1 \text{ M}$ pH 10. Desta solução, retirou-se 1 mL como enzima controle, o restante foi adicionado a 2 g do suporte SM-glioxil. A suspensão foi mantida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sob constante agitação suave, e em intervalos regulares de tempo foram retiradas duas alíquotas da suspensão, uma para análise da atividade enzimática de peroxidase na suspensão e outra para ser centrifugada e analisar a atividade enzimática de peroxidase no sobrenadante, juntamente com a solução enzimática controle, para acompanhamento das atividades enzimáticas no processo de imobilização. Após o processo de imobilização, aos derivados foram acrescentados boroidreto de sódio (1 mg/mL de suspensão) e mantidos por 30 minutos sob agitação suave, para redução dos grupos ativados remanescentes no suporte, após a ligação da enzima. Em seguida, os derivados assim obtidos foram lavados com água milliQ e estocados a 4°C . Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.5. Descoloração do azul de bromofenol

Foram usados 0,300 g dos derivados SM-glioxil-peroxidase do chuchu aminado e estabilizados, na descoloração de 4,0 mL de azul de bromofenol 0,01mM, em presença de 100 uL de H₂O₂ 100 mM, sob agitação suave por 60 minutos, fazendo o acompanhamento de leituras no espectrofotômetro FEMTO 700S em $\lambda=590$ nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.6. Temperatura de inativação

As temperaturas de inativação foram testadas entre 45°C e 65°C , tanto para as enzimas solúveis como para os derivados, até a inativação do 90% da atividade da enzima. Prepararam-se as amostras suspendendo 0,300 g do derivado em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M e 2,0 mL dos extratos enzimáticos, colocaram-se as amostras nos diferentes banhos, a cada fração de tempo tomaram-se 10 μ L das suspensões para medir a atividade, pelo método descrito para atividade enzimática. Estas atividades foram comparadas contra a atividade inicial a 25°C e expressas em porcentagem.

4.7. pH ótimo do extrato e dos derivados

Para a determinação das condições ótimas de pH do extrato e os derivados, utilizaram-se tampões citrato de sódio, 0,1M (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0), fosfato de sódio 0,1M (pH 7,0; 8,0;) e bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0; 10).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de proteínas totais presentes no extrato do chuchu obtido pela metodologia descrita neste trabalho foi de $0,290\pm 0,011$ mg mL⁻¹, e a atividade

específica de peroxidase foi de $9,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0. A enzima peroxidase aminada 10 mM manteve-se com 88% da atividade e a aminada 50 mM com 52% da atividade inicial da peroxidase nativa (**Tabela 1**).

Tabela 1. Porcentagem da atividade específica recuperada depois da aaminação da peroxidase do chuchu

PEROXIDASES	Atividade específica (%)
Nativa	100
Aminada 10 mM	88
Aminada 50 mM	52

A inativação da enzima nativa a 45°C de temperatura manteve o 54% da sua atividade inicial em 120 horas de experimentação, enquanto que a aminada 10 mM nas 120 horas caiu para 22% da atividade e a aminada 50 mM perdeu toda a sua atividade, o que demonstra que a aaminação muito forte altera a estabilidade da enzima (**Figura 1**).

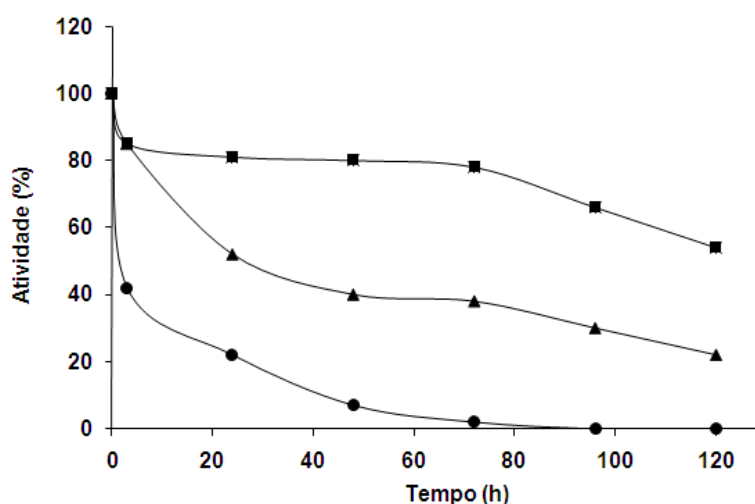


Figura 1. Porcentagem relativa da atividade residual das peroxidases do chuchu solúveis: ■ nativa; ▲ aminada 10 mM; ● aminada 50 mM, frente a 45°C de temperatura.

Determinou-se que 0,30 mg de proteínas presentes no extrato enzimático, com atividade de peroxidase por grama de suporte ativado, foi a concentração que permitiu a máxima recuperação de atividade. A imobilização covalente multipontual das peroxidases sobre suportes SM-glioxil a pH 10,0 foi desenvolvida através das zonas aminadas da superfície tridimensional. Em pH 10,0, estas amins estão desprotonadas, permitindo o ataque nucleofílico dos grupos amino sobre os aldeídos do suporte, e formam os derivados (SM-glioxil-NH₂10mM e SM-glioxil-NH₂50mM). Os resultados obtidos neste trabalho mostram rendimentos de 72% de imobilização de peroxidase aminada 10 mM e 96% para a aminada 50 mM, sendo que a atividade recuperada foi de 85% e 100%, respectivamente, em três horas de processo de imobilização (**Tabela 2**).

Valores similares de imobilização e atividade foram apresentados em outros estudos de imobilização de peroxidases.⁴⁴ Verificou-se que a atividade recuperada do derivado SM-glioxil-NH₂50mM foi 15 % maior que o derivado SM-glioxil-NH₂10mM. Este fato deve-se ao processo de aminação dos grupos glutamatos e aspartatos da enzima nativa, aumentando o número de amins na superfície da enzima, conseqüentemente elevando o número de ligações peptídicas entre a enzima e o suporte SM-glioxil (**Tabela 2**).

Tabela 2. Porcentagens de atividade enzimática no processo de imobilização das peroxidases aminadas da soja no suporte SM-glioxil

IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DO CHUCHU

Derivado	% de imobilização	% suspensão	% recuperado
SM-Gli-Ch-NH ₂ 10 mM	72	85	85
SM-Gli-Ch-NH ₂ 50 mM	96	90	100

SM-Gli-Ch-NH₂ 10 mM: Peroxidase do chuchu aminada 10 mM, imobilizada em sabugo de milho

SM-Gli-Ch-NH₂ 50 mM: Peroxidase do chuchu aminada 10 mM, imobilizada em sabugo de milho

Foi possível observar que o derivado SM-glioxil-peroxidase aminada com 10 mM de carbodiimida foi o que apresentou melhor estabilidade, a 45°C, por um período de 120 horas, mantendo 51 % da atividade inicial, enquanto que o derivado com a enzima aminada 50 mM manteve 38 % da atividade inicial. Podemos observar que as peroxidases aminadas e imobilizadas tiveram uma maior estabilidade que as respectivas solúveis. A peroxidase do chuchu com maior grau de aminação ligou-se ao suporte com alta afinidade e velocidade, formando desta forma, maior número de enlaces covalentes. Entretanto, a estabilidade foi menor, provavelmente pela mudança conformacional espacial nativa, levando a uma estrutura um pouco mais rígida, motivo pelo qual o centro catalítico pode estar comprometido (**Figura 2**).

A inativação da peroxidase nativa, aminadas e dos derivados obtidos, frente a distintos pHs, foi ensaiada por um período de 120 horas. Nestes experimentos, podemos observar que o derivado com a enzima aminada 50 mM foi o melhor, retendo 100% da atividade inicial nos pHs entre 5,0 a 10,0, e melhorando a estabilidade no pH 3,0 em 60% ao ser comparada com a solúvel, enquanto que o derivado da peroxidase aminada 10 mM reteve atividades nos pHs 3,0 a 10,0 acima de 63% (**Tabela3**). A aminação da enzima se fez necessário e propiciou a ligação da enzima ao suporte, enquanto que não foi possível a obtenção de imobilização, quando utilizou-se a enzima nativa, embora tenham sido experimentados suportes ativados diferentemente.

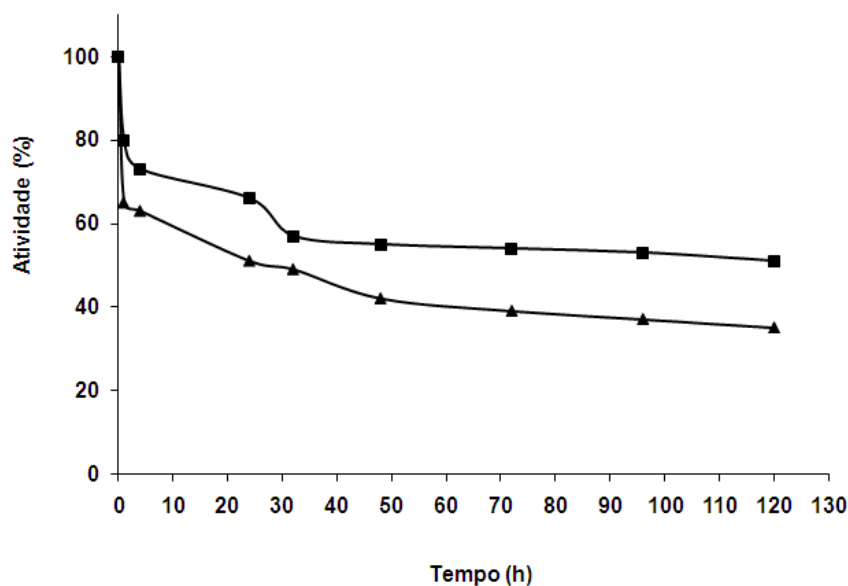


Figura 2. Porcentagem relativa da atividade residual dos derivados SM-glioxil das peroxidases aminadas do chuchu: ■ aminada 10 mM e ▲ aminada 50 mM, frente a 45°C de temperatura.

Tabela 3. Porcentagem relativa da atividade residual das peroxidases nativa, aminadas e imobilizadas do chuchu, frente a diferentes pHs, em 96 horas de tratamento.

PORCENTAGEM RELATIVA DA ACTIVIDADE RESIDUAL

	pH3	pH5	pH7	pH10
Nativa	18	64	17	82
Aminada 10 mM	17	42	66	63
SM-Gli-NH ₂ 10 mM	63	73	63	67
Aminada 50 mM	8	77	58	49
SM-Gli-NH ₂ 50 mM	77	100	100	100

SM-Gli-Ch-NH₂ 10 mM: Peroxidase do chuchu aminada 10 mM, imobilizada em sabugo de milho

SM-Gli-Ch-NH₂ 50 mM: Peroxidase do chuchu aminada 10 mM, imobilizada em sabugo de milho

Na **tabela 4** são apresentados resultados de descoloração do azul de bromofenol, utilizando derivados estabilizados, sob agitação suave por 60 minutos, na qual observa-se descoloração de 70% com o derivado SM-glioxil-peroxidase aminada 10 mM e 51%

com o derivado SM-glioxil-peroxidase aminada 50mM. Os derivados estabilizados foram reutilizados em cinco ciclos, e os resultados mostraram que por três ciclos a atividade mantém-se ao redor de 27%. Após o terceiro ciclo os derivados diminuem a atividade de descoloração, provavelmente reduzindo sua capacidade enzimática de descoloração, esta perda acontece uma vez que os polímeros formados no processo de descoloração são adsorvidos à enzima.^{25,37}

Tabela 4. Porcentagens de descoloração do azul de bromofenol 0,01mM, com os derivados SM-glioxil das peroxidases do chuchu aminadas 10 mM e 50 mM, em presença de H₂O₂, em 5 ciclos de 60 minutos.

DESCOLORAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL 0,01 mM

Derivado/ Ciclos	1°	2°	3°	4°	5°
SM-Gli-NH ₂ 10 mM	70	54	29	8	6
SM-Gli-NH ₂ 50 mM	51	40	24	8	5

SM-Gli-Ch-NH₂ 10 mM: Peroxidase do chuchu aminada 10 mM, imobilizada em sabugo de milho

SM-Gli-Ch-NH₂ 50 mM: Peroxidase do chuchu aminada 10 mM, imobilizada em sabugo de milho

Uma solução a este problema foi proposta por Nakamoto & Machida (1992),²⁵ a qual se baseia na adição de proteínas a polímeros hidrofílicos (aditivos), os quais inibem a adsorção da enzima nos polímeros fenólicos. Os aditivos que se têm proposto são a gelatina, caseína, soroalbumina bovina, álcool polivinílico, borato de sódio polietilenglicol.²⁵

Os dois derivados obtidos neste trabalho têm a mesma capacidade e tendência de descolorar o azul de bromofenol, por processos de oxido-redução.^{1,6,10} Valores similares foram obtidos com a enzima peroxidase do chayote,⁴⁴ aplicada na remoção dos corantes têxteis que também são de natureza poliazó, demonstrando a capacidade e velocidade que têm estas enzimas para atuar na oxidação dos grupos fenólicos. O tratamento

enzimático oferece um alto grau de especificidade, operações sob condições suaves e alta velocidade de reação.^{6,10,30,38,44}

As peroxidases são utilizadas para o tratamento de compostos aromáticos contaminantes em águas provenientes de diferentes fontes. Principalmente a peroxidase do rabanete (HRP) tem sido usada para a remoção de contaminantes fenólicos, assim como também são capazes de remover anilinas aromáticas, hidroxiquinoleína e carcinogênicos como benzidinas y naftilaminas.^{16,27,38} Mas, por ser uma enzima de importância, seu custo comercial é alto. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a possibilidade de utilização dos derivados SM-glioxil-peroxidase do chuchu aminadas, com ciclos de pelo menos de três vezes, diminuindo os custos da aplicação de enzimas.

6. CONCLUSÕES

O resultado principal deste estudo foi imobilizar a peroxidase do chuchu multipontualmente no suporte SM-glioxil. Os derivados estabilizados das peroxidases aminadas mostraram propriedades catalíticas diferentes das suas correspondentes enzimas solúveis nativas. Os dois derivados obtidos, SM-glioxil-peroxidases do chuchu aminadas, apresentaram atividades médias no processo de descoloração do azul de bromofenol, demonstrando-nos que poderão ser utilizados no tratamento de efluentes ou águas contaminadas que contenham fenóis ou grupos fenólicos, pela facilidade do seu grau oxidante na presença de H_2O_2 .

Este trabalho demonstra que a enzima peroxidase do chuchu, imobilizada em pó de sabugo de milho altamente ativado, é uma excelente alternativa, de baixo custo, e com grande viabilidade, para ser usada em lugar da peroxidase de rabanete não imobilizada, uma vez que os derivados obtidos, apresentaram ótima estabilidade frente a

temperaturas moderadas e pHs extremos. Além do tratamento de águas residuais oriundas de processos industriais, poderá ser utilizada também em kits de diagnósticos substituindo os que usam a peroxidase do rabanete (HRP).

7. AGRADECIMENTOS

CAPES, FUNDACIÓN CAROLINA, FUNDUNESP

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALARCON, B. et al. O pka de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.
2. ALONSO-CALDERÓN, A. I. A. J. et al. Eliminación de fenol, 2-clorofenol colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando a la peroxidasa de chayote. **Revista Latinoamericana de Recursos Naturales**, v. 4, n.2, p.278 -284, 2008.
3. BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydrate reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366, 1989.
4. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254,1976.
5. BRUNETTI, I. L.; FARIA, O.M.N. Sistemas quimioluminescentes com peroxidases (EC.1.11.1.7) e suas aplicações. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v. 16, p. 55-77, 1995.
6. DAVIS, S.; BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Biodegradation**, v.5, p.13. 1994.
7. DUARTE M. et al. Renoval of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (*Brassica napus* L var purple top white globe) peroxidase. **J. of Chem Technol and Biotechnol**, v.78, n1, p.43-45, 2002.
8. DUNFORD, H.B.; STILLMAN, J.S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, p. 187-251, 1976.

9. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RESELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; GUISÁN, J.M. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 517-523, 1995.
10. FERRER, I. et al. Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidases and horseradish peroxidase. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.577. 1991.
11. GOULART, A.J. et al. Multipoint Immobilization of invertase on Agarose: Stability and Kinetic Properties. Current Trends in **Biotechnolo and Pharma**, v.2, n.3, p 462-470, 2008.
12. GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375- 382. 1988.
13. GUISÁN, J. M. et al. **Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose – Strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment.** In: Immobilization of enzymes and cells. BICKERSTAFF, G. F. Totowa: Humana Press, v.31, p.277-287, 1997.
14. GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge. In: GUISÁN, J.M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells.** Totowa: Humana Press, 2006. Cap.1, p. 1 13.
15. HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.
16. KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 141-153, 1997.
17. KLIBANOV, A.M.; TU, T.M.; SCOTT, K.P. Peroxidase catalyzed removal of phenoles from coal conversion waste waters. **Science**, v. 221, p. 259- 261, 1983.
18. LÓPEZ-GALLEGO, et al., R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **J. Biotechnol.**, v. 116, p. 1-10, 2005.
19. MARQUES, D. P. et al. Hydrolysis of protein by immobilized and stabilized trypsin. **Biotechnol. Prog** v.27, n.3, p.677-683, 2011.
20. MATEO, C. et al. Epoxy Sepabeads: A novel Epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnol Prog**, v. 18, p. 629-634, 2002.
21. MATEO, C. et al. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition of promoted by glucose: Full hydrolysis of lactose in milk. **Biotechnol. Prog.** v.20, p.1259-1262, 2004.

22. MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert y hydrophilic support for immobilization y high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280. 2006
23. MATHEUS, P.R. et al. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). **Avances en Química**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2009.
24. MUÑOZ, C. et al. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation ID activationof molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p. 2166-2174, 1997.
25. NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. Phenol removal from aqueous solutios by peroxidase-catalyzed reaction using additives. **Water Research.**, v. 26, n. 1, p. 49-54, 1992.
26. NEWSTROM, L.E. Evidence for the Origin of Chayote, *Sechium edule* (Cucurbitaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 410-428, 1991.
27. NICELL, J.A. et al. Reactor development for peroxidases catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. **Water Research**, v. 27, p. 1629-1639, 1993.
28. O'BRIEN, P. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 129, p. 113-139, 2000.
29. Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization: recent experimental progress. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, p. 137-149, 2003.
30. ORTEGA TOVAR M. A. **Eliminación de compuestos fenólicos mediante su polimerización catalizada por peroxidasa de nabo (*Brassica napus* L. var. Purple top white globe)**. Tesis de Licenciatura Químico en Alimentos., UAQ-Querétaro México, 2001.
31. PAULA, F.C. et al. Screening of supports for *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* inulinase immobilization. **Current Trends in Biotechnol and Pharma**, v.1, n.1, p. 34-40, 2007.
32. PAULA, F.C. et al. Sucrose hydrolysis by gelatin-immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* . **Food Chemistry**. v.111, p. 691-695, 2008.
33. PBMH & PIF - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS. Normas de Classificação de Chuchu. São Paulo: CEAGESP, 2006. (Documentos, 30).

34. RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
35. REED, G. Peroxidase. In: **Enzyme s in food processing**. Academic Press, New York, 1975, p. 243–7.
36. REGALADO, C.; GARCÍA, B.; DUARTE, M. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**. v.3, n. 1, p. 243-256, 2004.
37. ROJAS, M. F. et al. Immobilization of horseradish peroxidase on cinnamic carbohydrate esters. **Proc. Bioche.**, v. 39, p. 1455–1464, 2004.
38. SIDDIQUE, M. H. et al. Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. **Wat. Res.**, v. 27, p.883, 1993.
39. TARDIOLI, P. W. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 352-360, 2003.
40. Tavano, O.L. et al. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnol**, v. 22, p. 262-275, 2008.
41. TITA, S.P.S.; PAIVA, J.M.F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia**, v. 12, n 4, p. 228-239, 2002.
42. TSAI, W.T.; CHANG, C.Y.; WANG, S.Y.; CHANG,C.F.; CHIEN, S.F.; SUN, H.F. Preparation of activated carbons form corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification. **Bioresouce Technology**, v. 78, p. 203-208, 2000.
43. VIEIRA, I. C.; FATIBELLO, F. O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v. 52, n. 4, p. 681-689, 2000.
44. VILLEGAS-ROSAS, M.L.O. et al. Inmovilización de una peroxidasa de chayote [*sechium edule* (jacq.) sw] y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. **Rev. Int. Contam. Ambient.**, v. 19, n. 2, p. 73-81, 2003.
45. ZIGLIO, B.R. et al. Elaborações de pães com sabugo de milho. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, p. 117-128, 2007.