



PRICILA MARIA BATISTA CHAGAS

**ESTABILIDADE CATALÍTICA DA PEROXIDASE DO
NABO NA FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM
ESFERAS DE QUITOSANA**

LAVRAS - MG

2014

PRICILA MARIA BATISTA CHAGAS

**ESTABILIDADE CATALÍTICA DA PEROXIDASE DO NABO NA
FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM ESFERAS DE QUITOSANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Angelita Duarte Corrêa

Dra. Maria Cristina Silva

Dr. Custódio Donizete dos Santos

Coorientadores

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Chagas, Pricila Maria Batista.

Estabilidade catalítica da peroxidase do nabo na forma livre e
imobilizada em esferas de quitosana / Pricila Maria Batista Chagas.

– Lavras : UFLA, 2014.

91 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Angelita Duarte Corrêa.

Bibliografia.

1. Enzima. 2. Glutaraldeído. 3. Remazol Brilliant Blue R. 4.
Descoloração. 5. Enzima - Armazenamento. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

CDD – 547.23

PRICILA MARIA BATISTA CHAGAS

**ESTABILIDADE CATALÍTICA DA PEROXIDASE DO NABO NA
FORMA LIVRE E IMOBILIZADA EM ESFERAS DE QUITOSANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro 2014.

Dra. Denise Alvarenga Rocha UFLA

Dr. Arnaldo César Pereira UFSJ

Dra. Angelita Duarte Corrêa
Orientadora

Dra. Maria Cristina Silva
Dr. Custódio Donizete dos Santos
Coorientadores

LAVRAS – MG

2014

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”

Paulo Coelho

DEDICO

Aos meus pais,
Dorlinda e Clarindo, pela
dedicação, por acreditar e
acima de tudo pelo amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida, pela força, coragem e sabedoria.

À Profa. Dra. Angelita Duarte Corrêa pela oportunidade, orientação, confiança e incentivo durante todos os trabalhos, além dos ensinamentos proporcionados por eles.

À Cris, por todo o aprendizado, pela amizade e incentivo durante todos os trabalhos realizados. Ao Prof. Custódio, pela grande colaboração e ensinamentos durante nossos trabalhos.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos André e Jorge, pela oportunidade e carinho.

Aos amigos do laboratório, Mariana, Adnéia, Anderson, Mariene, Ana Paula, Luciana, Lucas, Estela, Valquíria, Denise, Vinícius, Rafaela, Tamara, Rodrigo, Fabíola em especial minha bic junior Juliana Arriel pela nossa cumplicidade, por todo nosso aprendizado durante todos os trabalhos que realizamos juntas, pela paciência e persistência que tivemos, e acima de tudo pela nossa fé e amizade.

À Xulita, pela colaboração e pela amizade conquistada no Laboratório de Bioquímica.

A todos os meus grandes amigos Mariana, Lucas e Deise que sempre estiveram presentes em todos os momentos deste aprendizado.

À Karina e à Geovanna minhas irmãs de coração, as vezes são filhas, pelo incentivo e ensinamentos de todos os dias.

Ao programa de Pós-graduação em Agroquímica/UFLA, pela oportunidade. À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

As peroxidases são enzimas que têm aplicações em diversos campos como a medicina, a síntese química, na análise de alimentos, em novas aplicações ambientais como desintoxicação e remoção de diversos poluentes orgânicos como fenóis, aminas aromáticas e corantes de água residuais. Algumas limitações na utilização de enzimas livres, como a estabilidade e a capacidade catalítica, diminuem com a complexidade dos efluentes. Algumas destas limitações são superadas pelo uso de enzimas na forma imobilizada, as quais podem ser utilizadas como catalisadores com tempo de vida longo, sendo um meio eficaz para efetuar a reutilização da enzima e para melhorar a sua estabilidade. Para que enzimas apresentem uma maior durabilidade, baixo custo e altamente ativas, vários suportes têm sido utilizados nos processos de imobilização, como a quitosana. Os experimentos foram conduzidos tendo como objetivo a preparação das esferas de quitosana utilizando como agente reticulante o glutaraldeído para a imobilização da enzima peroxidase de nabo por um processo de baixo custo. Foram determinadas as características do suporte e o efeito de imobilização na atividade da enzima. Após a determinação das melhores condições de imobilização da enzima, algumas propriedades do sistema imobilizado foram comparadas com a enzima livre, incluindo o pH ótimo e a temperatura, a estabilidade de armazenamento, a aplicação na remoção de corante têxtil e reutilização. A peroxidase foi caracterizada e imobilizada com sucesso nas esferas de quitosana reticuladas. O pH ótimo 7,0 foi o mesmo para ambas as peroxidases livre e imobilizada, entretanto a imobilização resultou na estabilização da enzima em uma ampla variação de pH, e ambas foram ativas na faixa de temperatura de 30 °C a 50 °C, o que favorece o uso de processos industriais. Verificou-se que a enzima imobilizada apresentou-se mais estável em relação ao armazenamento quando comparada à enzima livre. Ambas foram utilizadas na remoção do corante Remazol Brilliant Blue R. Nos experimentos de descoloração com peroxidase imobilizada, dois fenômenos foram observados, descoloração devido à adsorção sobre o suporte (60,45%) e degradação do corante devido à ação da enzima (27,50%). A enzima livre proporcionou 62,86% de remoção da cor. A imobilização da enzima proporcionou um aumento na estabilidade da enzima frente alguns parâmetros, além de possibilitar a recuperação e sua reutilização. A enzima imobilizada apresentou um potencial na remoção de cor do corante de 61,17% após 6 ciclos consecutivos e uma atividade residual de 55,25% após 5 ciclos consecutivos de seu reuso. Estes resultados são significativos com possibilidade de aplicação de enzimas imobilizadas em setores industriais levando a uma redução do custo operacional.

Palavras-chave: Enzima. Glutaraldeído. Remazol. Brilliant. Blue R. Descoloração. Armazenamento.

ABSTRACT

Peroxidases are enzymes that have applications in many fields such as medicine, chemical synthesis, food analysis, and new environmental applications, like detoxification and removal of various organic pollutants such as phenols, aromatic amines and wastewater dyes. Some limitations on the use of free enzymes, like stability and catalytic ability, decrease with effluent complexity. Some of these limitations are overcome by the use of immobilized enzymes, which can be used as long-life catalysts and are effective means to reuse the enzyme and to improve its stability. In order for enzymes to present higher durability, low cost and high activity, various supports, such as chitosan, have been used in immobilization processes. The experiments were conducted with the objective to prepare chitosan beads, using glutaraldehyde as a cross-linking agent, for the immobilization of turnip peroxidase through a low-cost process. The support characteristics and the effect of immobilization on enzyme activity were determined. After the determination of the best conditions for enzyme immobilization, some properties of the immobilized system were compared with the free enzyme, including optimum pH and temperature, storage stability, application in the removal and reuse of the textile dye. Peroxidase was successfully characterized and immobilized on the cross-linked chitosan beads. The optimum pH (7.0) was the same for both free and immobilized peroxidases; however, immobilization resulted in the stabilization of the enzyme through a wide pH range, and both were active in the temperature range between 30 °C and 50 °C, which favors the use of industrial processes. It was found that the immobilized enzyme was more stable, when compared to the free enzyme, regarding storage. Both were used in the removal of the dye Remazol Brilliant Blue R. In discoloration experiments with immobilized peroxidase, two phenomena were observed: discoloration, due to adsorption on the support (60.45%) and dye degradation, due to the action of the enzyme (27.50%). The free enzyme removed 62.86% of the color. Enzyme immobilization resulted in an increase in enzyme stability regarding certain parameters, besides enabling its recovery and reuse. The immobilized enzyme showed a potential of 61.17% for the removal of the dye color after 6 consecutive cycles and a residual activity of 55.25% after 5 consecutive cycles of its reuse. These results are significant, with the possibility of application of immobilized enzymes in industrial sectors, leading to a reduction in operating costs.

Keywords: Enzyme. Glutaraldehyde. Remazol Brilliant. Blue R. Discoloration. Storage.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS	43
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	51
	ARTIGO 1 Catalytic stability of turnip peroxidase in free and immobilized form on chitosan beads	51
1	INTRODUCTION	53
2	MATERIAL AND METHODS	56
3	RESULTS AND DISCUSSION	64
4	CONCLUSION	84
	REFERENCES	85

PRIMEIRA PARTE

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem na introdução e no referencial teórico.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas apresentam várias propriedades (atividade, seletividade, especificidade) que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. Um grande número de enzimas, provenientes de uma variedade de vegetais e microrganismos, vem sendo apresentadas como capazes de desempenhar importantes papéis em diferentes aplicações nas indústrias química, alimentícia, têxtil, de papel e na agricultura, resultando em significativas reduções de custos. A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar, e reconhecido pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável. Esse desenvolvimento tem estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia de enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde, de energia e do meio ambiente (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

Entre as enzimas estudadas destacam-se as peroxidases que são empregadas na indústria devido às suas propriedades catalítica e à versatilidade de reconhecer diversos substratos. Apresentam aplicações na área de síntese orgânica, remoção de compostos fenólicos em resíduos industriais, construção e aplicação de biossensores, imunoenaios enzimáticos e diminuição de resíduos poluentes de indústria de tecidos, que utilizam estas enzimas em processos de descoloração.

Estas enzimas catalisam a redução do peróxido de hidrogênio, enquanto um doador de elétrons é oxidado, e podem ser utilizadas na remoção de compostos fenólicos e aminas aromáticas em soluções aquosas. Além disso, alguns autores mostram que a oxidação de compostos coloridos é estimulada significativamente por meio da utilização de enzimas oxidativas.

Devido à ampla utilização das peroxidases, principalmente como biocatalisador ambiental, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima e por processos de obtenção de baixo custo. Nosso grupo de pesquisa concluiu, dentre vários vegetais estudados, que a raiz do nabo é uma ótima fonte de peroxidase, e pode ser obtida por um processo de baixo custo. A enzima bruta foi investigada, quanto à remoção de uma série de corantes da indústria têxtil com resultados bastante promissores (SILVA et al., 2012).

Entretanto, as peroxidases, assim como quaisquer enzimas, estão sujeitas a inativação por diversos fatores químicos, físicos e biológicos, podendo estes ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Portanto, estudar formas de armazenamento da enzima é relevante no sentido de encontrar uma condição que resulte na manutenção da sua atividade catalítica. Além disso, para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger a enzima de interagir com o meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a sua inativação, impossibilitando a catálise da reação. A estabilidade e capacidade catalítica de enzimas diminuem com a complexidade dos efluentes. Considerando isso, há a necessidade de estabilizar a enzima e protegê-la contra essa inativação podendo utilizá-la nas suas várias aplicações. Faz-se então, necessário, o emprego de um método para que a mesma não perca sua atividade catalítica e sua seletividade. Frente a este problema, várias técnicas vem sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade as enzimas e facilitar sua recuperação e utilização.

A imobilização de enzimas tem se mostrado, nos últimos tempos, uma ferramenta para melhorar as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade, representando uma alternativa para a condução de bioprocessos uma vez que, teoricamente, os biocatalisadores imobilizados ficam retidos para serem várias vezes, o que acarreta economia significativa no custo global do processo. A fixação ou encerramento das enzimas em suportes sólidos

proporciona diversas vantagens sobre as enzimas livres, tais como: maior estabilidade operacional e aumento da vida útil da enzima, facilidade de separação do produto do catalisador em processos analíticos e em reatores de fluxo contínuo.

Vários tipos de suportes sólidos vêm sendo estudados para a imobilização de enzimas. Entre estes destaca-se a quitosana, que possui várias propriedades físicas, químicas e biológicas que a tornam muito versátil quimicamente. É um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina, um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental e foi o suporte testado neste trabalho na imobilização da peroxidase do nabo.

1.1 Objetivo geral

Armazenamento e imobilização da enzima peroxidase extraída da raiz do nabo em esferas de quitosana da enzima peroxidase, avaliando seu potencial de aplicação na biodegradação do corante Remazol Brilliant Blue R.

1.2 Objetivos específicos

- a) extrair a peroxidase da raiz do nabo;
- b) otimizar os parâmetros de imobilização da enzima peroxidase da raiz do nabo, avaliando o tempo de contato da enzima com o suporte e a relação da concentração da enzima com o suporte;
- c) estudar a estabilidade da enzima livre e imobilizada;
- d) armazenar a enzima livre e imobilizada sob várias condições;
- e) avaliar o potencial de reutilização do complexo enzima-suporte.

- f) avaliar a capacidade de degradação do corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) catalisada pela peroxidase da raiz do nabo na sua forma imobilizada e livre.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas como biocatalisadores e suas aplicações

As enzimas são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas. São macromoléculas geralmente proteicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois aceleram as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais.

Caracterizam-se pela alta especificidade e eficiência, e se fazem necessárias em baixas concentrações. Em muitos processos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para processos de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica. A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e pelo fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Essas propriedades têm estimulado as indústrias química e farmacêutica a utilizarem a tecnologia de enzimas com interesse concentrado nas áreas da saúde, de energia e do meio ambiente (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

A tecnologia enzimática despontou como área de investigação no início de 1960, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então esses biocatalisadores têm sido empregados em diversos segmentos, incluindo a síntese de compostos bioativos e de novos

biopolímeros, metodologias analíticas por meio de construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel e celulose, têxtil e cosméticos (SIMÕES et al., 2011).

Com o avanço da tecnologia enzimática, a seleção de novas enzimas, a produção de enzimas por tecnologia do DNA recombinante e a engenharia de proteínas permitiram a modificação das propriedades cinéticas e da estabilidade que contribuíram para o desenvolvimento de novas soluções na tecnologia de reatores enzimáticos e nas técnicas de imobilização (GUISAN, 2006).

As pressões governamentais, a regulamentação severa, as novas tecnologias e as descobertas científicas, no entanto, condicionam o crescimento do mercado das enzimas. O desenvolvimento de tecnologias com base enzimática tem direta correlação com a procura de novos produtos para diferentes segmentos do mercado. De acordo com Industry Market Research for Business Leaders, Strategists, Decision Makers (2012), o mercado global de enzimas industriais foi de 5,1 bilhões de dólares em 2008 e a projeção é de que o crescimento anual foi de aproximadamente 6,3%, com estimativa de movimentação de 7,0 bilhões de dólares para 2013.

O mercado mundial das enzimas divide-se em três segmentos: enzimas empregadas na indústria de alimentos, enzimas técnicas e enzimas empregadas na produção de ração animal. Destes três grupos, destacam-se as enzimas destinadas aos setores de alimentos, que são empregadas basicamente na produção de xarope de açúcar invertido e de compostos aromatizantes, e as enzimas técnicas, que são utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos. Este é o principal mercado consumidor de enzimas, detendo aproximadamente 50% do total das enzimas comercializadas. Outras empresas desenvolvem sistemas industriais de conversão de biomassa para transformação enzimática de resíduos agrícolas em etanol. Verifica-se também a introdução de enzimas na produção

de plásticos derivados de matérias-primas não originadas do petróleo, na produção de fontes alternativas de energia, como os biocombustíveis, ou outros materiais relacionados (GUISAN, 2006; MENDES et al., 2011; SÁ-PEREIRA et al., 2008).

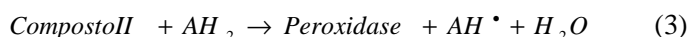
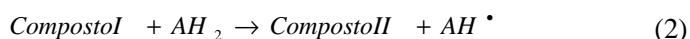
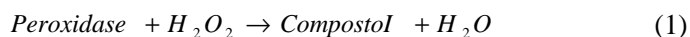
Muitas vezes, para um determinado processo biocatalítico, a enzima nativa não atende aos requisitos para aplicação em grande escala, e as suas propriedades, portanto, necessitam ser otimizadas ou moduladas. O papel de engenharia de proteínas é o de ultrapassar as limitações de enzimas naturais como biocatalisadores, otimizando quimiosseletividade, regiosseletividade e principalmente, estereosseletividade do biocatalisador, aspectos relacionados a processos como estabilidade a longo prazo em determinadas temperaturas e valores de pH e a atividade na presença de concentrações elevadas de substrato para atingir a produtividade máxima. Desta forma, técnicas de imobilização têm sido empregadas com o objetivo de reutilizar as enzimas (SINGH et al., 2013).

O uso de biocatalisadores imobilizados (enzimas e células) é uma estratégia e importante ferramenta para estabilizar e reduzir a inativação por distorção da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial, a ser utilizada para a condução de bioprocessos em várias situações. Aliada à engenharia, bioquímica, microbiologia e genética, esta tecnologia pode ser utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos e, conseqüentemente, reduzir custos de produção (CARVALHO et al., 2005; SHELDON, 2007).

2.2 Enzima peroxidase e suas aplicações

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7, doador H_2O_2 oxidorreductase) são enzimas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou outro peróxido

orgânico, enquanto um doador de elétrons (AH_2) é oxidado. A reação ocorre em várias etapas, como mostrado a seguir:



No primeiro estágio do processo catalítico ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é reduzido produzindo água e a enzima é oxidada formando o composto I, uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação mais alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio da reação, o composto I oxida uma molécula de substrato (AH_2), gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato, fazendo com que a enzima retorne a sua forma inicial (HINER et al., 2001).

Os radicais livres formados durante o ciclo (AH^\bullet) difundem-se do sítio ativo da enzima para o meio da solução. Estes radicais livres são reativos e tendem a iniciar uma reação espontânea, em cadeia, em que as moléculas aromáticas são ligadas formando um produto poliaromático com solubilidade reduzida $2 AH^\bullet \rightarrow A_2H_{2(S)} \downarrow$ (NICELL, 1994).

A maioria das moléculas poliaromáticas solúveis produzidas apresenta características de substrato da enzima, sendo novamente oxidadas pela reação. Conseqüentemente, a demanda de H_2O_2 para a reação global de um substrato aromático é sempre maior do que o previsto pela estequiometria da reação. O resultado subsequente desta oxidação é a formação de cadeias ainda maiores com solubilidade reduzida (NICELL et al., 1992).

As enzimas peroxidases possuem especificidade por uma ampla variedade de substratos aromáticos, como fenóis, polifenóis, aminas aromáticas

primárias e poliaminas aromáticas primárias. Essas enzimas podem ser encontradas em microrganismos, plantas e também em mamíferos. A função biológica das peroxidases envolve síntese de várias biomoléculas e também a detoxificação por meio da destruição de H_2O_2 . (VAN DE VELDE; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2001).

As peroxidases podem ser classificadas em três superfamílias: planta peroxidase, animal peroxidase e catalase peroxidase. A superfamília planta peroxidase está ainda dividida em três classes, de acordo com sua origem: classe I, peroxidases intracelulares que incluem a citocromo C peroxidase de levedura, a ascorbato peroxidase e a catalase-peroxidase bacteriana (PASSARDI et al., 2007); a classe II, que consiste em peroxidases fúngicas extracelulares: ligninases, ou lignina peroxidase e manganês peroxidase, glicoproteínas monoméricas que estão envolvidas na degradação da lignina e são comumente estudadas na descoloração de corantes e a classe III, que compreende as classes vegetais, sendo a isoenzima C da horsehadish peroxidase o exemplo mais estudado (DUNFORD, 1999; HUSSAIN, 2009).

Peroxidases de plantas têm sido amplamente investigadas quanto à sua aplicação em poluentes orgânicos e outras áreas. Fatibello Filho e Vieira (2002) avaliaram o uso de extratos brutos vegetais ricos em peroxidase para a determinação de vários analitos de interesse alimentício, ambiental, farmacêutico, industrial e tecnológico.

Silva et al. (2012) estudaram os seguintes vegetais para a obtenção da peroxidase: nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*), rabanete (*Raphanus sativus*), abobrinha (*Curcubita pepo*), jiló (*Solanum gilo* Raddi) e batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), entre estes, a raiz do nabo apresentou a mais alta atividade enzimática. No trabalho também foram avaliadas condições que melhorassem a obtenção da enzima peroxidase da raiz do nabo durante o processo de extração, constatando que a solução extratora contendo NaCl 0,2

mol L⁻¹ acarreta maior atividade enzimática (extrato bruto enzimático). Essa enzima apresentou atividade máxima em pH 7,0 e é ativa na faixa de temperatura de 30 °C a 50 °C, o que favorece a sua utilização em processos industriais. Na purificação parcial da peroxidase, o agente precipitante mais eficiente foi a acetona.

Enzimas tais como lignina peroxidase e manganês peroxidase, ambas associadas com a degradação de lignina, podem ser utilizadas com sucesso para o biobranqueamento na indústria do papel, e podem produzir quebra oxidativa de corantes sintéticos azo. A horshadish peroxidase (HPR) bem como as peroxidases de soja e nabo estão sendo aplicadas para a biorremediação de efluentes contaminados com fenóis, cresóis e fenóis clorados (MAYER; STAPLES, 2002; REGALADO; GÁRCIA-ALMENDÁREZ; VÁZQUEZ, 2004).

As peroxidases também são utilizadas em sistemas analíticos em biossensores para a determinação de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos, glicose, álcoois, glutamato e colina; em kits de diagnóstico, tais como a quantificação de ácido úrico, colesterol, lactose, e entre outros. Testes imunoenzimáticos como o teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) que permitem a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo utilizam-se de enzimas na qual as peroxidases tem sido mais comuns utilizadas. A evolução destes métodos parece ser uma alternativa para projetar novas formas catalíticas de peroxidases de plantas de fontes diferentes para superar os problemas de estabilidade e aumentar a resistência térmica (HAMID; KHALIL, 2009; REGALADO; GÁRCIA-ALMENDÁREZ; VÁZQUEZ, 2004).

As principais classes de enzimas que apresentam potencial no tratamento de uma variedade de compostos coloridos são as oxirredutases, como lacases e peroxidases (AKHTAR et al., 2006; BHUNIA; DURANI; WANGIKAR, 2001; YANG et al., 2003) e seu uso pode ser uma prática

interessante para a descoloração de corantes sintéticos. Peroxidases podem catalisar a transformação/degradação de corantes aromáticos, tanto por precipitação como pela ruptura do anel aromático (HAMID; KHALIL, 2009; HUSSAIN, 2009). Vários estudos foram realizados utilizando peroxidases de plantas na descoloração de corantes.

Várias são as dificuldades da utilização de peroxidases livres na descoloração e degradação de corantes. Uma nova abordagem baseada na aplicação de enzimas imobilizadas para o tratamento de compostos aromáticos tem aumentado a demanda devido ao seu menor impacto sobre os ecossistemas. Além de maior estabilidade, as enzimas quando imobilizadas podem adquirir propriedades adicionais vantajosas; enzimas imobilizadas podem ser usadas repetidamente ou continuamente em uma variedade de reatores, pode ser facilmente separadas dos produtos de reação solúveis e substrato não tratado o que envolvem a redução do custo operacional, e a remoção contínua de metabólitos tóxicos, simplificando o trabalho e atendendo aos processos industriais (MATTO; HUSAIN, 2009).

Vários esforços têm sido feitos para desenvolver os procedimentos para a imobilização de peroxidases de várias fontes, mas a maioria das preparações de enzimas imobilizadas utilizam as enzimas comercialmente disponível ou suportes caros que aumentam os custos dos processos.

2.3 Imobilização de enzimas

A imobilização pode ser definida como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador (TAMPION; TAMPION, 1988). A imobilização também é definida como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada

negativamente e que possam ser usadas repetidamente e continuamente (GUISAN, 2006).

A utilização de formas enzimáticas imobilizadas é de fundamental importância para aumentar a potencialidade dos sistemas enzimáticos no tratamento de resíduos industriais. Consequentemente, muitos suportes tem sido utilizados para a imobilização de enzimas de interesse. De maneira geral, a utilização de enzimas suportadas tem-se mostrado bastante conveniente, principalmente em função do aumento da sua estabilidade química e térmica.

As enzimas são moléculas solúveis em água e o seu uso repetido, o qual é importante para viabilizar um processo econômico, é problemático devido ao fato de que elas são difíceis de serem recuperadas deste meio além da separação dos substratos e produtos. Muitas enzimas não são suficientemente estáveis dentro das condições operacionais, e elas podem perder a atividade catalítica devido as altas temperaturas, auto-oxidação, auto-digestão e/ou desnaturação pelo solvente e solutos ou devido a danos físicos. A produtividade de processos industriais, medidas de rendimento em função do tempo, é frequentemente baixa devido ao limite tolerado pela enzima para altas concentrações de substrato(s) e produto(s). Estes problemas podem ser solucionados pela imobilização de enzimas e biocatalizadores (CASTILLO et al., 1997; SATAR; HUNSAI, 2011).

Para a obtenção da diminuição no custo global de processos que utilizam enzimas imobilizadas, o procedimento de imobilização deve atender a alguns requisitos, como baixo custo, boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa. (CASTRO et al., 2008; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Deve-se sempre considerar que a atividade da enzima seja mantida após a imobilização, ou seja, não deverão ocorrer alterações estruturais que levam a mudanças em seu sítio ativo (MENDES et al., 2011).

Processos de imobilização e aplicações industriais têm sido relatados na literatura, incluindo a síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, metodologias analíticas por meio de construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel e celulose, têxtil e cosméticos (MENDES et al., 2011; RASERA, 2006).

2.3.1 Métodos de imobilização

Na literatura, inúmeros métodos de imobilização de enzimas têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil.

Os métodos de imobilização variam da simples ligação por adsorção física em suportes diversos até a encapsulação em matrizes de sol-gel e granulação. Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização química estão: ligação da enzima no suporte por ligações iônicas; ligação da enzima no suporte por ligações covalentes; ligação cruzada entre a enzima e o suporte; ligação da enzima no suporte promovida por reagentes multifuncionais (ALFAYA; KUBOTA, 2002; KHAN; AKHTAR; HUSAIN, 2005; SHELDON, 2007). Os métodos físicos envolvem o confinamento das moléculas de enzima dentro dos poros de uma matriz polimérica, micelas reversas, microcápsulas ou entre membranas macroscópicas (DURAN et al., 2002). Na Figura 1 é mostrada, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para a imobilização de enzimas.

Ambos os métodos físicos e químicos possuem suas vantagens e desvantagens que dependem de vários fatores. A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações com o suporte como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada e além de ser um processo de menor custo. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (DURAN et al., 2002; MENDES et al., 2011).

Em geral, os métodos de imobilização química tendem a reduzir a atividade da enzima. A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção.

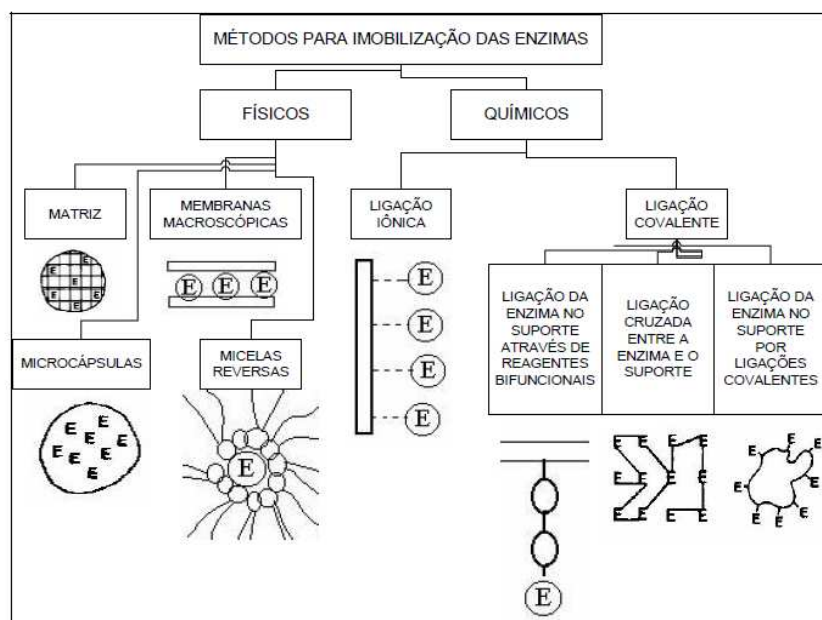


Figura 1 Métodos mais comuns utilizados para a imobilização de enzimas
 Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI (2004)

A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo, contudo se a ligação covalente não inviabilizar o sítio ativo, pode-se obter uma maior eficiência catalítica. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa

de imobilização (CANO; MINGUILLON; PALET, 2006; CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

O procedimento de imobilização por oclusão em géis ou membranas orgânicas corresponde ao confinamento do material biológico em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, sendo o sistema revestido por uma membrana polimérica permeável, para reduzir a lixiviação do material biológico. Este tipo de imobilização apresenta a grande vantagem de se poder utilizar qualquer tipo de enzima. No entanto, exibe a desvantagem de lixiviação do material enzimático, devido aos diferentes tamanhos de poros nos polímeros, como também problemas de tempo de resposta, pela dificuldade de difusão das espécies envolvidas através das membranas (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

O processo mais amplamente utilizado baseia-se na formação de ligações cruzadas entre os grupos amino do suporte com os grupos amino da enzima, ou da formação de ligações cruzadas intermoleculares com a formação de partículas insolúveis macroscópicas, pela utilização de reagentes bi- ou multifuncionais. O reagente multifuncional é geralmente uma molécula que possui a capacidade de ligar a enzima ao suporte. Vários reagentes multifuncionais podem ser utilizados, envolvendo diferentes tipos de aminoácidos das enzimas e grupos funcionais do suporte. Entre os agentes multifuncionais mais utilizados pode-se destacar o glutaraldeído, carbodiimida e γ -aminopropiltrióxissilano (FRANCA et al., 2008; MOHAMED et al., 2013; VILLELA, 2006). As principais vantagens deste método são a simplicidade de execução e a forte interação da enzima com o suporte. Entretanto, também apresenta grandes desvantagens, como a dificuldade do controle da reação, o uso de grandes quantidades de enzima, baixa atividade enzimática (ALFAYA; KUBOTA, 2002; SHELDON, 2007).

Dessa forma, a escolha entre os métodos físicos e químicos depende de vários fatores. Usualmente, é preferível obter uma enzima com menor atividade,

mas com maior estabilidade do que uma enzima com uma alta atividade, mas que possua uma pequena estabilidade (DURAN et al., 2002). Em algumas situações, quando se deseja obter enzimas imobilizadas com maior atividade, ou aumentar a resistência mecânica dos suportes, é recomendável a utilização de uma combinação de métodos para a imobilização de enzimas. Por exemplo, pode-se melhorar a estabilidade da enzima imobilizada por adsorção promovendo-se uma ligação cruzada entre as moléculas da enzima com o glutaraldeído (CASTRO et al., 2008).

A utilização de enzimas imobilizadas pode ultrapassar algumas destas limitações e fornecer catalisadores estáveis com longos tempos de vida. Em particular, imobilização de peroxidases por ligações covalentes retém alta atividade da enzima e é eficaz na remoção de compostos fenólicos e cor numa ampla faixa de pH e temperatura (ZILLE, 2003).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas (MENDES et al., 2011). A escolha do método de imobilização a ser utilizado para imobilização de uma determinada enzima passa, necessariamente, por análise da aplicação a que se destina o sistema contendo a enzima imobilizada. Uma vez definida a aplicação e condições operacionais onde a enzima deverá atuar, pode-se então avaliar, entre as técnicas disponíveis, aquela que melhor se adequa às necessidades exigidas. É importante avaliar o tempo e os custos necessários para viabilizar o método de imobilização escolhido, uma vez que tais parâmetros irão refletir no processo, portanto, nos custos do produto final (CASTRO et al., 2008; SILVA, 2000).

Na Tabela 1 estão apresentados de modo resumido as principais vantagens e desvantagens dos cinco métodos básicos de imobilização.

Tabela 1 Vantagens e desvantagens dos cinco métodos básicos de imobilização

	Característica natural	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Ligações fracas	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade operacional • Perda limitada da atividade enzimática 	<ul style="list-style-type: none"> • Dessorção • Adsorção não específica
Ligação covalente	Ligação química entre os grupos funcionais da enzima e do suporte	<ul style="list-style-type: none"> • Nenhuma barreira de difusão • Estável • Curto tempo de resposta • Alta atividade enzimática 	<ul style="list-style-type: none"> • Matriz não regenerável • Produto tóxico com o acoplamento
Confinamento	Incorporação da enzima dentro de um gel ou um polímero	<ul style="list-style-type: none"> • A atividade catalítica não é influenciada por interações químicas entre o monômero e a enzima • Vários tipos de enzimas podem ser imobilizadas dentro de um mesmo polímero 	<ul style="list-style-type: none"> • Barreira de difusão • Vazamento de enzima • Altas concentrações de monômero e necessidade de enzima por electropolimerização
Ligação-cruzada	Ligação entre enzima e agente de reticulação (Ex. glutaraldeído)/ molécula inerte (Ex., BSA)	<ul style="list-style-type: none"> • Simples 	<ul style="list-style-type: none"> • Perda da atividade enzimática
Afinidade	Ligação por afinidade entre um grupo funcional em um suporte (Ex., avidina) e afinidade em uma sequência de proteína (Ex., Biotina)	<ul style="list-style-type: none"> • Imobilização controlada e orientada 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade da presença de grupos específicos na enzima (Ex., His, Biotina)

Fonte: SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER (2012)

2.3.2 Tipos de suportes

As propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte. A interação entre esses dois componentes proporciona um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas.

Há uma imensa variedade de suportes que tem sido utilizados para a imobilização de enzimas e, de modo geral, pode-se classificá-los de acordo com sua natureza química, em suportes orgânicos ou inorgânicos, sendo possível apontar uma série de vantagens e desvantagens associadas a cada um desses tipos de suportes (CASTRO et al., 2008).

Muitos suportes orgânicos, sejam naturais ou sintéticos, têm sido propostos para imobilização de enzimas e a predominância do uso desses sobre os inorgânicos deve-se, principalmente, à versatilidade que esses materiais têm de participarem de um grande número de diferentes reações, o que favorece sua ativação. Por outro lado, sua aplicação em muitas áreas é limitada por uma baixa estabilidade, bem como a dificuldade de recuperação do catalisador do meio reacional por métodos simples (KENNEDY; WHITE, 1985; SHELDON, 2007). Outro inconveniente associado aos suportes orgânicos, particularmente os naturais e seus derivados, é susceptibilidade ao ataque de microorganismos.

Na Tabela 2 são apresentados alguns exemplos de suportes orgânicos e inorgânicos utilizados em processos de imobilização.

Tabela 2 Exemplos de suportes insolúveis para imobilização de enzimas

Orgânicos naturais	Orgânicos sintéticos	Inorgânicos
Ágar/agarose	Copolímeros de acrilato/metacrilato	Alumina
Carbônio ativado	Poli(amida)	Celite
Celulose	Poli(anilina)	Hidroxiapatita
Colágeno	Poli(estireno)	Óxidos metálicos
Dextranas	Poli(pirrol)	Sílica
Gelatinas	Poli(vinilálcool)	Titânia
Quitina/quitosana	Poli(vinilcloroeto)	Vidro poroso
Seda	Polímeros de acrilamida	Zircônia

Fonte: CASTRO et al. (2008)

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se de um lado um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema (CASTRO et al., 2008; MENDES et al., 2011).

A escolha do suporte é tão importante quanto a escolha do método de imobilização a ser utilizado em um determinado sistema. Alguns cuidados devem ser tomados nessa escolha, uma vez que, após a imobilização, o suporte será o principal constituinte do microambiente em que a enzima estará imobilizada. Neste sentido, é necessário que sejam avaliadas algumas características do sistema.

Os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: as características físicas do suporte devem ser adequadas para uso no reator selecionado; manter a estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais; conter grupos químicos capazes de se ligarem ao biocatalisador; o material constituinte do suporte deve permitir a obtenção de partículas com dimensões variadas, a fim de que se possa alcançar um ponto de equilíbrio entre a redução de efeitos difusionais e a operacionalidade do reator,

sobretudo quando este for do tipo leito fixo; porosidade compatível com as dimensões do biocatalisador a ser imobilizado; resistência aos microrganismos; estabilidade térmica; permitir a regeneração; um longo período de vida útil; alta capacidade de retenção de enzima (CASTRO et al., 2008; SILVA, 2000).

Polímeros naturais vêm sendo utilizados como materiais de suporte na tecnologia de imobilização, tais como alginato, carragenina, agarose, quitina, quitosana, e apresentam vantagens de ser atóxico, biocompatível e biodegradável.

2.3.2.1 Quitina/Quitosana

A quitina, denominação usual para o polímero β (1-4) 2-acetamino-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina), possuindo, assim, estrutura semelhante a fibra vegetal denominada celulose (Figura 2). A diferença estrutural entre as duas fibras deve-se aos grupos hidroxilas localizados na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetoamino, é o segundo polissacarídeo natural mais abundante encontrado na natureza e está presente em uma variedade de animais marinhos (caranguejo, camarão, lagosta), insetos, fungos e leveduras.

A quitosana, β (1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glicose (Figura 2), é o principal derivado da quitina, obtida a partir da desacetilação por processo de hidrólise básica . A transformação da quitina em quitosana modifica suas propriedades, de modo que a quitosana insolúvel em água, torna-se solúvel na maioria dos ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico e ácidos inorgânicos, incluindo o ácido clorídrico. A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental

causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).

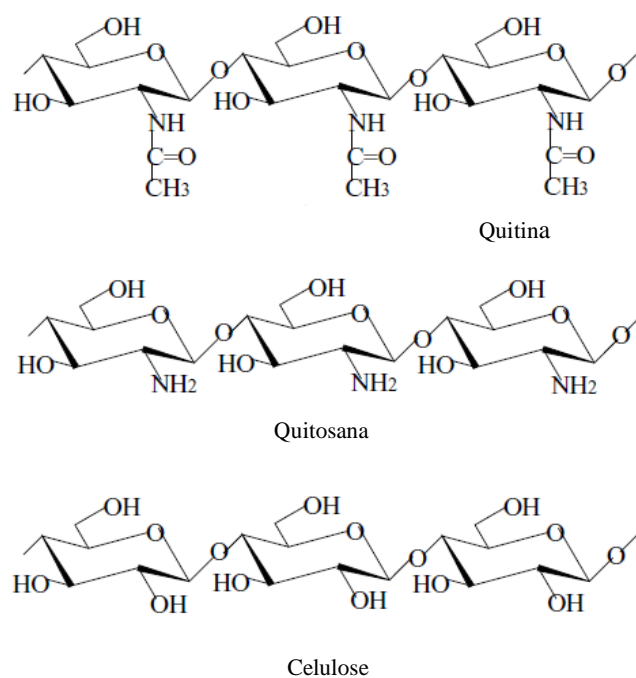


Figura 2 Estruturas da quitina, quitosana e celulose
Fonte: KRAJEWSKA (2004)

A presença de grupos amino livres na quitosana e sua consequente solubilidade em soluções aquosas de certos ácidos, seu caráter de polieletrólito e suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornam este polímero mais versátil quimicamente quando comparado com seu análogo, a quitina. Dessa forma, a quitosana torna-se uma atraente alternativa para muitas aplicações, sendo considerada um suporte ideal para imobilização de enzimas, devido as propriedades já citadas, e, principalmente, em função de sua matéria prima ser

de baixo custo, pois se trata, principalmente, de resíduos da indústria pesqueira (AMORIM et al., 2003; KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).

Os biocatalisadores preparados por imobilização em quitosana têm sido empregados na biotransformação de proteínas, modificação de óleos e gorduras e materiais lignocelulósicos, remoção de contaminantes em águas residuárias, síntese de compostos de alto valor agregado empregados nas indústrias farmacêutica e alimentícia e geração de energia, purificação de enzimas, preparação de sofisticados biossensores para medições *in situ* em águas residuárias e quantificação de metabólitos produzidos pelo organismo humano no controle de enfermidades. Além disso, é economicamente viável, e bastante empregada na medicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, em biotecnologia, na indústria de cosméticos e de alimentos e, também, como adsorvente na remoção de corantes e no tratamento de efluentes industriais (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006; MENDES et al., 2011).

Quitosana e quitina são materiais suportes para imobilização de enzimas, os quais podem ser utilizados sob a forma de pós, flocos e géis e em diferentes configurações geométricas. A preparação do gel de quitosana é favorecida pelo fato de que a quitosana se dissolve facilmente em soluções diluídas da maioria dos ácidos orgânicos, incluindo ácido fórmico, acético, tartárico e ácido cítrico, de modo a formar soluções viscosas que precipitam sobre um aumento de pH e por formação de complexos ionotrópicos com polieletrólitos aniônicos insolúveis em água. Desta forma géis de quitosana podem ser transformados em esferas, membranas, revestimentos, cápsulas, fibras, fibras ocas e esponjas (KRAJEWSKA, 2004).

A preparação de esferas é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que as esferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos. Além disso, as esferas apresentam cinéticas de adsorção mais rápidas e maior facilidade de manuseio e

operação. A versatilidade deste polímero permite a preparação de esferas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados. O uso de quitosana porosa em partículas apresenta inúmeras vantagens no processo de imobilização de enzimas: o fato de a quitosana ser um material de origem natural (biopolímero), sendo desta maneira seguro para o uso e biocompatível; quando comparada com outras resinas sintéticas, sua grande quantidade de poros se apresenta de maneira uniforme desde a superfície até seu interior, provendo desta maneira uma grande difusão do substrato; a presença abundante de grupos amina altamente reativos disponíveis para imobilizar enzimas via ligação covalente e pelo fato de que a quitosana, por si mesma, possui uma grande afinidade com enzimas, permitindo, desta maneira, que uma grande quantidade de enzimas possa ser imobilizada (AZEVEDO et al., 2007; DENKBAS et al., 2002).

No intuito de aumentar a estabilidade química e física da quitosana e seus derivados (complexos polieletrólíticos e matrizes híbridas), têm sido empregadas alternativas como a modificação química, também denominada de reticulação, empregando diferentes agentes de ativação. As reações envolvidas na reticulação por agentes bifuncionais ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana. Esta modificação pode ser realizada com diferentes agentes químicos como glicidol, epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído e genipina, formando estruturas complexas, amplamente reportadas na literatura especializada (MENDES et al., 2011).

Na reação da quitosana com glutaraldeído, ocorre ataque nucleofílico dos grupos amino da quitosana aos grupos carbonilas do glutaraldeído, também observado quando se utiliza glioxal e formaldeído. A ligação covalente entre os grupos amino do biopolímero e aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a valores extremos de pH e temperatura. Diferentes mecanismos são propostos para explicar a reação de glutaraldeído com quitosana.

Monteiro e Airoidi (1999) propuseram o mecanismo como sendo uma interação dos grupos amino livres da quitosana com o grupo aldeído do glutaraldeído formando uma base de Schiff (ligação imina). Para interpretar este comportamento, três hipóteses são consideradas: (i) formação de uma base de Schiff entre o grupo aldeído com o grupo amino da quitosana, o outro grupo aldeído livre seria utilizado para uma determinada reação de interesse; (ii) a reticulação é formada entre uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de grupo amino, resultando na formação de duas bases de Schiff e (iii) a reticulação é formada também por mais de uma molécula de glutaraldeído, devido à sua polimerização em determinadas condições, por exemplo, em altos valores de pH.

O glutaraldeído reage com os grupos NH_2 da quitosana formando uma rede polimérica, na qual a enzima peroxidase está aprisionada entre os interstícios formados. Além disso, existe a possibilidade da enzima encontrar-se ligada em uma das extremidades do glutaraldeído (Figura 3) (AYBASTIER et al., 2011; OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).

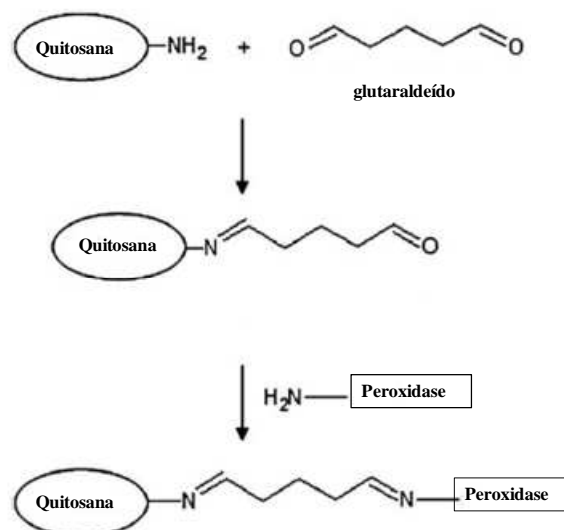


Figura 3 Esquema da enzima peroxidase imobilizada em uma matriz de quitosana modificada com glutaraldeído
 Fonte: AYBASTIER et al. (2011), com modificações

2.4 Tratamento de corantes têxteis

Do total de água doce disponível para consumo mundial, cerca de 88% são utilizadas na agricultura. A indústria é responsável por apenas 7%, ficando os restantes 5% para uso doméstico. Somente o setor têxtil é responsável pelo consumo de 15% da água destinada ao setor industrial, devolvendo-a, depois dos processos, extremamente contaminada (HUNSAIN, 2006).

Os corantes são substratos utilizados para impressão de papel, fotografia a cores, tingimento têxtil e como um aditivo em produtos de petróleo, apresentando uma origem sintética e estrutura aromática molecular complexa (HAMID; KHALIL, 2009; HUNSAIN, 2006).

A indústria têxtil contribui significativamente para a poluição dos rios em algumas regiões do Brasil ao transformar fibras naturais e sintéticas em tecidos e outros produtos. Em algum ponto do processo de fabricação de tecidos,

operações de processamento químico úmido são necessárias para preparar, purificar, colorir ou acabar adequadamente o produto. Isso resulta na geração de efluentes cuja carga de poluentes provém não somente da remoção de impurezas das próprias matérias-primas como também dos reagentes químicos residuais usados no processamento (CAMMAROTA; COELHO, 2001). Estima-se que aproximadamente 20% da carga de corantes seja perdida nos resíduos de tingimento durante o processamento têxtil, enquanto, para os corantes reativos, até 50% da concentração inicial do corante é descarregada no banho de tingimento (AZMI; BANERJEE, 2001).

A legislação ambiental de países desenvolvidos, e mesmo a de países em desenvolvimento, vem exigindo melhor qualidade dos efluentes industriais, estimulando assim o desenvolvimento de pesquisas que conduzam a tratamentos mais eficientes.

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), os corantes são classificados de acordo com sua estrutura química ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado na fibra têxtil. Baseado na estrutura química ou cromóforo, cerca de 20 a 30 diferentes grupos de corantes podem ser identificados. Corantes azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antraquinona, ftalocianina e triarilmetano são quantitativamente os grupos cromóforos principais (ZILLE, 2005), e representam o grupo de corantes maior e mais versátil, representando 70% de todo o material corante consumido (SATAR; HUSAIN, 2011).

Os corantes azo reativos são a maior classe de corantes sintéticos solúveis em água, com a maior variedade de cores e estruturas e são geralmente resistentes à biodegradação aeróbica. Durante o processo de tingimento a maior parte dos corantes é hidrolisado e depois lançado nos cursos de água. No entanto, a maioria destes corantes não apresenta toxicidade por si, mas após o lançamento em ambientes aquáticos podem ser convertidos em aminas com

potenciais carcinogênicas e isto apresenta um impacto sob o ecossistema (HUSAIN, 2006).

Corantes antraquinonas constituem a segunda mais importante classe de corantes têxteis, depois de corantes azo (BAUGHMAN; WEBER, 1994). Eles têm uma vasta gama de cores em quase todo o espectro visível, sendo violeta, azul e verde as cores mais comuns utilizadas (FONTENOT et al., 2002). Entre eles, Remazol Brilliant Blue R (RBBR) é um corante importante industrialmente que é frequentemente usado como um material de partida na produção de corantes poliméricos. RBBR é um derivado de antraceno e representa uma importante classe de organopoluentes tóxicos e recalcitrantes (OSMA; TOCA-HERRERA; RODRIGUEZ-COUTO, 2010).

O RBBR tem sido utilizado como uma substância modelo em diversos estudos sobre a degradação de corantes e diferentes tipos de processos físicos, químicos e biológicos foram testados para a sua remoção. Na Tabela 3 estão listados alguns métodos utilizados na remoção RBBR. Apesar das metodologias citadas se apresentarem como eficazes, as desvantagens de cada processo devem ser consideradas, tais como: geração de lodo (adsorção e oxidação de Fenton), meia-vida curta (ozonização) e alto custo da energia elétrica (eletroquímica).

Tabela 3 Os métodos químicos e físicos estudados para remoção de corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR)

Metodologia	Concentração (RBBR) (mg L ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH	Tempo de reação (min)	Descoloração (%)
Adsorção em material de resíduos agroindustrial (farelo de trigo)	50	20	1,5	300	97,5
Adsorção em nanopartículas (MgO)	50-300	20	8	5	98
Oxidação Fenton	100	20	3	60	99
Ozonização	800	25	3-10	45	100
Hidrolise	100	120	4	120	74,39
Eletroquímica	400	25		80	100
O ultrasom assistido processo eletroquímico	50	-	8	120	90
Biossorção em <i>Candida sp.</i>	203	25	2	5760	69

Fonte: SILVA et al. (2013)

No que diz respeito ao tratamento de efluentes coloridos, a diversidade estrutural dos corantes proporciona uma grande variedade de cores, dificultando, entretanto, a utilização de um único método no tratamento desses efluentes (LEITÃO, 2000). Atualmente, vários métodos podem ser utilizados na remoção de corantes em efluentes industriais. Estes métodos podem ser distribuídos em três categorias, que são químicos, físicos e biológicos.

O uso de processos biológicos baseados na utilização de fungos e bactérias, ou diretamente na utilização de enzimas, tem surgido como uma das alternativas de grande potencial. A crescente utilização de enzimas, nos tratamentos de poluentes específicos, e recentes avanços biotecnológicos têm

possibilitado a produção de enzimas mais baratas e facilmente disponíveis utilizando de melhores procedimentos de isolamento e purificação. As potenciais vantagens do tratamento enzimático quando comparadas a tratamentos convencionais incluem: aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil processo de controle, entre outros (DURÁN; ESPOSITO, 2000).

Entre os processos biotecnológicos de tratamento de efluentes têxteis, com o emprego de enzimas, podem-se citar as enzimas lignolíticas como as lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase. Estas enzimas têm demonstrado sua capacidade de descolorir os corantes têxteis, mediante a polimerização ou degradação desses corantes (BHUNIA; WANGIKAR, 2001; GÜBITZ, 2003).

A enzima peroxidase é conhecida por sua capacidade de remoção de compostos fenólicos e aminas aromáticas de soluções aquosas e também a descoloração de efluentes da indústria têxtil. O tratamento com peroxidase resulta na remoção de grupamentos fenólicos tóxicos dos efluentes industriais, usando peróxido de hidrogênio no processo (WILBERG; ASSENHAIMER; RUBIO, 2002).

Silva et al. (2012), trabalhando com a peroxidase de nabo em solução (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*), obtiveram uma remoção de 66% da cor do corante RBBR em solução aquosa após 40 minutos de reação. Enquanto a descoloração obtida pela peroxidase das cascas de soja foi de 86%, em um tempo de reação de 13 minutos (SILVA et al., 2013).

Apesar desses resultados promissores, várias limitações impedem a utilização de oxidoreduções livres na descoloração e degradação de corantes. O uso de enzimas livres mostram algumas desvantagens como instabilidade térmica, suscetibilidade ao ataque por proteases e alguns agentes desnaturantes,

inibição da atividade e dificuldade de separação e reuso da enzima ao final da reação (KHAN; AKHTAR; HUSAIN, 2005).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enzimas peroxidases possuem especificidade por uma ampla variedade de substratos aromáticos, e devido a esta especificidade estas enzimas têm sido aplicadas no tratamento de águas residuais, biotransformações, monitoramento ambiental, bem como construções de biossensores, na remediação de vários poluentes aromáticos tais como fenóis, aminas aromáticas e corantes.

Devido ao uso generalizado de peroxidases, principalmente como biocatalisador ambiental, existe um interesse crescente em novas fontes desta enzima. Silva et al. (2012) investigaram vários vegetais como fonte de peroxidase. Neste estudo, observou-se que a raiz de nabo é uma fonte rica em peroxidase, e apresentou uma alternativa de baixo custo na remoção de corantes têxteis, sem purificação.

Várias são as dificuldades da utilização de peroxidases livres na descoloração e degradação de corantes, como sua separação para posterior aplicação, a contaminação do produto desejado e sua inativação aumenta com a complexidade dos efluentes. Enzimas imobilizadas podem melhorar a termoestabilidade, estabilidade operacional, recuperação, reutilização, alta pureza e rendimentos elevados de produtos em suas aplicações industriais.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de tornar os procedimentos para a imobilização de peroxidases viáveis do ponto de vista prático e econômico. Entretanto, a maioria das preparações de enzimas imobilizadas requer utilização de enzimas comercialmente disponíveis ou suportes caros que aumentam o custo dos processos.

Neste estudo objetivou-se a obtenção da enzima e sua imobilização por um processo de baixo custo. A peroxidase extraída do nabo foi caracterizada e imobilizada nas esferas de quitosana, as quais foram reticuladas com

glutaraldeído com sucesso. Foram determinadas as características do suporte e o efeito da imobilização na atividade da enzima. Definiram-se as melhores condições de imobilização da enzima e algumas propriedades do sistema imobilizado foram comparadas com a enzima livre. Em relação ao pH, ambas as enzimas livre e imobilizada, apresentaram melhor performance em pH 7,0. A imobilização melhorou a estabilidade da peroxidase de nabo, em valores menores de pH (região ácida), o que proporciona maior flexibilidade quanto à aplicação da enzima em meios diversos. No que se refere à temperatura, ambas foram ativas na faixa de 30 °C a 50 °C, o que favorece sua aplicação em processos industriais.

A peroxidase imobilizada apresentou maior estabilidade em relação ao tempo de armazenamento, quando comparada a enzima livre, o que pode ser atribuído ao fato de que a enzima imobilizada sofre menor influência de agentes externos.

As enzimas livre e imobilizada em esferas de quitosana, foram investigadas quanto ao seu potencial na remoção do Remazol Brilliant Blue R em solução aquosa. A remoção do corante obtida para a enzima imobilizada foi de 87,95%, enquanto que para a enzima livre foi de 62,86%.

Em relação à enzima imobilizada, dois mecanismos distintos foram responsáveis pela remoção da cor, adsorção do corante no biopolímero e degradação enzimática. A imobilização da enzima proporcionou um aumento na estabilidade da enzima frente a alguns parâmetros, além de possibilitar a recuperação da enzima do meio reacional e a sua reutilização.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, S. H. Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 7, p. 1228-1235, Nov. 2006.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, São Paulo v. 25, n. 5, p. 835-841, set. 2002.

AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, New York, v. 89, n. 1, p. 35-39, Aug. 2003.

AYBASTIER, O. et al. Determination of total phenolic content in *Prunella L.* by horseradish peroxidase immobilized onto chitosan beads. **Analytical Methods**, New York, v. 3, n. 10, p. 2289-2297, Oct 2011.

AZEVEDO V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, dez. 2007.

AZMI, W.; BANERJEE, U. Biological decolorization of crystal violet by a newly isolated *Bacillus* sp. and microbial assessment of toxicity of untreated and treated dye. **Scientia Iranica**, Tehran, v. 8, n. 3, p. 171-178, July 2001.

BAUGHMAN, G. L.; WEBER, E. J. Transformation of dyes and related-compounds in anoxic sediment - kinetics and products. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 28, n. 2, p. 267-276, Feb. 1994.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 72, n. 5, p. 562-567, Mar. 2001.

CAMMAROTA, M. C.; COELHO, M. A. Z. Tratamento enzimático para remoção de cor de efluentes da indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, São Paulo, n. 65, p. 40-47, jan. 2001.

CANO, A.; MINGUILLON, C.; PALET, C. Immobilization of endo-1,4-beta-xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 280, n. 1-2, p. 383-388, Sept. 2006.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CARVALHO, W. et al. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. metabolic behavior of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p.25-31, Aug. 2005.

CASTILLO, E. et al. The role of silica in lipase-catalyzed esterification reactions of high-polar substrates. **Journal Organic Chemical**, Washington, v. 74, p. 77-85, Aug. 1997.

CASTRO, F. H de et al. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123-151.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicação de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-630, maio 2004.

DENKBAS, E. B. et al. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. **Reactive & Functional Polymers**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 225-232, Feb. 2002.

DUNFORD, H. B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VHC, 1999.

DURAN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 907-931, Dec. 2002.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase: like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v. 28, n. 2, p. 83-99, Nov. 2000.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, maio 2002.

FONTENOT, E. J. et al. Kinetics and inhibition during the decolorization of reactive anthraquinone dyes under methanogenic conditions. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 105-111, Feb. 2002.

FRANCA, E. F. et al. Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, New York, v. 4, n. 12, p. 2141-2149, Dec. 2008.

GUARATINI, C. C. I. ; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-78, jan. 2000.

GÜBITZ, G.M. Uma introdução à biotecnologia e a enzimologia e suas aplicações na indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, São Paulo, n. 73, p. 54-68, jun. 2003.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2006.

HAMID, M.; KHALIL, R.-U. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, Barking, v. 115, n. 4, p. 1177-1186, Aug. 2009.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, London, v. 38, n. 2, p. 453-468, Dec. 2009.

HINER, A. N. P. et al. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 392, n. 2, p. 295-302, Sept. 2001.

HUSAIN, Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 26, n. 4, p. 201-221, Oct./Dec. 2006.

HUSSAIN, Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 117-140, June 2009.

INDUSTRY MARKET RESEARCH FOR BUSINESS LEADERS, STRATEGISTS, DECISION MAKERS. World enzymes. **Industry Study with Forecasts**, Cleveland, n. 2506, p. 1-6, Aug. 2009. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/brochure/25xx/2506smwe.pdf>>. Acesso em: 11 Nov. 2012.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. (Ed.). **Handbook of enzymes biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1985. Cap. 4, p. 147-207.

KHAN, A. A.; AKHTAR, S.; HUSAIN, Q. Simultaneous purification and immobilization of mushroom tyrosinase on an immunoaffinity support. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 7, p. 2379-2386, Sept. 2005.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, Dec. 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

LEITÃO, V. S. F. **Estudo da degradação do azul de metileno e do azure B e obtenção preferencial de derivados n-desmetilados usando lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium***. 2000. 90 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

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

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 6, p. 551-565, July 2002.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MOHAMED, S. A. et al. Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 60, p. 295-300, Sept. 2013.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some thermodynamic data on copper-chitin and copper-chitosan biopolymer interactions. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 212, n. 2, p. 212-219, Apr. 1999.

NICELL, J. A. et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 157-164, June 1992.

NICELL, J. A. Kinetics of horseradish peroxidase-catalysed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 60, n. 2, p. 203-215, June 1994.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 932-939, out. 2006.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Transformation pathway of remazol brilliant blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 22, p. 8509-8514, Nov. 2010.

PASSARDI, F. et al. Prokaryotic origins of the nonanimal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, Amsterdam, v. 89, n. 5, p. 567-579, 2007.

RASERA, K. **Desenvolvimento de membranas com lacases por imobilização do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju***. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

REGALADO, C.; GÁRCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, New York, v. 3, n. 1-2, p. 243-256, Dec. 2004.

SÁ-PEREIRA, P. et al. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 19, p. 431-462.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 3, p. 489-511, May/June 2012.

SATAR, R.; HUSAIN, Q. Catalyzed degradation of disperse dyes by calcium alginate-pectin entrapped bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 23, n. 7, p. 1135-1142, 2011.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, Weinheim, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, June 2007.

SILVA, K. F. F. **Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas: aplicações analíticas**. 2000. 140 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2000.

SILVA, M. C. et al. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*brassica campestris*). **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012a.

SILVA, M. C. et al. Obtention of plant peroxidase and its potential for the decolorization of the reactive dye Remazol Turquoise G 133%. **Water Science & Technology**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 669-675, 2012.

SILVA, M. C. et al. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, Amsterdam, v. 89, p. 122-129, May 2013.

SIMÕES, A. S. et al. Desempenho da matriz híbrida sílica-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 33-38, 2011.

SINGH, R. K. et al. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, Oxford, v. 14, p. 1232-1277, Jan. 2013.

TAMPION, J.; TAMPION, M. D. **Immobilized cells: principles and applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

VAN DE VELDE, F.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 73-80, Feb. 2001.

VILLELA, S. M. **Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleras**. 2006. 131 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

WILBERG, K.; ASSENHAIMER, C.; RUBIO, J. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v. 77, n. 7, p. 851-857, Oct. 2002.

YANG, Q. X. et al. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnology Letters**, New York, v. 25, n. 9, p. 709-711, May 2003.

ZILLE, A. et al. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 17, p. 1473-1477, June 2003.

ZILLE, A. **Laccase reactions for textile applications**. 2005. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) - Universidade do Minho, Itália, 2005.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO**ARTIGO 1****CATALYTIC STABILITY OF TURNIP PEROXIDASE IN FREE AND
IMMOBILIZED FORM ON CHITOSAN BEADS**

Artigo a ser submetido na revista *Current Organocatalysis*.

Pricila Maria Batista Chagas^{1*}, Juliana Arriel Torres¹, Maria Cristina Silva²,
Francisco Guilherme Esteves Nogueira³, Custódio Donizete dos Santos¹,
Angelita Duarte Corrêa¹

¹Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal
de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

²Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, CEP 30421-169,
Belo Horizonte, MG, Brazil.

³Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CEP 13560-
970, São Carlos, SP, Brazil.

Corresponding authors

Pricila Maria Batista Chagas, Angelita Duarte Corrêa

Laboratório de Bioquímica, Departamento de Química, Universidade Federal de
Lavras

CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

Phone: +(55) 35 8833 7262, +(55) 35 38291272

Email: pricilambatista@yahoo.com.br, angelita@dqi.ufla.br

Abstract - Chitosan beads were prepared, using glutaraldehyde as a crosslinking agent for the immobilization of turnip peroxidase (TP). The morphology and structure of materials were examined by X-ray diffraction and scanning electron microscopy. The activity of free and immobilized TP was studied. The optimum pH was 7.0 for both free and immobilized enzyme. However, immobilization resulted in the stabilization of the enzyme over a wider pH range, and both were active in the temperature range between 30 °C and 50 °C, which favors its use in industrial processes. It was found that storage stability of the immobilized enzyme was better than that of the free enzyme. Both free and immobilized enzyme were used in the color removal of the dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR). In discoloration experiments with immobilized TP, two phenomena were observed: discoloration, due to adsorption on the support (60.45%) and dye degradation, due to the enzyme action (27.50%). The free enzyme removed 62.86% of the color. The immobilized enzyme showed a potential of 61.17% for the removal of the dye color after 6 consecutive cycles and a residual activity of 55.25% after 5 consecutive cycles.

Keywords: Enzyme. Glutaraldehyde. Remazol. Brilliant. Blue R. Discoloration. Storage.

1 INTRODUCTION

Enzymes found in nature have been exploited in industry due to their inherent catalytic properties in complex chemical processes under mild experimental and environmental conditions. Biocatalysts have been successfully exploited for the synthesis of various complex drug intermediates, especially chemicals, and even commodity chemicals in pharmaceutical, chemical, and food industries, due to their ability to catalyze reactions with high speed and unmet specificity under a variety of conditions, as well as their potential as a greener alternative to chemical catalysts [1,2].

Due to their substrate specificity and catalytic properties, biocatalysts have shown potential in wastewater treatment, biotransformations, as well as biosensor constructs. These enzymes could be exploited for the detoxification and remediation of various aromatic pollutants such as phenols, aromatic amines, 2,4,6-trinitrotoluene and dyes, present in wastewater/industrial effluents coming out from several industries, such as textile dyes [3,1].

Peroxidases (donor H_2O_2 oxidoreductase, E.C.1.11.1.7) are enzymes that catalyze the reduction of peroxides, such as hydrogen peroxide and the oxidation of a variety of organic and inorganic compounds [4].

Peroxidase has been used in biotechnology and several other areas of science for establishing clinical diagnoses, in the evaluation of pathological processes, food quality analysis, construction of biosensors for qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical and cosmetic formulas, and in paper and cellulose manufacturing [5,6]. This great diversity of applications is due to the wide substrate specificity of peroxidase catalysis [7]. Furthermore, due to the oxidative nature of peroxidases, there are several areas where it could replace current chemical oxidant techniques [4].

For environmental purposes, peroxidases have been employed for detoxification and removal of various organic pollutants, like phenols, aromatic amines and dyes from polluted wastewater [8]. However, a major obstacle in the commercial application of peroxidases for environmental purposes is their limited stability and reusability, which means that a continuous supply of a large amount of fresh enzyme is required [9]. The stability and catalytic ability of soluble enzymes dramatically decrease with effluent complexity [10].

The industrial application of enzymes is often hampered by their lack of long-term operational stability and shelf-storage life, their cumbersome recovery and reuse. In many cases, a simple way to avoid at least some of these drawbacks is to immobilize enzymes, and a major challenge in industrial biocatalysis is the development of stable, robust and preferably insoluble biocatalysts [11,2]. Immobilized enzymes improve thermostability, operational stability, recovery, reusability, high purity and high product yields in their industrial applications [12]. To make enzymes cost-effective, long-lived, and highly active, various supports have been used to immobilize enzymes [13].

Natural polymers used as carrier materials in immobilization technology, such as alginate, carrageenan, agarose, chitin, and chitosan, have the advantages of being nontoxic, biocompatible, and biodegradable [14]. Chitosan is a deacetylated product of a natural polymer of chitin; it is a polycationic polysaccharide with abundant amino groups, widely used for numerous applications in industrial and biomedical areas, which include: wastewater treatment, chromatographic support, enzyme immobilization, and carriers for controlled drug delivery [15-18].

Chitosan is known as an ideal support material for enzyme immobilization, since its chemical structure, containing reactive amino and hydroxyl groups, makes chitosan easily modified, and also because of its many characteristics, like improved mechanical strength, resistance to chemical

degradation, avoiding the disturbance of metal ions to the enzyme, anti-bacterial properties and low cost [19,21]. Immobilization can be carried out by using glutaraldehyde to form the Schiff's base [16]. Glutaraldehyde is used for immobilization because, in addition to activating the beads, glutaraldehyde also stabilizes enzymes due to the multipoint attachment, as well as due to its polymeric nature. Furthermore, glutaraldehyde provides a long lash, attaching the protein to the matrix and allowing a greater flexibility for conformational changes required for the activity [2].

The properties of the immobilized turnip peroxidase (TP) on chitosan beads were investigated. Experiments were carried out to determine the characteristics of the support and the effect of immobilization on enzyme activity. The best conditions for peroxidase immobilization were defined and some properties of the immobilized system were compared to the free enzyme, including optimum pH and temperature, storage stability, application in dye removal and reusability.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Dye

The textile dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR), which presents an anthraquinone as chromophore, was kindly provided by DyStar (Porto – Portugal) and used as received, without further purification. The dye solution used for degradation experiments was prepared with distilled water.

2.2 Obtention of the enzymatic extract

The enzyme was extracted from turnip roots purchased from the local market. The roots (with peel) were washed in water and cut into small uniform pieces. Turnip roots (30 g) were homogenized in a blender with 100 mL of 0.05 mol L⁻¹ pH 6.5 phosphate buffer for 30 s. The homogenate was filtered in organza cloth and centrifuged at 10000 × g for 15 min, at 4 °C [22]. The obtained solution was subjected to precipitation, by adding cold acetone until reaching 65% (v/v). After a rest from 12 to 14 h, at -18 °C, the homogenate was centrifuged at 11000 × g for 15 min, at 4 °C. The supernatant was collected and acetone was subsequently recovered by distillation in a rotary evaporator, at controlled temperature of 56 °C. The precipitate containing the peroxidase was submitted to the removal of acetone by evaporation in an ice bath for 24 h and was used in the testing storage assays, in the assays of enzyme immobilization, and then used in the dye removal studies.

2.3 Polyacrylamide gel electrophoresis

The anodic electrophoresis was performed in polyacrylamide gel (Acrylamide: bis-acrylamide, 19:1) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS). The sample (crude enzymatic extract) was prepared under non-reducing (absence of β -mercaptoethanol and boiling) and reducing conditions (boiling at 98 °C for ten minutes in a β -mercaptoethanol solution; 0,5 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 6.8; glycerol, 10% SDS (w/v); 0.1% bromophenol blue (w/v)). After application of the sample in the 12% polyacrylamide gel, electrophoresis was carried out in running 0.025 mol L⁻¹ Tris buffer; 0.192 mol L⁻¹ glycine; 0.1% SDS pH 8,3, for a period of 4 h under a current of 80 V. The pattern of relative mass (Mr) of BIO RAD (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 25 kDa, 10 kDa), was subjected to the same electrophoresis, allowing the calculation of Mr protein fractions of the samples. The bands characterizing the protein profile of the samples were stained with the dye coomassie blue, G-250, prepared in the ratio of 0.2% dye to 20% acetic acid. The visualization of peroxidase bands was performed using the same reaction medium activity, with some modifications, using 60 mL solution containing 1% guaiacol and 16 mL of 0.3% hydrogen peroxide in 48 mL of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0; the appearance of a brown-stained band demonstrates the presence of peroxidase. After 30 min at room temperature, the gels were rinsed with distilled water. The gel was reproduced in Scanner and the migration distance of standards was prepared in a graph on a logarithmic function of Mr.

2.4 Preparation of chitosan beads

1.5 g chitosan (low molecular weight, obtained from Sigma) was dissolved in 40 mL of 2.0% aqueous acetic acid. The chitosan solution was

dropped into an aqueous 2 mol L⁻¹ NaOH solution, where chitosan precipitated immediately to form gelatinous beads [23]. The chitosan beads were thoroughly washed with distilled water until neutrality was reached.

2.5 Crosslinking of chitosan beads with glutaraldehyde treatment

The crosslinking of chitosan beads with glutaraldehyde was carried out by immersion of 17.60 g hydrated chitosan (1 g dry weight of chitosan) in 15 mL of 2.5% glutaraldehyde solution, stirring for 24 h at 25 °C. The beads were washed with distilled water to remove excess glutaraldehyde.

2.6 Characterization of chitosan beads

Diameter and density of the chitosan beads were determined by picnometry, and bead porosity was determined using the gravimetric method in three replications [24]. The chitosan degree of deacetylation was obtained by potentiometric titration in three replications [25]. The structure of the materials was analysed by X-ray diffraction (XRD) spectra, data were collected using an X'Pert Pro Multi-purpose X-ray diffraction (MPD) system employing Cu K α radiation ($\lambda = 0.154$ nm), and operated at 40 mA and 45 kV. The morphology of the materials was obtained using a SEM LEO 440 equipment provided with an OXFORD detector, and the electron beam operated at 15 k.

2.7 Immobilization of turnip peroxidase

The crosslinked chitosan beads were used as supports for the immobilization of turnip peroxidase; 120 beads were added (or 5.04 g \pm 0.015 hydrated weight of the beads) in 10 mL of TP precipitate. The assembly was

subjected to slight stirring in a water bath at 20 °C, and aliquots of supernatant were removed at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. The total protein determination was carried out according to Bradford [26] and the enzymatic activity, by the method proposed by Khan and Robinson [27]. After the determination of total protein and enzymatic activity, the coupled protein (CP) and immobilization yield (IY) were estimated according to equations (1) and (2), respectively:

$$\text{Coupled protein (\%)} = \frac{\text{amount coupled protein}}{\text{amount introduced protein}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Immobilization yield (\%)} = \frac{At_0 - At_t}{At_0} \times 100 \quad (2)$$

At_t = enzymatic activity of the supernatant after the incubation period and At_0 = enzyme activity of the supernatant before incubation

2.8 Activity measurement of free and immobilized turnip peroxidase

The activities of the free and immobilized enzyme were tested according to the methodology described by Khan and Robinson [27], with modifications; the following reaction media were used: 1.5 mL guaiacol (Vetec; 97%, v/v) 1% (v/v); 0.4 mL H₂O₂ (Vetec, PA) 0.3% (v/v); 0.1 mL free enzyme (or approximately 4 mg immobilized enzyme, the equivalent weight of a bead) and 1.2 mL of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0. The reaction was monitored during 3 min at 30 °C, using a Spectrovision spectrophotometer coupled to a thermostatic bath. Tests for the immobilized enzyme were performed in the same conditions used for the free enzyme, except that the reaction medium was maintained with stirring, and interrupted by removal of the chitosan beads from

the reaction mixture. The absorbance of the mixture was determined, and the enzymatic activity of immobilized peroxidase was calculated.

One unit of peroxidase activity represents the formation of 1 μmol tetraguaiacol during 1 min in the assay conditions and it was calculated using data relative to the linear portion of the curve.

The relative activity was calculated using equation 3.

$$\text{Relative activity (\%)} = (\text{Activity}/\text{Maximum activity}) \times 100 \quad (3)$$

2.9 Influence of pH

The optimum pH was determined by varying the pH of the buffer solutions from 2.0 to 9.0 in intervals of one pH unit. Reaction rates of free and immobilized enzyme preparations, were investigated using the buffers citrate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 2.0 to 6.0), phosphate (0.1 mol L⁻¹, pH 7.0) and Tris-HCl buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 8.0 and 9.0). The immobilized enzyme was incubated for 10 min in the buffers before the activity measurement.

2.10 Influence of temperature

The thermal stability of peroxidase was evaluated by incubating the free and immobilized enzyme for 1, 2, 3 and 4 h, and by varying the temperature from 20 °C to 90 °C at intervals of 10 °C. After the thermal treatment, the samples were cooled in an ice bath, and the residual activity was determined.

2.11 Storage stability of free and immobilized turnip peroxidase

The activity of free TP was investigated subjecting the precipitate to the four forms of storage, in three replicates : A) 0.2 g of TP precipitate stored in eppendorf at -20 °C in the freezer; B) 0.2 g of TP precipitate stored in the refrigerator at 3 °C ; C) 1.5 mL of enzyme extract stored in eppendorf in the freezer at -20 °C (prepared from 4 g of TP precipitate resuspended in 30 mL of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0) and D) 1.5 mL of enzyme extract stored in the refrigerator in eppendorf at 3 °C (the same preparation which was performed in C).

The activity of the stored immobilized enzyme was measured in two different ways: A) beads stored in the refrigerator at 3 °C; B) beads stored in the freezer at -20 °C.

From 10 to 10 days, the activity of free and immobilized enzyme was measured for each form of storage for a period of 170 days.

2.12 Discoloration assay

Based on the methodology described by Silva *et al.* [28] with modifications, the enzymatic oxidation reactions of the textile dyes were conducted at 30 °C in a 1.2 mL phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 7.0) containing 0.4 mL H₂O₂ (100 μmol L⁻¹), 1.5 mL Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (50 mg L⁻¹), and 0.1 mL free enzyme (23.80 U mL⁻¹ or specific activity 63.13 U mg⁻¹) and, for the immobilized enzyme, 0.012 g ± 0.003 (0.036 U bead⁻¹ or specific activity 5.61 U mg⁻¹).

The reaction mixture was incubated in a water bath with mild stirring. The consumption of RBBR was monitored at 596 nm, which corresponds to the

maximum absorption wavelength of this dye. The amount of oxidized dye was estimated according to the equation 4.

$$\frac{\text{absorbance}_{\text{initial}} - \text{absorbance}_{\text{final}}}{\text{absorbance}_{\text{initial}}} \times (100) \quad (4)$$

The same procedure was performed with the chitosan beads without enzyme to evaluate the adsorption material; the analysis was carried out in three replications.

2.13 Reusability of immobilized turnip peroxidase on dye discoloration

Repeated application of immobilized TP was studied by the repeated use of immobilized peroxidase beads for RBBR removal (1.5 mL dye concentration 50 mg L⁻¹; H₂O₂ dose 0.4 mL; 1.2 mL of 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0, 0.012 g ± 0.003 of immobilized peroxidase (0.036 U bead⁻¹)). The reaction mixture was incubated in a water bath with mild agitation during 80 min. At the end of each cycle, the same immobilized enzyme was washed with 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0, and the procedure was repeated with a fresh aliquot of substrate. The analysis was carried out in three replications.

2.14 Operational stability

The residual activity of the immobilized enzyme was determined under standard assay conditions. Several consecutive operating cycles were performed using guaiacol and H₂O₂ as substrates, in order to evaluate assess the operating stability of the immobilized TP. At the end of each cycle, the same immobilized enzyme was washed with 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.0, and the

procedure was repeated with a fresh aliquot of substrate. The analysis was carried out in three replications.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Turnip peroxidase characterization

Due to the widespread use of peroxidases, mainly as an environmental biocatalyst, there is a growing interest in new sources of this enzyme and processes for obtaining it at a low cost. Silva *et al.* [22] investigated various vegetables as a peroxidase source. In this study, it was observed that turnip roots constitute a rich peroxidase source, and presented a low cost alternative in the dye removal, without purification. In this context, the objectives of this study include the obtention of a process for stabilizing and reusing turnip peroxidase, maintaining the low cost.

After the precipitation of TP, the mass yield was $5.25 \% \pm 0.17$. The enzymatic TP extract was subjected to electrophoresis to estimate the molecular weight. After coomassie blue staining, a denatured broad peroxidase band was detected, with an approximate molecular weight of 39.50 kDa (Figure 1A, lanes 1 and Figure 1B). This was not observed in the unreduced form (Figure 1A, lanes 2), which can be attributed to the fact that plant peroxidases are glycoproteins. The thermal denaturation of the glycoprotein promoted the release of the carbohydrate, allowing the appearance of the band in gel electrophoresis. In order to reveal peroxidase activity, the same gel was revealed with the reaction medium of peroxidase activity in this study, the brown-stained band proved the existence of peroxidase (Figure 1A, lanes 4).

Similar results were obtained by Quintanilla-Guerrero *et al.* [29], who found an approximate molecular weight of 40.0 kDa for purified turnip peroxidase. Also, Duarte Vazquez [30] observed that the molecular weight of denatured peroxidases were 39.2 to 42.5 kDa for the isoenzyme.

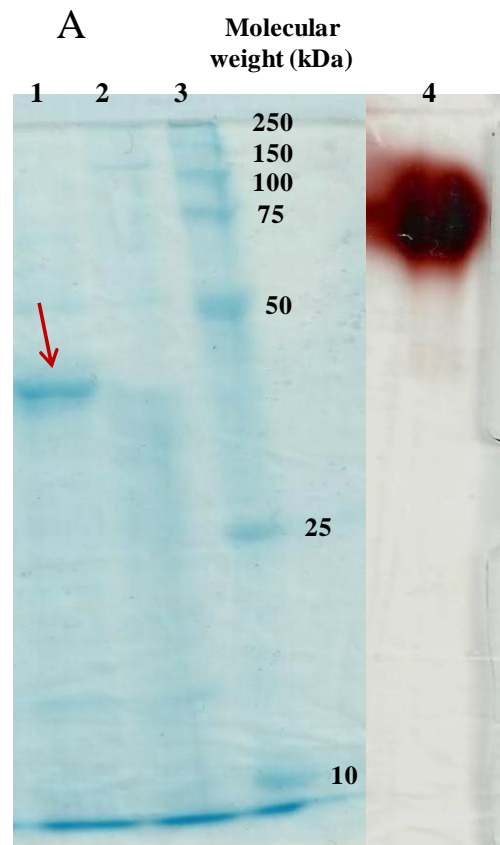
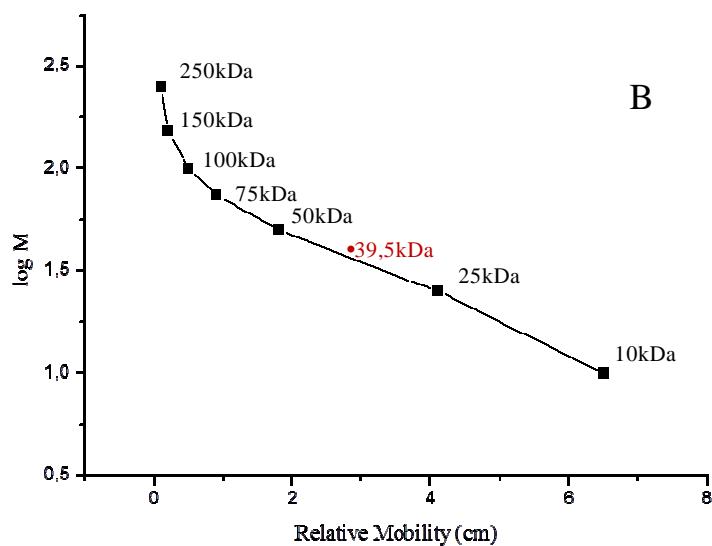


Figure 1 **A**) Extract of turnip peroxidase (reduced lane 1 and unreduced lane 2); molecular weight standard (lane 3); brown colored band with guaiacol shows peroxidase activity (lane 4) **B**) Determination of the molecular weight of turnip peroxidase by the linear regression of log molecular weight, with relative mobility of marker proteins on the gel
(...continue...)



3.2 Characterization of chitosan beads

In this study, the immobilization of TP onto chitosan beads with 2.5% glutaraldehyde solution was investigated. Glutaraldehyde activation of solid support media has been extensively studied for biomolecule immobilization since it is simple, efficient and inexpensive [31]. Glutaraldehyde is used to activate aminated supports and immobilize the enzyme by physical adsorption, followed by covalent binding, immobilizing the enzyme on a glutaraldehyde pre-activated support [32,33]. The importance of glutaraldehyde activation is due to its reliability and ease of use, but more importantly, due to the availability of amino groups for glutaraldehyde reaction, not only with enzymes, but also with chitosan [34].

An illustrative scheme of TP covalent immobilization on chitosan beads is shown in Figure 2. During the reaction, the aldehyde group on the surface of chitosan beads interacted with the amino group of the enzyme to form an imino

group ($-\text{CH}=\text{N}-$). Multipoint covalent attachment of enzymes on highly activated supports promotes a rigidification of the structure of the immobilized enzyme. This rigidification reduces any conformational changes involved in enzyme inactivation and increases enzyme stability [35]. The properties of the immobilized enzyme are significantly determined by the immobilization procedure; thus, it is important to discuss the main factors that influence TP immobilization.

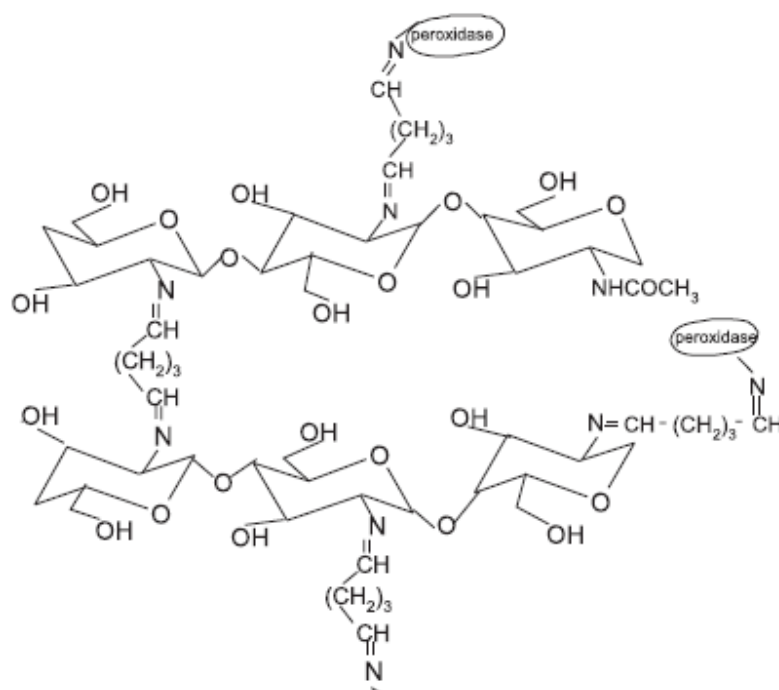


Figure 2 Schematic illustration of peroxidase immobilization on chitosan beads by crosslinking with glutaraldehyde. Source: Oliveira and Vieira [36], with modification

Recent studies show that chitosan can be used to prepare beads for different purposes. Its versatility allows the preparation of polymer beads of different shapes and sizes, including different products and derivatives. It has

been shown that supports with different particle sizes have an effect of the amount of immobilized enzyme, immobilization yield, immobilized enzyme activity and specific activity of the immobilized enzyme. The use of porous chitosan particles presents numerous advantages in the enzyme immobilization process [32,37].

Table 1 shows the results of the physical characterization of chitosan beads activated with glutaraldehyde. It can be observed that the activated beads showed a decrease in particle porosity and diameter, when compared to non-activated particles. This decrease was probably due to the crosslinking of polymeric chitosan chains with the glutaraldehyde that approached the chains and, therefore, decreased the pore sizes of the matrix [38]. On the other hand, particle density did not change after activation.

Table 1 Physical characterization of chitosan beads

Chitosan beads	Density (g mL⁻¹)	Bead diameter (mm)	Porosity
Non-activated beads	1.06 ± 0.06	0.44 ± 0.01	1.04 ± 0.04
Activated glutaraldehyde	1.07 ± 0.06	0.42 ± 0.01	0.93 ± 0.00

Data are the average of three replicates

The degree of deacetylation (DD) is defined as the average number of amino groups in relation to the amide groups of the polymer chain [39]. The DD calculated in the chitosan powder and in the beads without crosslinking by this method was 77.02% ± 1.17 and 80.7% ± 1.35. The beads crosslinked with glutaraldehyde did not present protonatable amino groups, measured by the potentiometric titration method. This result suggests that glutaraldehyde binded to the chitosan amino groups.

The structure of the materials was studied by X-ray diffractometry. All materials showed diffraction peaks at $2\theta = 20^\circ$ related to chitosan (Figure 3). In Figures 3A and 3B, in addition to the peak at $2\theta = 20^\circ$, a halo diffraction was observed at $2\theta = 10^\circ$, also referring to chitosan; these peaks are in agreement with the results described in the literature [40,41]. According to Uragami [42], strong intra-and intermolecular interactions, due to hydrogen bonds between the amine groups, alcohol and amide groups present in the molecule of chitosan, make this material present a certain crystallinity. In Figure 3C, it was possible to observe the complete disappearance of the diffraction peak at $2\theta = 10^\circ$ together with a significant decrease in the crystallinity of the material after activation with glutaraldehyde.

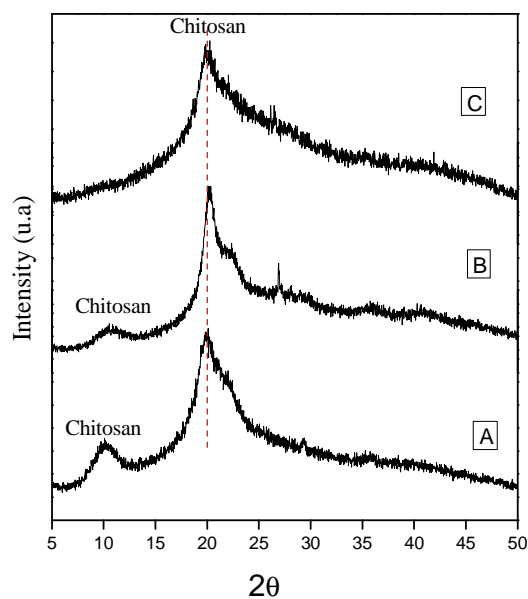


Figure 3 X-ray diffraction. **A)** powder chitosan; **B)** chitosan beads without crosslinking; **C)** beads crosslinked with 2.5% glutaraldehyde

The immobilization of peroxidase on the surface of chitosan beads activated with glutaraldehyde was analyzed by scanning electron microscope (SEM). The results obtained by SEM showed the formation of small granules of irregular sizes for the chitosan powder (Figure 4, A and B). Following the procedure for obtaining the chitosan beads, it is noted that the bead without treatment with glutaraldehyde (Figure 4 C and D) showed roughness on its surface, while the beads crosslinked with glutaraldehyde had a significant change in the surface (Figure E and F), making it more uniform. In the reaction of chitosan with glutaraldehyde, there was a nucleophilic attack of the amino groups of chitosan to the carbonyl groups of glutaraldehyde, causing it to resist extremes of pH and temperature (increased physical and chemical stability of chitosan) [17,43]. It was found, however, that crosslinking did not generate pores in the surface, practically preserving the original dimensions of the beads before crosslinking. Changes in the topology of the beads (Figure 4, G and H) confirm the immobilization of the enzyme on the surface of chitosan beads.

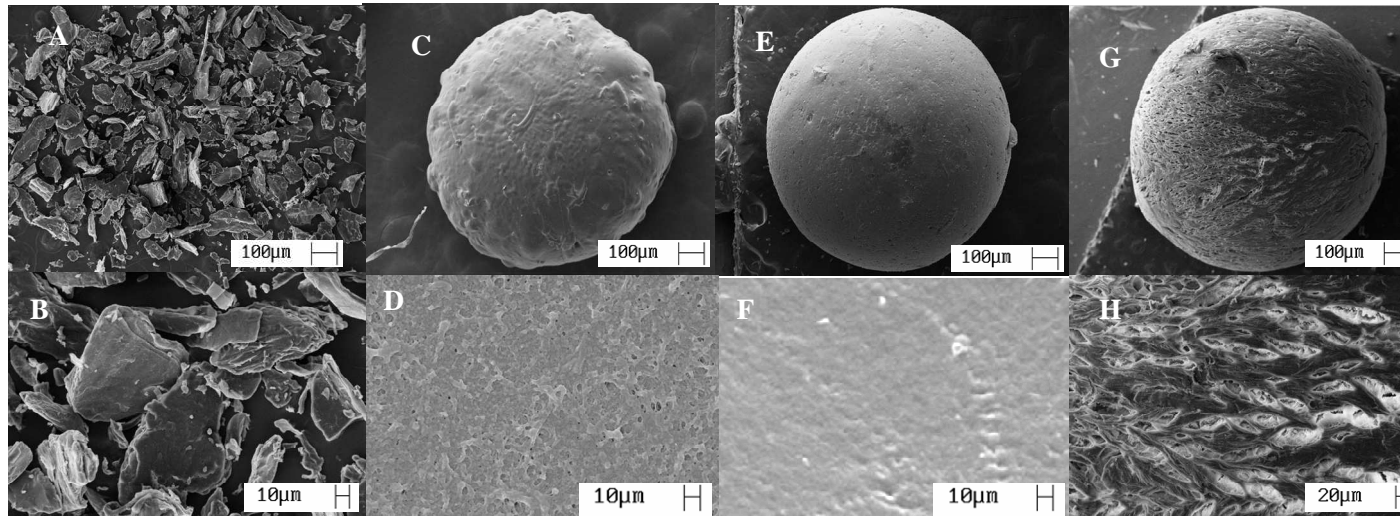


Figure 4 Scanning electron microscope (SEM) images. **A**) chitosan powder (100 μm) ; **B**) chitosan powder (10 μm); **C**) beads without cross-linking (100 μm); **D**) beads without cross-linking (10 μm); **E**) chitosan beads crosslinked with 2.5% glutaraldehyde (100 μm); **F**) beads cross-linking with 2.5% glutaraldehyde (10 μm); **G**) chitosan beads after immobilization of peroxidase (100 μm); **H**) chitosan beads after immobilization of peroxidase (20 μm)

3.3 Immobilization of turnip peroxidase

Turnip peroxidase was immobilized on chitosan beads for different times, ranging from 1 h to 6 h. The effect of time on TP immobilization in terms of *coupled protein (CP)* and *immobilization yield (IY)* is shown in Figure 5. The coupling time of 4 h gives the highest coupled protein and immobilization yield (CP = 50.48%, and YI = 51.23%). However, prolonging the reaction time up to 6 h, decreases in immobilization yield and coupled protein were observed.

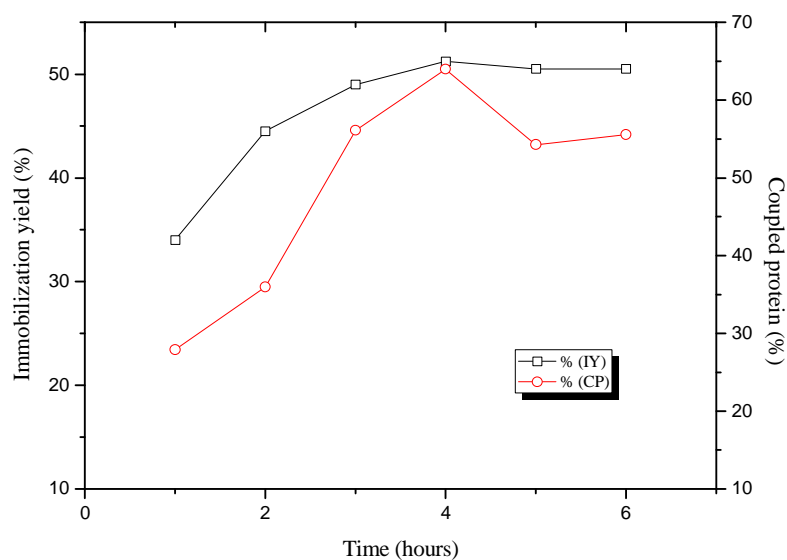


Figure 5 Effect of time on immobilization of turnip peroxidase at 20 °C

The effect of different concentrations of the free enzyme was investigated in the immobilization process by *coupled protein (CP)* and *immobilization yield (IY)*. A decrease in immobilization yield and coupled protein was observed (Table 2), due to the increasing concentration of free enzyme; however, the immobilized enzyme activity increased, and it may be

due to saturation of the binding sites of the support, causing a partial or total blockage of the pore entrance [38].

Table 2 Effect of different concentrations of the free turnip peroxidase on the *coupled protein* (CP) and *immobilization yield* (IY)

Enzyme (U mL ⁻¹)	IY (%)	CP (%)	Enzyme activity U beads ⁻¹
4.60	84.33	92.01	0.005
8.47	79.20	85.32	0.015
17.31	70.83	72.00	0.026
34.61	58.33	53.91	0.045

U = 1 $\mu\text{mol tetraguaiacol min}^{-1}$ of reaction

3.4 Effect of pH on the activity of turnip peroxidase

The results of pH on the activity of free and immobilized enzyme are presented in Figure 6. The stabilities of both enzymes show some similarities. In acidic pH, TP presented a decrease in activity. This activity decrease might have occurred mainly by ionic alterations of the enzyme, which alter the form of the enzyme and, consequently, the active site. The activity decrease can also be observed at pH 8 and 9.

Both free and immobilized enzyme presented an optimum pH of 7.0; however, the immobilized peroxidase had a broader pH stability than the free enzyme. It suggested that the immobilized enzyme was less sensitive to pH changes than the free enzyme, owing to the protection of the enzyme by immobilization. However, it has been demonstrated that the entrapment of enzymes in gel beads provides a microenvironment for enzyme, which plays an important role in the protonation state of the protein molecule [44,45].

The procedure of enzyme immobilization on insoluble carriers has a variety of effects on protein conformation, as well as on the ionization state of the enzyme and its environment, and it is not uncommon to result in changes in the relationship between pH and enzyme stability, and activity. It is known that, in some cases, when the enzyme is coupled with a polyanionic carrier, the optimum pH usually shifts towards the alkaline direction, whereas if the carrier is polycationic (e.g. chitosan), the shift is towards the acid direction [46].

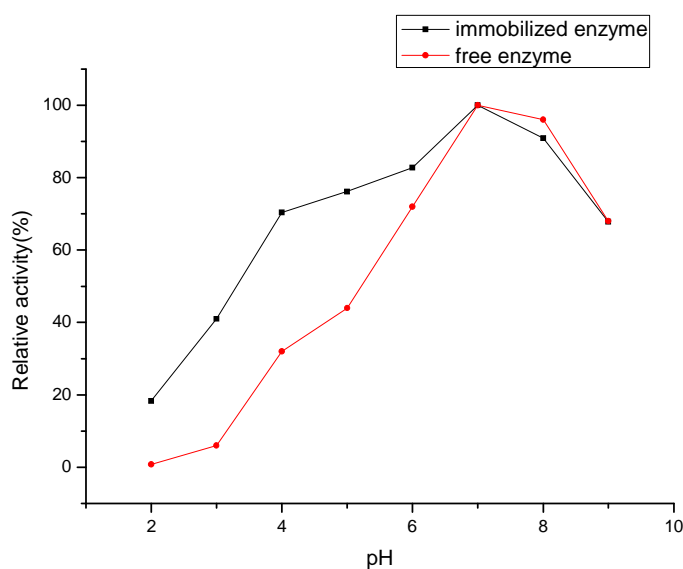


Figure 6 Effect of pH on the activity of turnip peroxidase

3.5 Effect of temperature on activity of turnip peroxidase

The study of the effect of temperature on the activity of the free and immobilized enzyme after 1 h, 2 h, 3 h and 4 h of incubation is shown in Figure 7 (A and B). The thermal stability of the free and immobilized enzyme after 1

hour of incubation follow the same profile, both showed a high activity at 30 °C and, at 60 °C, a decrease in the reaction rate was observed . After 70 °C, the free and immobilized enzyme are completely denatured.

After 4 h of incubation at 50 °C and 60 °C, the free enzyme displayed a relative activity of 82.65% and 60.47% respectively, whereas the activity of the immobilized enzyme dropped significantly at these temperatures (53.84% and 19.23% relative activity), indicating that the enzyme activity became more dependent on the temperature after immobilization. The enzyme thermal stability is one of the important criteria for its long-term and commercial application: the higher stability and enzymatic activity, the better enzyme application capacity in diverse methods, such as application as biocatalysts [46,6]. According to the results obtained in a temperature range of 30 °C to 50 °C, the free and immobilized enzymes did not present a significant decrease in the enzymatic activity, which favors its use in industrial processes.

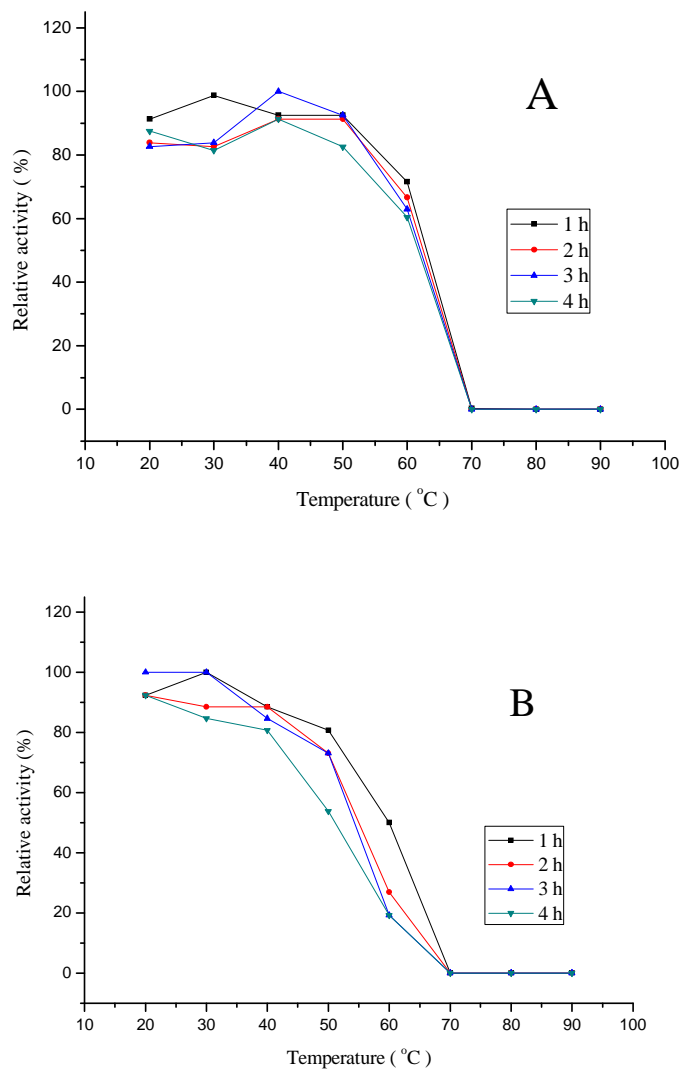


Figure 7 Influence of temperature and incubation time on the stability of turnip peroxidase. **A)** free; **B)** immobilized

3.6 Storage stability of turnip peroxidase

The enzymatic activities for the four storage forms of the free TP ((A) precipitated enzyme at -20 °C, (B) precipitated enzyme at 3 °C, (C), enzyme extract at -20 °C and (D) enzyme extract at 3 °C) are shown in Figure 8. The enzymatic activity was maintained at an average of 80% within 90 days, regardless of the storage form. After 170 days of storage, form (A) showed the highest enzyme activity with a loss of 33.4%, while form (B) presented a loss of 52.4%, which can be attributed to fungal growth, which occurred after 80 days of storage. The obtained data suggests, therefore, that the storage form B was not adequate.

Mohamed *et al.* [47] studied the storage of miswak peroxidase, measuring peroxidase activity in liquid and powder (lyophilization) forms during 8 weeks at 4 °C, with a relative activity of 70% and 95%, respectively. At the end of the storage period, the results were similar to those found in the present study, considering enzyme powder the best form of storage.

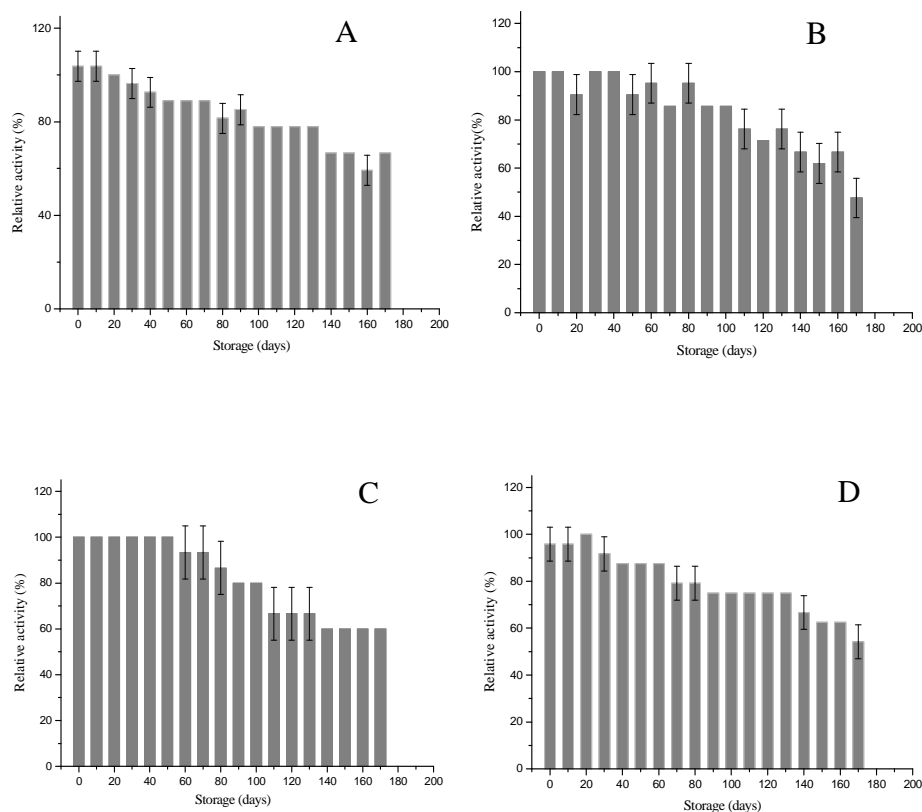


Figure 8 Enzymatic activity of the four storage forms of the free turnip peroxidase (TP) in the period of 170 days. **A)** TP precipitate at -20°C ; **B)** TP precipitate at 3°C ; **C)** TP extract at -20°C and **D)** TP extract at 3°C . Data are the average of three replicates

For enzyme immobilization, another important factor that needs to be taken into account is the storage stability of the immobilized enzyme. The enzymatic activities for the two storage forms of the immobilized enzyme ((A) beads stored in the refrigerator at 3°C ; (B) beads stored in the freezer at -20°C) are shown in Figure 9. The enzymatic activity of storage form (A) was kept around 85% after 80 days and, at the end of storage, showed a loss in activity of 68%. The storage of the immobilized enzyme in the freezer showed excellent

results, since it was observed that it maintained its activity by 100% up to 130 days, with a loss of only 9% at the end of storage.

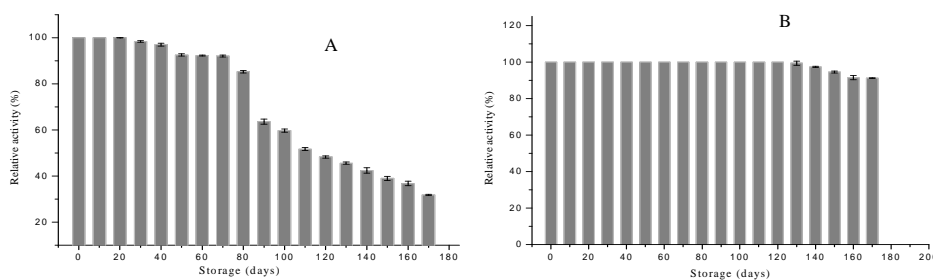


Figure 9 Enzymatic activity of the two storage forms of the immobilized turnip peroxidase in the period of 170 days. **A)** beads stored in the refrigerator at 3 °C; **B)** beads stored in the freezer at -20 °C

The immobilized TP retained about 91% of its original activity after 170 days at -20 °C (Figure 9 B), while the free enzyme maintained about 66% of its original activity over the same period of time (Figure 8 A). The reason might be attributed to possible distortion effects imposed by the aqueous medium. The charged residues could be neutralized by the interaction with the substrate or less exposed after immobilization, thus leading to an increase in the resistance of the immobilized TP to conformational changes in solution [18].

For both free and immobilized enzyme, the best way to store was keeping the enzyme at -20 °C.

3.7 Discoloration of RBBR by the free and immobilized enzyme

The dye Remazol Brilliant Blue R (RBBR) has been used as a model substance in several studies on dye degradation and different kinds of physical, chemical and biological processes have been tested for its removal. RBBR is an

industrially important dye that is frequently used as a starting material in the production of polymeric dyes, is a derivative anthracene and represents an important class of toxic and recalcitrant organopollutants [48].

The discoloration of the dye in aqueous solution catalyzed by the free TP (23.80 U mL^{-1}) was $62.86\% \pm 1.8$ after 40 min in the presence of the enzyme (Figure 10A). Similar results were found by Silva *et al.* [22], who obtained $66.00\% \pm 3.8$ of RBBR discoloration in aqueous solution with turnip peroxidase under similar conditions. The removal of RBBR catalyzed by the immobilized enzyme was $87.95\% \pm 0.56$ after 140 min of incubation (Figure 10B). The greater discoloration performance of the immobilized enzyme, in comparison to the free enzyme, could be explained by a high dye adsorption on the chitosan support. Two phenomena were observed: discoloration, due to adsorption on the support (60.45%) and dye degradation, due to the enzyme action (27.50%).

Chitosan is well known as an excellent biosorbent of heavy metal ions, dyes and proteins. It contains a large number of $-\text{NH}_2$ and $-\text{OH}$ groups and is able to remove this stuff in near-neutral solutions, through various types of interaction mechanisms, such as electrostatic attractions, chelation, among others. This explains the high adsorption of the dye in chitosan beads [49,50].

Similar behaviors were observed by Zille *et al.* [10], who investigated the removal of the dye Reactive Black 5, catalyzed by free and immobilized laccase. In this study, a dye removal of 79% was observed, due to adsorption on the alumina support, and 4% due to the enzyme action.

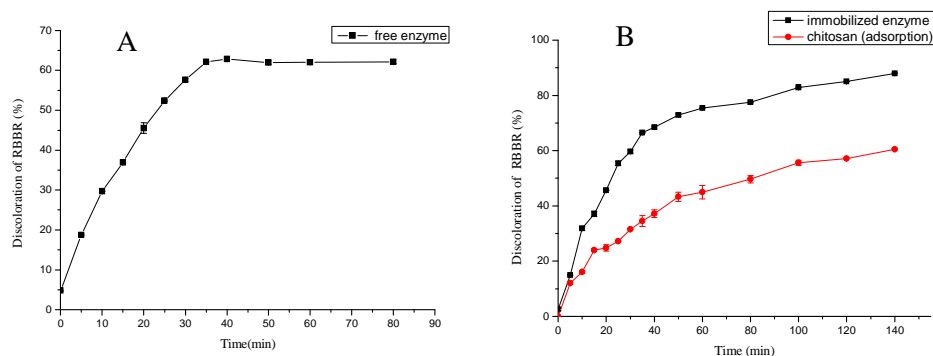


Figure 10 Reaction progress on the discoloration of Remazol Brilliant Blue R. **A)** free turnip peroxidase; **B)** immobilized turnip peroxidase and adsorption on chitosan. Data are the average of three replicates

3.8 Reuse of immobilized turnip peroxidase in the discoloration of RBBR

Reusability is one of the significant indices to evaluate the application of immobilized enzymes in industries [9]. Besides enhanced stability, enzymes can acquire additional advantageous properties via immobilization: immobilized enzymes can be used repeatedly or continuously in a variety of reactors; can be easily separated from soluble reaction products and untreated substrate and they involve reduced operational cost [34,51].

The immobilized enzyme could be easily removed and assessed for its remained catalytic activity. In this study, after 6 times of the repeated test, the dye removal efficiency was reduced to 38.83% of the initial value (Figure 11). This result might be explained by the plugging of the chitosan pore through the adsorption of the dye in the interior environment of each bead, reaching the active site of the enzyme, resulting in the loss of the enzymatic activity.

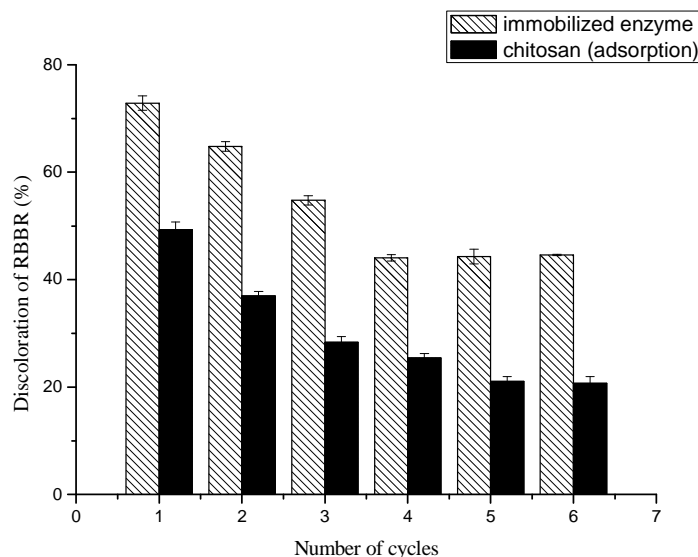


Figure 11 Removal of 50 mg L^{-1} Remazol Brilliant Blue R with repeated applications of immobilized turnip peroxidase. Data are the average of three replicates

3.9 Operating stability

The operational stability of immobilized TP is shown in Figure 12. After 5 consecutive operations, the immobilized enzyme could retain $55.25\% \pm 1.01$ residual activity and, at the end of 8 cycles, the enzyme still retained $43.18\% \pm 0.43$ residual activity. This loss in activity may be due to the adsorption of tetraguaiacol (product formed in the reaction medium), because it causes the beads to brown after subsequent cycles.

Monier *et al.* [52] observed that, after 6 consecutive operations, the immobilized horseradish peroxidase (HRP) on modified chitosan beads could retain 65.8% residual activity. Arslan [53] also obtained better results, using a different material in the immobilization, the immobilized HRP on the activated poly(ethylene terephthalate) fibers retained a relative activity of 69.6% after 5

cycles. These responses can be better attributed to the use of different carriers and purified enzymes.

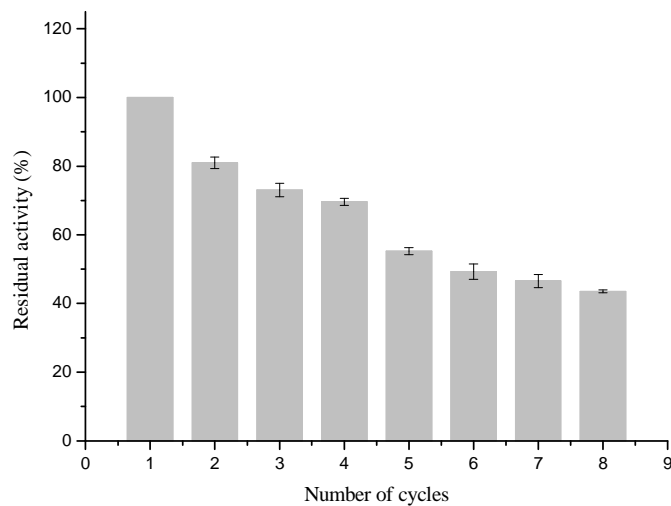


Figure 12 Operating stability of the immobilized turnip peroxidase. Data are the average of three replicates

4 CONCLUSION

Turnip peroxidase was successfully characterized and immobilized onto chitosan with glutaraldehyde. The optimum pH 7.0 was the same for both free and immobilized peroxidase. Immobilization improved the stability of peroxidase in the acidic region, and both were active in the temperature range between 30 °C and 50 °C.

It was found that the storage stability of the immobilized enzyme was better than that of the free enzyme.

It was possible to observe a removal of about 87.95% Remazol Brilliant Blue R with immobilized TP, while 62.86% of the removal was found with the free enzyme. The discoloration with immobilized enzyme was due to adsorption on the support, and enzymatic degradation of the dye.

Enzyme immobilization provided an increase in the stability of the enzyme regarding some parameters, besides enabling the recovery of the enzyme from the reaction medium and its reuse.

Acknowledgment: CAPES, CNPq, FAPEMIG.

REFERENCES

- [1] Husain, Q., Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: A review. *Critl. Rev. Biotechnol.* **2006**, *26* (4), 201-221.
- [2] Singh, R.; Lee, J. K., From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (1), 1232-1277.
- [3] Kulshrestha, Y.; Husain, Q., Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. *Biomol. Eng.* **2006**, *23* (6), 291-297.
- [4] Hamid, M.; Khalil ur, R., Potential applications of peroxidases. *Food Chem.* **2009**, *115* (4), 1177-1186.
- [5] Maciel, H. P. F.; Gouvêa, C. M. C. P.; Pastore, G. M., Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf com alta atividade. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26* (4), 735- 739.
- [6] Maciel, H. P. F.; Gouvêa, C. M. C. P.; Pastore, G. M., Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaves. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27* (2), 221- 225.
- [7] Hiner, A. N. P.; Hernandez-Ruiz, J.; Williams, G. A.; Arnao, M. B.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M., Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *392* (2), 295-302.

- [8] Regalado, C.; García-Almendárez, B. E.; Duarte Vázquez, M. A., Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3* (2), 243-256.
- [9] Akhtar, S.; Husain, Q., Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. *Chemosphere* **2006**, *65* (7), 1228-1235.
- [10] Zille, A.; Tzanov, T.; Gubitz, G. M.; Cavaco-Paulo, A., Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25* (17), 1473-1477.
- [11] Satar, R.; Husain, Q., Catalyzed degradation of disperse dyes by calcium alginate-pectin entrapped bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase. *J. Environ. Sci-China* **2011**, *23* (7), 1135-1142.
- [12] Kennedy, J.F.; White, C. A. *Principles of Immobilization of Enzymes* – In : Alan Wiseman (ed), *Handbook of Enzymes Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York **1985**, cap. 4., pp. 147.
- [13] Wang, Z.-G.; Wan, L.-S.; Liu, Z.-M.; Huang, X.-J.; Xu, Z.-K., Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. *J. Mol. Catal B-Enzym* **2009**, *56* (4), 189-195.
- [14] Chun, K. H.; Kwon, I. C.; Kim, Y. H.; La, S. B.; Sohn, Y. T.; Jeong, S. Y., Preparation of sodium alginate microspheres containing hydrophilic beta-lactam antibiotics. *Arch. Pharmacol Res.* **1996**, *19* (2), 106-111.
- [15] Franca, E. F.; Lins, R. D.; Freitas, L. C. G.; Straatsma, T. P., Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4* (12), 2141-2149.

- [16] Jiang, D. S.; Long, S. Y.; Huang, J.; Xiao, H. Y.; Zhou, J. Y., Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochem. Eng. J.* **2005**, *25* (1), 15-23.
- [17] Kosaraju, S. L.; D'Ath, L.; Lawrence, A., Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64* (2), 163-167.
- [18] Zhai, R.; Zhang, B.; Wan, Y. Z.; Li, C. C.; Wang, J. T.; Liu, J. D., Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chem. Eng. J.* **2013**, *214*, 304-309.
- [19] Duran, N.; Rosa, M. A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L., Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31* (7), 907-93.
- [20] Juang, R. S.; Wu, F. C.; Tseng, R. L., Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. *Adv. Environ. Res.* **2002**, *6* (2), 171-177.
- [21] Li, F.; Chen, W.; Tang, C. F.; Zhang, S. S., Development of hydrogen peroxide biosensor based on in situ covalent immobilization of horseradish peroxidase by one-pot polysaccharide-incorporated sol-gel process. *Talanta* **2009**, *77* (4), 1304-1308.
- [22] Silva, M. C.; Correa, A. D.; Amorim, M.; Parpot, P.; Torres, J. A.; Chagas, P. M. B., Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2012**, *77*, 9-14.
- [23] Goy, R.C.; Assis, O.B.G.; Campana-Filho, S.P., Produção de esferas de quitosana. *Rev. Brasil. Biotecnol.* **2004**, *33*, 30-34.

[24] Gonçalves, L.R.B., Giordano, R.L.C.; Giordano, R. C. Effects of Diffusion on the Kinetics of Maltose Hydrolysis using Glucoamylase Immobilized on Macroporous Silica. *Braz. J. Chem Eng.* **1997**, *4* (14).

[25] Broussignac, J., Un hault polymere naturel per connum dans l'industrie le chitosan. *Chimie et Industrie-Genie Chimique* **1972**, *99*, 1241-1249.

[26] Bradford, M.M., A rapid and sensive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 254.

[27] Khan, A. A.; Robinson, D. S., Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food Chem.* **1994**, *49* (4), 407-410.

[28] Silva, M. C.; Torres, J. A.; de Sa, L. R. V.; Chagas, P. M. B.; Ferreira-Leitao, V. S.; Correa, A. D., The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. *J. Mol. Catal B-Enzym.* **2013**, *89*, 122-129.

[29] Quintanilla-Guerrero, F.; Duarte-Vazquez, M. A.; Garcia-Almendarez, B. E.; Tinoco, R.; Vazquez-Duhalt, R.; Regalado, C., Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99* (18), 8605-8611.

[30] Duarte-Vazquez, M. A.; Garcia-Almendarez, B.; Regalado, C.; Whitaker, J. R., Purification and partial characterization of three turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) peroxidases. *Journal of Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (5), 1574-1579.

[31] Goddard, J. M.; Hotchkiss, J. H., Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (7), 698-725.

[32] Aybastier, O.; Sahin, S.; Isik, E.; Demir, C., Determination of total phenolic content in Prunella L. by horseradish peroxidase immobilized onto chitosan beads. *Anal. Methods* **2011**, 3 (10), 2289.

[33] Betancor, L.; Lopez-Gallego, F.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Mateo, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M., Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39 (4), 877-882.

[34] Krajewska, B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35 (2-3), 126-139.

[35] Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40 (6), 1451-1463.

[36] Oliveira, I. R. W. Z.; Vieira, I. C., Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Quím. Nova* **2006**, 29 (5), 932-939.

[37] Azevedo V. V. C.; Chaves, A. S.; Bezerra, C. D.; Lia Food, V. M.; Costa, M. F. C. A., Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev. Eletrônica Mater. Processos* **2007**, 2 (3), 27-34.

[38] Adriano, W. S.; Filho, E. H. C.; Silva, J. A.; Giordano, R. L. C.; Goncalves, L. R. B., Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Braz. J. Chem. Eng.* **2005**, 22 (4), 529-538.

[39] Raymond, L.; Morin, F. G.; Marchessault, R. H., Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydr. Res.* **1993**, 246, 331-336.

[40] Liu, C. X.; Bai, R. B., Preparation of chitosan/cellulose acetate blend hollow fibers for adsorptive performance. *J. Membr. Sci.* **2005**, *267* (1-2), 68-77.

[41] Martins, A. O.; Da Silva, E. L.; Carasek, E.; Laranjeira, M. C. M.; De Favere, V. T., Sulphoxine immobilized onto chitosan microspheres by spray drying: application for metal ions preconcentration by flow injection analysis. *Talanta* **2004**, *63* (2), 397-403.

[42] Uragami T.; Tokura S. *Material Science of Chitin and Chitosan*, (eds) Japan: Kodansha Ltd., Springer, 2006.

[43] Krishna, B. L.; Singh, A. N.; Patra, S.; Dubey, V. K., Purification, characterization and immobilization of urease from *Momordica charantia* seeds. *Process Biochem.* **2011**, *46* (7), 1486-1491.

[44] Matto, M.; Husain, Q., Peroxide and redox mediators Decolorization of direct dyes by salt fractionated turnip proteins enhanced in the presence of hydrogen. *Chemosphere* **2007**, *69* (2), 338-345.

[45] Matto, M.; Satar, R.; Husain, Q., Application of Calcium Alginate-Starch Entrapped Bitter Gourd (*Momordica charantia*) Peroxidase for the Removal of Colored Compounds from a Textile Effluent in Batch as well as in Continuous Reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *158* (3), 512-523.

[46] Costa, S. A.; Tzanov, T.; Paar, A.; Gudelj, M.; Gubitz, G. M.; Cavaco-Paulo, A., Immobilization of catalases from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28* (9-10), 815-819.

[47] Mohamed, S. A.; Al-Malki, A. L.; Khan, J. A.; Sulaiman, M. I.; Kumosani, T. A., Properties of peroxidase from chewing stick miswak. *African J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *6* (9), 660-670.

[48] Fontenot, E. J.; Beydilli, M. I.; Lee, Y. H.; Pavlostathis, S. G., Kinetics and inhibition during the decolorization of reactive anthraquinone dyes under methanogenic conditions. *Water Sci. Technol.* **2002**, *45* (10), 105-111.

[49] Crini, G., Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress Polym. Sci.* **2005**, *30* (1), 38-70.

[50] Liu, B. J.; Wang, D. F.; Yu, G. L.; Meng, X. H., Adsorption of heavy metal ions, dyes and proteins by chitosan composites and derivatives - A review. *J. Ocean Univ. China* **2013**, *12* (3), 500-508.

[51] Matto, M.; Husain, Q., Decolorization of textile effluent by bitter gourd peroxidase immobilized on concanavalin A layered calcium alginate-starch beads. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *164* (2-3), 1540-1546.

[52] Monier, M.; Ayad, D. M.; Wei, Y.; Sarhan, A. A., Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46* (3), 324-330.

[53] Arslan, M., Immobilization horseradish peroxidase on amine-functionalized glycidyl methacrylate-g-poly(ethylene terephthalate) fibers for use in azo dye decolorization. *Polym. Bull.* **2011**, *66* (7), 865-879.