



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CAMILA GOES SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DA CELULOSE BACTERIANA NO  
PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DO RABANETE  
PARA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.**

***INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF BACTERIAL CELLULOSE IN  
THE PROCESS OF IMMOBILIZATION OF RADISH PEROXIDASE FOR  
DECOLORIZATION OF DYES.***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CAMILA GOES SANTOS**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DA CELULOSE BACTERIANA NO  
PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DO RABANETE  
PARA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.**

Exame de Defesa/Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Iara de Fatima Gimenez**

***INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF BACTERIAL CELLULOSE IN  
THE PROCESS OF IMMOBILIZATION OF RADISH PEROXIDASE FOR  
DECOLORIZATION OF DYES.***

*Defense exam / Master dissertation  
presented to the PostGraduate  
Program in Chemistry of the Federal  
University of Sergipe to obtain MSc. in  
Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Santos, Camila Goes  
S237i Investigação do potencial da celulose bacteriana no processo de  
imobilização da peroxidase do rabanete para descoloração de corantes /  
Camila Goes Santos ; orientadora Iara de Fatima Gimenez - São  
Cristóvão, 2024.  
86 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de  
Sergipe, 2024.

1. Corantes e coloração (Microscopia). 2. Chá de kombucha.  
3. Oxidases. I. Gimenez, Iara de Fatima orient. II. Título.

CDU 544.6

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** IARA DE FATIMA GIMENEZ  
Data: 17/07/2024 17:37:20-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Iara de Fátima Gimenez

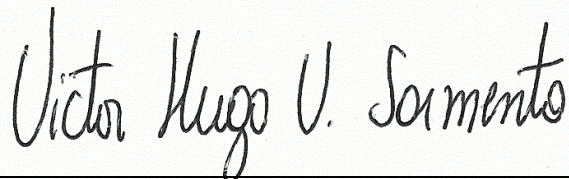
---

**COORDINADOR:** Prof. Dr. Nome do coordenador



---

**1º MEMBRO TIT.:** Profa. Dra. Silvia Maria Egues



---

**2º MEMBRO TIT.:** Prof. Dr. Victor Hugo Sarmento

**SÃO CRISTÓVÃO - SE**

**MAIO, 2024**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SERGIPE**

Programa de Pós-Graduação em Química  
PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Camila Goes Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 29/05/2024.

Documento assinado digitalmente



**IARA DE FÁTIMA GIMENEZ**  
Data: 06/06/2024 07:36:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara de Fátima Gimenez**  
Departamento de Química- UFS

Documento assinado digitalmente



**VICTOR HUGO VITORINO SARMENTO**  
Data: 06/06/2024 07:32:28-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino**  
**Sarmento**  
Departamento de Química Campus Itabaiana -  
UFS

Documento assinado digitalmente



**SILVIA MARIA EGUES DARIVA**  
Data: 05/06/2024 18:02:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Maria Egues**  
Universidade Tiradentes

## RESUMO

O presente estudo foi focado na imobilização da peroxidase extraída do rabanete e purificada através de uma metodologia baseada em um sistema aquoso bifásico. A determinação da atividade enzimática foi realizada empregando um teste espectrofotométrico baseado na oxidação do guaiacol em tetraguaiacol, revelando um valor de 1,133 U. Como suporte para a imobilização da enzima, empregou-se celulose bacteriana obtida a partir de Kombucha, uma bebida gaseificada obtida a partir da fermentação de chá verde que contém bactérias capazes de produzir celulose na forma de películas. A enzima foi imobilizada pelo método de adsorção física utilizando a celulose bacteriana purificada, sem modificações químicas e imobilizada por ligação covalente onde a celulose foi submetida a oxidação para formação de grupos aldeído, por periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) em diferentes tempos e concentrações do oxidante, visando a imobilização da enzima através da base de Schiff. A determinação do teor de aldeído mostrou que a celulose bacteriana oxidada por periodato 4% no tempo de 1h com maior grau de oxidação (0,327mmol). As membranas resultantes foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e adsorção/dessorção de  $\text{N}_2$ , com determinação da área superficial, volume dos microporos e distribuição do tamanho e diâmetros dos poros. As membranas contendo a peroxidase também foram submetidas à determinação da atividade enzimática e determinação de proteína, observando-se que não houveram diferenças estatisticamente significativas entre as atividades de todas as amostras. De acordo os resultados obtidos nas caracterizações, a peroxidase imobilizada por adsorção física e imobilizada por celulose bacteriana oxidada por periodato de sódio 4% no tempo de 1h, foram escolhidos para testes de descoloração das soluções dos corantes catiônicos azul de metileno, violeta cristal e rodamina 6G e do corante aniônico índigo sintético. A descoloração das soluções foi acompanhada por espectrofotômetro UV/VIS. A solução do corante que apresentou maior grau de descoloração foi o violeta de cristal, sendo respectivamente de 91,53% para a peroxidase imobilizada pela celulose bacteriana pura e 91,18% para a peroxidase imobilizada pela celulose bacteriana oxidada por periodato de sódio 4% no tempo de 1h. Portanto os resultados indicam que a peroxidase do rabanete imobilizada tem potencial para descoloração de corantes e que o desempenho de descoloração da enzima imobilizada por adsorção física ou ligação covalente foram similares.

Palavras chaves: peroxidase; imobilização; corantes; celulose bacteriana e descoloração.

## **ABSTRACT**

*The present study was focused on the immobilization of peroxidase extracted from radish and purified through a methodology based on a two-phase aqueous system. The determination of enzymatic activity was carried out using a spectrophotometric test based on the oxidation of guaiacol in tetraguaiacol, revealing a value of 1.133 U. As a support for the immobilization of the enzyme, bacterial cellulose obtained from Kombucha, a carbonated drink obtained from the fermentation of green tea that contains bacteria capable of producing cellulose in the form of films. The enzyme was immobilized by the physical adsorption method using purified bacterial cellulose, without chemical modifications and immobilized by covalent bonding where the cellulose was subjected to oxidation to form aldehyde groups, by sodium periodate ( $\text{NaIO}_4$ ) at different times and concentrations of the oxidant, aiming at immobilizing the enzyme through Schiff base. The determination of the aldehyde content showed that bacterial cellulose was oxidized by 4% periodate time the 1h with a higher degree of oxidation (0.327mmol). The resulting membranes were characterized by thermogravimetric analysis (TG), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR) and  $\text{N}_2$  adsorption/desorption, with determination of surface area, micropore volume and size distribution and diameters of the pores. The membranes containing peroxidase were also subjected to determination of enzymatic activity and protein determination, observing that there were no statistically significant differences between the activities of all samples. According to the results obtained in the characterizations, peroxidase immobilized by physical adsorption and immobilized by bacterial cellulose oxidized by 4% sodium periodate time the 1h were chosen for discoloration tests of solutions of the cationic dyes methylene blue, crystal violet and rhodamine 6G and the anionic dye synthetic indigo. The discoloration of the solutions was monitored by a UV/VIS spectrophotometer. The dye solution that showed the highest degree of discoloration was crystal violet, being respectively 91.53% for peroxidase immobilized by pure bacterial cellulose and 91.18% for peroxidase immobilized by bacterial cellulose oxidized by 4% sodium periodate time the 1 hour. Therefore, the results indicate that immobilized radish peroxidase has the potential for dye decolorization and that the decolorization performance of the enzyme immobilized by physical adsorption or covalent bodwas similar.*

*Keywords: peroxidase; immobilization; dyes; bacterial cellulose and decolorization.*

## SUMÁRIO

<b>Sumário .....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Peroxidase (PO) .....	3
2.2 Clico Catalítico da Heme-Peroxidase .....	5
2.3 Rabanete.....	6
2.4 Sistema aquoso bifásico.....	8
2.5 Imobilização enzimática .....	10
2.6 Método de imobilização por adsorção física .....	11
2.7 Método de imobilização por ligação covalente .....	13
2.8 Celulose .....	15
2.9 Celulose bacteriana.....	17
2.10 Kombucha .....	19
2.11 Corantes.....	20
2.11 Peroxidase imobilizada na descoloração de corantes .....	21
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Objetivo Geral .....	22
3.2 Objetivo Específico.....	22
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Reagentes.....	24
4.2 Síntese da celulose bacteriana (CB). .....	24
4.3 Purificação da celulose bacteriana .....	25
4.4 Extração da peroxidase do Rabanete.....	26
4.5 Purificação da peroxidase extraída do rabanete.....	27
4.6 Atividade Enzimática da peroxidase do rabanete. ....	28
4.7 Oxidação da Celulose Bacteriana .....	29
4.8 Determinação do teor de aldeído .....	29
4.9 Imobilização enzimática .....	30
4.9.1 Adsorção física .....	30
4.9.2 Ligação covalente.....	31
4.10 Atividade Enzimática enzima imobilizada .....	17
4.11 Determinação da quantidade de proteína imobilizada .....	18
4.12 Descoloração das soluções de corantes com a enzima livre, imobilizada e celulose bacteriana pura. ....	18



4.13 Técnicas de Caracterização .....	40
4.13.1 Análise Termogravimétrica (TG) .....	40
4.13.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	40
4.13.3 Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	41
4.13.4 Espectrofotometria UV/VIS .....	41
4.13.5 Adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 Atividade enzimática .....	42
5.2 Análise termogravimétrica (TG) .....	43
5.3 Determinação do teor de oxidação após reação com NaIO <sub>4</sub> .....	44
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	45
5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura: CB pura .....	45
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura: celulose bacteriana oxidada (CBOX) .....	46
5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura: peroxidase imobilizada por CB pura e CBOX .....	47
5.5 Análises de FTIR para celulose bacteriana pura e oxidada .....	49
5.6 Análises de FTIR para amostras com peroxidase imobilizada .....	51
5.7 Atividade enzimática após a imobilização da enzima. ....	52
5.8 Determinação da quantidade de proteína imobilizada .....	53
5.9. Resultados de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> .....	55
5.10 Descoloração .....	58
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>7 PERSPECTIVAS DO TRABALHO .....</b>	<b>65</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>

Dedico este trabalho aqueles com quem  
compartilho todas escolhas da minha vida a  
meus pais José Carlos e Clezia Goes.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas.”

Isaac Newton

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus, por sempre está comigo nesta jornada.

À minha mãe, Clézia Goes, por sempre me apoiar, me incentivar com seu amor e suas palavras de carinho.

A meu pai, José Carlos que mesmo com poucas palavras me mostrou com grandes atitudes o seu apoio.

Agradeço, a meu namorado Keven Gabriel por sempre acreditar, pelo seu apoio e carinho nos momentos difíceis.

A meu tio, Miron Goes por sempre me dar a mão quando precisei.

Agradeço imensamente a minha família e amigos, pelo apoio, palavras de carinho.

Agradeço, aos meus amigos da pós-graduação Elaine Santos, Felipe Gabriel, Júlia Botti, Luiz Felipe, Valéria Vieira e Pricília Santos, pela ajuda, conselhos e pela jornada que compartilhamos.

Agradeço, a minha orientadora Iara Gimenez, pela confiança, paciência, dedicação, pelos conhecimentos transmitidos como orientadora e como pessoa.

A meus colegas de laboratório em especial Liliane Mota e Yslaine Andrade, pelos conselhos, pela ajuda, pela paciência, por sempre estarem comigo.

Agradeço a minha banca examinadora, pelo aceite do convite de participar da defesa.

A universidade Federal de Sergipe, pelo programa de pós-graduação permitindo o crescimento profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da Heme peroxidase .....	4
Figura 2. Diversas fontes vegetais de peroxidase.....	5
Figura 3. Ciclo catalítico da heme-peroxidase.....	6
Figura 4. Fluxograma das características que os rabanetes podem apresentar.....	7
Figura 5. Rabanetes dos quais foram extraídos a peroxidase.....	8
Figura 6. Interação da enzima com o suporte por meio de adsorção física.....	12
Figura 7. Interação da enzima com o suporte por meio de ligação covalente.....	13
Figura 8. Esquema de reação de oxidação seletiva do periodato de sódio, seguida da reação da base de Schiff.....	15
Figura 9. Estrutura da celulose.....	16
Figura 10. Regiões amorfas e cristalinas das microfibrilas de celulose.....	17
Figura 11. Síntese da celulose bacteriana pelo método de cultura estática.....	18
Figura 12. Exemplo de grupos cromóforos e auxocromo.....	21
Figura 13. Ilustração do passo a passo para a obtenção da celulose bacteriana, através da fermentação do chá verde e como ela se apresenta depois da purificação.....	25
Figura 14. Fotografias da celulose bacteriana, antes da purificação e depois da etapa de purificação.....	26
Figura 15. Ilustração do passo a passo para extração da peroxidase do rabanete.....	27
Figura 16. Purificação da peroxidase extraída do rabanete, pelo sistema aquoso bifásico.....	28
Figura 17. Nomenclatura de imobilização da metodologia por adsorção física.....	30
Figura 18. Nomenclatura de imobilização da metodologia por ligação covalente.....	17
Figura 19. Proporções das amostras da análise de descoloração e tempo de reação.....	19
Figura 20. Análise termogravimétrica (TG).....	44
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do CB pura.....	45
Figura 22. Micrografias das CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora (CBO <sub>x</sub> 2%1h); CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 3 horas (CBO <sub>x</sub> 2%3h); CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora (CBO <sub>x</sub> 4%1h); CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m 3 horas (CBO <sub>x</sub> 4%3h).....	47
Figura 23. O MEV das amostras Peroxidase imobilizada CB pura (PIMAF); Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora (PIMCBO <sub>x</sub> 2%1h); Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 3 horas (PIMCBO <sub>x</sub> 2%3h); Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora (PIMCBO <sub>x</sub> 4%1h); Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 3 horas (PIMCBO <sub>x</sub> 4%3h).....	48
Figura 24. FTIR da CB pura; das amostras oxidadas: CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora (CBO <sub>x</sub> 2%1h); CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 3 horas (CBO <sub>x</sub> 2%3h); CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora (CBO <sub>x</sub> 4%1h); CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m 3 horas (CBO <sub>x</sub> 4%3h).....	50
Figura 25. Reação da oxidação da CB por periodato de sódio, formando dialdéido celulose, seguindo das etapas de transformação da fração de aldeído em hidratados, hemialdais e hemiacetais.....	51
Figura 26. FTIR da peroxidase imobilizada celulose bacteriana (CB) pura; imobilizada por CBCO <sub>x</sub> (CB oxidada) na concentração de NaIO <sub>4</sub> de 2% durante 1 hora (PIMCBO <sub>x</sub> 2%1h); na concentração de NaIO <sub>4</sub> de 2% durante 3 horas (PIMCBO <sub>x</sub> 2%3h); na concentração de NaIO <sub>4</sub> de 4% durante 1 hora (PIMCBO <sub>x</sub> 4%1h) e na concentração de NaIO <sub>4</sub> de 4% durante 3 horas (PIMCBO <sub>x</sub> 4%3h).....	52
Figura 27. Gráficos de adsorção-dessorção CBpura, da celulose oxidada com periodato de sódio e peroxidase imobilizada.....	56
Figura 28. Gráfico de descoloração com peroxidase imobilizada por adsorção física (PIMAF); peroxidase imobilizada por celulose bacteriana oxidada com periodato de sódio 4% m/m no tempo de 1h (PIMCBO <sub>x</sub> 4% 1h); celulose bacteriana pura (CB pura) e peroxidase do rabanete livre (PRL).....	59
Figura 29. Ilustração das soluções dos corantes AM, IS, VC e R6G antes e depois das metodologias de descoloração.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das enzimas livres e imobilizadas.....	11
Tabela 2. Características químicas dos corantes.....	40
Tabela 3. Atividade enzimática da enzima comercial, extraída do rabanete purificada por sistema aquoso bifásico.....	42
Tabela 4. Determinação do teor de oxidação de acordo com o tempo e a concentração do oxidante.....	44
Tabela 5. Resultados da análise de atividade enzimática após a imobilização pelo método de adsorção física e ligação covalente da peroxidase extraída do rabanete.....	53
Tabela 6. Concentração da peroxidase do rabanete livre (PRL) e concentração da PR nos suportes imobilizadores. ....	54
Tabela 7. Ilustração da classificação das isotermas adsorções/dessorção de N <sub>2</sub> e histerese, da área superficial e porosidade da CBpura, da celulose bacterianas oxidadas por periodato de sódio e das amostras que imobilizaram a peroxidase por adsorção física e ligação covalente. ....	58
Tabela 8. Descoloração das soluções dos corantes em porcentagem.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PO	Peroxidase
PRL	Peroxidase do rabanete Livre
SAB	Sistema Aquoso
KCl	Bifásico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de Hidrogênio
PEG	Polietileno Glicol
OEOP	Óxido de Etileno e Óxido de Propileno
FP	Fator de Purificação
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	D-glucopirranose
CB	Celulose Bacteriana
KC	Kombucha
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
TG	Análise termogravimétrica
BET	Brunauer, Emmett, Teller
UV/VIS	Espectrofotômetro UV/Vis
NaOH	Hidróxido de sódio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio Dibásico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio Monobásico
NaIO <sub>4</sub>	Periodato de Sódio
CBO <sub>x</sub> 2%1h	Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 2% por 1h
CBO <sub>x</sub> 2%3h	Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 2% por 3h
CBO <sub>x</sub> 4%1h	Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 4% por 1h
CBO <sub>x</sub> 4%3h	Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 4% por 3h
PIMAF	Peroxidase Imobilizada por Adsorção Física
PIMCBO <sub>x</sub> 2%1h	Peroxidase Imobilizada por Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 2% por 1h
PIMCBO <sub>x</sub> 2%3h	Peroxidase Imobilizada por Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 2% por 3h

PIMCBO <sub>x</sub> 4%1h	Peroxidase Imobilizada por Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 4% por 1h
PIMCBO <sub>x</sub> 4%3h	Peroxidase Imobilizada por Celulose Bacteriana Oxidada por NaIO <sub>4</sub> 4% por 3h
TO	Teor de Oxidação
AM	Azul de Metileno
IS	Índigo Sintético
VC	Violeta Cristal
R6G	Rodamina 6G



## 1 INTRODUÇÃO

A indústria têxtil tem potencial de despejar uma alta concentração de corantes nos recursos hídricos, cuja remoção pode ser desafiadora na medida em que tais corantes são resistentes aos tratamentos convencionais como filtração, precipitação, e adsorção [1,2]. Os corantes mais amplamente utilizados, que são geralmente sintéticos, quando descartados nos rios e lagos, não só causam poluição visual, mas podem também trazer efeitos indesejáveis na fauna e na flora, pois são tóxicos e mutagênicos [3].

A resistência de diversos corantes aos tratamentos de remediação, bem como suas implicações ambientais, faz com que se busquem soluções para resolver essa problemática. Neste contexto, o tratamento enzimático vem ganhando espaço, pois as enzimas apresentam funções catalíticas, adaptabilidade e alta seletividade ao substrato, tendo a enzima peroxidase como destaque [4] no presente trabalho.

A peroxidase pertence à classe das enzimas oxidorredutases, que catalisam oxidações de diversos compostos orgânicos e redução de peróxido [5]. Esse tipo de enzima pode ser obtido de fontes vegetais e animais, sendo a vegetal a maior fonte de extração. Das fontes vegetais a mais conhecida e geralmente utilizada é a peroxidase da raiz forte (peroxidase do rábano), porém outras fontes vegetais economicamente mais viáveis foram descobertas e estão sendo utilizadas para extração da enzima [6].

Entre as fontes vegetais alternativas pode-se destacar o rabanete, vegetal pertencente à família Brassicaceae e que tem a presença dessa enzima. Ao comparar as sequências de aminoácidos primários da peroxidase do rabanete com o rábano, fonte mais utilizada quando se fala da extração da enzima, o rabanete apresenta 70% de similaridade [7].

A necessidade da obtenção desta enzima purificada por metodologias que sejam rápidas, versáteis e economicamente viáveis, trouxe um destaque para os sistemas aquosos bifásicos (SABs). SABs são amplamente utilizados na extração de enzimas, devido à extração cinética rápida para separação, operação fácil e flexível para lidar com as separações em larga escala, baixo custo e versatilidade no tipo de solvente para formação do sistema [8].

Quando a enzima é extraída da fonte desejada e purificada, esta se apresenta em sua forma livre, a qual apresenta alguns desafios relacionados à sua aplicação na degradação da cor em águas contaminadas por corantes. Um exemplo disso é a necessidade de manter as reações estáveis e favoráveis para obter o máximo desempenho catalítico e possibilitar a reutilização. Esses desafios tornam o custo do processo de utilização da enzima economicamente alto [9].

A imobilização enzimática é uma maneira de minimizar esses desafios, pois, fornece ao catalisador uma melhor estabilidade, possibilita melhor desempenho da atividade catalítica e evita a desnaturação, bem como minimiza os problemas de inibição. Dessa maneira, diferentes técnicas podem ser usadas para a imobilização da enzima, como por exemplo, adsorção física e ligação covalente que são técnicas consolidadas [10].

Para que a imobilização da enzima seja realizada é necessário que se escolha um suporte adequado. Os suportes podem ser orgânicos naturais (incluindo celulose, quitosana, alginato, entre outros), orgânicos sintéticos (incluindo propileno, resinas polivinílicas e poliamidas) ou inorgânicos (como sílica, argila e óxidos metálicos) [9,10]. Neste contexto, um suporte orgânico já utilizado na imobilização da peroxidase do rábano é a celulose [11].

A celulose é um suporte muito interessante por ser um polímero renovável e de grande abundância na Terra, distribuindo-se amplamente nas paredes celulares das plantas, em organismos marinhos e até mesmo produzidas por biossíntese microbiana (algas, fungos, bactérias) [12]. Dessas fontes alternativas de produção de celulose, a de origem bacteriana vem ganhando destaque, pois sua estrutura não está combinada com a lignina e a hemicelulose como acontece na celulose vegetal [13].

Portanto, nesta pesquisa a enzima peroxidase foi extraída do rabanete e purificada através do sistema aquoso bifásico constituído por polietilenoglicol e cloreto de potássio (KCl). Com a enzima extraída e purificada, passou-se para etapa de imobilização, utilizando como suporte a celulose bacteriana e duas técnicas de imobilização: adsorção física e por ligação covalente. Após essas etapas a peroxidase livre, a celulose bacteriana pura e a enzima peroxidase imobilizada no suporte de celulose bacteriana -tanto por adsorção quanto por ligação covalente- foram aplicadas na descoloração dos corantes, azul de metileno, índigo sintético, violeta cristal e

rodamina 6G. Os desempenhos foram comparados em termos das porcentagens de descoloração após 24 horas de contato.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Peroxidase (PO)**

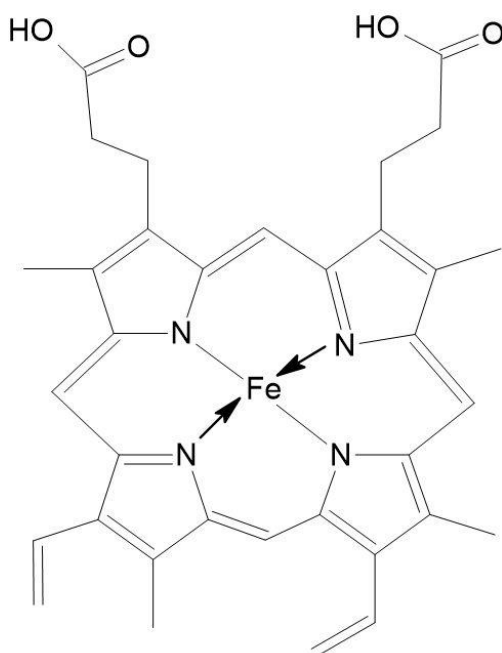
As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores. Elas apresentam um alto grau de seletividade em relação a seu respectivo substrato, atuando em condições brandas de temperatura e pH. Além disso, por apresentarem funções catalíticas, aceleram as reações químicas sem afetar a constante de equilíbrio, diminuindo a energia de ativação da reação, para que ela aconteça de forma mais rápida [14].

Dentro desta perspectiva a peroxidase (PO) tem ganhado grande destaque. É uma enzima que pertence à classe oxidorreductase e utiliza ampla variedade de compostos como doadores e aceitadores de hidrogênio. Em outras palavras, a peroxidase catalisa reações de oxidações e reduções, contudo, para que a PO (peroxidase) consiga catalisar essas reações, ela precisa do cofator peróxido de hidrogênio.

A PO é um tipo de enzima que pode ser encontrada em animais, bactérias, fungos e plantas [15,16]. Em destaque, nas plantas ela apresenta funções fisiológicas como cicatrização de feridas, proteção contra estresse oxidativo, defesa contra o ataque patogênico, entre outros [17].

Dentre as peroxidases, a mais comum é a que apresenta o grupo heme. A heme-peroxidase é um tipo essencial de oxidorreductase que possui o átomo de ferro centralizado no grupo porfirina IX, ilustrado na Figura 1 [18]. Elas podem ser de origem animal e não-animal. As de origem não-animal são classificadas em I, II e III. A classe I inclui a peroxidase do pigmento, peroxidase ascorbata e a bacteriana. Na classe II são encontradas principalmente as peroxidases secretadas por fungos, peroxidase lignina, peroxidase manganês e a peroxidase versátil [18,19].

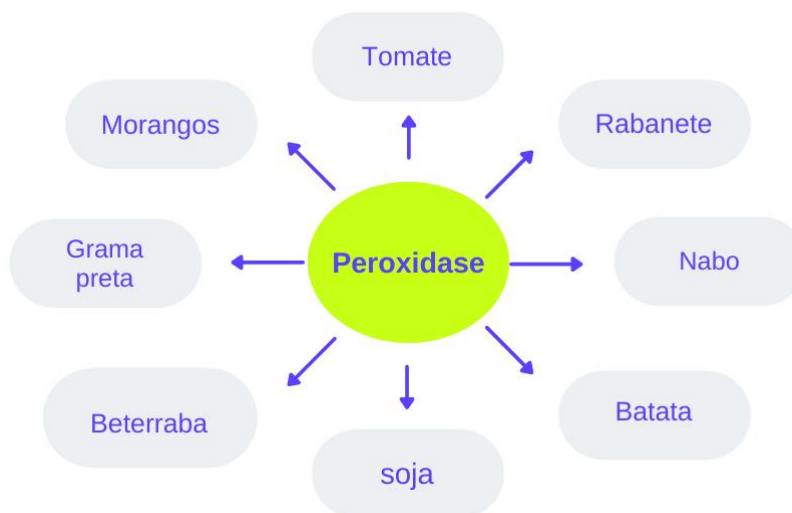
**Figura 1.** Estrutura química da Heme peroxidase



**Fonte:** Autoria própria.

Quando se fala da classe III têm-se as peroxidases secretadas das plantas. Elas têm um papel preponderante no processo fisiológico das plantas como proteção das células contra o estresse oxidativo, formação da lignina e suberina, reticulação de componentes da parede celular, cicatrização de feridas e defesa contra patógenos ou insetos. Esse tipo de classe teve sua primeira caracterização através da raiz do rábano e posteriormente, diferentes POs foram isoladas, purificadas e caracterizadas a partir de diversas fontes vegetais. Algumas fontes de origem vegetal da peroxidase classe III são mostradas na Figura 2 [20]

**Figura 2.** Diversas fontes vegetais de peroxidase.

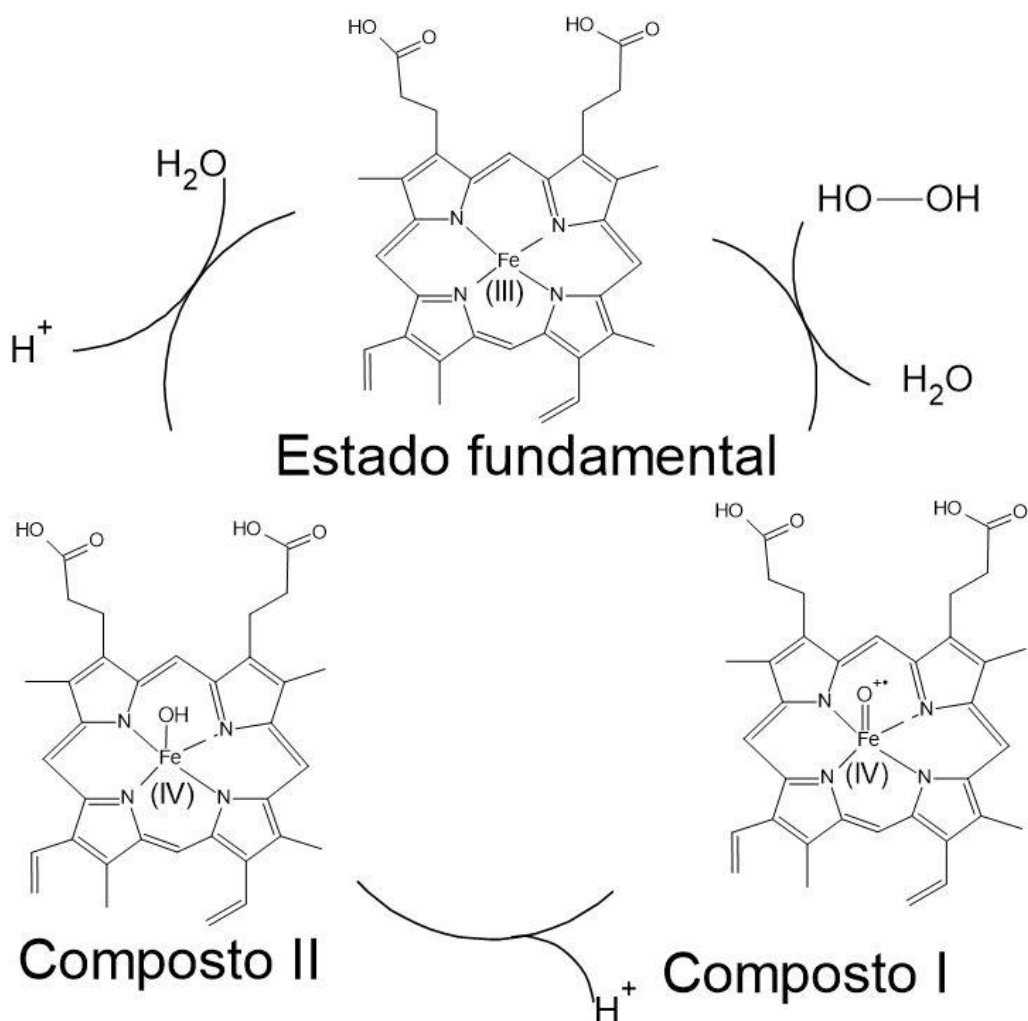


Fonte: Autoria própria.

## 2.2 Ciclo Catalítico da Heme-Peroxidase

O ciclo catalítico da peroxidase é um processo redox que ocorre em três etapas, uma etapa de oxidação e duas etapas de redução, ilustrados na Figura 3. Através do ciclo catalítico, nota-se a dependência da peroxidase em relação ao peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A primeira etapa consiste na formação do composto I, o intermediário oxiferril [ $^+\text{O}=\text{Fe}(\text{IV})$ ], produzido pela ação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre a peroxidase no seu estado fundamental [ $\text{Fe}(\text{III})$ ], pela oxidação de dois elétrons, em que um dos oxigênios presentes no peróxido sai em forma de água o outro fica aprisionado no grupo heme da enzima. O composto I formado é posteriormente reduzido e resulta no composto II que é restabelecido ao estado original [ $\text{Fe}(\text{III})$ ], quando ganha um dos elétrons do substrato redutor [21].

**Figura 3.** Ciclo catalítico da heme-peroxidase.



**Fonte:** Adaptado [22].

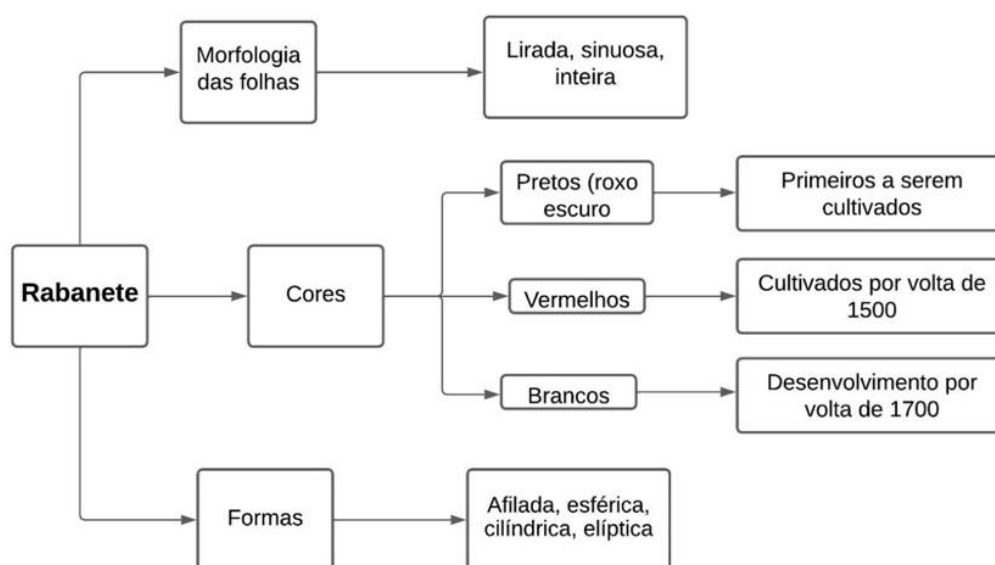
### 2.3 Rabanete

O rabanete é uma hortaliça de produção anual e pode ser cultivada em climas temperados e tropicais. Sua produção mundial chega a cerca de 7 milhões de toneladas por ano, sendo uma das hortaliças mais cultivadas do mundo, com destaque para o leste da Ásia como o principal produtor [23,24]. Essa produção está ligada à sua importância econômica, pois é uma fonte rica em minerais, como ferro, potássio, cálcio, magnésio e fósforo. Além disso, possui fibras dietéticas, gorduras, carboidratos, proteínas, vitaminas hidrossolúveis, entre outros. Sendo assim, o

consumo desse vegetal é de grande relevância para saúde, pois apresenta diversos nutrientes [25,26].

O fluxograma representado na Figura 4 descreve os tipos de rabanete, de acordo com a morfologia das folhas, a coloração e suas formas. Dentre essas características o rabanete que apresenta coloração vermelha, devido à presença de antocianinas, é o mais comumente conhecido e utilizado, além disso, o rabanete vermelho possui alta concentração de ácido ascórbico, principalmente quando comparado com os rabanetes de outras cores [26].

**Figura 4.** Fluxograma das características que os rabanetes podem apresentar.



**Fonte:** Autoria própria.

O rabanete mostrado na Figura 5 é um vegetal de crescimento rápido, baixo custo e alto rendimento [26,27]. Além disso, apresenta sequências de aminoácidos primários com 70% de similaridade com a peroxidase extraída da raiz forte, que é a fonte mais conhecida de extração desta enzima [27–29]. Portanto, esse vegetal pertencente à família Brassicaceae, é um caminho muito interessante para obtenção da peroxidase.

**Figura 5.** Rabanetes dos quais foram extraídos a peroxidase.



**Fonte:** Autoria própria.

## **2.4 Sistema aquoso bifásico**

Quando a enzima é extraída de uma fonte vegetal, o processo em princípio não propicia sua obtenção na forma pura, pois há outras substâncias presentes no vegetal que são extraídas juntamente com a enzima. Desta forma, o sistema aquoso bifásico (SAB) tem como objetivo separar ao máximo a peroxidase das substâncias indesejadas que podem interferir na aplicação escolhida.

O SAB é uma técnica de extração líquido-líquido, pois ocorre a formação de duas fases aquosas imiscíveis, ou seja, com polaridades e densidades diferentes [30]. Tais fases se separam espontaneamente em fase superior e inferior, de modo que cada uma é enriquecida com os componentes formadores de fase, considerando que o sistema deve estar em uma determinada temperatura, concentração e pH [31,32]. Essa técnica tem sido bastante aplicada na recuperação e purificação de diversos compostos, tais como proteínas, células, antibióticos, ácidos nucleicos e enzimas [32].

A purificação e extração de enzimas por sistemas aquosos bifásicos é um processo que tem sido amplamente utilizado nos dias de hoje [33]. Isso se deve a algumas vantagens que esses sistemas apresentam, como a recuperação e separação da biomolécula, baixo custo, viabilidade para operação contínua, alto teor



de água (70% - 90%) e baixa tensão interfacial, que acarreta numa conservação da estrutura e funcionalidade das biomoléculas [34].

No SAB o perfil de separação vai depender de diversas interações físico-químicas entre o biomaterial e os compostos que formam as fases. As interações são forças de van der Waals, ligação hidrogênio, interações eletrostáticas, efeitos estéricos, hidrofobicidade, interações de afinidade bioespecíficas, bem como efeitos conformacionais entre os componentes de fase e as substâncias, contribuindo assim para separação da substância [35].

A mistura das fases imiscíveis, para formação do sistema aquoso bifásico pode ser formado a partir de um sistema polímero/sal, no qual ocorre a salinização do polímero com sais solúveis em água [34]. A solução salina presente no sistema é responsável pela formação do SAB, pois gera ambiente cosmotrópico (o sal interage mais fortemente com as moléculas de água do que as próprias moléculas de água entre si, ocasionando a quebra das ligações hidrogênio entre as moléculas de água) [34–36].

O sistema formado a partir do polímero/sal possui alta força iônica que pode ser considerada uma desvantagem, mas é muito eficiente na extração e separação de espécies com grandes diferenças de polaridade [34–36]. Os sais utilizados para formação de fase podem ser inorgânicos (sulfato, fosfato, carbonato, hidróxido e cloreto) ou sais orgânicos (citrato, tartarato e acetato) [34–36]. Em relação, aos polímeros utilizados podem ser copolímero de óxido de etileno e óxido de propileno (OEOP), polietilenoglicol (PEG), poliacrilatos e dextrano [37].

O SAB já é uma metodologia de purificação utilizada com sucesso na enzima peroxidase extraída do rabanete. Por exemplo, em um teste com sete polímeros (PEG 400, 1000, 1500, 4000, 6000, 8000, e 20000 g/mol), com sal de sulfato de amônio (20% m/m), líquido iônico prótico como adjuvante (5% m/m) e extrato de rabanete bruto (60% m/m). Verificou-se que o extrato de rabanete migrou completamente para fase superior em PEG 400, tendo um aumento do fator de purificação (FP) de 2,54 vezes [38]. Também tal sistema de purificação foi utilizado na concentração da peroxidase do farelo do arroz em que sistema SABs era composto por 15% de peso do polímero de PEG 1500, 14% em peso de cloreto de sódio em pH 8, tendo um fator de purificação de 2,7 [39].

Além da peroxidase o SAB também foi utilizado na purificação da bromelaína, fazendo uma análise da purificação com diferentes polímeros (PEG 4000, 6000 e 8000 g/mol) e sal fosfato, com peso total para cada amostra de 10 g em pH 7,5. Neste contexto, em PEG 4000, por ter menor comprimento de cadeia, permitiu que a bromelaína particionasse da fase superior tendo o melhor fator de purificação (FP) de 7 [40]. Portanto, torna-se muito atrativo a geração do SAB polímero/sal para a purificação de enzimas, em destaque a peroxidase extraída do rabanete.

## **2.5 Imobilização enzimática**

Como já mencionado, após a extração a partir da fonte original, as enzimas são obtidas na sua forma livre. Porém, numa escala industrial, as enzimas na forma livre expõem algumas limitações, como custos de operação e sua estabilidade [41].

Além disso, alguns subprodutos da extração podem inibir a ação enzimática [41]. Os inibidores podem agir de diferentes formas, sendo que um tipo comum é a inibição reversível, também conhecida como inibição competitiva [41,42]. Esse tipo de inibidor compete com o substrato para se ligar ao sítio ativo da enzima, impedindo o substrato de se ligar à enzima. Também, pode acontecer um tipo raro de inibição que é a não competitiva, a qual ocorre mudanças conformacionais no sítio ativo da enzima, impedindo a enzima de se ligar ao substrato [42].

Existem maneiras de contornar as limitações abordadas acima que podem ser aplicadas juntas ou separadamente. A maneira “invasiva” é aquela na qual a enzima tem suas propriedades alteradas através da engenharia genética; de maneira “excludente”, que é a seleção de novas enzimas e melhores. Adicionalmente, tem-se a “melhoria externa”, que está relacionada à melhoria em relação à otimização do processo da enzima, como exemplo, o processo de imobilização [41].

O processo de imobilização é um método que vem sendo usando comumente na busca da superação das limitações das enzimas livres, visto que, as enzimas imobilizadas podem trazer benefícios como a redução a suscetibilidade à contaminação microbiana, a inativação da enzima [42]. Além da melhora na estabilidade, observa-se também um aprimoramento na capacidade de reutilização da enzima [43]. As características das enzimas livres e imobilizadas são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características das enzimas livres e imobilizadas.

<b>Características</b>	
<b>Enzimas livres</b>	<b>Enzimas imobilizadas</b>
Baixa estabilidade operacional	Maior estabilidade em termos de temperatura e pH
Incapacidade de recuperação e reutilização da enzima	Facilita a separação e reutilização da enzima
Propícias a ação de inibidor	Redução de ação de inibidor
Alto custo e baixa eficiência	Diminuição nos custos e melhor eficiência.

**Fonte:** adaptado [42,43]

A imobilização enzimática é um processo no qual a enzima liga-se fisicamente ou quimicamente a um determinado substrato mantendo sua atividade catalítica. Como resultado, o material de suporte para imobilização a ser escolhido é de grande importância, pois os métodos de interação entre o suporte e a enzima podem ser físicos (como adsorção, encapsulamento e aprisionamento) ou químicos (como ligação covalente e ligação cruzada ou reticulação) [44].

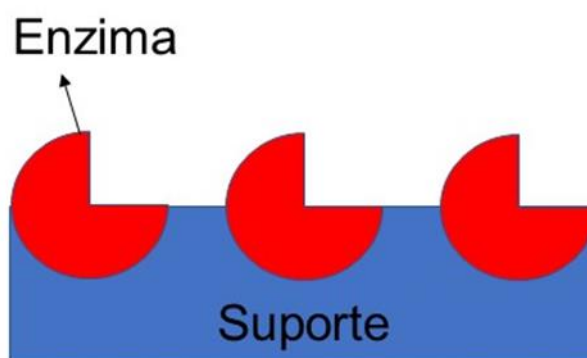
Dentre esses métodos destacam-se a adsorção física e a ligação covalente, a serem abordados neste trabalho. A principal diferença entre eles é que o de adsorção física não é necessário que o suporte passe por uma modificação química, ao contrário do método por ligação covalente, que requer esse processo de modificação. Logo, qualquer uma das técnicas escolhidas tem o objetivo da reutilização e melhoria da estabilidade, principalmente para a redução de custos em relação à escala industrial [44].

## **2.6 Método de imobilização por adsorção física**

O método de imobilização por adsorção física tem alguns benefícios, como o baixo custo, facilidade de preparação e nenhuma restrição de transferência de massa. É um tipo de imobilização rápida, fácil de executar e é um processo de imobilização

reversível, no qual não tem a necessidade de aditivos químicos e não causa alteração ou destruição da conformação dos sítios ativos da enzima [45]. As enzimas são imobilizadas no suporte por meio de ligações fracas através de interação física como Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligação hidrogênio e atração eletrostática. O método de adsorção física está ilustrado na Figura 6 [46].

**Figura 6.** Interação da enzima com o suporte por meio de adsorção física.



**Fonte:** adaptado [41].

Os materiais porosos orgânicos e inorgânicos como caulinita, diatomita, carvão ativado, vidro poroso, bentonita, sílica gel e celulose, são suportes utilizados na imobilização de enzimas pelo método de adsorção física. Além disso, nanomateriais de carbono, incluindo grafeno, nanotubos de carbono, carbono nanoporoso e fulerenos, são também suportes imobilizadores [47].

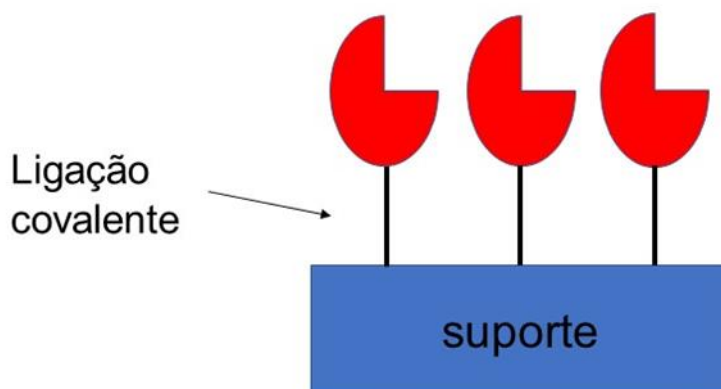
O processo de adsorção física é simples, porque ocorre em apenas duas etapas. Na primeira etapa ocorre a difusão da enzima através da superfície do suporte e, em seguida, adsorção ao suporte [48]. Contudo, é interessante salientar que esse tipo de imobilização é suscetível frente a mudanças na força iônica do meio, pH, temperatura, vazão do reator, agitação e colisões de partículas, podendo ocorrer mudanças na interação entre a enzima e o suporte, causando lixiviação das enzimas [48,49].

Neste contexto, diversas pesquisas foram realizadas em relação à imobilização de enzimas pelo método de adsorção física utilizando celulose bacteriana como suporte. Por exemplo, deste suporte foi empregado com resultados promissores para a imobilização de enzimas como lizosima [50], lacase utilizando nanocelulose bacteriana [51], de lipase [52], de peroxidase do rábano de raiz forte utilizando celulose bacteriana pura e a celulose bacteriana com grupos aminos [53]. Nesta perspectiva, existem vários trabalhos relacionados a imobilização de enzima em busca de melhorias nas limitações das enzimas na forma livre.

## 2.7 Método de imobilização por ligação covalente

Por ser considerado um tipo de ligação forte que proporciona alta estabilidade e alta fixação, o método de imobilização por ligação covalente (Figura 7) torna-se um método interessante, principalmente no ponto de vista industrial [54]. É amplamente usado quando se fala em tratamento de água residual, capaz de prevenir dessorção e desnaturação da enzima [55], além de ser aplicado em processos contínuos e descontínuos [56].

**Figura 7.** Interação da enzima com o suporte por meio de ligação covalente.



**Fonte:** adaptado [41].

O processo de imobilização por ligação covalente deve acontecer em condições consideradas brandas e, para que isso aconteça, o suporte deve apresentar uma alta concentração de grupos reativos, sendo os materiais mais comuns os polissacarídeos, como agarose, dextrano, amido e celulose [57]. No

entanto, apesar do suporte apresentar grupos reativos, este ainda passa por uma etapa de modificação química, antes da imobilização [58].

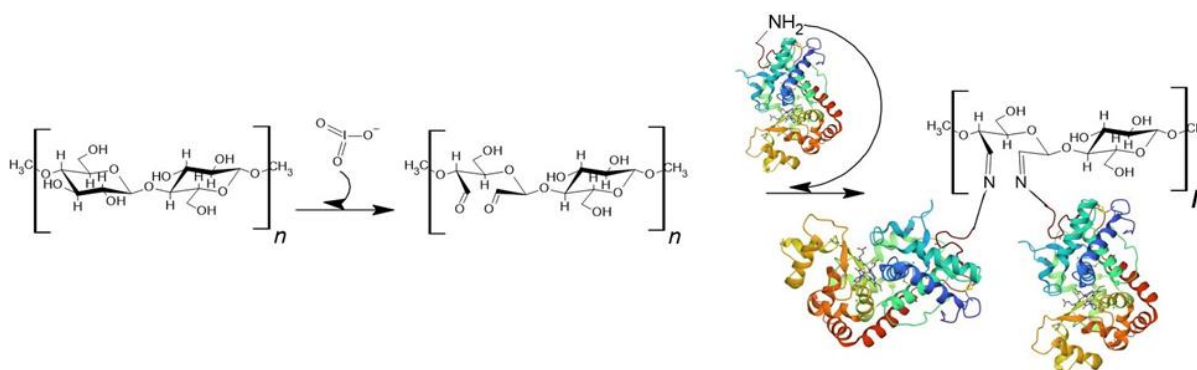
A modificação química que o suporte irá sofrer antes da etapa de imobilização, ocorrer por meio de reações de ativação. Essas reações de ativação tem o objetivo de formar grupos funcionais mais ativos no suporte, para que possam interagir mais fortemente com a enzima que se deseja imobilizar. Um exemplo, de uma reação de ativação é a oxidação da celulose com periodato de sódio [58,59].

A celulose que pode ser de origem vegetal ou bacteriana apresenta na sua superfície grupos hidroxilas que interagem entre si por forças de Van der Waals e isso permite sua modificação por várias reações, dentre as quais a oxidação por periodato de sódio. Esse tipo de oxidação regioseletiva é um processo em que ocorre a clivagem nas hidroxilas vicinais do carbono 2 e 3 da D-glucopiranoose, acontecendo a inserção dos grupos aldeídos nesses carbonos ao longo da cadeia polimérica. O suporte após esse processo de modificação passa a ser chamado de 2,3 dialdeído celulose [59].

O processo de oxidação realizado como ativação na metodologia de ligação covalente é de extrema importância, pois, esses aldeídos introduzidos no suporte são grupos funcionais mais ativos para interação com a enzima no processo de imobilização, [58,59]. Além disso, esses grupos aldeídos vão permitir a ligação com os grupos aminas ( $-NH_2$ ) presente nos aminoácidos, ou seja, a enzima se ligará a celulose modificada através N terminal, formando ligação imina ( $-C=NR$ ) como é instável, ocorre um rearranjo formando uma amina mais estável [59].

A reação entre os grupos aldeídos formados na celulose oxidada com os grupos aminas presente na enzima, é um tipo de reação química conhecida como base de Schiff. O mecanismo de oxidação da celulose e imobilização da enzima pela base de Schiff são mostrados na Figura 8. Essa abordagem utilizando a imobilização por ligação covalente pode ocorrer por outros tipos de reações químicas como a diazotação, amidação, alquilação e disulfeto de tiol, ligação pepetídica [59].

**Figura 8.** Esquema de reação de oxidação seletiva do periodato de sódio, seguida da reação da base de Schiff.



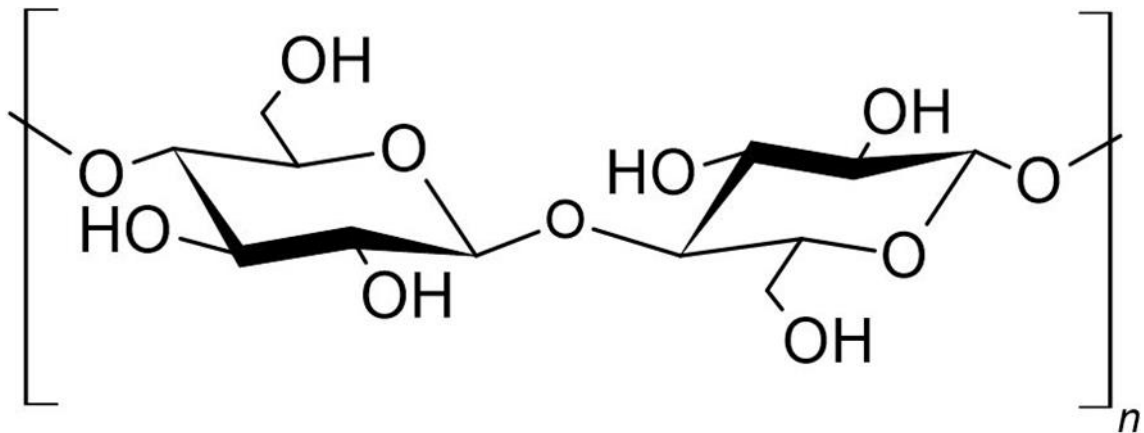
**Fonte:** Autoria própria.

## 2.8 Celulose

A celulose é um biopolímero natural que foi descoberto e separado da biomassa lignocelulósica em 1838 por Anselme Payene após um tratamento com ácido nítrico e, desde então, é utilizada como fonte de energia, material de construção de vestuário, entre outros [60]. É curioso ressaltar que o termo celulose surgiu após sua descoberta, em 1939 [61]. A celulose natural advém frequentemente do algodão, madeira, bambu, rami, juta, linho e bactérias [61,62].

A sua estrutura linear consiste de unidades de D-glucopiranoose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) interconectadas com ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, na qual cada unidade de glicose possui hidroxilas ligadas capazes de formar ligações hidrogênio. Estas ligações são de grande importância no empacotamento do cristal e no manuseio das propriedades físico-químicas da celulose, como mostrado na Figura 9. A celulose é formada por múltiplas cadeias unidas por ligação hidrogênio e forças de Van der Waals, no qual o comprimento da cadeia polimérica da celulose depende da fonte escolhida [63].

**Figura 9.** Estrutura da celulose.



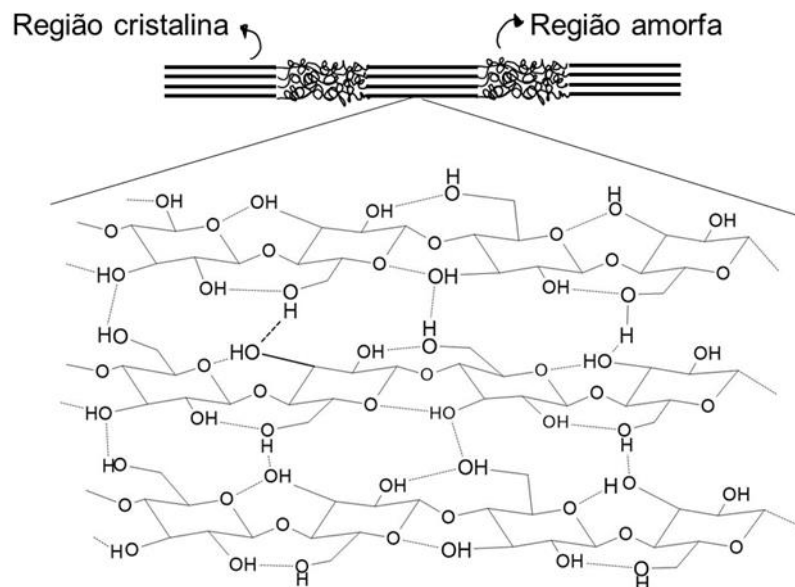
**Fonte:** Autoria própria.

Além disso, a celulose pode se dividir em tipo I e tipo II, sendo que a do tipo I tem dois polimorfos  $I_\beta$  e  $I_\alpha$ , os quais existem lado a lado em proporções diferentes. Quando se aborda a celulose,  $I_\alpha$  tem sistema cristalino triclinico e a  $I_\beta$  tem sistema cristalino monoclinico de cadeia dupla. Já a celulose do tipo II tem que passar por um processo de regeneração ou maceração para que o tipo I se converta em celulose do tipo II, em um processo irreversível [64].

A Figura 10 revela as microfibrilas da celulose. Sua cadeia molecular é dividida em regiões altamente ordenadas e compactas conhecidas como regiões cristalinas e também apresenta regiões desordenadas, com emaranhados aleatórios conhecidos como regiões amorfas, dando uma característica de um material semicristalino [65]. Dependendo do material natural escolhido para o processo de extração, a cristalinidade pode variar de 70% a 40%. Um fator significativo é que a região amorfa é menos densa quando comparada com a região cristalina, logo a região amorfa é a mais acessível a produtos químicos para ser modificado [65].



**Figura 10.** Regiões amorfas e cristalinas das microfibrilas de celulose.



**Fonte:** Adaptado [66].

## 2.9 Celulose bacteriana

A celulose bacteriana (CB), quando descoberta em 1886, foi descrita como “uma espécie de pele úmida, inchada, gelatinosa e escorregadia” [66]. Em 1931, 45 anos depois de sua descoberta, Hilbert e Barsa fizeram um estudo sobre a composição química e estrutural da CB, e concluíram ser idêntica à da celulose vegetal do tipo I [67]. A celulose do tipo I tem dois polímeros de celulose  $I_\alpha$  e  $I_\beta$ , sendo que  $I_\alpha$  é o principal componente da CB, considerando assim, um alomorfo alfa [68].

A celulose bacteriana também é chamada de celulose microbiana, por ser produzida por meio de bactérias, incluindo *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Pseudomonas* e *Alcaligenas*, sendo a diferença entre essas bactérias diretamente relacionada ao rendimento [69]. Dentre essas bactérias, a *Komagataeibacter Xylinus* é a que apresenta maior rendimento, podendo produzir celulose em níveis comerciais, polimerizando cerca de 200.000 moléculas de glicose de cadeia  $\beta$ -1,4-glucano [70].

Em relação ao processo de produção da celulose bacteriana (CB), um dos mais conhecidos e utilizados é o método de cultura estática, que requer tempos de cultivo que variam 5 a 20 dias, ou seja, até que a celulose preencha toda a superfície do recipiente escolhido para o processo como mostrado na Figura 11. A CB produzida neste método é composta por 99% de água e 1% de celulose, sendo importante salientar que a produção da *Komagataeibacter Xylinus* está diretamente relacionada a área da superfície do líquido [71].

**Figura 11.** Síntese da celulose bacteriana pelo método de cultura estática.



**Fonte:** Autoria própria.

No cultivo da celulose bacteriana, deve-se empregar um meio contendo fontes de carbono e nitrogênio. Essas fontes podem ser adquiridas através de meios alternativos, como por exemplo, tecido de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, casca do arroz, funcionando também como uma estratégia de remediação ambiental. Além disso, outros meios alternativos utilizados envolvem a produção através da fermentação de chá preto ou verde [71].

A CB assim como a celulose vegetal apresenta uma estrutura com regiões cristalinas e regiões amorfas, caracterizando assim como um material semicristalino. Essa característica permite modificações químicas deste material, como por exemplo, uma oxidação com periodato de sódio, que transforma grupos hidroxilas em grupos aldeídos que são mais reativos, tornando esse material interessante para imobilização de enzima por ligação covalente [72].

Além disso, a CB também apresenta área superficial relativamente elevada e porosidade tornando esse material um suporte muito interessante para o processo de imobilização por adsorção física [72]. Nesta perspectiva de propriedades a CB que é um material biodegradável apresenta capacidades de absorção, propriedades mecânicas e alto grau de polimerização [73].

Apesar de ser abordado por autores que a CB tem estrutura idêntica à celulose vegetal, ela apresenta uma estrutura tridimensional única e uma nanomorfologia não encontrada na celulose vegetal responsável pelas suas propriedades físicas e químicas, comportamento mecânico e não alergênico [74]. No entanto, o que também torna esse material muito interessante e preferível em relação a celulose vegetal é que, quando sintetizada, a sua estrutura não está ligada a lignina e a hemicelulose, ao contrário do que acontece na celulose vegetal, eliminando a necessidade de um processamento para separar essas substâncias [75].

## **2.10 Kombucha**

A produção de materiais por um processo verde, ou seja, sem causar danos ao ambiente, é um caminho de pesquisa crescente e promissor. A celulose bacteriana, biomassa de grande potencial, produzida por bactérias, é um exemplo de biomaterial que apresenta como característica a ausência de impurezas. A kombucha (KC) é uma fonte interessante quando se fala em produção de celulose através de bactérias, a chamada celulose bacteriana (CB).

A kombucha é um tipo de chá, cujo sabor é descrito como levemente ácido, e refrescante e levemente carbonatada. Na sua composição existem vários ácidos orgânicos, 14 aminoácidos, vitaminas e algumas enzimas hidrolíticas e, além disso, por apresentar baixo teor alcoólico, pode ser um substituto para espumantes e refrigerantes, pois possui um alto teor de carbonação [76]. Essas diversas características que KC apresenta estão diretamente relacionadas com a sua produção que ocorre através de um processo fermentativo que tem duração de 7 a 20 dias [77]

O processo de fermentação para a produção da KC consiste tradicionalmente na utilização de fontes de nitrogênio, que pode ser o chá verde ou preto, com presença de açúcar. No chá açucarado é adicionada uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias denominada SCOBY (do acrônimo em inglês *Symbiotic Culture of Bacteria*

and Yeast). Após essa adição, o chá passa pelo processo de fermentação produzindo assim a KC [77].

O SCOBY é um biofilme de celulose bacteriana utilizado como iniciador do processo fermentativo, ou seja, as bactérias e leveduras estão acomodadas na matriz do SCOBY [77]. O KC que é a fonte nitrogênio estimula as leveduras e bactérias presentes no SCOBY, desta forma as leveduras presentes utilizaram a sacarose, que é uma fonte de carbono, hidrolisando-a por invertase em glicose e frutose, transformando-a em etanol. O etanol produzido é oxidado pelas bactérias acéticas em ácido acético. À medida que o processo acontece, novas camadas são formadas no biofilme iniciador, que assume a forma do recipiente o qual o chá foi preparado e deixado para a fermentação [78].

No consórcio simbiótico várias leveduras e bactérias acéticas estão envolvidas. Porém, quando se busca uma parte central para o crescimento deste consórcio, estão envolvidas as leveduras conhecidas como *Dekkera* e *Pichia* e as bactérias acéticas do gênero *Komagataeibacter* e *gluconobacter*. Essas bactérias, destacando *Komagataeibacter*, são responsáveis pela formação das camadas do biofilme, devido à polimerização da glicose de cadeia  $\beta$ -1,4-glucano, que está presente, porque o açúcar é adicionado na preparação do chá [79].

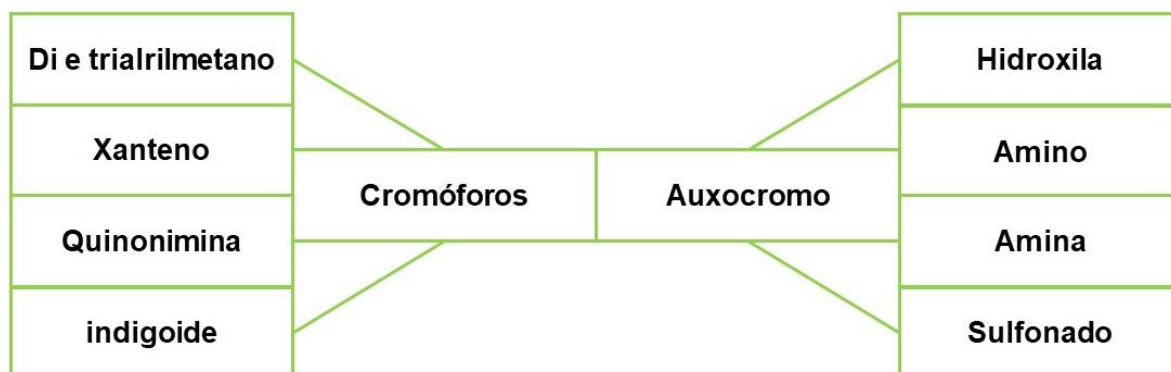
## 2.11 Corantes

A cor sempre teve um papel fundamental em diversas culturas dos seres humanos no mundo. Porém, o crescimento populacional acarretou também em crescimento e desenvolvimento industrial, principalmente da indústria têxtil, necessitando de uma demanda maior de corantes. Essa demanda levou ao surgimento de corantes de origem sintética que ocorreu 1856 quando William Perkin criou o corante sintético mauveína [80]. Esse marco permitiu que as roupas fossem tingidas com cores mais fortes e vivas e de forma mais rápida, em busca de suprir a demanda populacional [81].

Os corantes sintéticos atualmente são formados por dois grupos: os cromóforos, que são responsáveis pela cor dos corantes, e os grupos auxocromos, que retiram e doam elétrons e provocam a intensificação das cores, associados aos cromóforos. É mostrado na Figura 12 exemplos desses grupos [82,83]. Eles também

apresentam outras classificações de acordo com os métodos que vão ser aplicados, tais como corantes reativos, ácidos, básicos, diretos, dispersos e de à cuba [83].

**Figura 12.** Exemplo de grupos cromóforos e auxocromo.



**Fonte:** Autoria própria.

Além do método de classificações de acordo com sua aplicação, os corantes também podem ser classificados, como aniônicos, catiônicos e não-aniônicos. Os corantes classificados como diretos, ácidos e reativos são tipo aniônicos, ou seja, possuem seus ânions ativos, os básicos que são tipo catiônicos possuem seu cátion ativo e ele é o responsável pela cor desses corantes, e os dispersivos são tipo não-iônicos [84].

## 2.11 Peroxidase imobilizada na descoloração de corantes

A descoloração de corantes por meio de degradação catalisada por enzimas imobilizadas, vem sendo amplamente estudada nas últimas décadas. Neste contexto, a peroxidase é um exemplo de enzima que vem atraindo atenção neste campo de pesquisa, pois é uma biomolécula de fácil acesso, encontrado em diversos tipos de vegetais e extraído usando o sistema aquoso de duas fases. Dentre as oxidorreduções, a peroxidase é a menos estudada quando comparada com a lacase [85].

Merecem destaque estudos existentes na literatura, nos quais a enzima foi imobilizada por adsorção física na superfície de fibras eletrofiadas de poliamida 6. Após isso, foi aplicada na descoloração dos corantes preto reativo 5 e verde malaquita com eficiências de descoloração de 83% e 95% respectivamente [85]. Ela também foi imobilizada através agregados enzimáticos reticulados a base de peroxidase, que foi utilizada na descoloração do corante índigo e rodamina 6G. Esse mecanismo apresentou uma eficiência de descoloração respectivamente de 84,35% e 73,60% [86].

Além disso, a peroxidase de raiz forte também foi utilizada na descoloração do azul de bromofenol, onde essa enzima foi aminada e imobilizada por celulose oxidada para formação de grupos aldeídos, ligando-se covalentemente por formação de base de Schiff. Essa enzima imobilizada por esse mecanismo teve um desempenho de 100% na descoloração do corante azul de bromofenol [87].

Desta forma, como vários corantes com diversas especificidades são descartados em águas residuais. A imobilização da peroxidase no estudo de descoloração de corantes se torna, muito atrativo. Logo, o presente trabalho utilizará a peroxidase extraída do rabanete e imobilizada por celulose bacteriana oxidada e pura, como o material que auxilie no processo de descoloração de corantes que são descartados diariamente nos recursos hídricos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Imobilizar peroxidase do rabanete em suporte de celulose bacteriana para investigação do processo de descoloração.

#### **3.2 Objetivo Específico**

- Obter Celulose bacteriana através da Kombucha;
- Extrair e purificar a enzima peroxidase do rabanete;
- Imobilizar a peroxidase do rabanete por adsorção física e ligação covalente;
- Determinar o teor de oxidação da celulose bacteriana;

- Caracterizar a celulose bacteriana pura, oxidada e após a imobilização da peroxidase por microscopia eletrônica de varredura (MEV), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TG) e Brunauer, Emmett, Teller (BET).
- Determinar atividade enzimática da peroxidase livre e imobilizada pela CB;
- Determinar quantidade de proteína presente na peroxidase extraída do rabanete e após a imobilização;
- Avaliar a peroxidase imobilizada, livre e a celulose bacteriana pura no processo descoloração.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Os reagentes hidróxido de sódio (Vetec), hipoclorito de sódio (Perfyl Tech), Enzima Horseradish Peroxidase HRP comercial (P8375 Type VI, CAS: 9003-99-0, Sigma), fosfato de sódio dibásico (ACS Científica), fosfato de sódio monobásico (ACS Científica), PEG 4000 (Synth), cloreto de potássio (Dinâmica), guaiacol (ACS Científica), peróxido de hidrogênio (ACS Científica), álcool etílico (ACS Científica), brometo de potássio (Dinâmica), periodato de sódio (Dinâmica), cloridrato de hidroxilamina (Synth), corante sintético índigo (Reagen), rodamina 6G (Sigma), violeta cristal (Reagen), Azul de metileno (Neon) foram utilizados sem a realização de etapas de purificação. Outros materiais foram adquiridos no comércio local, incluindo Kombucha engarrafada, chá verde e açúcar de diversos fabricantes. Amostras de rabanete foram adquiridas em feiras e mercados locais.

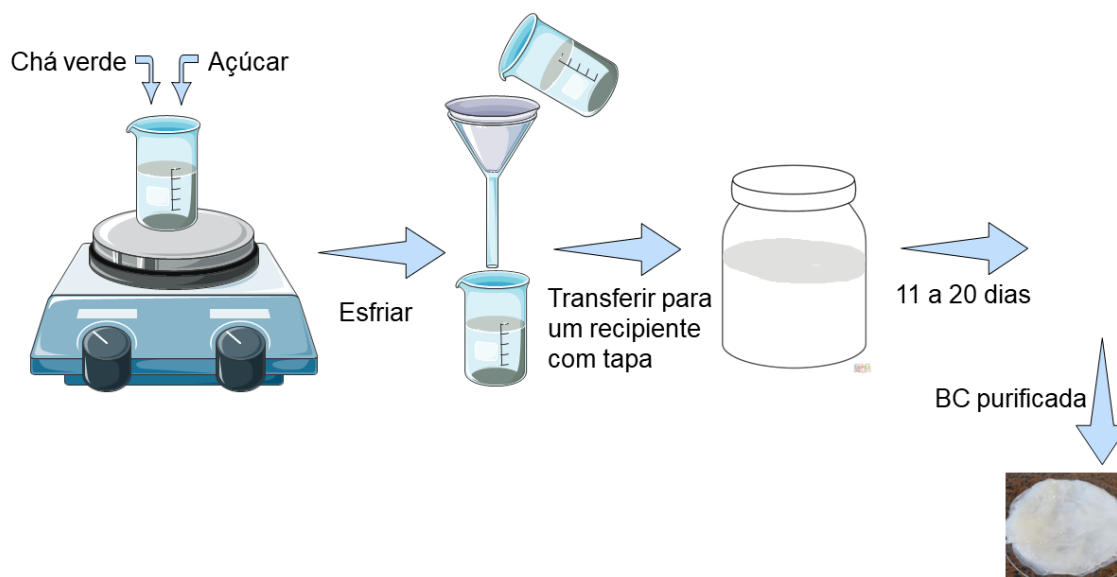
### 4.2 Síntese da celulose bacteriana (CB).

A síntese da CB consistiu inicialmente na preparação do chá verde açucarado. Nesta preparação, utilizou-se 1000 mL de água contendo 400 g de açúcar e aquecido até 100 °C. Quando chegou a temperatura desejada e todo açúcar estava dissolvido a solução foi retirada da chapa aquecedora e 9 g de chá verde foi adicionado, deixando-se esfriar até chegar à temperatura ambiente de 25 °C.

Após o chá atingir a temperatura ambiente, o chá verde foi separado em duas porções de 500 mL, as quais foram misturadas com 500 mL do Kombucha, que tinha a presença da bactéria *Komagataeibacter Xylinus* responsável pela produção da CB. Essa solução foi deixada em repouso por 20 dias obtendo-se o biofilme em conjunto com a fase líquida, que pode ser usada como pré-inóculo para cultivos subsequentes. O processo de síntese é mostrado na Figura 13.



**Figura 13.** Ilustração do passo a passo para a obtenção da celulose bacteriana, através da fermentação do chá verde e como ela se apresenta depois da purificação.



**Fonte:** Autoria própria.

### 4.3 Purificação da celulose bacteriana

A purificação da CB consistiu em imergir a película de CB em 50 mL de solução 1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH) a 90 °C por 1 hora. Após este tratamento, a película foi removida da solução e lavada 6 vezes com porções de 500 mL de água destilada e seca superficialmente com lenço de papel Kleenex. Essa etapa de purificação alcalina foi realizada duas vezes [88].

Após essa etapa de purificação com NaOH para a retirada de taninos e polifenóis presente na película, realizou-se a etapa de clareamento. Na etapa de clareamento a película foi imersa em 50 mL de solução de hipoclorito de sódio 1,5% a temperatura ambiente e mantida por 2 horas. Finalmente, removeu-se a película desta solução, lavou-se 6 vezes com porções de 500 mL de água destilada e secou-se superficialmente com lenço Kleenex, armazenando-se a 4 °C. Depois de toda essa

etapa de purificação CB, a água foi removida pelo método de liofilização. A CB não-purificada e purificada estão mostradas na Figura 14 [88].

**Figura 14.** Fotografias da celulose bacteriana, antes da purificação e depois da etapa de purificação.



Não-purificada



Purificada

**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.4 Extração da peroxidase do Rabanete

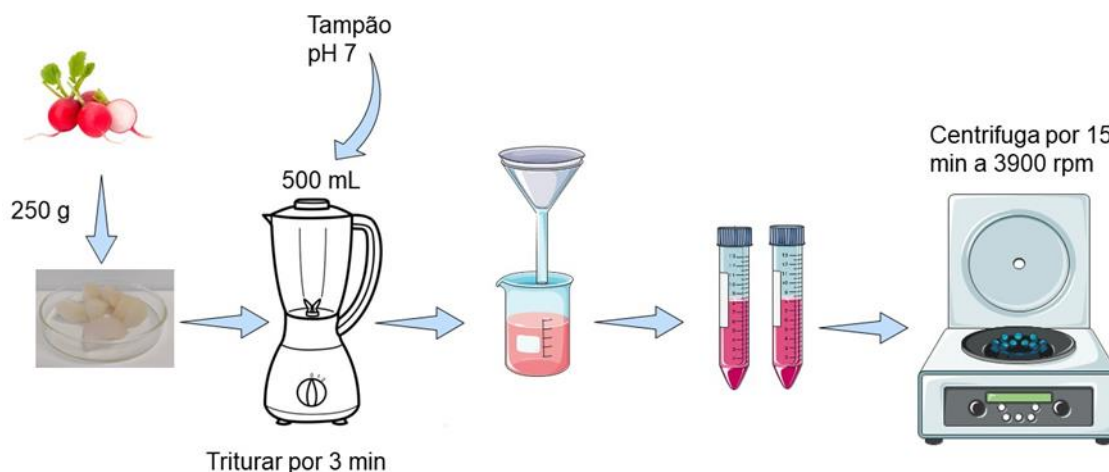
A extração da enzima peroxidase presente no rabanete foi realizada utilizando tampão fosfato pH 7. Para a preparação do tampão, prepararam-se duas soluções de fosfato, uma dibásica e outra monobásica. Pesou-se 87,090 g de fosfato de sódio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) e dissolveu-o em 500 mL de água destilada e 68,044 g de fosfato de sódio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), que foram dissolvidos em 500 mL de água destilada.

Na preparação de 500 mL do tampão pH 7, 307,5 mL de  $K_2HPO_4$  e 192,5 mL de  $KH_2PO_4$  foram adicionados em um balão volumétrico de 500 mL, homogeneizando-se a solução.

Após a preparação do tampão, se iniciou a extração da peroxidase do rabanete. Em um liquidificador, Philips Walita de 250 W de potência, adicionou-se 250 g de

rabanete descascado e cortado em cubos, juntamente com 500 mL de tampão fosfato pH 7, triturando-se a mistura por 3 min. Depois da etapa de trituração, o triturado foi filtrado em 4 camadas de gaze e o líquido filtrado foi centrifugado por 15 min em 3900 rpm em centrífuga Quimis. É ilustrado na Figura 15 as etapas de purificação.

**Figura 15.** Ilustração do passo a passo para extração da peroxidase do rabanete.



**Fonte:** Autoria própria.

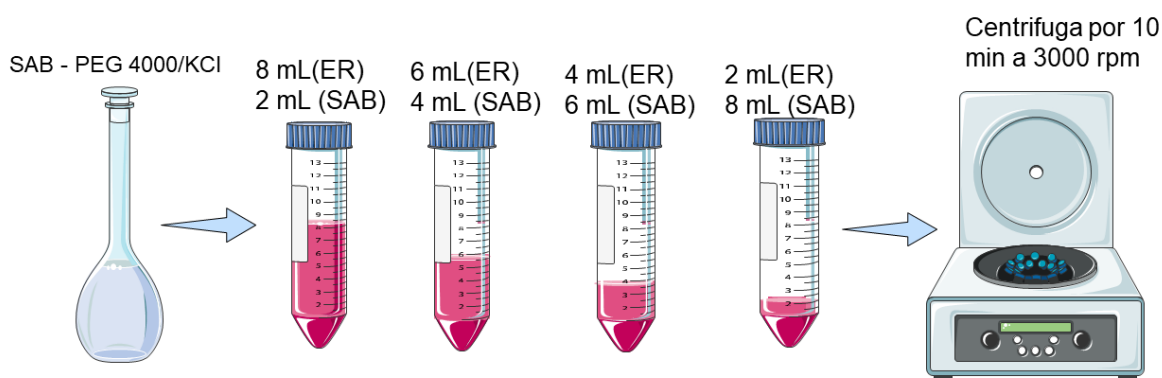
#### 4.5 Purificação da peroxidase extraída do rabanete

A purificação da enzima foi realizada utilizando o sistema aquoso bifásico (SAB), composto por uma mistura polímero/sal, para obtenção da peroxidase purificada e livre. Para isso, pesou-se 0,7 g do polímero PEG 4000 e 0,08 g do sal de cloreto de potássio (KCl), adicionando-os em um balão volumétrico de 10 mL diluindo-os com tampão fosfato pH 7.

Após a diluição o SAB foi misturado ao extrato de rabanete em diferentes proporções volumétricas. Nesta etapa, extrato de rabanete (ER) e sistema aquosos bifásico (SAB), respectivamente, foram misturados nas proporções de 8 mL:2 mL; 6 mL:4 mL; 4 mL:6 mL e 2 mL:8 mL, para otimizar a razão volumétrica mais eficiente para a partição da enzima, depois foram agitados e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos.

Após centrifugação duas fases aquosas com interface nítida foram formadas. O que apresentou interface com maior nitidez foi na proporção de 2 mL de extrato de rabanete (ER) com 8 mL de SAB, sendo o sistema escolhido para purificação. A etapa de purificação está representada na Figura 16. As fases separadas superior e inferior, foram testadas frente a oxidação do guaiacol para determinação da atividade enzimática.

**Figura 16.** Purificação da peroxidase extraída do rabanete, pelo sistema aquoso bifásico.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.6 Atividade Enzimática da peroxidase do rabanete.

Atividade enzimática foi determinada pela mudança na absorbância a 470 nm, devido à formação do produto de oxidação do guaiacol em tetraguaiacol. A referência a ser usada como meio em que o analito está ausente, chamada usualmente de “branco”, foi preparada adicionando-se em uma cubeta 2,79 mL do tampão fosfato com 0,1 mL de guaiacol 100 mM e 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM a temperatura ambiente de 25 °C, acompanhando-se a variação de absorbância durante 5 min. Nos testes com enzima, misturou-se na cubeta 2,79 mL da fase a ser testada com 0,1 mL de guaiacol 100 mM e 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM à temperatura ambiente e depois acompanhou-se a variação de absorbância durante 5 min [89].

Como 1 unidade de enzima fornece 1 µmol de tetraguaiacol em 1 min, aplicou-se a Lei de Beer, descrita na equação 1 para encontrar a concentração em mol/L de

tetraguaiacol. A concentração foi aplicada na equação 2 para encontrar a quantidade de matéria de tetraguaiacol. Por fim, tendo a quantidade de matéria do tetraguaiacol formado na reação química, considera-se que 1 unidade de enzima fornece 1  $\mu\text{mol}$  de tetraguaiacol em 1 min e encontra-se a atividade enzimática.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (1)$$

$$C = \frac{n}{v} \quad (2)$$

A = absorbância

$\varepsilon$  = absortividade molar

$l$  = espessura da amostra

C = concentração da amostra (mol/L)

n = quantidade da matéria

v = volume

#### 4.7 Oxidação da Celulose Bacteriana

A oxidação CB foi realizada com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ). Para isto, as membranas foram cortadas em pequenos pedaços quadrados de aproximadamente 0,5x0,5 cm e imersas em solução de periodato de sódio. Foram avaliadas as condições de concentração e tempo de oxidante. As membranas de celulose foram imersas em solução oxidante de 2% e 4% m/m. Em seguida as soluções foram envolvidas em papel alumínio para evitar a exposição a luminosidade e mantidas por 1 h e 3 h a temperatura ambiente, para obter as celulosas oxidadas ( $\text{CBO}_x$ ). Ao final dos tempos o excesso de  $\text{IO}_4^-$  e de  $\text{Na}^+$  foram removidos por repetidas lavagens com etanol e com água deionizada [59].

#### 4.8 Determinação do teor de aldeído

O teor de oxidação foi determinado por uma metodologia baseada na reação quantitativa entre os grupos carbonila e o cloridrato de hidroxilamina. Para a determinação, a solução de cloridrato de hidroxilamina 0,2 M teve seu pH ajustado

para 3 com adição de hidróxido de sódio (NaOH 0,01 M). Após essa etapa, pesou-se 0,1 g de cada celulose bacteriana oxidada, misturando-as com 25 mL de cloridrato de hidroxilamina 0,2 M pH 3. Essas amostras foram agitadas por 24 h, sendo que para cada amostra os testes foram realizados em duplicata. Após o tempo de reação a mistura foi titulada novamente para pH 3 usando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,01 M). A medição de uma amostra controle foi realizada de forma semelhante, porém com a celulose bacteriana não oxidada [90]. O grau de oxidação foi determinado a partir da equação 3:

$$Teor\ de\ aldeído = \frac{(V_{NaOH} - V_b) \times C_{NaOH}}{m_{CB}} \quad (3)$$

Onde  $V_{NaOH}$  o volume de hidróxido de sódio e  $V_b$  o volume do branco, enquanto  $C_{NaOH}$  a concentração do NaOH e  $m_{CB}$  a massa da amostra de celulose bacteriana seca.

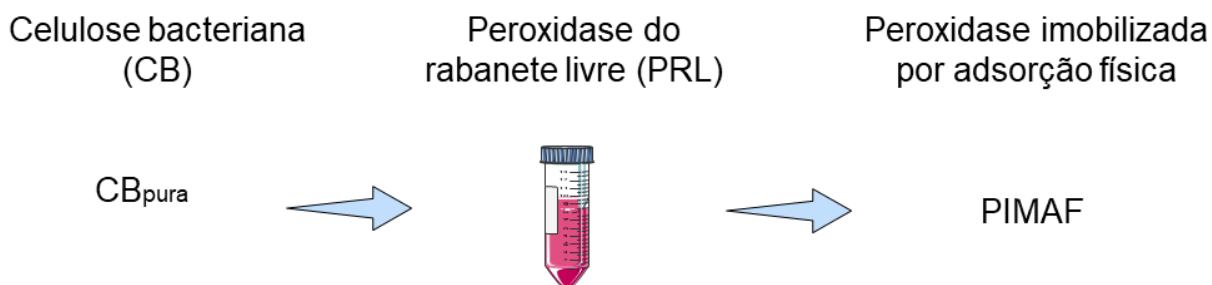
## 4.9 Imobilização enzimática

Para o processo de imobilização das enzimas nas membranas de celulose bacteriana foram estudadas duas metodologias descritas a seguir:

### 4.9.1 Adsorção física

Esta metodologia de imobilização foi realizada com a CB purificada, sem passar pelo processo de oxidação, na forma de pequenos quadrados de aproximadamente 0,5x0,5 cm, previamente liofilizados. Após isso, as peças foram padronizadas com massa de 5 mg e foram imersas em volumes de 10 mL de solução do extrato de rabanete, após purificação no sistema aquoso bifásico, mantendo-se as membranas no extrato por 12 h a temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas com água deionizada e liofilizadas [59] ilustração das nomenclaturas na Figura 17. A amostra foi testada frente a oxidação do guaiacol para determinação da atividade enzimática.

**Figura 17.** Nomenclatura de imobilização da metodologia por adsorção física.

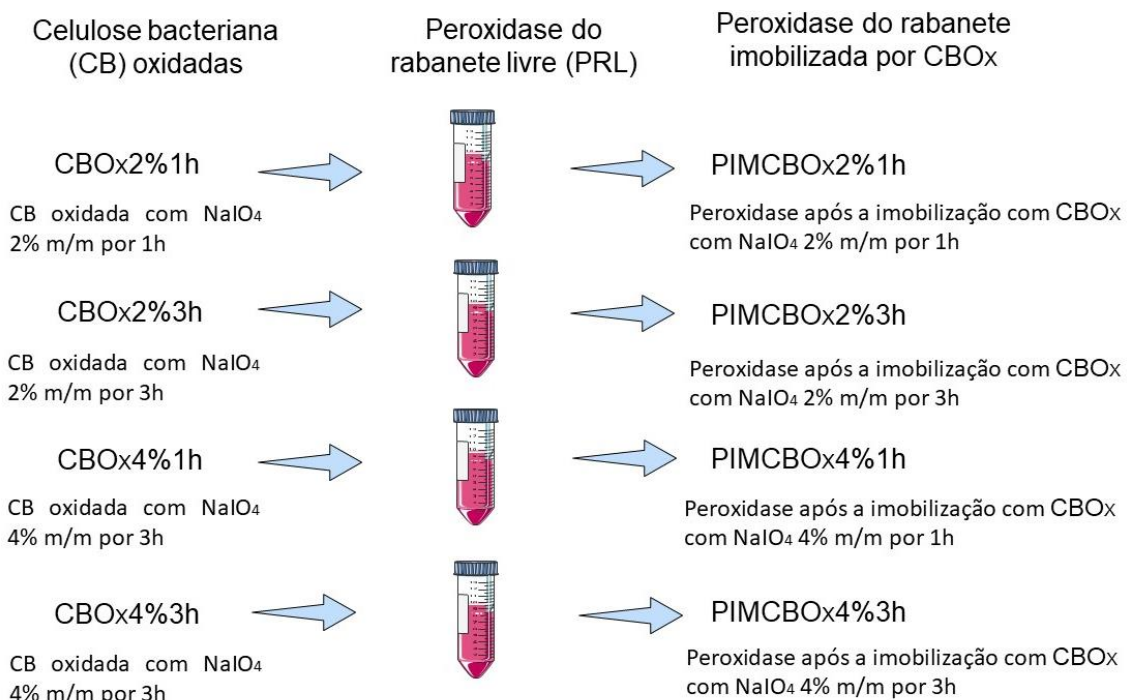


#### 4.9.2 Ligação covalente

Na imobilização por ligação covalente o suporte escolhido deve passar por uma modificação química para que os grupos químicos se tornem mais reativos, para o processo de imobilização. Logo, as membranas de celulose oxidada foram utilizadas para esta metodologia de imobilização.

As amostras de CB oxidadas já cortadas em pequenos quadrados de aproximadamente 0,5x0,5 cm e liofilizadas, foram padronizadas com massa de 5 mg e imersas em volumes de 10 mL de solução do extrato de rabanete previamente purificado no sistema aquoso bifásico. As membranas foram mantidas no extrato por 3 horas sendo, após desse período, lavadas com água deionizada e liofilizadas, representação das nomenclaturas na Figura 18. As amostras foram testadas frente a oxidação do guaiacol para determinação da atividade enzimática [91].

**Figura 18.** Nomenclatura de imobilização da metodologia por ligação covalente.



#### 4.10 Atividade Enzimática enzima imobilizada

Atividade enzimática foi determinada pela mudança na absorbância a 470 nm, devido à formação do produto de oxidação do guaiacol em tetraguaiacol. Analogamente ao descrito no item 4.6, o “branco” foi preparado adicionando-se em uma cubeta 2,79 mL do tampão fosfato pH 7, 0,1 mL de guaiacol 100 mM, 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM e alguns pedaços de celulose bacteriana pura a temperatura ambiente de 25 °C. Acompanhou-se, em seguida, a variação de absorbância durante 5 minutos. Nos testes com enzima imobilizada, misturou-se na cubeta 2,79 mL de tampão fosfato pH 7 com 0,1 mL de guaiacol 100 mM e 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM e pedaços das amostras imobilizadas a temperatura ambiente e depois acompanhou-se a variação de absorbância durante 5 minutos. Os cálculos foram realizados da mesma forma da equação 1 e 2 no tópico 4.6.



#### **4.11 Determinação da quantidade de proteína imobilizada**

Para determinação de proteína no extrato de rabanete foi feita uma curva padrão utilizando-se a proteína albumina comercial. Desta forma, preparou-se inicialmente uma solução estoque de albumina de 0,1 mg/mL. Em seguida foi realizada a diluição da solução estoque de albumina para construção dos pontos da curva de calibração com concentração 0,01 - 0,1 mg/mL. Das amostras diluídas foram pegos uma alíquota 50 µL de cada solução e adicionados em 1250 µL de reagente de Bradford, esperou-se 5 minutos reação e foi realizado a leitura para curva de calibração.

Para a determinação da concentração de peroxidase presente na solução purificada do rabanete. A análise foi feita inicialmente para amostra da peroxidase do rabanete no estado inicial, antes da imobilização. Logo, pegou-se uma alíquota 50 µL de uma solução de 10 mL e foi adicionado em 1250 µL de reagente de Bradford, após o tempo de reação a leitura foi realizada.

As amostras que foram submetidas a imobilização seguiram-se na mesma metodologia, foi retirada uma alíquota 50 µL de uma solução de 10 mL da peroxidase após a imobilização por ligação covalente (usando 0,3 g de celulose bacteriana oxidada para imobilização da peroxidase do rabanete) e da mesma forma para a imobilização por adsorção física (usando 0,3 g de celulose bacteriana pura) cada alíquota foi adicionada em 1250 µL de reagente de Bradford, após o tempo de reação a leitura foi realizada.

#### **4.12 Descoloração das soluções de corantes com a enzima livre, imobilizada e celulose bacteriana pura.**

O experimento foi realizado utilizando quatro corantes distintos (violeta cristal, rodamina 6G, índigo sintético e azul de metileno). Inicialmente as soluções dos corantes foram preparadas em água deionizada na concentração de  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . As amostras de enzima imobilizada pela celulose bacteriana oxidada com periodato 4% no tempo de 1h (PIMOxCB4%1h), enzima imobilizada por adsorção física (PIMAF), celulose bacteriana pura (CBpura) e peroxidase do rabanete livre (PRL) foram testadas no processo de descoloração das quatro soluções. Todos os ensaios foram realizados em triplicata com 2,5 mL de solução dos corantes, exceto para o PRL

que utilizou 100  $\mu\text{L}$  para 2,5 mL de solução dos corantes. Um esquema ilustrativo deste experimento é mostrado na Figura 17.

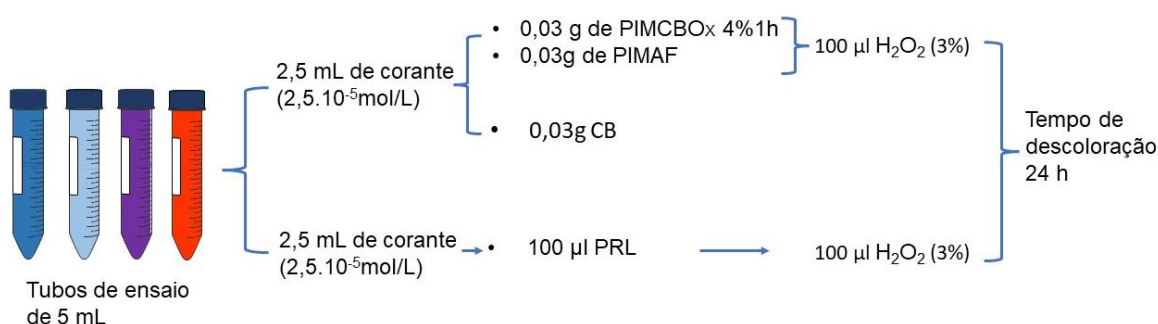
As amostras ficaram em contato com os corantes por 24 horas a 25°C e, após esse tempo, mediu-se as alterações da absorbância no comprimento de onda de máxima absorção de cada corante, em um espectrofotômetro UV/VIS. Os comprimentos de onda usados foram: 664 nm para o azul de metileno, 610 nm para o índigo sintético, 585 nm para o violeta cristal e 525 nm para a rodamina 6G, também representados na Tabela 2. Com os resultados obtidos é possível calcular através da equação 4, a eficiência de descoloração para cada mecanismo aplicado.

$$ED (\%) = \left( \frac{A_0 - A_F}{A_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

$A_0$  = absorbância inicial (antes do corante passar pela etapa de descoloração)

$A_F$  = absorbância final (depois que o corante passar pela etapa de descoloração)

**Figura 19.** Proporções das amostras da análise de descoloração e tempo de reação.



**Tabela 2.** Características químicas dos corantes.

Corante	Classe	Formula química	Massa Molar (g/mol)	$\lambda_{\text{máximo}}$
Azul de metileno	Catiônico	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$	319,85	664 nm
Violeta cristal	Catiônico	$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$	408,0	585 nm
Rodamina 6G	Catiônico	$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$	479.02	525 nm
Índigo sintético	Aniônico	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	262,27	610 nm

### 4.13 Técnicas de Caracterização

#### 4.13.1 Análise Termogravimétrica (TG)

O comportamento térmico da amostra foi avaliado por análise termogravimétrica (TG) utilizando-se um equipamento da Shimadzu modelo TGA-50. A análise termogravimétrica foi realizada com massa em torno de 5 mg, na faixa de temperaturas de 25 a 700 °C e com taxa de aquecimento de 10 °C·min<sup>-1</sup>, sob atmosfera de nitrogênio. A análise foi realizada no Laboratório de Análises Térmicas (CLQM-UFS) da Universidade Federal de Sergipe – Campus São Cristóvão.

#### 4.13.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas e microestruturas das amostras produzidas foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio modelo SEM-LV (JSM6510LV), com operação 20 kV. As amostras foram recobertas com ouro para melhor contraste das imagens usando uma

Metalizadora/Evaporadora da DENTON VACUUM (Desk V). As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microscopia Eletrônica (CMNano - UFS.) da Universidade Federal de Sergipe – Campus São Cristóvão.

#### *4.13.3 Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para verificar os grupos funcionais foram obtidos no estado sólido, a partir de amostras dispersas em pastilhas de KBr na região entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  utilizando um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de marca Shimadzu, modelo IRPrestige-21. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM-UFS) da Universidade Federal de Sergipe – Campus São Cristóvão.

#### *4.13.4 Espectrofotometria UV/VIS*

O espectrofotômetro UV/VIS da marca Cary, modelo 100 Scan, foi utilizado na determinação da atividade enzimática da peroxidase livre e imobilizada. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM-UFS) da Universidade Federal de Sergipe – Campus São Cristóvão. Já para a determinação da proteína e a etapa de descoloração de corantes, foram realizados no espectrofotômetro UV/VIS da marca Cary, modelo 100 Scan. Essas análises foram realizadas no Núcleo de Competência em Petróleo e Gás de Sergipe (NUPEG) da Universidade Federal de Sergipe – Campus São Cristóvão.

#### *4.13.5 Adsorção/dessorção de $\text{N}_2$*

As isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio das membranas de BC, CBOx e peroxidase imobilizada liofilizadas foram determinadas usando um NOVA 1200. Quantachrome Instruments, foi utilizado amostras de massa cerca 0,3 g inicialmente desgaseificadas sob vácuo a temperaturas 77K por 3 horas. As áreas superficiais das amostras foram calculadas a partir do método Brunauer, Emmett e Teller (BET) [92], os volumes de microporos foram calculados a partir do modelo Dubinin-Radushkevich (DR) [93], e as distribuições dos tamanhos e diâmetro de poros foram calculados a partir do modelo Density Functional Theory (DFT) [94].

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os próximos subitens serão apresentados os resultados da obtenção da peroxidase extraída do rabanete, da celulose bacteriana pura, oxidada e suas caracterizações, bem como da imobilização da enzima e respectivas caracterizações. Adicionalmente, o potencial da peroxidase do rabanete livre, imobilizado e celulose bacteriana pura da descoloração de corantes será apresentado e discutido.

### 5.1 Atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática para a peroxidase extraída do rabanete foi realizada para a enzima antes e após a etapa de purificação, bem como para a peroxidase comercial. No extrato de rabanete purificado pelo sistema aquoso bifásico a atividade enzimática foi determinada tanto para parte superior, quanto para parte inferior. Os resultados da atividade total da enzima encontram-se na Tabela 3.

**Tabela 3.** Atividade enzimática da enzima comercial, extraída do rabanete purificada por sistema aquoso bifásico.

Amostra	Parâmetros	Atividade enzimática (U)
1	Extrato purificado - superior	1,133
2	Extrato purificado – inferior	0,242
3	Enzima comercial	1,874

A atividade enzimática da peroxidase do rabanete purificada, especificamente a parte superior (amostra 1), apresentou valores semelhantes aos da enzima comercial (amostra 3). A amostra 2 apresentou a menor atividade enzimática em comparação com as demais amostras.

Como visto na Tabela 3, a maior atividade enzimática para as amostras purificadas se deu para a amostra coletada na parte superior do sistema aquoso bifásico, sendo um comportamento esperado, visto que, nesse sistema, a parte superior é a menos polar, na qual encontra-se o polímero PEG/4000 (polietilenoglicol/4000). Em contrapartida, a parte inferior é composta pelo sal, que

neste caso foi o KCl (cloreto de potássio) além da possibilidade de que as impurezas contidas no extrato enzimático e o sal se concentrem na fase inferior [95].

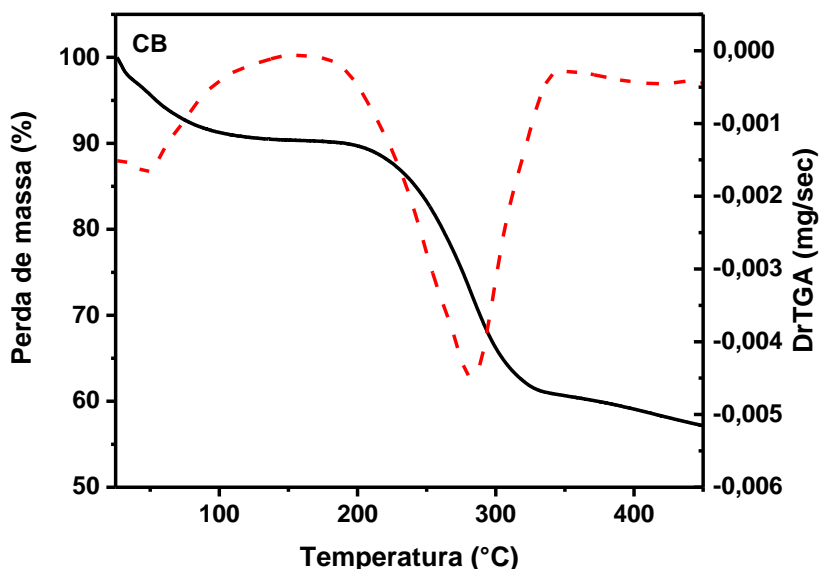
Portanto, através destes resultados, pode-se afirmar a presença de enzima peroxidase no extrato de rabanete, pois após a etapa de purificação a amostra 1, a parte superior do sistema aquoso bifásico apresentou atividade enzimática muito parecida com a enzima comercial. Os experimentos seguintes foram realizados com amostra 1, tendo a peroxidase rabanete livre (PRL).

## 5.2 Análise termogravimétrica (TG)

Antes da análise termogravimétrica, a celulose bacteriana (CB) foi submetida ao processo de purificação para a retirada de materiais não celulósicos. O processo de degradação térmica da CB já foi descrito na literatura e geralmente ocorre em três etapas, a desidratação, despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas, seguida pela formação de resíduos carbonizados [96]. Desta forma, de acordo com a Figura 20, ocorre uma perda de massa em temperaturas inferiores a 100 °C, que pode ser atribuída a volatilização de água, com posterior remoção de fragmentos moleculares como -OH e CH<sub>2</sub>-OH [97].

Além da etapa de desidratação na Figura 20, também se observa a etapa de despolimerização que ocorre na faixa de 150 °C a 350°C com a perda de massa quase completa. A temperaturas mais altas, ou seja, acima de 350°C, é observada a última etapa de degradação em que ocorre decomposição das unidades glicosídicas. Os resultados desta análise, mostram que o material sintetizado através do chá kombucha, tem um comportamento típico de materiais celulósicos, devido a seu padrão de degradação. [97].

Portanto como esse material apresenta características celulósicas, torna-se interessante para imobilização da peroxidase por adsorção física, devido ao seu entrelaçamento de rede. Além disso, como apresenta grupos funcionais assim como da celulose vegetal, isto abre a possibilidade de modificações química destes para deixá-los mais reativos e se ligarem covalentemente com a peroxidase.

**Figura 20.** Análise termogravimétrica (TG).

### 5.3 Determinação do teor de oxidação após reação com $\text{NaIO}_4$

Após a reação com  $\text{NaIO}_4$ , o teor de oxidação (TO) foi determinado pelo método envolvendo cloridrato de hidroxilamina e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Determinação do teor de oxidação de acordo com o tempo e a concentração do oxidante.

Amostras	$\text{NaIO}_4$ (m/m)	Tempo de reação (h)	TO (mmol)
$\text{CBO}_x2\%1\text{h}$	2%	1	0,170
$\text{CBO}_x2\%3\text{h}$	2%	3	0,125
$\text{CBO}_x4\%1\text{h}$	4%	1	0,327
$\text{CBO}_x4\%3\text{h}$	4%	3	0,320

No presente trabalho analisou-se a oxidação em função do tempo e da concentração (Tabela 4). Quando se observa os resultados levando em conta apenas concentração, nota-se que quanto maior a concentração do oxidante, maior foi o TO, ou seja, mais grupos OH (hidroxilas) foram convertidos em aldeídos.

Porém quando se faz uma comparação entre as amostras em relação ao tempo de oxidação, verifica-se que o teor de oxidação diminuiu com o aumento do tempo, para ambas as concentrações.

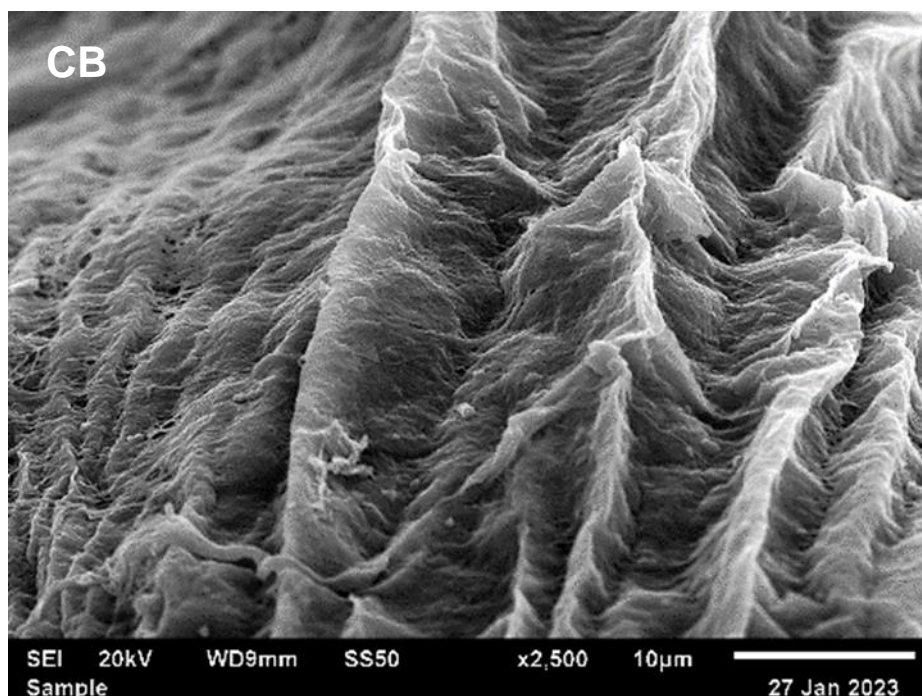
Como será discutido na caracterização por espectroscopia FTIR, a oxidação por  $\text{NaIO}_4$  depende de vários fatores, como concentração do oxidante, tempo e temperatura, sendo que tempos mais longos podem favorecer a formação de subprodutos [90].

#### 5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para a análise morfológica da celulose bacteriana pura, oxidada e depois da imobilização do processo de imobilização da enzima peroxidase. Os resultados estão nos tópicos a seguir:

##### 5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura: CB pura

**Figura 21.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do CB pura.



A morfologia da CB pura é observada na Figura 21. A micrografia da CB pura liofilizada expõe pequenas microfibrilas longas formando uma rede compactada e entrelaçada. Esse entrelaçamento da rede de nanofibras presentes na CB pode



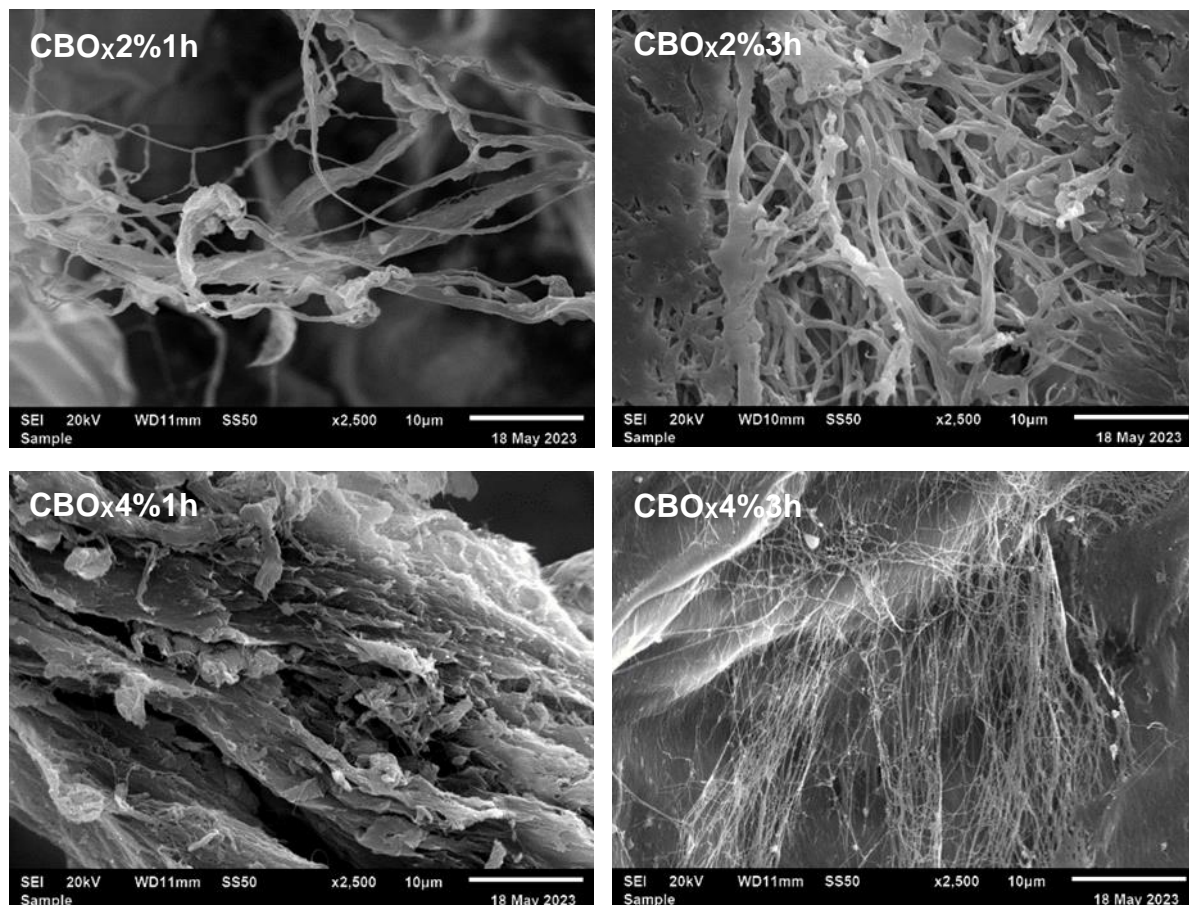
fornecer a esse material uma grande área superficial. Além disso, o fato de o material apresentar uma característica porosa o transforma em um suporte promissor no aprisionamento de moléculas, como a imobilização de enzimas. Dessa forma, devido à porosidade presente na estrutura da CB moléculas hóspedes, como enzimas, podem difundir facilmente por todo o seu espaço interno [98,99].

#### *5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura: celulose bacteriana oxidada (CBOX)*

As micrografias da CB oxidada com periodato de sódio estão ilustradas na Figura 22, e incluem CB oxidada com periodato de sódio 2% m/m por 1 hora (CBO<sub>x</sub>2%1h), 2% m/m por 3 horas (CBO<sub>x</sub>2%3h), 4% m/m por 1 hora (CBO<sub>x</sub>4%1h) e 4% m/m por 3 horas (CBO<sub>x</sub>4%3h). A CB tem em sua estrutura um anel de seis membros que é parcialmente destruído, devido à oxidação seletiva que acontece no C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> que foi aberta e formou o aldeído.

Note-se que, mesmo com a modificação química ocasionada pela oxidação do periodato de sódio, a estrutura microfilar da celulose bacteriana oxidada, permanece praticamente inalterada em relação àquela da celulose bacteriana pura. Esta é uma característica deste tipo de oxidação, que praticamente não altera a estrutura microfilar da celulose [100].

**Figura 22.** Micrografias das CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora (CBO<sub>x</sub>2%1h); CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 2% m/m por 3 horas (CBO<sub>x</sub>2%3h); CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora (CBO<sub>x</sub>4%1h); CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 4% m/m 3 horas (CBO<sub>x</sub>4%3h).



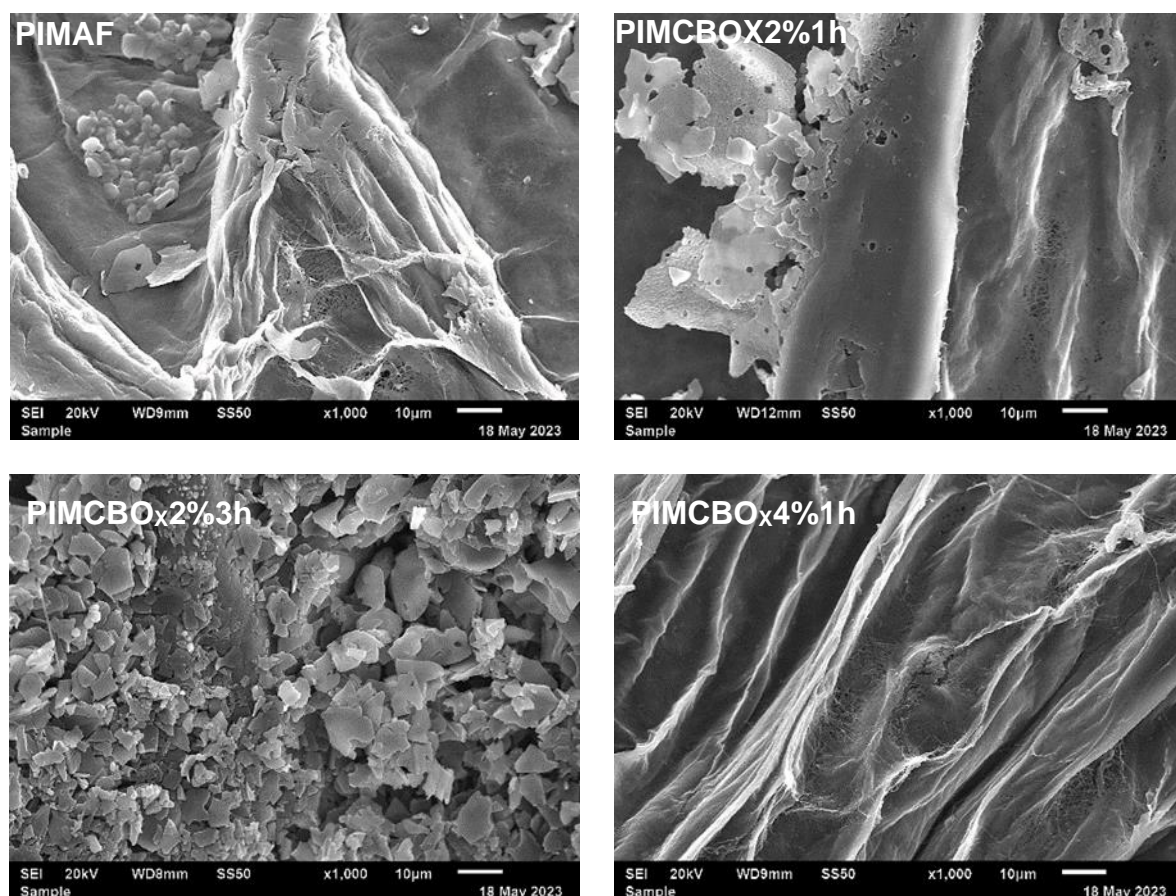
#### 5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura: peroxidase imobilizada por CB pura e CBOX

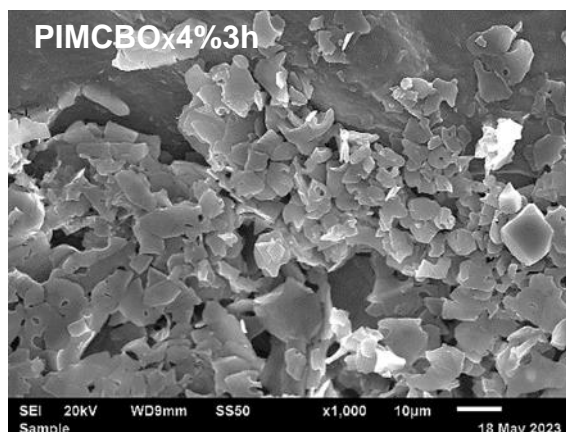
A morfologia da CB após a imobilização da enzima peroxidase extraída do rabanete é ilustrada na Figura 23. As morfologias tanto da CB pura usada contendo a enzima imobilizada pela metodologia de adsorção física quanto das celulosas bacterianas oxidadas (CBO<sub>x</sub>) usadas como suporte para imobilização pelo método de ligação covalente são mostradas nas Figuras 23.

Todas estas películas apresentaram superfícies irregulares que podem estar relacionadas a incorporação da enzima nos suportes. Observa-se a presença de estruturas com morfologias de placas, bem como agregados de partículas que não foram observados nas amostras antes da imobilização da enzima, por ambas as metodologias avaliadas.

Na amostra PIMCBO<sub>x</sub>4%1h as superfícies irregulares não são evidenciadas. Apesar do não aparecimento dessas superfícies irregulares na região observada, isso se deve apenas ao fato de que a enzima pode não estar distribuída homogeneamente sobre a superfície da amostra na escala de tamanho observada na técnica. Tal consideração é reforçada pelos resultados dos testes de atividade enzimática e determinação de proteína realizados. Nesses testes a amostra PIMCBO<sub>x</sub>4%1h, assim como PIMAF, PIMCBO<sub>x</sub>2%1h, PIMCBO<sub>x</sub>2%3h, PIMCBO<sub>x</sub>4%3h, apresentaram atividade enzimática e na determinação da proteína, além de ter sido identificada a presença da peroxidase extraída do rabanete. Esses resultados estão abordados de modo mais detalhado nos tópicos 5.7 e 5.8.

**Figura 23.** O MEV das amostras Peroxidase imobilizada CB pura (PIMAF); Peroxidase imobilizada CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora (PIMCBO<sub>x</sub>2%1h); Peroxidase imobilizada CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 2% m/m por 3 horas (PIMCBO<sub>x</sub>2%3h); Peroxidase imobilizada CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora (PIMCBO<sub>x</sub>4%1h); Peroxidase imobilizada CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 4% m/m por 3 horas (PIMCBO<sub>x</sub>4%3h).





### 5.5 Análises de FTIR para celulose bacteriana pura e oxidada

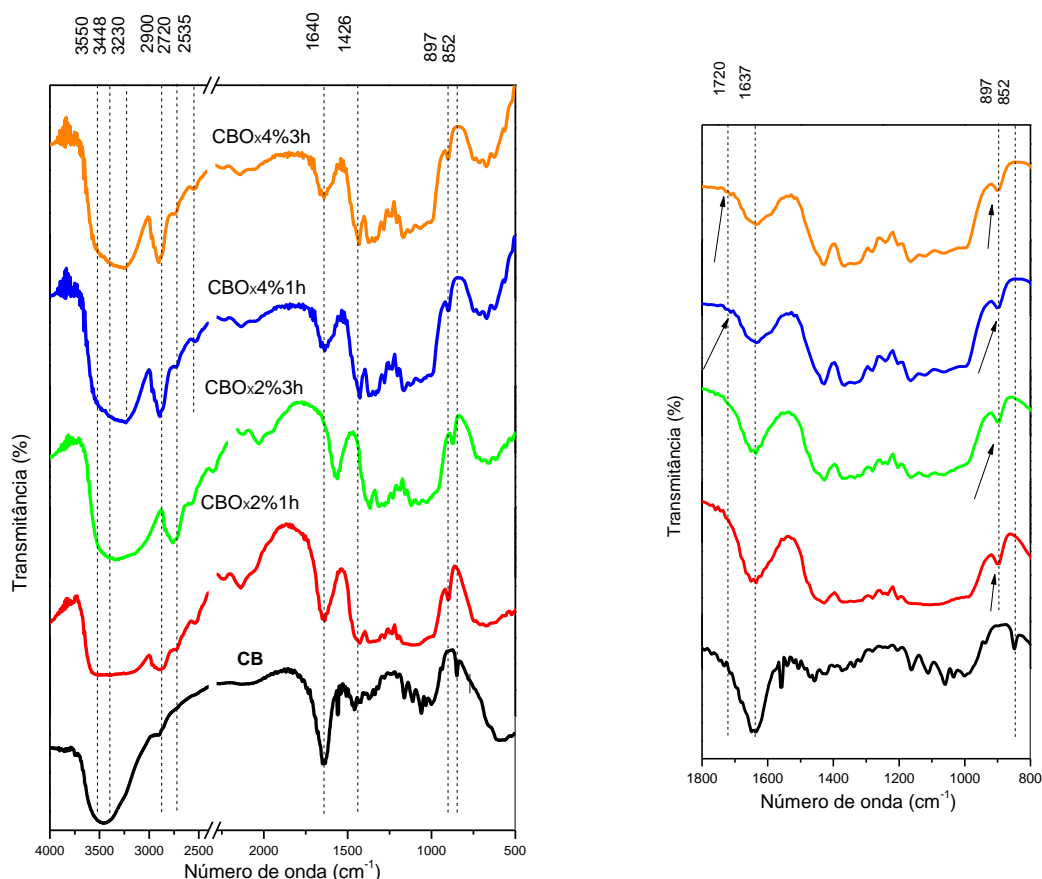
Os espectros de FTIR (Figura 24) foram medidos no intuito de avaliar a ocorrência da oxidação da celulose bacteriana, verificando possíveis modificações químicas na celulose. Outro objetivo foi confirmar a imobilização da enzima por ligação covalente e por adsorção física. É possível identificar no espectro da CB pura a banda larga em torno de  $\approx 3448 \text{ cm}^{-1}$  correspondente a vibração de estiramento  $\text{--OH}$ , seguida da banda em  $2900 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento  $\text{CH}$ , da banda em  $1640 \text{ cm}^{-1}$  (deformação  $\text{OH}$  de moléculas de água adsorvidas), além de de bandas em torno de  $1427 \text{ cm}^{-1}$  e em  $1160 \text{ cm}^{-1}$ , referentes à deformação  $\text{CH}_2$  e estiramento  $\text{C-O-C}$ , respectivamente [101,102].

Após a oxidação da CB, diversas mudanças espectrais são evidentes. A banda referente ao estiramento  $\text{OH}$  se alargou e se tornou assimétrica com intensidades elevadas entre  $3230$  e  $3550 \text{ cm}^{-1}$ . Na região do estiramento  $\text{CH}$ , juntamente com a intensificação da banda em  $2900 \text{ cm}^{-1}$ , surge uma nova banda em  $2700 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento  $\text{CH}$  típico de aldeídos, em números de onda mais baixos do que os demais grupos  $\text{CH}$ . A presença desta banda em  $2700 \text{ cm}^{-1}$ , juntamente com uma intensificação da banda em  $1426 \text{ cm}^{-1}$  relativa à deformação  $\text{CH}_2$  sugere fortemente a ocorrência de aldeídos, pois grupos  $\text{CH}_2$  vizinhos a carbonilas frequentemente absorvem mais fortemente [103].

Com relação à vibração de grupos  $\text{C=O}$ , na região de números de onda em torno de  $1720 \text{ cm}^{-1}$  os espectros das amostras oxidadas com  $\text{NaIO}_4$  (periodato de sódio) apresentam sinais quase imperceptíveis, mas que, examinados no conjunto

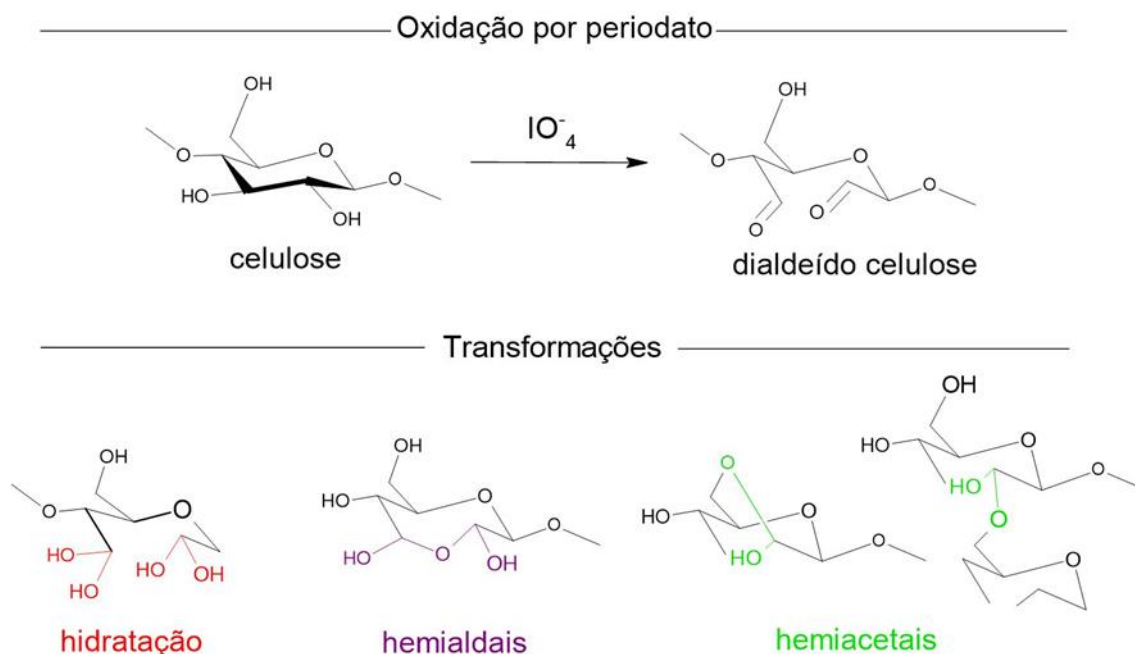
com os estiramentos CH característicos, podem confirmar a oxidação. Vale destacar que tais bandas frequentemente são fracas quando se trata da oxidação de polissacarídeos, principalmente no caso de materiais fibrosos em que a oxidação se restringe a superfície das fibras [90]. Além disso, a forma de aldeído livre corresponde apenas a uma pequena fração tendo em vista a ocorrência de hidratação e de reticulação formando hemialdal e hemiacetal, ilustrado na Figura 25 [104].

**Figura 24.** FTIR da CB pura; das amostras oxidadas: CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora (CBO<sub>x</sub>2%1h); CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 2% m/m por 3 horas (CBO<sub>x</sub>2%3h); CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora (CBO<sub>x</sub>4%1h); CBO<sub>x</sub> com NaIO<sub>4</sub> 4% m/m 3 horas (CBO<sub>x</sub>4%3h).





**Figura 25.** Reação da oxidação da CB por periodato de sódio, formando dialdéido celulose, seguindo das etapas de transformação da fração de aldeído em hidratados, hemialdais e hemiacetais.



Fonte: Adaptado [104].

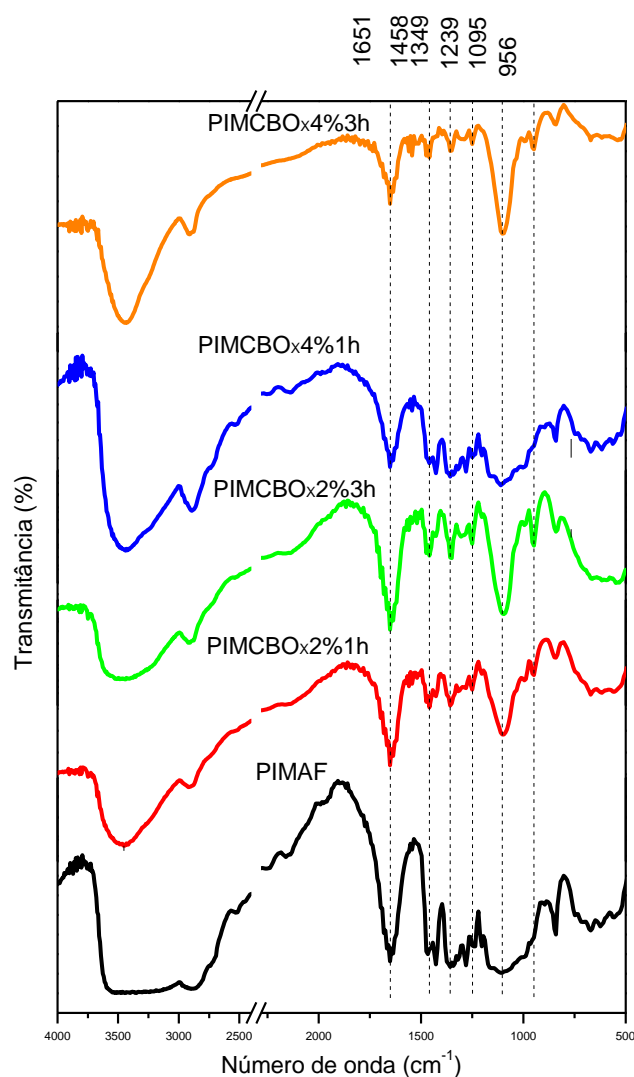
## 5.6 Análises de FTIR para amostras com peroxidase imobilizada

Após a etapa de imobilização, surgiram algumas bandas diferentes, tanto para a amostra obtida por imobilização por adsorção física, quanto para imobilização por ligação covalente (Figura 26). O espectro da peroxidase é caracterizado por bandas em  $3446\text{ cm}^{-1}$  (estiramento NH e OH),  $2965\text{ cm}^{-1}$  (estiramento CH),  $1655\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{COO}^-$ ),  $1439\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{COO}^-$ ),  $1248\text{ cm}^{-1}$  e  $1075\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-N). No presente caso, as bandas em  $1651$  e em  $1095\text{ cm}^{-1}$  aparecem de forma bastante evidente nos espectros das amostras referentes a imobilização covalente, sugerindo a presença da enzima [105].

Além disso, a banda em  $1651\text{ cm}^{-1}$  pode envolver contribuições tanto da formação de base de Schiff (corresponde ao estiramento  $\text{C}=\text{N}$ ) quanto a ligação amida I da enzima. Para a amostra referente a imobilização por adsorção física e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h, as bandas na região abaixo de  $1700\text{ cm}^{-1}$  se mostram em menores números de onda comparadas com as outras, sugerindo a imobilização de uma

quantidade menor de enzima. Porém nos testes de atividade enzimática e determinação de proteínas todas as amostras na visão geral tiveram valores muito parecidos. Esses resultados são mostrados nos tópicos 5.7 e 5.8.

**Figura 26.** FTIR da peroxidase imobilizada celulose bacteriana (CB) pura; imobilizada por  $\text{CBCO}_x$  (CB oxidada) na concentração de  $\text{NaIO}_4$  de 2% durante 1 hora ( $\text{PIMCBO}_{x2\%1h}$ ); na concentração de  $\text{NaIO}_4$  de 2% durante 3 horas ( $\text{PIMCBO}_{x2\%3h}$ ); na concentração de  $\text{NaIO}_4$  de 4% durante 1 hora ( $\text{PIMCBO}_{x4\%1h}$ ) e na concentração de  $\text{NaIO}_4$  de 4% durante 3 horas ( $\text{PIMCBO}_{x4\%3h}$ ).



### 5.7 Atividade enzimática após a imobilização da enzima.

Os valores de atividade enzimática obtidos para as diferentes amostras são mostrados na Tabela 5. Pode-se discutir os resultados de duas formas, sendo uma

visão geral e uma visão específica. A visão geral mostra que apesar de desvios padrões elevados, ou seja, de uma determinada heterogeneidade nos resultados, todas essas amostras apresentaram atividade enzimática. Desta forma, todas as amostras imobilizaram a enzima tanto a CB que foram oxidadas, quantos a CB pura. Portanto, é mostrado neste resultado uma confirmação dos resultados trazidos no MEV que apresentou o aparecimento das superfícies irregulares identificando incorporação das enzimas e também no FTIR com as modificações nos espectros apresentados.

**Tabela 5.** Resultados da análise de atividade enzimática após a imobilização pelo método de adsorção física e ligação covalente da peroxidase extraída do rabanete.

Amostra	Parâmetros	Atividade enzimática (U)
PIMAF	Peroxidase imobilizada adsorção física	0,423 $\pm$ 0,213
PIMCBO <sub>x</sub> 2%1h	Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora	0,197 $\pm$ 0,083
PIMCBO <sub>x</sub> 2%3h	Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 3 hora	0,265 $\pm$ 0,103
PIMCBO <sub>x</sub> 4%1h	Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora	0,240 $\pm$ 0,138
PIMCBO <sub>x</sub> 4%3h	Peroxidase imobilizada CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 3 hora	0,196 $\pm$ 0,089

Na visão específica todas as amostras apresentaram valores de atividade enzimática muito parecidas, sem diferenças estatisticamente significativas. Portanto, independente do mecanismo de adsorção física ou ligação covalente as amostras de CB com a peroxidase imobilizadas tem atividade enzimática parecidas.

## 5.8 Determinação da quantidade de proteína imobilizada

A determinação da quantidade de proteína presente nos suportes forneceu os resultados apresentados na Tabela 6.



**Tabela 6.** Concentração da peroxidase do rabanete livre (PRL) e concentração da PR nos suportes imobilizadores.

<b>Amostras</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Peroxidase total (mg)</b>	<b>Peroxidase imobilizada (mg)</b>	<b>Peroxidase imobilizada por grama de CB (mg/g)</b>
<b>PRL</b>	Peroxidase do rabanete livre	0,940	0,0000	0,0000
<b>PIMAF</b>	Peroxidase após a imobilização por adsorção física	0,400	0,540	1,80
<b>PIMCBO<sub>x</sub>2%1h</b>	Peroxidase após imobilização com CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 1 hora	0,180	0,760	2,53
<b>PIMCBO<sub>x</sub>2%3h</b>	Peroxidase após imobilização com CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 2% m/m por 3 hora	0,160	0,780	2,60
<b>PIMCBO<sub>x</sub>4%1h</b>	Peroxidase após imobilização com CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 1 hora	0,180	0,760	2,53
<b>PIMCBO<sub>x</sub>4%3h</b>	Peroxidase após imobilização com CBO <sub>x</sub> com NaIO <sub>4</sub> 4% m/m por 3 hora	0,180	0,760	2,53

Esses resultados apresentados mostram que a enzima foi imobilizada tanto no mecanismo de adsorção física, quanto o de ligação covalente. Essa confirmação já vem sendo apresentada, com resultados significativos no MEV com o aparecimento de superfícies irregulares, no FTIR com aparecimento de novas bandas após a imobilização e no teste de atividade enzimática em que todas as amostras, através dessa determinação mostrara que a peroxidase está presente no suporte.

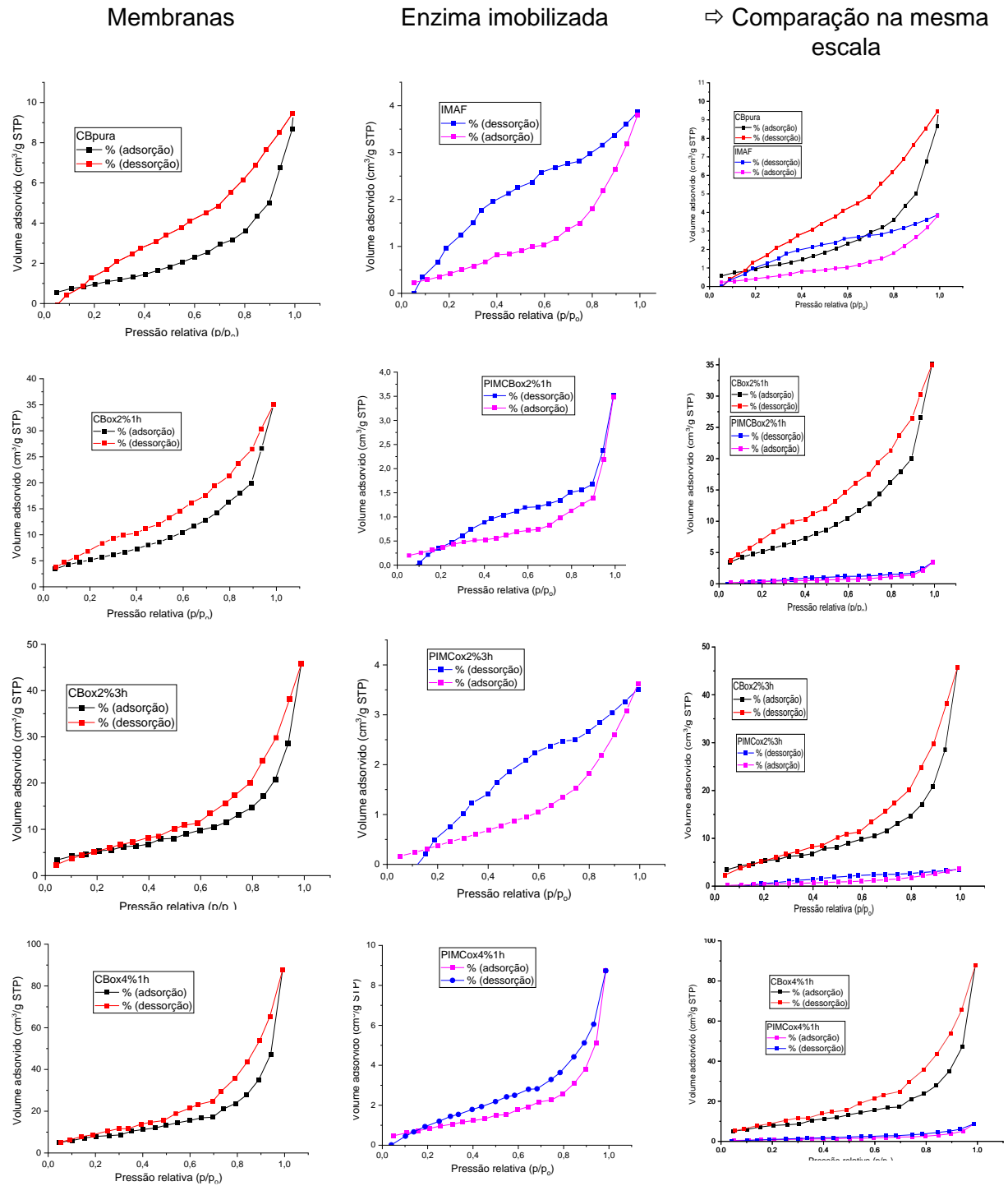
Além dessa observação, outra muito interessante é que através da determinação da proteína, obtendo os valores de (2,60 mg/g) para PIMCBO<sub>x2%3h</sub> e (2,53 mg/g) para PIMCBO<sub>x2%1h</sub>, PIMCBO<sub>x4%1h</sub> e PIMCBO<sub>x4%3h</sub>, relata que todas as amostras imobilizaram, quantidades de peroxidase muito parecidas, assim como no resultado da atividade enzimática que as amostras apresentaram resultados bem similares. Portanto as amostras PIMCBO<sub>x2%1h</sub>, PIMCBO<sub>x2%3h</sub>, PIMCBO<sub>x4%1h</sub>, PIMCBO<sub>x4%3h</sub>, com esses resultados mostram que a celulose bacteriana oxidada em concentrações diferentes e tempos diferentes não trouxe diferentes resultados de imobilização, pois todas as amostras imobilizaram quantidades muito similares de peroxidase.

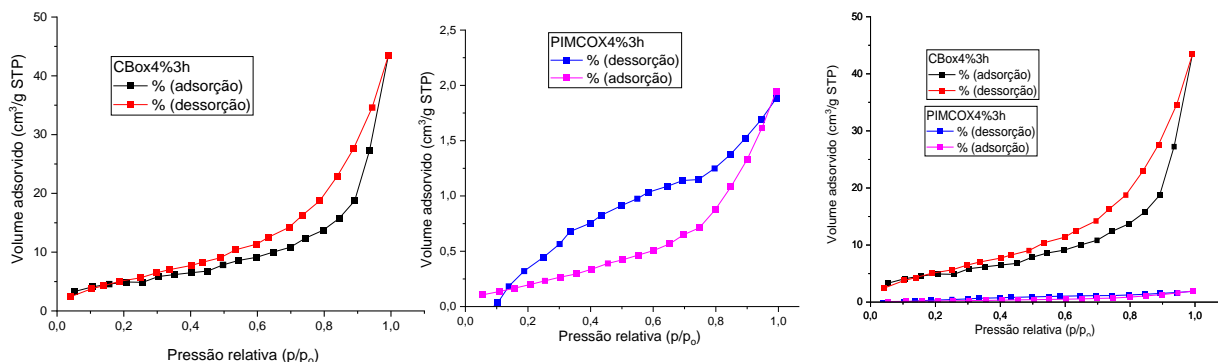
Também é interessante destacar a amostra PIMAF, na qual utilizada a celulose bacteriana pura, ou seja, sem oxidar para imobilizar a enzima, sendo assim o mecanismo de imobilização por adsorção física. Essa amostra merece destaque pois, quando comparada com as amostras que foram oxidadas para imobilizar, o valor de proteína presente na amostra PIMAF, foi parecida com as oxidadas.

## **5.9. Resultados de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>**

A técnica de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> propiciou a determinação das isotermas de adsorção (Figura 27), bem como o cálculo das propriedades texturais, mostradas na Tabela 7.

**Figura 27.** Gráficos de adsorção-dessorção CBpura, da celulose oxidada com periodato de sódio e peroxidase imobilizada.





Em termos gerais, todas as isothermas tendem ao tipo IVa, devido à presença de histerese, com histerese do tipo H3. Este tipo de histerese não possui patamar no limite superior de pressão relativa e é característica de materiais mesoporosos com poros em fenda, em concordância com dados da literatura para isothermas de perfis similares descritas para materiais a base de celulose bacteriana. Segundo a IUPAC, as isothermas do tipo IVa ocorrem quando as moléculas do adsorbato têm mais afinidade entre si do que com o adsorvente e exibem condensação capilar, o que faz com que a dessorção ocorra em valores menores de pressão relativa do que a adsorção.

Para as películas antes da imobilização da peroxidase, a quantidade de gás adsorvido aumenta com a oxidação com  $\text{NaIO}_4$ . Tal observação pode indicar que a modificação química de grupos hidroxilas, responsáveis pelas interações de hidrogênio que tornam as fibrilas fortemente empacotadas, favorece a separação de cadeias gerando poros. Vale destacar que o aumento da quantidade adsorvida em geral ocorre de modo simultâneo ao aumento da área superficial como mostrado na Tabela 7.

Após a imobilização da peroxidase, todas as películas apresentaram reduções significativas nas quantidades de gás adsorvido, o que pode indicar o preenchimento de poros pela peroxidase, bem como obstrução da entrada de canais. Um alargamento da alça de histerese pode ser observado para várias das amostras após a imobilização da peroxidase, especificamente IMAF e as celulosas oxidadas por 3 h. Pode-se propor que essa mudança no perfil de histerese resulta de uma contribuição de histerese do tipo H4, que pode indicar a presença de poros com formato de garrafa tinteiro (gargalo estreito e reservatório alargado). Isso ocorre em amostras após a imobilização e pode sugerir estreitamento das entradas dos canais, pela ligação preferencial de moléculas de enzima em sítios próximos a entrada, obstruindo o preenchimento interno.

**Tabela 7.** Ilustração da classificação das isotermas adsorções/dessorção de N<sub>2</sub> e histerese, da área superficial e porosidade da CBpura, da celulose bacterianas oxidadas por periodato de sódio e das amostras que imobilizaram a peroxidase por adsorção física e ligação covalente.

<b>Amostra</b>	<b>Área superficial (m<sup>2</sup>/g) BET</b>	<b>Volume de poros (cm<sup>3</sup>/g) DR</b>	<b>Raio de poros (Å) DFT</b>	<b>Diâmetro de poros (nm) DFT</b>	<b>Isoterma</b>	<b>Histerese</b>
<b>CB</b>	1,857	0,008351	14,483	2,8966	IV	H3
<b>CBOx 2% 1h</b>	7,804	0,022590	13,845	2,769	IV	H3
<b>CBOx 2% 3h</b>	8,828	0,020710	24,852	4,9704	IV	H3
<b>CBOx 4% 1h</b>	13,828	0,034580	31,123	6,2246	IV	H3
<b>CBOx 4% 3h</b>	7,072	0,019430	28,852	5,7704	IV	H3
<b>IMAF</b>	0,838	0,003214	13,845	2,769	IV	H3/H4
<b>IMCBOx 2% 1h</b>	0,525	0,002583	15,149	3,0298	IV	H3
<b>IMCBOx 2% 3h</b>	0,650	0,003997	15,133	3,0266	IV	H3/H4
<b>IMCBOx 4% 1h</b>	1,802	0,004357	13,845	2,769	IV	H3
<b>IMCBOx 4% 3h</b>	0,361	0,001984	14,483	2,8966	IV	H3/H4

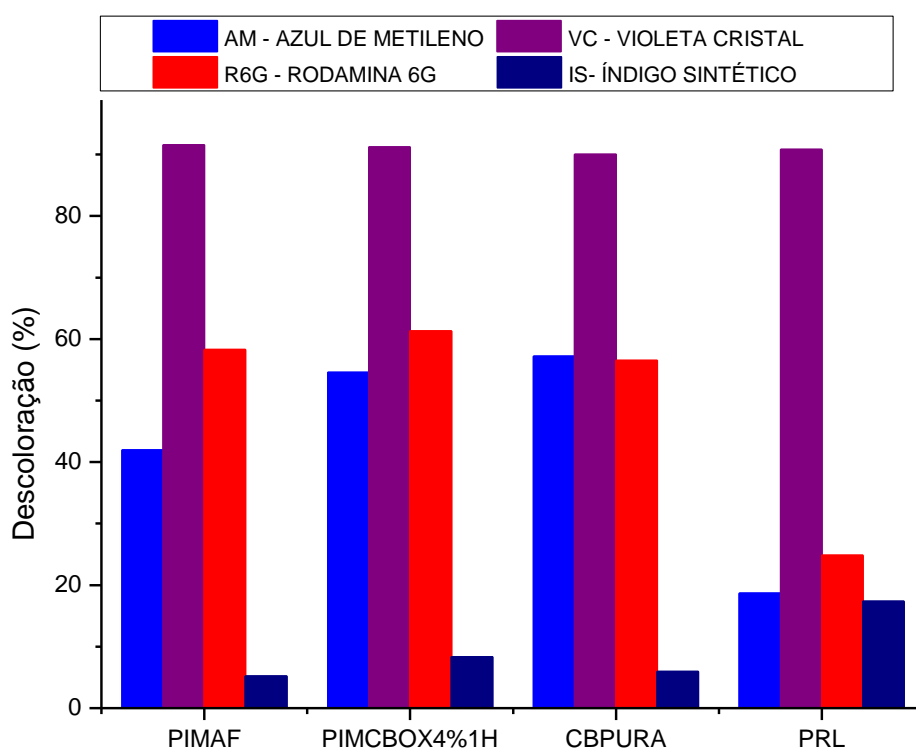
### 5.10 Descoloração

Portanto, a amostras oxidas para imobilização por adsorção física os resultados de atividade determinação de proteína e atividade enzimática não tiveram diferenças nos valores estatisticamente. Porém no grau de oxidação e nos resultados de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> a amostras oxidada por periodato 4% 1h (CBOx4%1h) apresentaram resultados mais significativos. E na etapa de imobilização na análise adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>, segundo a Tabela 2 a amostra utilizando CBOx4%1h para

imobilização da peroxidase também apresentou resultados bastante significativos, sendo a amostra escolhida para a etapa de descoloração.

Sendo assim, a análise das soluções dos corantes azul de metileno (AM), índigo sintético (IS), violeta cristal (VC) e rodamina 6G (R6G), são submetidos a descoloração, com peroxidase do rabanete livre (PRL), com peroxidase do rabanete imobilizada por adsorção física (PIMAF) e ligação covalente (PIMCBO<sub>x</sub>4%1h) e celulose bacteriana pura. O grau de descoloração de cada amostra, estão ilustrados na Figura 28 e na Tabela 8.

**Figura 28.** Gráfico de descoloração com peroxidase imobilizada por adsorção física (PIMAF); peroxidase imobilizada por celulose bacteriana oxidada com periodato de sódio 4% m/m no tempo de 1h (PIMCBO<sub>x</sub>4% 1h); celulose bacteriana pura (CB pura) e peroxidase do rabanete livre (PRL).



**Tabela 8.** Descoloração das soluções dos corantes em porcentagem.

CORANTES	Descoloração da cor (%)			
	PIMAF (%)	PIMCBO <sub>x</sub> 4%1H (%)	CB <sub>PURA</sub> (%)	PRL (%)
<b>AM - AZUL DE METILENO</b>	41,97	54,56	57,17	18,66
<b>VC - VIOLETA CRISTAL</b>	91,53	91,18	90,00	90,82
<b>R6G - RODAMINA 6G</b>	58,27	61,30	56,52	24,82
<b>IS- ÍNDIGO SINTÉTICO</b>	5,21	8,306	5,928	17,37

Nota-se que, das quatro soluções dos corantes utilizados para esse teste, os que merecem destaques são as soluções contendo AM (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S), VC (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>) e R6G (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl), que foram as que sofreram descoloração mais significativas, principalmente para a solução de corante VC, que apresentou grau de descoloração de aproximadamente 90% a 91%. Os resultados ilustrados na Figura 26 e na Tabela 8.

As soluções dos corantes AM (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S), VC (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>) e R6G (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl) mencionados acima têm uma característica em comum, todos são classificados como catiônicos. Logo apresenta uma alta densidade de cargas positivas em sua cadeia. A peroxidase apresenta um ciclo catalítico, que em sua primeira etapa ocorre a oxidação de 2 elétrons do grupo protético heme pelo cofator H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerando assim o radical livre oxiferril [<sup>•</sup>O=Fe (IV)] [106].

O radical oxiferril [<sup>•</sup>O=Fe (IV)] é um intermediário reativo que funciona como substrato para oxidar removendo átomos de hidrogênio [106]. Portanto as soluções dos corantes catiônicos, submetidas a descoloração com PIMAF, PIMCBO<sub>x</sub>4%1h e PRL, o radical produzido pelo ciclo catalítico da peroxidase, induz a descoloração destas soluções de corantes, através da remoção dos hidrogênios presentes nas estruturas dos corantes. Levando assim um maior grau de descoloração destas soluções [107].

Comparando o grau de descoloração das soluções dos corantes com a enzima livre (PRL) e as amostras com a enzima imobilizadas (PIMAF, PIMCBO<sub>x</sub>4%1h),

principalmente para as soluções do AM e R6G é interessante destacar que a enzima livre teve menor desempenho nestes corantes. Isto pode estar relacionado a vários fatores, desde adsorção dos corantes sobre a celulose até aumento da estabilidade e atividade da enzima imobilizada, comparada com a enzima livre.

A CB tem em sua estrutura química grupos hidroxilas, que vão aumentar o pH, favorecendo a fração aniônica da peroxidase, gerando maior potencial para oxidar auxiliando na orientação do substrato na interação com o sítio ativo [107]. Além disso, o fato de a CB apresentar esses grupos hidroxilas e às pontes hidrogênio na sua estrutura, fazem com que esses atuem como locais de adsorção. Portanto os grupos OH, atuam como centros de adsorção através da formação de ligações hidrogênio com o adsorbato. Justificando assim melhor desempenho das amostras com enzima imobilizada em relação a livre [108].

Nota-se que, a CB<sub>pura</sub> também foi utilizada para descoloração, e os valores do grau de descoloração para as soluções dos corantes catiônicos tiveram desempenho muito próximo ao das amostras com a peroxidase imobilizada, isso acontece devido aos grupos hidroxilas e as pontes de hidrogênio que vão atuar como locais de adsorção, gerando ligações hidrogênio com os corantes catiônicos [108].

Nestes experimentos, também foi realizado um teste para solução do corante aniônico IS ( $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ) e as amostras PIMAF, PIMCBO<sub>x</sub>4%1h, CB<sub>pura</sub> tiveram menor desempenho comparado com a amostra PRL, os resultados ilustrados na Figura 28 e Tabela 8. Isso pode estar relacionado a CB, apresentar grupos hidroxilas em sua estrutura. Esses grupos vão aumentar a carga negativa do meio, ou seja, aumentar o pH da solução da solução do corante IS ( $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ). Como é um corante aniônico vai favorecer o meio para ele, diminuindo assim eficiência de descoloração [107,108].

Além disso, o ponto isoelétrico da peroxidase é 4,7 e 5,1, quando se tem um pH maior que 5 vai favorecer fração aniônica da peroxidase, esse fator é favorável para soluções dos corantes catiônicos. Pois na fração aniônica, vai liberar íons negativos e a fração catiônica íons positivos, como as cargas opostas se atraem há um forte interações entre as moléculas e consequentemente a descoloração [107].

Porém quando se fala da solução do corante aniônico, favorecer a fração aniônica da peroxidase, leva aos desfavorecimentos das interações entre essas



moléculas, pois ambas vão liberar íons negativos, cargas iguais se repelem, ou seja, interações entre elas desfavorecidas. Logo isso pode ser um fator para que as amostras PIMAF e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h não tiveram um bom desempenho de descoloração da solução do corante IS (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [107]. No caso PRL, por não ter presença da celulose bacteriana como imobilizador, apresentou um desempenho de descoloração para esta solução melhor do que as amostras em que a enzima estava imobilizada PIMAF e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h.

Vale ressaltar que, descoloração dos corantes contendo apenas a CB pura e amostras contendo a enzima imobilizada apresentam valores semelhantes. Porém, o processo de descoloração ocorre em metodologias diferentes. A celulose bacteriana pura tem grupos químicos em suas superfícies, isso faz com que esse material apresente afinidade com contaminantes, como por exemplo os corantes. Desta forma como ocorre por adsorção física os pedaços de celulose adicionados no corante vão adquirir a coloração [109].

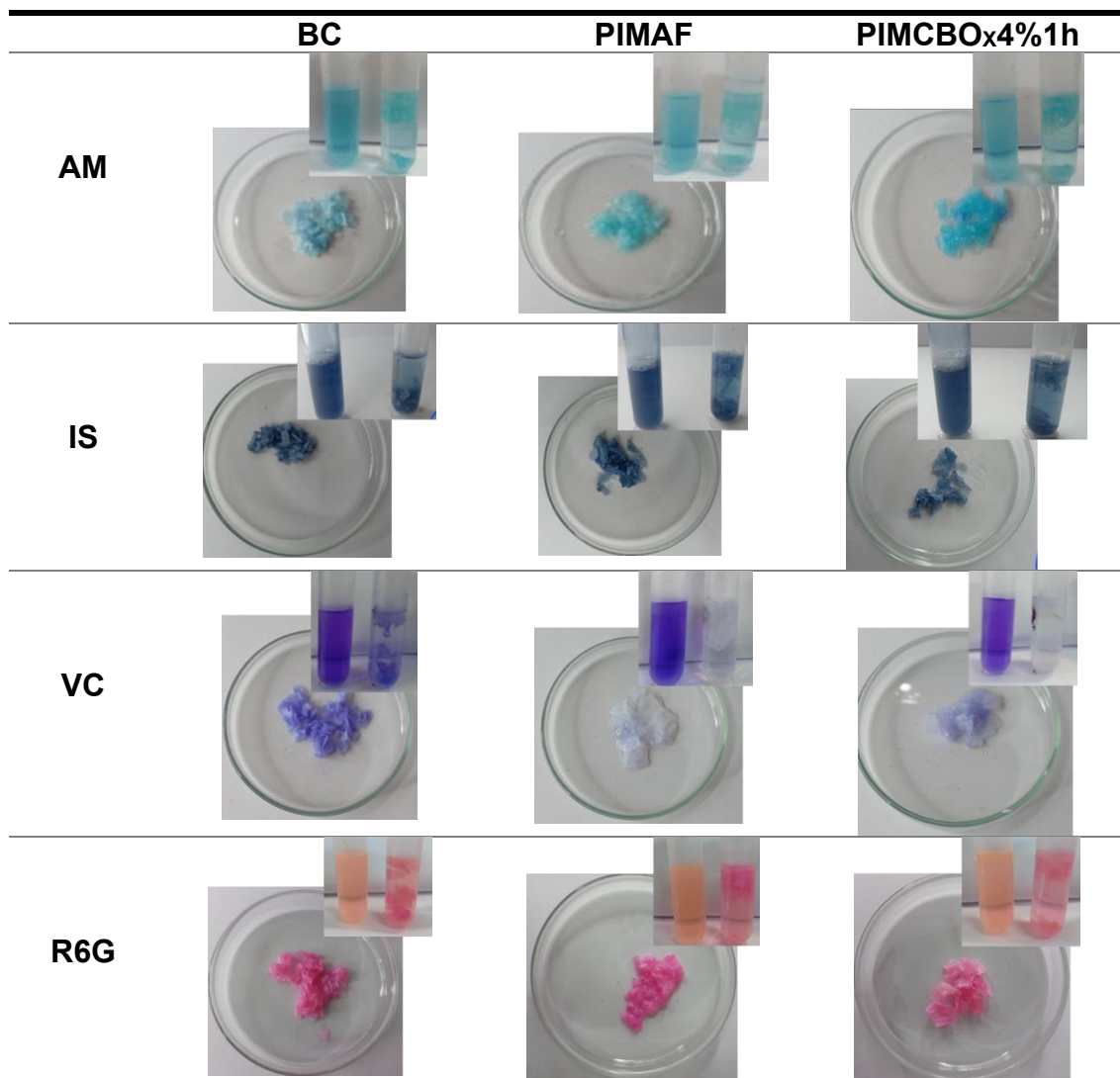
Nas amostras PIMAF e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h, tem a presença da enzima que tem como objetivo conferir a esse material o poder de transformar poluentes para diminuir sua toxicidade, aumentando sua solubilidade em água permitindo sua posterior degradação microbiana. Portanto as amostras contendo a enzima ao entrar em contato com a solução de corante, tem como objetivo descolorir por degradação [110].

Com tais informações é possível ter outras observações sobre cada etapa de descoloração. CBpura, PIMAF e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h ao entrarem em contato com as soluções dos corantes AM (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S), R6G (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Cl) e IS (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) adquiriram a cor da solução. Isso revela que CBpura e as amostras contendo a enzima imobilizada (PIMAF e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h) adsorveram o corante presente na solução. Portanto conclui-se que a enzima imobilizada não atuou de forma significativas nessas soluções de corantes. Resultados ilustrados na Figura 29.

Na solução do corante VC (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>) é possível evidenciar as diferenças entre as metodologias de descoloração, para as amostras contendo a enzima imobilizada (PIMAF e PIMCBO<sub>x</sub>4%1h), a solução ficou transparente, e alguns pedaços adquiriram a cor da solução indicando descoloração por adsorção e outros permaneceram na coloração branca indicando descoloração pelo processo

biocatalítico da enzima [111]. Para a CBpura todos os pedaços adquiriram a cor da solução, mostrados que a descoloração aconteceu apenas por adsorção. Portanto na solução do corante VC ( $C_{25}H_{30}ClN_3$ ) a enzima imobilizada teve um desempenho significativo na descoloração. Resultados ilustrados na Figura 29.

**Figura 29.** Ilustração das soluções dos corantes AM, IS, VC e R6G antes e depois das metodologias de descoloração.



## 6 CONCLUSÕES

No trabalho obtiveram-se evidências da extração da peroxidase do rabanete, da síntese da celulose bacteriana através do chá kombucha, da oxidação da celulose bacteriana e da imobilização da peroxidase do rabanete na celulose bacteriana pura por adsorção física, bem como na oxidada por ligação covalente aplicados no processo de descoloração dos corantes, tendo as seguintes conclusões:

A curva TG, apresentou etapas de decomposição características da celulose pura, a abaixo de 100 °C, entre 150 e 350 °C e degradação acima de 350 °C. Indicando características celulósicas da película originada através de bactérias e que sua purificação foi bem sucedida. A análise de FTIR, possibilitou identificar bandas características de material celulósico de CB pura. Nas imagens MEV, sua morfologia foi observada na forma de pequenas microfibrilas. As isotermas BET tenderam ao tipo IVa com histerese do tipo H<sub>3</sub>.

A determinação do teor de aldeídos das celulosas bacterianas oxidadas revelou que todas amostras foram oxidadas, porém, em proporções diferentes. Dentre as amostras, a que se destaca é a CB oxidada por periodato de sódio 4% m/m por 1 hora, que apresentou teor de aldeído de 0,327 mmol/g. A análise de FTIR a oxidação foi identificada pelo aparecimento de bandas de 2700 cm<sup>-1</sup> e 1426 cm<sup>-1</sup> características de aldeído.

A morfologia após a oxidação, observada por MEV, praticamente não mostrou alteração da estrutura microfibrilar da celulose. Para a análise de BET as isotermas tenderam ao tipo IVa e histerese H<sub>3</sub>. A área superficial e porosidade do material aumentaram significativamente após a oxidação, com destaque na amostra de CB oxidada por periodato de sódio 4% m/m por 1 hora, que sofreu maiores modificações.

A peroxidase extraída do rabanete e purificada por sistema aquoso bifásico, apresentou atividade enzimática 1,133 (U), tendo um valor próximo ao da enzima adquirida comercialmente. A análise de FTIR das amostras obtidas pelas metodologias de imobilização por adsorção física e por ligação covalente, sugiram bandas em 1951 cm<sup>-1</sup> e 1095 cm<sup>-1</sup>, característica de presença de enzima.

A peroxidase imobilizada pela CB pura e pelas CB oxidadas apresentou em sua morfologia agregados de forma aproximadamente esférica, associando a superfícies ligadas as enzimas. A peroxidase imobilizada por CB oxidada por periodato de sódio 4% m/m por 1 hora, esses agregados não ficaram evidentes. As isotermas BET após imobilização do tipo IVa, porém para as amostras que imobilizou a peroxidase por adsorção física e as oxidadas por 3 horas que imobilizou por ligação covalente, a histerese passou a ser do tipo H<sub>4</sub>.

Os testes de atividade enzimática todas as amostras revelaram que todas as amostras se mostraram ativas, porém sem diferenças estatisticamente significativas

entre elas. Para o teste de determinação de proteína todas as amostras apresentaram concentração de proteína no suporte imobilizador.

Nos testes de descoloração destacam-se para CBpura a solução do AM (57,17%), PIMCBOx4%1h a solução R6G (61,30%) e PRL para solução IS (17,37%). Para o a solução do corante VC, todas as amostras apresentaram descoloração na faixa de aproximadamente (90,00%). O que os diferencia é que processo de descoloração a CBpura ocorre por adsorção, PIMAF e PIMCBOx4%1h acontece por degradação enzimática e adsorção. O presente estudo revelou a eficácia da peroxidase do rabanete na descoloração de corantes catiônicos e aniônicos.

## 7 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Estudo das propriedades fluorescentes dos corantes para todas as condições e amostras submetidas a descoloração, a fim de avaliar as diferenças entre a descoloração por adsorção e por degradação sobre tais propriedades, de modo comparativo com análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS);
- Avaliação do grau de degradação através de análises de demanda química de oxigênio;
- Estudo de otimização da quantidade de enzima imobilizada por ambas as metodologias.

## 8 REFERÊNCIAS

- [1] S Lopes L, Vieira N, R da Luz JM, S Silva M de C, Cardoso WS, M Kasuya MC. Production of fungal enzymes in Macaúba coconut and enzymatic degradation of textile dye. *Biocatal Agric Biotechnol* 2020;26. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101651>.
- [2] Dhankhar P, Dalal V, Mahto JK, Gurjar BR, Tomar S, Sharma AK, et al. Characterization of dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis*. *Arch Biochem Biophys* 2020;693. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108590>.
- [3] Qayyum S, Nasir A, Mian AH, Rehman S, Qayum S, Siddiqui MF, et al. Extraction of peroxidase enzyme from different vegetables for biodegradation of vat dyes. *Applied Nanoscience (Switzerland)* 2020;10:5191–9. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01348-4>.
- [4] Khalid N, Kalsoom U, Ahsan Z, Bilal M. Non-magnetic and magnetically responsive support materials immobilized peroxidases for biocatalytic degradation of emerging dye pollutants—A review. *Int J Biol Macromol* 2022;207:387–401. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.035>.

- [5] Camiscia P, Silva JM, Picó G, Woitovich Valetti N. Extraction and purification of peroxidase and trypsin inhibitor from soybean hulls: A strategy to revalue a waste as a source of different types of molecules of biotechnological interest. *Sep Purif Technol* 2020;252. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117456>.
- [6] Oztekin A, Almaz Z, Gerni S, Erel D, Kocak SM, Sengül ME, et al. Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2019;1114–1115:86–92. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.035>.
- [7] Da Silva Barbosa GS, Oliveira MEPS, Dos Santos ABS, Sánchez OC, Soares CMF, Fricks AT. Immobilization of low-cost alternative vegetable peroxidase (*Raphanus sativus* L. peroxidase): Choice of support/technique and characterization. *Molecules* 2020;25. <https://doi.org/10.3390/molecules25163668>.
- [8] González-González M, Picó G, Lima ÁS, Ussemane Mussagy C, Pereira JFB, Fernandez-Lahore HM, et al. Aqueous two-phase systems in Latin America: perspective and future trends. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2022;97:1353–62. <https://doi.org/10.1002/jctb.6890>.
- [9] Klanovicz N, Stefanski FS, Camargo AF, Michelon W, Treichel H, Teixeira ACSC. Complete wastewater discoloration by a novel peroxidase source with promising biooxidative properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2022;97:2613–25. <https://doi.org/10.1002/jctb.7134>.
- [10] Zahirinejad S, Hemmati R, Homaei A, Dinari A, Hosseinkhani S, Mohammadi S, et al. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021;204. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111774>.
- [11] Savic S, Petrovic S, Savic S, Petronijevic Z. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Modified Cellulose Carriers via Hydrophobic Interactions: Catalytic Properties and Stability. *Iran J Sci Technol Trans A Sci* 2021;45:55–63. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-01027-7>.
- [12] Liu K, Du H, Zheng T, Liu H, Zhang M, Zhang R, et al. Recent advances in cellulose and its derivatives for oilfield applications. *Carbohydr Polym* 2021;259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117740>.
- [13] Provin AP, Cubas ALV, Dutra AR de A, Schulte NK. Textile industry and environment: can the use of bacterial cellulose in the manufacture of biotextiles contribute to the sector? *Clean Technol Environ Policy* 2021;23:2813–25. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02191-z>.
- [14] Courth K, Binsch M, Ali W, Ingenbosch K, Zorn H, Hoffmann-Jacobsen K, et al. Immobilization of peroxidase on textile carrier materials and their application in the bleaching of colored whey. *J Dairy Sci* 2021;104:1548–59. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17110>.

- [15] Askari H, Rahimian A, Aminian M. Purification and Biochemical Characterization of Two Anionic Peroxidase Isoenzymes from *Raphanus sativus* L. var niger Roots. *Appl Biochem Biotechnol* 2022;194:2219–35. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03736-0>.
- [16] Attar F, Shahpar MG, Rasti B, Sharifi M, Saboury AA, Rezayat SM, et al. Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities. *J Mol Liq* 2019;278:130–44. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.011>.
- [17] Basumatary D, Yadav HS, Yadav M. Potential applications of peroxidase from *Luffa acutangula* in biotransformation. *Chemical Papers* 2023;77:3181–200. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02696-5>.
- [18] Xu L, Sun J, Qaria MA, Gao L, Zhu D. Dye decoloring peroxidase structure, catalytic properties and applications: Current advancement and futurity. *Catalysts* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/catal11080955>.
- [19] Gan JS, Bilal M, Li XB, Hussain Shah SZ, Mohamed BA, Hadibarata T, et al. Peroxidases-based enticing biotechnological platforms for biodegradation and biotransformation of emerging contaminants. *Chemosphere* 2022;307. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136035>.
- [20] Kidwai M, Ahmad IZ, Chakrabarty D. Class III peroxidase: an indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. *Plant Cell Rep* 2020;39:1381–93. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02588-y>.
- [21] de Oliveira FK, Santos LO, Buffon JG. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Research International* 2021;143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>.
- [22] Briley K. PEROXIDASE IN PUERARIA MONTANA 1 The Discovery and Analysis of Peroxidase Enzyme in *Pueraria montana*. n.d.
- [23] Sajid Ansari M, Ahmad G, Khan AA, Mohamed HI, Elhakem A. Coal fly ash and nitrogen application as eco-friendly approaches for modulating the growth, yield, and biochemical constituents of radish plants. *Saudi J Biol Sci* 2022;29. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103306>.
- [24] Noman A, Ali Q, Maqsood J, Iqbal N, Javed MT, Rasool N, et al. Deciphering physio-biochemical, yield, and nutritional quality attributes of water-stressed radish (*Raphanus sativus* L.) plants grown from Zn-Lys primed seeds. *Chemosphere* 2018;195:175–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.059>.
- [25] Bhardwaj S, Verma T, Raza A, Kapoor D. Silicon and Nitric Oxide-Mediated Regulation of Growth Attributes, Metabolites and Antioxidant Defense System of Radish (*Raphanus sativus* L.) under Arsenic Stress. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 2023;92:763–82. <https://doi.org/10.32604/phyton.2023.025672>.

- [26] SMohannJain DennissVJohnsonn J-K. Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops. n.d.
- [27] Wu G, Chen X, Zheng T, Xiao P xian, Zhong N ying, Yang X lin, et al. Effects of U on the growth, reactive oxygen metabolism and osmotic regulation in radish (*Raphanus sativus* L.). *Environmental Science and Pollution Research* 2022;29:55081–91. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19803-w>.
- [28] Wang L, Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK. Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolise pelargonidin and forms a gene family in Brassicaceae. *Gene* 2004;343:323–35. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.018>.
- [29] Lucena I V., Brandão I V., Mattedi S, Souza RL, Soares CMF, Fricks AT, et al. Use of protic ionic liquids as adjuvants in PEG-based ATPS for the purification of radish peroxidase. *Fluid Phase Equilib* 2017;452:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.012>.
- [30] Pereira JFB, Freire MG, Coutinho JAP. Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications. *Fluid Phase Equilib* 2020;505. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112341>.
- [31] Soares RRG, Azevedo AM, Van Alstine JM, Raquel Aires-Barros M. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnol J* 2015;10:1158–69. <https://doi.org/10.1002/biot.201400532>.
- [32] Oke EA, Ijardar SP. Advances in the application of deep eutectic solvents based aqueous biphasic systems: An up-to-date review. *Biochem Eng J* 2021;176. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108211>.
- [33] Silvério SC, Rodríguez O, Tavares APM, Teixeira JA, MacEdo EA. Laccase recovery with aqueous two-phase systems: Enzyme partitioning and stability. *J Mol Catal B Enzym* 2013;87:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.10.010>.
- [34] Karmakar R, Sen K. Aqueous biphasic extraction of metal ions: An alternative technology for metal regeneration. *J Mol Liq* 2019;273:231–47. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.036>.
- [35] Pletnev I V., Smirnova S V., Sharov A V., Zolotov YA. New generation extraction solvents: from ionic liquids and aqueous biphasic systems to deep eutectic solvents. *Russian Chemical Reviews* 2021;90:1109–41. <https://doi.org/10.1070/rcr5007>.
- [36] Tian H, Berton P, Rogers RD. Choline-based aqueous biphasic systems: Overview of applications. *Fluid Phase Equilib* 2019;502. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112258>.
- [37] Phong WN, Show PL, Chow YH, Ling TC. Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *J Biosci Bioeng* 2018;126:273–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>.

- [38] Ivanov YD, Pleshakova TO, Shumov ID, Kozlov AF, Valueva AA, Ivanova IA, et al. Aftm and ftir investigation of the effect of water flow on horseradish peroxidase. *Molecules* 2021;26. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020306>.
- [39] Klanovicz N, Warken A, Paliga L, Camargo AF, Scapini T, Buffon JG, et al. One-step procedure for peroxidase concentration, dye separation, and color removal by aqueous two-phase system n.d. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11412-9/Published>.
- [40] Wu WC, Ng HS, Sun IM, Lan JCW. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2017;79:158–62. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.04.001>.
- [41] Routoula E, Patwardhan S V. Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. *Environ Sci Technol* 2020;54:647–64. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03737>.
- [42] Jun LY, Yon LS, Mubarak NM, Bing CH, Pan S, Danquah MK, et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. *J Environ Chem Eng* 2019;7. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102961>.
- [43] Filho DG, Silva AG, Guidini CZ. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;103:7399–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>.
- [44] Romero-Fernández M, Paradisi F. Protein immobilization technology for flow biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 2020;55:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.008>.
- [45] Somu P, Narayanasamy S, Gomez LA, Rajendran S, Lee YR, Balakrishnan D. Immobilization of enzymes for bioremediation: A future remedial and mitigating strategy. *Environ Res* 2022;212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113411>.
- [46] Ismail AR, Baek KH. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *Int J Biol Macromol* 2020;163:1624–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>.
- [47] Zhou W, Zhang W, Cai Y. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal* 2021;403. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126272>.
- [48] Shuai W, Das RK, Naghdi M, Brar SK, Verma M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnol Appl Biochem* 2017;64:496–508. <https://doi.org/10.1002/bab.1515>.
- [49] Yang J, Hu X, Xu J, Liu X, Yang L. Single-Step in Situ Acetylcholinesterase-Mediated Alginate Hydrogelation for Enzyme Encapsulation in CE. *Anal Chem* 2018;90:4071–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05353>.



- [50] Bayazidi P, Almasi H, Asl AK. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. *Int J Biol Macromol* 2018;107:2544–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.137>.
- [51] Sampaio LMP, Padrão J, Faria J, Silva JP, Silva CJ, Dourado F, et al. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydr Polym* 2016;145:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.009>.
- [52] Buruaga-Ramiro C, Valenzuela S V., Valls C, Roncero MB, Pastor FIJ, Díaz P, et al. Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper. *Cellulose* 2020;27:3413–26. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03025-9>.
- [53] Yu B, Cheng H, Zhuang W, Zhu CJ, Wu J, Niu H, et al. Stability and repeatability improvement of horseradish peroxidase by immobilization on amino-functionalized bacterial cellulose. *Process Biochemistry* 2019;79:40–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.024>.
- [54] Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol* 2013;6:185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- [55] Singh RK, Zhang YW, Nguyen NPT, Jeya M, Lee JK. Covalent immobilization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89:337–44. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2768-z>.
- [56] Bilal M, Iqbal HMN, Hussain Shah SZ, Hu H, Wang W, Zhang X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. *J Environ Manage* 2016;183:836–42. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.040>.
- [57] Girelli AM, Astolfi ML, Scuto FR. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere* 2020;244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>.
- [58] Sharifi M, Robatjazi SM, Sadri M, Mosaabadi JM. Immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme by covalent attachment on modified cellulose microfibrils using different chemical activation strategies: Characterization and stability studies. *Chin J Chem Eng* 2019;191–9. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.03.023>.
- [59] Luo X, Xia J, Jiang X, Yang M, Liu S. Cellulose-Based Strips Designed Based on a Sensitive Enzyme Colorimetric Assay for the Low Concentration of Glucose Detection. *Anal Chem* 2019;91:15461–8. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03180>.
- [60] Krichen F, Walha S, Abdelmouleh M. Hirshfeld surface analysis of the intermolecular interaction networks in cellulose I $\alpha$  and I $\beta$ . *Carbohydr Res* 2022;518. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108600>.

- [61] Peng B, Yao Z, Wang X, Crombeen M, Sweeney DG, Tam KC. Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. *Green Energy and Environment* 2020;5:37–49. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.09.003>.
- [62] Oprea M, Voicu SI. Recent advances in composites based on cellulose derivatives for biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2020;247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116683>.
- [63] Mokhena TC, John MJ. Cellulose nanomaterials: new generation materials for solving global issues. *Cellulose* 2020;27:1149–94. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02889-w>.
- [64] Seddiqi H, Oliaei E, Honarkar H, Jin J, Geonzon LC, Bacabac RG, et al. Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications. *Cellulose* 2021;28:1893–931. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03674-w>.
- [65] Rana AK, Frollini E, Thakur VK. Cellulose nanocrystals: Pretreatments, preparation strategies, and surface functionalization. *Int J Biol Macromol* 2021;182:1554–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.119>.
- [66] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition* 2005;44:3358–93. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.
- [67] van Zyl EM, Coburn JM. Hierarchical structure of bacterial-derived cellulose and its impact on biomedical applications. *Curr Opin Chem Eng* 2019;24:122–30. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.04.005>.
- [68] Bergenstr hle M, Wohler J, Himmel ME, Brady JW. Simulation studies of the insolubility of cellulose. *Carbohydr Res* 2010;345:2060–6. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.06.017>.
- [69] Choi SM, Rao KM, Zo SM, Shin EJ, Han SS. Bacterial Cellulose and Its Applications. *Polymers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/polym14061080>.
- [70] Zhong C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>.
- [71] Lin SP, Loira Calvar I, Catchmark JM, Liu JR, Demirci A, Cheng KC. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose* 2013;20:2191–219. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-9994-3>.
- [72] Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie - International Edition* 2011;50:5438–66. <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>.
- [73] Rol F, Belgacem MN, Gandini A, Bras J. Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils. *Prog Polym Sci* 2019;88:241–64. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.09.002>.
- [74] Amano Y, Ito F. Novel cellulose producing system by microorganisms such as *Acetobacter* sp. 2005.

- [75] Jozala AF, de Lencastre-Novaes LC, Lopes AM, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Mazzola PG, Pessoa-Jr A, et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:2063–72. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>.
- [76] Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci* 2018;83:580–8. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.
- [77] Coelho RMD, Almeida AL de, Amaral RQG do, Mota RN da, Sousa PHM de. Kombucha: Review. *Int J Gastron Food Sci* 2020;22. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>.
- [78] Ahmed RF, Hikal MS, Abou-Taleb KA. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. *Annals of Agricultural Sciences* 2020;65:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.04.001>.
- [79] Soares MG, de Lima M, Reolon Schmidt VC. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. *Trends Food Sci Technol* 2021;110:539–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.017>.
- [80] Hagan E, Poulin J. Statistics of the early synthetic dye industry. *Herit Sci* 2021;9. <https://doi.org/10.1186/s40494-021-00493-5>.
- [81] Forster V, Vettese Forster S, Christie RM. The significance of the introduction of synthetic dyes in the mid 19th century on the democratisation of western fashion. *Journal of the International Colour Association* 2013:11–2.
- [82] Saranraj P. African Journal of Microbiology Research Bacterial biodegradation and decolourization of toxic textile azo dyes 2013;7:3885–90. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5788>.
- [83] Kumar A, Choudhury R. ECO-FRIENDLY DYES AND DYEING. vol. 2. 2018.
- [84] Sharma J, Sharma S, Soni V. Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. *Reg Stud Mar Sci* 2021;45. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101802>.
- [85] Jankowska K, Zdarta J, Grzywaczyk A, Degórska O, Kijeńska-Gawrońska E, Pinelo M, et al. Horseradish peroxidase immobilised onto electrospun fibres and its application in decolourisation of dyes from model sea water. *Process Biochemistry* 2021;102:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.015>.
- [86] Bilal M, Iqbal HMN, Hu H, Wang W, Zhang X. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *J Environ Manage* 2017;188:137–43. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.015>.
- [87] César J, Galárraga V, Da H, Barud S, Kolenyak F, Santos D, et al. MULTIPOINT IMMOBILIZATION AND STABILIZATION OF AMINED PEROXIDASES FROM

# SOYBEAN HULL AND CHAYOTE EMPLOYING BACTERIAL CELLULOSE AS SUPPORT. n.d.

- [88] Amarasekara AS, Wang D, Grady TL. A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Appl Sci* 2020;2. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-1982-2>.
- [89] Fricks AT, Souza DPB, Oestreicher EG, Antunes OAC, Girardi JS, Oliveira D, et al. Evaluation of radish (*Raphanus sativus* L.) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 2006;38:347–53. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.11.019>.
- [90] Madivoli ES, Kareru PG, Gachanja AN, Mugo SM, Makhanu DS. Synthesis and characterization of dialdehyde cellulose nanofibers from *O. sativa* husks. *SN Appl Sci* 2019;1. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0769-9>.
- [91] Vasconcelos NF, Andrade FK, Vieira L de AP, Vieira RS, Vaz JM, Chevallier P, et al. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. *Cellulose* 2020;27:3055–83. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02966-5>.
- [92] Vasconcelos NF, Andrade FK, Vieira L de AP, Vieira RS, Vaz JM, Chevallier P, et al. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. *Cellulose* 2020;27:3055–83. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-02966-5>.
- [93] Rehman A, Nazir G, Yop Rhee K, Park SJ. A rational design of cellulose-based heteroatom-doped porous carbons: Promising contenders for CO<sub>2</sub> adsorption and separation. *Chemical Engineering Journal* 2021;420. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130421>.
- [94] Peng X, Chen L, Liu S, Hu L, Zhang J, Wang A, et al. Insights into the interfacial interaction mechanisms of p-arsanilic acid adsorption on ionic liquid modified porous cellulose. *J Environ Chem Eng* 2021;9. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105225>.
- [95] Asenjo JA, Andrews BA. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *J Chromatogr A* 2011;1218:8826–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.051>.
- [96] Souza EF, Furtado MR, Carvalho CWP, Freitas-Silva O, Gottschalk LMF. Production and characterization of *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose using cashew apple juice and soybean molasses. *Int J Biol Macromol* 2020;146:285–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.180>.
- [97] Soemphol W, Charee P, Audtarat S, Sompech S, Hongdachart P, Dasri T. Characterization of a bacterial cellulose-silica nanocomposite prepared from agricultural waste products. *Mater Res Express* 2020;7. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6c25>.
- [98] Cabañas-Romero LV, Valls C, Valenzuela S V., Roncero MB, Pastor FIJ, Diaz P, et al. Bacterial Cellulose-Chitosan Paper with Antimicrobial and Antioxidant

Activities. *Biomacromolecules* 2020;21:1568–77.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00127>.

- [99] Zhijiang C, Guang Y. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. *J Appl Polym Sci* 2011;120:2938–44. <https://doi.org/10.1002/app.33318>.
- [100] Sirviö JA, Kolehmainen A, Visanko M, Liimatainen H, Niinimäki J, Hormi OEO. Strong, self-standing oxygen barrier films from nanocelluloses modified with regioselective oxidative treatments. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:14384–90. <https://doi.org/10.1021/am503659j>.
- [101] Avcioglu NH, Birben M, Seyis Bilkay I. Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry* 2021;108:60–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.005>.
- [102] Sederavičiūtė F, Bekampienė P, Domskienė J. Effect of pretreatment procedure on properties of Kombucha fermented bacterial cellulose membrane. *Polym Test* 2019;78. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.105941>.
- [103] Pavia-Introduction-to-Spectroscopy[1] n.d.
- [104] Simon J, Tsetsgee O, Iqbal NA, Sapkota J, Ristolainen M, Rosenau T, et al. A fast method to measure the degree of oxidation of dialdehyde celluloses using multivariate calibration and infrared spectroscopy. *Carbohydr Polym* 2022;278. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118887>.
- [105] Hassaan A, Yaneva S, Yotova L. Design of optical nanobiosensors for detection of toxic compounds and pharmaceutical products. *NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics*, Springer Verlag; 2017, p. 453–4. [https://doi.org/10.1007/978-94-024-0850-8\\_31](https://doi.org/10.1007/978-94-024-0850-8_31).
- [106] Briley K. PEROXIDASE IN PUERARIA MONTANA 1 The Discovery and Analysis of Peroxidase Enzyme in Pueraria montana. n.d.
- [107] Costa da Conceicao K, Alan Dantas Araujo P, Silva Lima A, Canielas Krause L, Tinoco Fricks A, Mara Farias Soares C, et al. Biodegradation of Textile Dyes by Radish Peroxidase (<i>Raphanus sativus</i> L.) Immobilized on Coconut Fiber. *Chemical and Biomolecular Engineering* 2023. <https://doi.org/10.11648/j.cbe.20220704.11>.
- [108] Khraisheh MAM, Al-Ghouti MA, Allen SJ, Ahmad MN. Effect of OH and silanol groups in the removal of dyes from aqueous solution using diatomite. *Water Res* 2005;39:922–32. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.008>.
- [109] Boran F. Dye Removing with Dry and Wet Forms of Pure Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter xylinus*. *Commagene J Biol* 2022;6:1–5. <https://doi.org/10.31594/commagene.1037538>.

- [110] Ferreira-Leitão VS, de Carvalho MEA, Bon EPS. Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods. *Dyes and Pigments* 2007;74:230–6. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.02.002>.
- [111] Qiao W, Zhang Z, Qian Y, Xu L, Guo H. Bacterial laccase immobilized on a magnetic dialdehyde cellulose without cross-linking agents for decolorization. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2022;632. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127818>.