



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EVA GOMES MORAIS

**IMOBILIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES DE *Moringa oleifera* EM
QUITOSANA ATIVADA COM DIVINIL SULFONA PARA A DEGRADAÇÃO
DE CORANTES TÊXTEIS**

FORTALEZA

2020

EVA GOMES MORAIS

IMOBILIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES DE *Moringa oleifera* EM
QUITOSANA ATIVADA COM DIVINIL SULFONA PARA DEGRADAÇÃO DE
CORANTES TÊXTEIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M825i Morais, Eva Gomes.

Imobilização de uma peroxidase de raízes de Moringa oleifera em quitosana ativada com divinil sulfona para a degradação de corantes têxteis / Eva Gomes Morais. – 2020.
67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Imobilização enzimática. 2. Peroxidase . 3. Divinil sulfona. 4. Descoloração de corante. I. Título.
CDD 572

EVA GOMES MORAIS

IMOBILIZAÇÃO DE UMA PEROXIDASE DE RAÍZES DE *Moringa oleifera* EM
QUITOSANA ATIVADA COM DIVINIL SULFONA PARA DEGRADAÇÃO DE
CORANTES TÊXTEIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa. (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hermogenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas bênçãos diárias.

Aos meus pais, Elistênio e Fátima, pelo amor, esforço e doação dedicados a mim e a minhas irmãs. Pelo apoio incondicional durante minha formação acadêmica e por serem exemplos de honestidade, integridade e perseverança.

As minhas irmãs, Emília e Emanuela, pelo companheirismo, cumplicidade e por serem exemplo de tenacidade.

A meu querido Bruno Freire, que me deu a alegria de seu companheirismo durante os bons e maus momentos dessa jornada, e que, com sua determinação e mansidão, sempre me incentivou a seguir em frente.

À professora Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa que depositou em mim a confiança para continuar este trabalho, pelo seu constante apoio, companheirismo, dedicação, paciência e por ter me ajudado a crescer nesses últimos anos.

À professora Luciana Rocha Barros Gonçalves por ter aceitado continuar me orientando, pela confiança, encorajamento, carinho, por sempre me ensinar a valorizar meu trabalho e esforço e pelo exemplo de profissional a ser seguido.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Bruna Bandeira Pinheiro e Larissa Alves Lopes por estarem sempre presentes para sanar minhas dúvidas e discutir resultados, ao João Xavier da Silva Neto, ao Lucas Pinheiro Dias e à Helen Paula Silva da Costa pelo constante apoio técnico e disponibilidade de me acompanhar durante os experimentos, e aos demais integrantes do Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX), do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) e do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa (LPDV) por serem sempre tão prestativos e tornarem a rotina do laboratório mais leve, descontraída e agradável.

A todos os professores que me proporcionaram conhecimento, valores e admiração durante toda minha vida estudantil.

Aos amigos conquistados durante o mestrado, que foram excelentes companheiros durante essa jornada acadêmica e em quem eu me espelho.

À Universidade Federal do Ceará por disponibilizar os laboratórios onde este trabalho foi executado: Laboratório de Toxinas Vegetais (LABTOX) com coordenação da Profª. Dra. Daniele Oliveira Bezerra de Sousa, Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa com coordenação do Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, ambos no Departamento de

Bioquímica e Biologia Molecular, e Laboratório do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) com coordenação da Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves do Departamento de Engenharia Química.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), por concessão de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal e de Ensino Superior), através da concessão de bolsa de estudo e de auxílio financeiro para a realização do presente trabalho.

"Os desafios não são difíceis porque tentamos;
é por que não tentamos que são difíceis."

Sêneca

RESUMO

A indústria têxtil, apesar da grande importância econômica, pode ocasionar sérios riscos ao meio ambiente devido à liberação de compostos tóxicos como os corantes têxteis. A biodegradação enzimática de corantes têxteis é apontada como opção de remediação eficiente e com menor impacto ambiental. Uma peroxidase purificada de raízes de *Moringa oleifera* (*MoPOX*) se revela bastante promissora na biodegradação de corantes têxteis, apresentando eficiência de até 65% de descoloração. *MoPOX* tem rendimento de purificação de 1,97% em coluna de cromatografia DEAE-Sephacel, possui massa de 43,6 kDa, ponto isoelétrico de 9,4, além de apresentar elevada termoestabilidade, mantendo até 80% de sua atividade catalítica mesmo após 1 h a 80 °C. Embora *MoPOX* mostre-se bastante promissora para biodegradação de corantes, é imprescindível a implementação de metodologias de imobilização para que a enzima possa ser utilizada em escala industrial. Portanto, este trabalho visou a imobilização de *MoPOX* em esferas de quitosana ativadas com divinil sulfona (CTS-DVS) com o intuito de gerar um biocatalisador estável para a degradação de corantes têxteis. *MoPOX* foi eficientemente imobilizada ao suporte em tampão acetato de sódio 5 mM pH 5.2, tendo-se obtido cerca de 67% de rendimento de imobilização após 4 h de contato. O suporte apresentou capacidade máxima de carga enzimática de 300 UPA/g de suporte, além de reagir por meio de ligações covalentes com a enzima. Os ensaios de caracterização do biocatalisador proposto demonstraram que a propriedade estabilizadora da divinil sulfona melhorou a atividade enzimática em todas as condições testadas e tornou a enzima imobilizada mais ativa em temperaturas elevadas e pHs alcalinos. Dessa forma, *MoPOX* imobilizada apresentou melhor atividade em pH 8.0 e temperatura ótima de atividade de 80 °C. Além disso, o processo de imobilização foi capaz de manter o perfil de resistência térmica apresentada pela enzima solúvel. A degradação do corante Remazol® Azul ocorreu em pH 8.0 como forma de simular as condições características do efluente têxtil. Após 6 h de reação, *MoPOX* imobilizada foi capaz de degradar cerca 40% do corante, enquanto a enzima solúvel apresentou taxa de degradação de apenas 8.5%. O reuso enzimático nas condições de degradação do corante demonstraram que o biocatalisador foi capaz de manter 36% da sua taxa de degradação inicial após sete ciclos consecutivos. Os resultados obtidos demonstram o potencial de aplicação do biocatalisador proposto na bioremediação de efluentes têxteis.

Palavras-chave: Imobilização enzimática. Peroxidase. Divinil sulfona. Descoloração de corante.

ABSTRACT

The textile industry, despite its great economic importance, can cause serious risks to the environment due to the release of toxic compounds like textile dyes. Enzymatic biodegradation of textile dyes is pointed out as an efficient remediation alternative with lower environmental impact. A peroxidase purified from *Moringa oleifera* roots (*MoPOX*) is very promising for the biodegradation of textile dyes, showing efficiency of up to 65% of discoloration. *MoPOX* presents a purification yield of 1.97% in DEAE-Sephacel chromatography column, molecular weight of 43.6 kDa, isoelectric point of 9.4, and shows high thermostability, maintaining up to 80% of its catalytic activity even after 1h at 80 °C. Although *MoPOX* displays great potential for the biodegradation of dyes, it is essential to implement immobilization methodologies so that the enzyme can be used on an industrial scale. Therefore, this work aimed to immobilize *MoPOX* in chitosan spheres activated with divinyl sulfone (CTS-DVS) in order to generate a stable biocatalyst for the degradation of textile dyes. *MoPOX* was efficiently immobilized to the support in 5 mM sodium acetate buffer pH 5.2, obtaining about 67% immobilization yield after 4 h of contact. The support showed a maximum enzyme load capacity of 300 UPA /g of support, in addition to reacting through covalent bonds with the enzyme. The characterization tests of the proposed biocatalyst demonstrated that the stabilizing property of divinyl sulfone improved the enzymatic activity in all conditions tested and rendered the immobilized enzyme more active at elevated temperatures and alkaline pHs. Thus, immobilized *MoPOX* showed better activity at pH 8.0 and an optimum activity temperature of 80 ° C. In addition, the immobilization process was able to maintain the thermal resistance profile presented by the soluble enzyme. The degradation of the Remazol® Blue dye occurred at pH 8.0 as a way to simulate the characteristic conditions of the textile effluent. After 6 h of reaction, immobilized *MoPOX* was able to degrade about 40% of the dye, while the soluble enzyme showed a degradation rate of only 8.5%. The enzymatic reuse in the dye degradation conditions demonstrated that the biocatalyst was able to maintain 36% of its initial degradation rate after seven consecutive cycles. The results obtained demonstrate the potential application of the proposed biocatalyst in the bioremediation of textile effluents.

Keywords: Enzymatic immobilization. Peroxidase. Divinyl sulfone. Dye discoloration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1	Indústria têxtil e seu impacto socioambiental	12
2.2	Corantes têxteis	13
2.2.1	<i>Características gerais</i>	13
2.2.2	<i>Impacto ao meio ambiente e à saúde humana</i>	16
2.3	Remediação de efluentes têxteis	17
2.4	Peroxidases	19
2.4.1	<i>Peroxidase de Moringa oleífera Lamarck</i>	20
2.5	Imobilização enzimática	21
3	HIPÓTESE	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo Geral	25
4.2	Objetivos Específicos	25
5	MoPOX IMMOBILIZATION IN CHITOSAN MODIFIED WITH DIVINYL SULFONE AS A STABLE BIOCATALYST FOR TEXTILE DYES DISCOLORATION	26
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Tem-se testemunhado nas últimas décadas o aumento da consciência ambiental de diversas nações. Se antes os problemas ambientais eram vistos apenas como preocupações de ONGs e ativistas ambientais, hoje é evidente a pressão que a população em geral exerce sobre os governos para adoção de medidas sustentáveis e para a devida punição para os crimes ambientais. Cientistas e pesquisadores ambientais são os principais responsáveis pela formação consciência ambiental da sociedade por mostrarem a finitude dos recursos naturais e como as atividades humanas impactam diretamente tais recursos. Nesse contexto, muitas pesquisas têm se voltado a propor soluções que tornem viáveis o desenvolvimento social econômico das nações sem negligência.

O desenvolvimento de estratégias para o tratamento de efluentes industriais tem sido o foco de muitas pesquisas uma vez que esses efluentes têm elevado potencial toxicológico para os seres vivos além de serem prejudiciais ao meio ambiente. De modo mais específico, os efluentes oriundos as indústrias têxteis destacam-se pelos elevados teores de carga orgânica, pH, temperatura, demanda química (COD) e bioquímica de oxigênio (BOD), além de serem caracterizados pelas diferentes colorações advindas do processo de tingimento (ARSLAN *et al.*, 2016; UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016). Estima-se que cerca de 52% dos efluentes industriais coloridos sejam advindos da indústria têxtil (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018). Os corantes são os poluentes mais problemáticos desse tipo de atividade industrial porque são compostos potencialmente carcinogênicos e mutagênicos (KHATRI *et al.*, 2018), e com capacidade de bioacumulação na cadeia trófica (SANDHYA, 2010).

Apesar dos graves impactos ambientais da indústria têxtil, as técnicas convencionais de remediação de corantes possuem importantes desvantagens como elevados custos, baixa eficácia e possível geração de subprodutos ainda tóxicos (ARSLAN *et al.*, 2016; JUN *et al.*, 2019). Com isso, a busca por técnicas alternativas que sejam efetivas e ecologicamente sustentáveis tem crescido vertiginosamente nos últimos anos. A bioremediação enzimática por uso de enzimas imobilizadas é uma promissora alternativa devido à possibilidade de diminuição de custos por reutilização das enzimas e geração de subprodutos menos ou não tóxicos (KATHERESAN; KANSEDO; LAU, 2018).

Dentre as enzimas com aplicação em remediação ambiental, peroxidases de diversas fontes têm tido destaque na descontaminação de poluentes e na detoxificação e degradação de

contaminantes emergentes, como os corantes têxteis sintéticos (BILAL *et al.*, 2018). A peroxidase de raízes de *Moringa oleifera* (*MoPOX*), purificada pelo nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA *et al.*, 2020) demonstrou elevado potencial de uso na degradação de corantes têxteis. Contudo, para que possa competir com os métodos físico-químicos de tratamento de efluentes, é indispensável que a imobilização de *MoPOX* gere um biocatalisador estável nas duras condições de pH e temperatura característica dos efluentes têxteis.

Uma das maneiras de obtenção de biocatalisadores estáveis é permitindo a imobilização enzimática através de ligação cruzadas multipontuais (DOS SANTOS *et al.*, 2015a; DOS SANTOS *et al.*, 2015c). A interação covalente entre enzima e suporte evita o desprendimento enzimático ao mesmo tempo que enrijece a estrutura da enzima, tornando o biocatalisador mais resistente em condições desfavoráveis de atividade, tais como os elevados pH e temperatura dos efluentes têxteis industriais. Apesar de o glutaraldeído ser o principal agente de ligação cruzada utilizado nos estudos de imobilização, a divinil sulfona (DVS) tem recebido destaque por permitir interação com a enzima não somente por meio dos grupos amino, mas também pelos grupamentos tiol, fenol e imidazol (DOS SANTOS *et al.*, 2015c, 2015a).

Nesse cenário, a imobilização de *MoPOX* em suportes modificados em DVS permite a obtenção de biocatalisadores mais estáveis e resistentes em diversas condições. Portanto, este trabalho se propõe a gerar um biocatalisador enzimático a partir da imobilização de *MoPOX* em suporte modificado com divinil sulfona e avaliar seu uso na degradação de corantes têxteis. Esta dissertação se organiza em revisão de literatura, onde são apresentados os principais aspectos sobre o tema, e em manuscrito de publicação científica, onde são mostrados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Indústria têxtil e seu impacto socioambiental

Vestir-se é o segundo mais importante anseio humano após a necessidade de alimentar-se. Esse fato ajuda a entender o porquê de a indústria têxtil ser uma das mais bem estabelecidas mundialmente e presente em todos os países, não importando o nível de desenvolvimento. A cadeia produtiva do setor têxtil é bastante longa, tendo início desde a produção de fibras naturais ou sintéticas, até os processos de confecção e acabamento têxteis (CNI, 2017). A indústria têxtil não atende somente o setor de vestuário. Embora o setor de vestuário represente mais de 70% do mercado mundial de produtos têxteis em 2019, essa indústria também oferece produtos para áreas técnicas, tais como médica, de construção e transportes, além de produtos do lar, incluindo artigos de cama, mesa e banho, dentre outros (Grand View Research, 2020).

Em 2019, o mercado têxtil mundial foi avaliado em 965 bilhões de dólares (Grand View Research, 2020), com previsão de atingir cerca de 1,207 bilhões em 2025 (Zion Market Research, 2019), o que demonstra a relevância do setor na economia mundial. A China é o país líder em exportações têxteis, com suas instalações fabris representando cerca de 25% da indústria têxtil mundial (UDDIN, 2019). Conseqüentemente, além de ser o maior produtor têxtil, a China é também o país mais poluidor na área, gerando 53% da poluição têxtil global. Estima-se que dois terços dos rios e lagos chineses estejam poluídos por cerca de 9 bilhões de litros de efluentes têxteis contaminados (LEHMANN *et al.*, 2018),

No Brasil, a indústria têxtil tem mais de 200 anos de atividade, apresentando elevada relevância na economia da nação. Segundo dados de 2017 da Associação Brasileira da Indústria Têxtil e Confecção (ABIT), esse setor industrial é o segundo maior gerador de empregos no país, com oferta de 1,5 milhões de empregos diretos em 32 mil empresas distribuídas em todo o território nacional. A região Sudeste detém 49,4% da força de trabalho têxtil nacional, com o Estado de São Paulo concentrado 27,7% da mão de obra têxtil brasileira. O lugar de destaque da indústria têxtil brasileira também é reconhecido internacionalmente: o Brasil é o quarto maior produtor de vestuário do mundo (CNI, 2017).

Apesar de ser um setor industrial com grande visibilidade internacional (7% das exportações mundiais são de produtos têxteis), a gestão social e ambiental desse setor ainda é arcaica (DESORE; NARULA, 2018). Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a displicência com a força de trabalho têxtil é ainda mais evidente. Por exemplo, em países

como a Índia e as Filipinas, a remuneração da indústria têxtil representa apenas 50% do que seria considerado um salário que possibilite as condições mínimas de sobrevivência. (KERR; LANDRY, 2017).

Todos os processos de produção têxtil possuem algum tipo de impacto direto na qualidade na água e do ar e na geração de resíduos, com destaque para os processos molhados, que incluem desde a etapa de preparo da fibra para tecelagem até as etapas de acabamento, como a aplicação de corantes (MADHAV *et al.*, 2018). Estima-se que os processos molhados sejam responsáveis por 86%, 79% e 65% do consumo de água, energia e produtos químicos, respectivamente, na cadeia de produção têxtil (UDDIN, 2019). Estudos apontam que até 2030, o consumo de bens têxteis irá aumentar em 63%, resultando em aumentos de 63% e 62% de emissão de gás carbônico e geração de resíduos, respectivamente (KERR; LANDRY, 2017).

O aumento na geração de resíduos é bastante preocupante tanto por conta do descaso com o correto tratamento do efluente, quanto pelas características poluentes dos efluentes têxteis incluindo alta demanda química de oxigênio (DQO), elevados pH e temperatura e além da baixa capacidade de biodegradação (ARSLAN *et al.*, 2016; YASEEN; SCHOLZ, 2019). Diante da prática ainda incomum tratamento de efluentes têxteis, os cientistas ambientais alertam para o principal poluente nesse cenário, os corantes têxteis. Além de se bioacumularem na cadeia trófica, os corantes são potencialmente tóxicos e carcinogênicos, apresentando sérios riscos à saúde humana e animal, e são dificilmente degradados por conta de suas estruturas recalcitrantes (SANDHYA, 2010; TORRES-DUARTE; VAZQUEZ-DUHALT, 2010).

2.2 Corantes têxteis

2.2.1 Características gerais

Embora todas as etapas de fabricação e processamento de tecidos gerem impactos ambientais relevantes, o tingimento de tecidos é o principal agente de produção de efluentes tóxicos. Corantes e pigmentos são compostos químicos capazes de colorir os materiais aos quais são aplicados. Contudo, enquanto pigmentos mantêm seu estado particulado e cristalino durante a aplicação, os corantes são completamente dissolvidos no processo, de forma a se difundirem no material e se tornarem parte dele (UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016). Os corantes são utilizados em diversas áreas como nas indústrias farmacêutica, de cosméticos, de alimentos, de plásticos, de papel e na indústria têxtil (CHEQUER *et al.*, 2013).

Esta última é a maior consumidora de corantes, com demanda de cerca 70% produção mundial (BENKHA YA; HARFI; HARFI, 2017).

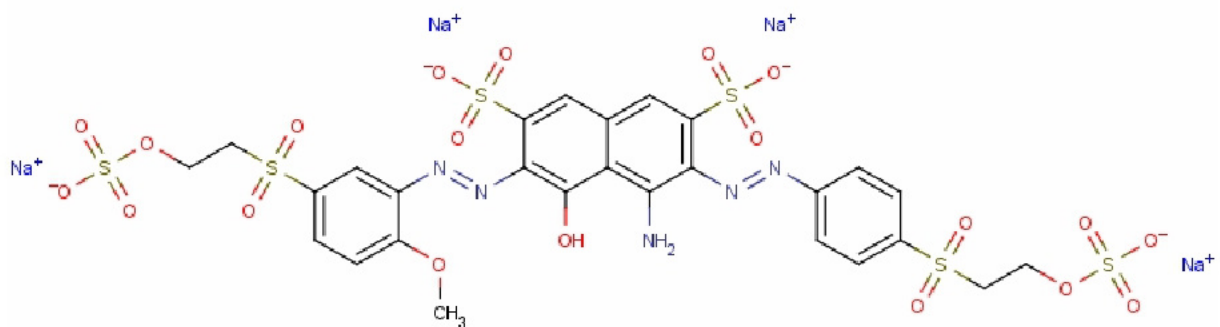
Estima-se que de 10 a 15% da produção anual de 7×10^5 toneladas de corantes seja descartada nos efluentes industriais (VIKRANT *et al.*, 2018). A demanda cada vez mais crescente por esses corantes se dá pelo seu processo de produção menos custoso e mais rápido, pela maior gama de cores e pela maior estabilidade contra degradação (YASEEN; SCHOLZ, 2019). A síntese de corantes sintéticos ocorre pela adição de diferentes grupos funcionais, como por exemplo grupos amino, nitro e bromo, a compostos químicos básicos orgânicos, como o benzeno (UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016). A presença de complexas estruturas aromáticas faz com que os corantes sintéticos sejam mais recalcitrantes que os corantes naturais (DRUMOND CHEQUER *et al.*, 2013).

A estrutura dos corantes é composta por um ou mais grupos cromóforos e auxocromos e por grupos reativos, sendo estes os responsáveis pela fixação ao tecido. Os cromóforos são os grupos funcionais responsáveis pela coloração, tais como grupos azo, nitro, carbonila, antraquinona, dentre outros. A transição eletrônica entre diversos orbitais moleculares no cromóforo é o que gera a cor (GHALY *et al.*, 2014). Já os auxocromos são grupos responsáveis por intensificar a cor gerada pelos cromóforos e incluem grupos hidroxila, amina, carbonila e sulfonatos (BHATIA *et al.*, 2017; DRUMOND CHEQUER *et al.*, 2013).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, índice de coloração e outras características como solubilidade e carga. Essa última forma de classificação divide esses compostos em aniônicos, catiônicos e não iônicos (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Os corantes não iônicos são chamados de dispersivos e não são completamente dissolvidos na água, permanecendo como uma suspensão de partículas microscópicas. Os corantes catiônicos, conhecidos como corantes básicos, são solúveis em água, produzindo uma solução colorida de cátions. Os corantes aniônicos são subdivididos em ácidos, diretos e reativos. Corantes ácidos são aniônicos tanto em sua forma natural como quando estão dissolvidos em água e interagem com o tecido por meio de trocas iônicas. Os corantes aniônicos reativos ganham destaque porque formam interações covalentes com o tecido e, portanto, são considerados os corantes com maior permanência no tecido (DRUMOND CHEQUER *et al.*, 2013; GUARATINI; ZANONI, 2000; UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016).

Corantes reativos são os principais corantes usados no tingimento de fibras celulósicas, podendo também ser usados na coloração de fibras proteicas, como a lã, e de tecidos com poliamidas, como o poliéster (GHALY *et al.*, 2014; KIMURA, 2001). A maioria desses corantes possui grupos azo (-N=N-) ou antraquinonas como cromóforos, e grupos monoclorotriazina e vinil sulfonas como grupos reativos. Os corantes com grupo vinil sulfonas foram primeiramente registrados como a marca Remazol e são atualmente reconhecidos por essa nomenclatura (GHALY *et al.*, 2014; GUARATINI; ZANONI, 2000; UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016). A Figura 1 ilustra a estrutura química do corante Remazol® Azul RGB, cujo nome genérico de acordo com o índice de coloração (do inglês, Colour Index Generic Name) é Reativo Azul 250. Como ilustrado nesta figura, o corante em questão apresenta dois azogrupos como grupos cromóforos e dois grupos reativos do tipo vinil sulfona.

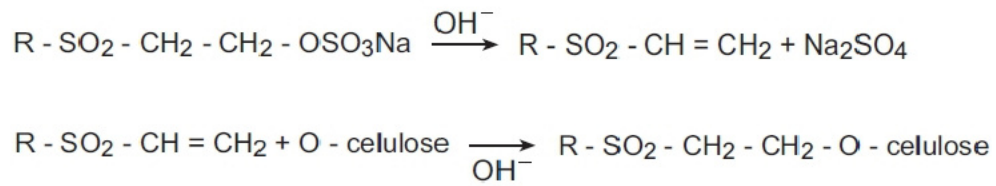
Figura 1. Fórmula estrutural do corante Remazol® Azul RGB.



Fonte: ChemNet, 2020.

Além dos grupos cromóforos e grupos reativos, os corantes reativos possuem grupos de solubilização constituídos de sulfonato de sódio (-SO₃Na), grupos ligantes, que não são obrigatórios na estrutura do corante; e grupos de saída, que serão substituídos pelos grupos ligantes dos tecidos. A fixação de corantes Remazol nos tecidos ocorre por meio de adição nucleofílica, como ilustrado na Figura 2. Em condições alcalinas, o grupo de saída é eliminado, gerando a dupla ligação do grupamento vinílico da vinil sulfona. A elevada eletronegatividade do grupo sulfona, torna o grupo vinílico um eletrófilo. Na presença de um nucleófilo, que são os grupos ligantes dos tecidos, ocorre a adição nucleofílica, formando a ligação covalente entre corante e tecido (GUARATINI; ZANONI, 2000; KIMURA, 2001).

Figura 2. Mecanismo de fixação dos corantes Remazol.



Fonte: GUARANTINI; ZANONI, 2000.

Corantes reativos possuem taxas maiores de fixação, que podem ser ainda melhoradas pela introdução de mais de um grupo reativo. Por exemplo, corantes com apenas um grupo reativo são afixados aos tecidos a taxas que variam de 50 a 70%. Já corantes com mais de um grupo de reação, essa taxa de fixação pode aumentar para 80 a 95% (GHALY *et al.*, 2014). A taxa de fixação também pode ser aumentada por meio do controle do pH alcalino durante o tingimento. Em pH alcalino, o grupo eletrofílico dos corantes reativos pode sofrer hidrólise e, com isso, não se ligar ao tecido. Portanto, é essencial que o tingimento ocorra em condições alcalinas que possibilitem a formação do grupo eletrofílico, sem que o mesmo seja prontamente hidrolisado (KIMURA, 2001).

2.2.2 Impacto ao meio ambiente e à saúde humana

Os corantes usados no tingimento de tecidos são os principais poluentes das indústrias têxteis por dois principais motivos: os corantes são compostos altamente recalcitrantes e tóxicos e não são inteiramente afixados aos tecidos sendo, portanto, comumente encontrados nos efluentes têxteis. Esses efluentes são caracterizados por apresentarem alta demanda química de oxigênio (DQO), elevados pH e temperatura, além da baixa capacidade de biodegradação (ARSLAN *et al.*, 2016). Embora a fixação do corante no material varie bastante de acordo com sua estrutura química, com o tipo de fibra do tecido e com o método de fixação, estima-se que cerca de 200.000 toneladas de corantes sejam perdidas anualmente durante o tingimento (DRUMOND CHEQUER *et al.*, 2013).

Dentre as problemáticas advindas da presença de corantes têxteis no meio ambiente, o aumento da demanda biológica por oxigênio (DBO) é bastante preocupante porque diminui a capacidade de reoxigenação do efluente, inibindo o crescimento de microrganismos fotoautotróficos e impactando todo o sistema aquático (IMRAN *et al.*, 2015; MOHAMMED *et al.*, 2017). Além disso, esses compostos são bioacumulados nas cadeias tróficas (SANDHYA, 2010) e são altamente resistentes à temperatura, à luz, à ação de surfactantes e

detergentes e ao ataque microbiano (TORRES-DUARTE; VAZQUEZ-DUHALT, 2010). Vale ressaltar que, mesmo concentrações muito baixas (\cong 1ppm), é suficiente para a formação de efluentes corados (UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016).

A poluição pelos corantes têxteis é percebida não somente por danos ao meio ambiente, mas também por riscos à saúde humana, os quais podem variar desde dermatites até síndromes no sistema nervoso (KHAN; MALIK, 2018). Corantes dispersivos são comumente relacionados a casos alérgicos por contato com reconhecida importância clínica (MALINAUSKIENE *et al.*, 2013; ROVIRA; DOMINGO, 2019). O corante azure-B, vastamente utilizado na indústria têxtil, age como inibidor reversível da enzima monoamina oxidase A, uma enzima intracelular do sistema nervoso central com grande importância para o comportamento humano (LELLIS *et al.*, 2019).

Ainda mais preocupantes são os danos causados pelos azocorantes, classe de corantes com maior produção mundial (cerca de 70%) (SINGH; ARORA, 2011). Esses corantes possuem aminas aromáticas como intermediários na sua síntese (FREEMAN, 2013), que são reconhecidas pelas suas propriedades carcinogênicas e genotóxicas (BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017; MORIKAWA *et al.*, 1997).

2.3 Remediação de efluentes têxteis

Não somente a obrigatoriedade de cumprimento das leis e normas ambientais impulsiona a indústria têxtil a reverter esse quadro de contaminação do meio ambiente, também a opinião pública começa a estimular a adoção de medidas mais sustentáveis. A disseminação dos dados de poluição ambiental têxtil ajuda a moldar a consciência ambiental dos consumidores. Segundo pesquisas de opinião realizadas em 2019, 75% dos consumidores de vestuário consideram a sustentabilidade como algo muito ou extremamente importante, e mais de 50% planejam mudar de marca no futuro se outra marca agir mais ambientalmente e socialmente do que a preferida (LEHMANN; ARICI; MARTINEZ-PARDO, 2019),

Nesse cenário, adaptar-se a medidas sustentáveis significa ganhar uma maior parcela de mercado. Portanto, muitas pesquisas tem tentado solucionar o ponto mais agravante da poluição têxtil, que são o descarte inadequado de efluentes corados. A importância da degradação de corantes nos efluentes têxteis é refletida na busca por alternativas que consigam degradar eficientemente esses compostos de forma economicamente viável e ambientalmente menos prejudicial. Dentre as estratégias de descontaminação de corantes, pode-se citar aquelas que se baseiam em métodos físicos, químicos e biológicos.

O método físico de coagulação e floculação de moléculas de corante requer etapas posteriores de tratamento e destino do resíduo sólido gerado. Além disso, os agentes coagulantes usados são caros e dificilmente recuperados. A degradação de corantes por métodos químicos ocorre por meio de reações de oxidação. Os processos avançados de oxidação (AOPs) utilizam ozônio ou peróxido de hidrogênio para oxidar corantes na presença ou não de uma fonte de irradiação. Apesar de bastante eficientes na remoção de corantes, os AOPs não são utilizados comercialmente por representarem uma etapa de tratamento de custo bastante elevado (SINGH; ARORA, 2011; UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016).

Considerando as desvantagens dos métodos físico-químicos de remediação, a biorremediação surge como uma alternativa mais limpa e sustentável, com um melhor equilíbrio entre custo e eficiência. A biodegradação enzimática é uma técnica de biorremediação que tem ganhado destaque porque faz uso de enzimas de alta especificidade e capacidade de degradação de compostos recalcitrantes (UDAY; BANDYOPADHYAY; BHUNIA, 2016).

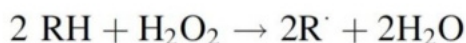
Os métodos de biorremediação têm surgido então como alternativas mais seguras ambientalmente e economicamente mais plausíveis para a remoção/degradação dos micropoluentes. Entende-se como biorremediação a transformação ou degradação de químicos persistentes em compostos menos ou não tóxicos através de processos mediados por agentes biológicos (ZDARTA *et al.*, 2018). A biorremediação pode ocorrer através de organismos ou microrganismos, nos casos em que plantas e bactérias são utilizados para absorver e bioassimilar poluentes, ou pode ainda se dar pelo uso de produtos advindos de organismos, como os biocatalisadores biológicos.

A biodegradação é uma técnica de biorremediação que tem ganhado destaque porque faz uso de enzimas de alta especificidade e capacidade de degradação de compostos recalcitrantes (ARSLAN *et al.*, 2016). Enzimas isoladas são preferíveis ao uso de organismos completos por serem mais convenientemente manipuladas, podendo ainda ter sua atividade padronizada de acordo com as condições de reação (BILAL *et al.*, 2019; BÓDALO *et al.*, 2006).

2.4 Peroxidases

Dentre as enzimas com potencial de aplicação na biodegradação de corantes, pode-se citar as peroxidases (EC 1.11.1.x), que são oxidoredutases que catalisam a redução de peróxidos, como o peróxido de hidrogênio, acoplando essa reação à oxidação de compostos poluentes orgânicos e inorgânicos por meio dos radicais livres formados (BANSAL; KANWAR, 2013). Na verdade, o termo peroxidase se refere a um grupo heterogêneo de enzimas que acoplam a oxidação de diversos substratos à redução de peróxidos. Assim, alguns exemplos de membros desse grupo são as NADH peroxidases (EC 1.11.1.1), as glutathione peroxidases (EC 1.11.1.9), as guaiacol peroxidases (EC 1.11.1.7), dentre outras, e demais peroxidases não específicas (BILAL *et al.*, 2018; HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009; PANDEY *et al.*, 2017). A Figura 3 esquematiza o mecanismo de reação das peroxidases, onde RH é um substrato viável da enzima, e R· representa o radical livre gerado.

Figura 3. Esquema geral do mecanismo de ação das peroxidases.



Fonte: DE MONTELLANO, 2010.

Peroxidases são ubíquas na natureza, tendo diversas fontes como plantas, fungos, algas, bactérias e animais (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Essa família de enzimas é caracterizada por apresentarem massa molecular entre 30 e 150 kDa, e a maioria delas (cerca de 80 % de acordo com o banco de dados PeroxiBase) possui grupamentos heme como grupo prostético (PANDEY *et al.*, 2017). A importância das peroxidases é vista diante da sua vasta gama de aplicações, podendo ser utilizada na confecção de biossensores, em imunoenaios enzimáticos, síntese orgânica, dentre outras (QUEIROZ *et al.*, 2018). Além disso, as peroxidases têm ganhado grande destaque em pesquisas de tratamento de efluentes por serem capaz degradar poluentes ambientais como fenóis, cresóis, pesticidas, corantes têxteis sintéticos etc (BANSAL; KANWAR, 2013).

Peroxidases que possuem grupamento heme como grupo prostético são agrupadas nas superfamílias das ciclooxigenase peroxidases e das catalase peroxidases. Estas últimas são representadas por três classes. A classe I engloba principalmente citocromo *c* peroxidases de fungos, ascorbato peroxidases e catalase peroxidases bacterianas. A classe II é constituída de lignina e manganês peroxidases de fungos, enquanto a classe III é composta por peroxidases de plantas (ZÁMOCKÝ; OBINGER, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial uso de peroxidases de origem vegetal na biodegradação de corantes advindos da indústria têxtil. Por exemplo, estudos com a peroxidase purificada de raízes de *Armoracia rusticana*, comumente conhecida como peroxidase de raiz-forte, mostraram que a enzima conseguiu degradar 59% do corante Remazol Turquoise Blue G 133% após 50 min de reação em pH 4,0 (DE SOUZA; FORGIARINI; DE SOUZA, 2007) e 69% do corante Reative Blue 21 em 1 h de reação do mesmo pH (FARIAS *et al.*, 2017). A mesma enzima também foi capaz de degradar 94% do corante Acid Blue-25 após 75 min de reação em pH 7,0 (GHOLAMI-BORUJENI; FARAMARZI; NEJATZADEH, 2013).

Embora a peroxidase de raiz-forte seja a principal representante das peroxidases de plantas, outras enzimas da classe III também mostraram grande potencial de degradação de corantes têxteis. Por exemplo, uma peroxidase purificada de soja degradou 95% do corante Remazol Turquoise Blue G 133% em 4 h de reação em pH 3,0 (MARCHIS *et al.*, 2011).

2.4.1 Peroxidase de *Moringa oleifera* Lamarck

Moringa oleifera Lam. é uma planta de porte arbóreo pertencente à classe Magnoliopsida, à ordem Brassicales e à família Moringaceae (SULTANA, 2020). Nativa da Índia essa planta de crescimento rápido se desenvolve principalmente em regiões de clima semiárido, tropical e subtropical, contudo suas características de resistência à seca a torna mais facilmente adaptável a regiões de clima seco (GUPTA *et al.*, 2018; LEONE *et al.*, 2015). *M. oleifera* é notoriamente conhecida pelo elevado valor nutricional, principalmente das suas folhas, sendo comumente utilizada em países subdesenvolvidos no tratamento contra a desnutrição infantil (SULTANA, 2020). A quantidade de aplicações de *M.oleifera* é bastante extensa e diversa uma vez que essa planta apresenta propriedades antimicrobianas (DA SILVA NETO *et al.*, 2020), antidermatofíticas (LOPES *et al.*, 2020), hipoglicêmicas e antioxidantes (PAULA *et al.*, 2017), cardioprotetivas (ABDULAZEEZ *et al.*, 2016), neuroprotetivas (HANNAN *et al.*, 2014), imunomodulatórias e imunoestimulatórias (RACHMAWATI; RIFA'I, 2014) e propriedades de purificação de águas, dentre outras (GUPTA *et al.*, 2018).

Trabalhos desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa permitiram a purificação de uma peroxidase de raízes de *M. oleifera* capaz de degradar corantes têxteis. Essa peroxidase, denominada de *MoPOX*, tem peso molecular de 43,6 kDa, ponto isoelétrico de 9,4, atividade ótima em pH 5,2 e em 70 °C e possui elevada termoestabilidade, mantendo 80% de sua

atividade depois de 60 min a 70 °C. A total inibição de *MoPOX* quando tratado com ditioneitol (DTT) indica a presença de pontes dissulfeto estabilizadoras da enzima. Além disso, a significativa inibição por azida sódica sugere a presença de grupamento heme como grupo prostético (ALMEIDA *et al.*, 2020; LOPES, 2019).

MoPOX demonstrou elevado potencial de degradação de corantes têxteis. Em pH 5,2 e após 48 h de reação, a enzima descoloriu 64% e 60 % dos corantes Remazol® Azul e Telon® Turquesa M-G5 85%, respectivamente (LOPES, 2019). Apesar dos resultados promissores de *MoPOX*, o uso de enzimas livres apresenta a desvantagem de dificuldade de recuperação do biocatalisador ao final do processo de catálise. Esse percalço é facilmente contornado através de técnicas de imobilização enzimática, as quais além de diminuir o custo total por permitir o reuso enzimático, podem ainda melhorar propriedades como estabilidade, atividade, seletividade, especificidade e robustez (ZHANG; GE; LIU, 2015).

2.5 Imobilização enzimática

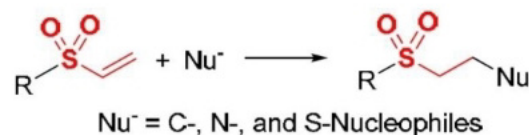
As metodologias de imobilização enzimática permitem a recuperação da enzima e a melhoria de propriedades enzimáticas, tais como estabilidade, atividade, seletividade, especificidade e robustez (MATEO *et al.*, 2007; ZHANG; GE; LIU, 2015). Além disso, a imobilização de enzima permite diminuir de custos de produção e superar as limitações do uso de enzimas livres nos processos industriais, tais como sensibilidade às condições do processo, baixa estabilidade em operações de longa duração, estrutura instável etc (MOHAMAD *et al.*, 2015; VAGHARI *et al.*, 2016).

Os métodos de imobilização enzimática podem ser divididos em adsorção física, ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada (BEZERRA *et al.*, 2015). Imobilização por adsorção é considerado o método mais simples e gera catalisadores com elevada atividade enzimática. Contudo, a enzima é facilmente desprendida do suporte devido as fracas forças de interação envolvidas tais como ligação de hidrogênio, força de Van der Waals e ligação iônica (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015). A síntese de suportes poliméricos na presença da enzima caracteriza a imobilização por encapsulamento, que tem como desvantagens as limitações difusionais do substrato por dificultar a interação entre a enzima encapsulada e o ambiente externo. Interações fortes entre enzima e suporte caracterizam a imobilização por ligação covalente e por ligação cruzada, as quais diminuem a lixiviação enzimática, facilitando o reuso do biocatalisador (BEZERRA *et al.*, 2015; MOHAMAD *et al.*, 2015).

Glutaraldeído é o agente de ligação cruzada mais utilizado em estudos de imobilização por ser barato e facilmente encontrado em quantidades comerciais (MIGNEAULT *et al.*, 2004). Contudo, a imobilização enzimática em suporte ativado com glutaraldeído possui baixa estabilidade em pHs alcalinos, o que não permite a ativação de grupos de aminoácidos de pKa mais elevado, como ocorre com os amino grupos da lisina, diminuindo as possibilidades de se alcançar interações multipontuais (DOS SANTOS *et al.*, 2015b; PINHEIRO *et al.*, 2019).

Os estudos têm se voltado para a investigação de novas estratégias para formação de ligações multipontuais. Imobilização utilizando divinilsulfona (DVS) como agente de crosslinkning tem se mostrado eficiente para formação de ligações multipontuais intensas, uma vez que os grupos vinil sulfona altamente reativos podem interagir com grupos tiol, imidazol, fenol e aminas primárias e secundárias das enzimas (DOS SANTOS *et al.*, 2015a, 2015c). A interação da divinil sulfona com esses grupos funcionais ocorre por meio da Adição de Michael, como ilustrado na Figura 4. A elevada eletronegatividade do grupamento sulfona faz com que os grupamentos vinílicos se tornem bons eletrófilos. Dessa forma, DVS é um ótimo aceptor de Michael para o ataque de grupamentos nucleofílicos (LOPEZ-JARAMILLO; HERNANDEZ-MATEO; SANTOYO-GONZALEZ, 2012).

Figura 4. Mecanismo de interação das vinil sulfonas por meio da Adição de Michael.



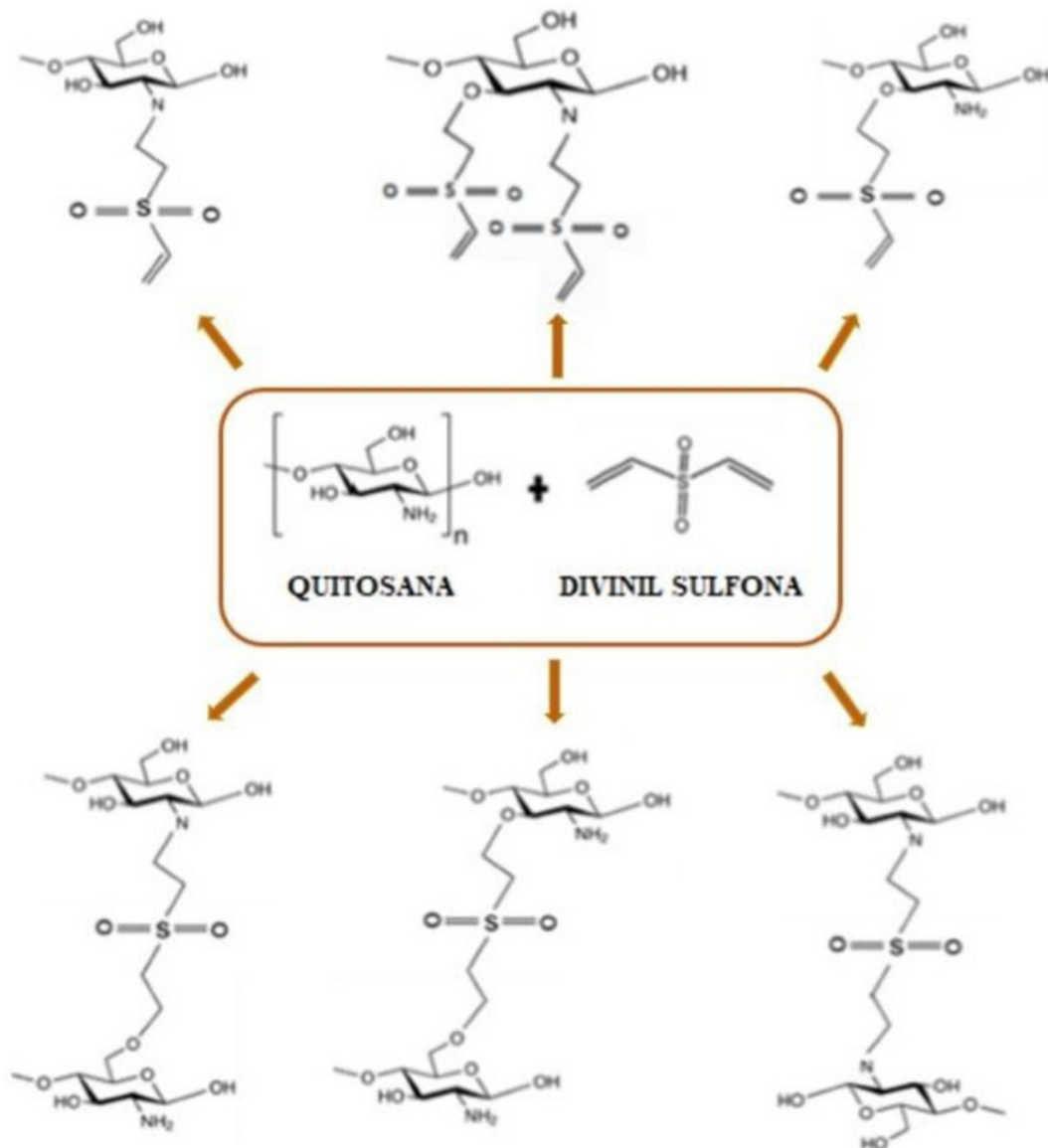
Fonte: LOPEZ-JARAMILLO b, 2012.

O sucesso da imobilização enzimática depende não somente da enzima e da metodologia de imobilização, mas também da escolha adequada do suporte. A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina (HUANG *et al.*, 2017), o segundo biopolímero mais abundante, e é o suporte a base de biopolímero mais utilizado nos estudos de imobilização (BILAL *et al.*, 2016) As vantagens que justificam seu uso incluem sua biocompatibilidade, abundância comercial, ausência de toxicidade (LIU *et al.*, 2012) e sua heterofuncionalidade, possuindo grupos amino e hidroxila como grupos funcionais (BARBOSA *et al.*, 2013).

A presença de mais de um grupo funcional traz vantagens à quitosana como suporte de imobilização por oferecer mais de um ponto de ancoragem para funcionalização. No caso da

ativação com divinil sulfonas, esse agente de ligação cruzada pode tanto interagir com os grupos amino quanto com os grupamentos hidroxila da quitosana (PINHEIRO *et al.*, 2019), como ilustrado na Figura 5, de forma a permitir maior número de ligações cruzadas e consequente maior rigidez do suporte. Portanto, este trabalho se propôs a imobilizar *MoPOX* em quitosana ativada com divinil sulfona com a intenção de gerar um biocatalisador cujo uso seja viável para a descoloração de corantes têxteis.

Figura 5. Mecanismo de reação da ativação da quitosana com divinil sulfonas em pH alcalino.



Fonte: Adaptado de PINHEIRO, 2019.

3 HIPÓTESE

A imobilização de *MoPOX* em quitosana ativada com divinil sulfonas resultaria em um biocatalisador com maior atividade catalítica e com maior estabilidade diante das condições desfavoráveis dos efluentes têxteis.

4. OBEJTIVOS

4.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo estudar a imobilização de uma peroxidase purificada de raízes de *Moringa oleifera* em esferas de quitosana funcionalizadas com divinil sulfonas e avaliar as propriedades catalíticas na descoloração de corantes têxteis.

4.2 Objetivos Específicos

- Purificar *MoPOX* a partir de raízes de *Moringa oleifera*;
- Determinar estrutura primária de *MoPOX*;
- Determinar as melhores condições de funcionalização das esferas de quitosana com divinil sulfona;
- Determinar as melhores condições de imobilização de *MoPOX* (pH e tempo de contato entre enzima e suporte);
- Determinar a carga máxima enzimática do suporte;
- Avaliar o perfil de atividade catalítica do estabilizador frente a diferentes condições de pH e temperatura;
- Avaliar a estabilidade térmica do biocatalisador proposto;
- Avaliar a eficiência do biocatalisador na degradação de corantes têxteis;
- Avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador proposto.

ARTIGO DA DISSERTAÇÃO***Mo*POX IMMOBILIZATION IN CHITOSAN MODIFIED WITH DIVINYLSULFONE AS A STABLE BIOCATALYST FOR TEXTILE DYES DISCOLORATION**

Eva G. Morais^a, Bruna B. Pinheiro^b, Larissa A. Lopes^a, João Xavier S. Neto^a, Lucas P. Dias^a,
Luciana R. B. Gonçalves^b, Daniele O. B. Sousa^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bDepartment of Chemistry Engineering, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

***Correspondence:**

Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, 60451-970, Brazil. Fax: +55 85 3366 9783, Telephone: +55 85 3366 9820. E-mail: daniele.sousa@ufc.br

1. Introduction

In recent decades, there has been an increase in the environmental awareness of several nations. If environmental problems were previously seen only as concerns of non-governmental organizations and environmental activists, today the pressure that the general population exerts on governments to adopt sustainable measures is always increasing. In this scenario, the environmental impact caused by the textile industry is highlighted both because of the water demand in this industry and because of the toxic effluents generated. It is estimated that by 2030, consumption of textile goods will increase by 63%, resulting in increases of 63% and 62% in carbon dioxide emissions and waste generation, respectively [10].

In addition to presenting high organic load, pH, temperature, chemical (COD) and biochemical oxygen demand (BOD), textile effluents are also characterized by the coloring resulting from the dyeing process [1,2,11]. It is estimated that about 52% of colored industrial effluents come from the textile industry [3]. Dyes are the most worrying pollutants in the textile industry because they are toxic compounds that are potentially carcinogenic and mutagenic [4,58], and capable of bioaccumulating in the food chain [5]. Despite the serious environmental impacts of the textile industry, conventional dye remediation techniques have important disadvantages such as high costs, low efficiency and possible generation of still toxic by-products [2,6,59].

As a result, the search for alternative techniques that are effective and ecologically sustainable stimulated the research on bioremediation. Enzymatic bioremediation is a promising alternative due to the possibility of reducing costs by reusing enzymes and generating less or non-toxic by-products [3,6,60].

Among the enzymes used in environmental remediation, peroxidases from different sources are highlighted in the decontamination of pollutants and in the detoxification and degradation of emerging contaminants [6,7,61]. The peroxidase purified from *Moringa oleifera* roots (*MoPOX*) [62] demonstrated a high potential for use in the degradation of textile dyes, being able to discolor 64% and 60% of Remazol® Blue and Telon® Turquoise M-G5 85% dyes, respectively, after 48 h of reaction [63]. However, in order to be effectively implemented in the wastewater textile treatment, it is essential that *MoPOX* be immobilized and generate a stable biocatalyst under the harsh pH and temperature conditions characteristic of textile effluents. The need for immobilization is easily justified because it reduces

production costs, overcoming the limitations of using free enzymes in industrial processes, such as sensitivity to process conditions, low stability in long-term operations, unstable structure, etc [47,61,64].

One of the possibilities to obtain stable biocatalysts is to allow enzymatic immobilization through multipoint cross-linking [8]. The covalent interaction between enzyme and support prevents enzymatic leaking while tightening the enzyme structure and making the biocatalyst more resistant to unfavorable conditions of activity. Although glutaraldehyde (GA) is the main cross-linking agent used in immobilization studies [50], divinyl sulfone (DVS) has also been gaining great attention because it allows interaction with the enzyme not only through amino groups, but also by thiol, phenol and imidazole groups [65]. Moreover, DVS is stable in a broad range of pH value (from 4 to 10) [8] and has been suggested as an important enzyme stabilizing agent via multipoint covalent attachment [66]. In this scenario, the immobilization of *MoPOX* on supports modified in DVS contributes to the effective implementation of the enzyme as an efficient alternative for the degradation of textile dyes.

Not only the choice of enzyme and immobilization method is important to create a successful biocatalyst, choosing the appropriate immobilization support is crucial. Chitosan (CTS) is the second most abundant biopolymer and is the most widely used biopolymer-based support in immobilization studies [7]. The advantages that justify chitosan use as immobilization support include its biocompatibility, commercial abundance, absence of toxicity [7,56,67] and its heterofunctionality, having amino and hydroxyl groups as functional groups [57].

The presence of more than one functional group brings advantages to chitosan as an immobilization support as it offers more than one anchorage point for functionalization. In the case of activation with divinyl sulfones, this cross-linking agent can either bind with the amino groups or with the chitosan hydroxyl groups [52], in order to allow a greater number of cross-links and consequently greater support rigidity. Therefore, this work proposed to immobilize *MoPOX* in chitosan beads activated with divinyl sulfone with the objective of generating a stable biocatalyst whose use is feasible for the discoloration of textile dyes.

2. Material and methods

2.1. Materials

Chromatographic resin DEAE-Sephacel and molecular mass markers were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Guaiacol, medium molecular weight chitosan and divinyl sulfone were purchased from Sigma-Aldrich Ltd (St. Louis, USA). Textile dyes were gently provided by the company DyStar. Other reagents used were of analytical grade and for biochemical use.

2.2. Methods

2.2.1. Plant material and cultivation conditions

M. oleifera seeds were collected in Pici campus of Federal University of Ceará (3°44'48"S, 38°34'30"W), with the authorization (number 47766) from the Chico Mendes Biodiversity Conservation Institute (ICMBio).

Sterilization conditions are described according to [68] with modifications. Viable seeds had their surface sterilized with 2.0% sodium hypochlorite for 5 min, being then thoroughly washed in three cycles of 10 min submersion in deionized water. Germination proceeded in Germitest paper humidified with deionized water for 10 days in a light protect environment and with Germitest paper continuously soaked in deionized water. After this period, radicle emission allowed seedling transference to green house cultivation in sterilized sand. Plants were grown for 30 days being daily watered and nourished with Hoagland Solution [69]. After cultivation period, roots were abundantly washed with deionized water, being then excised from the plant and stored in - 20 °C for later use.

2.2.2. Peroxidase extraction and purification

MoPOX extraction and purification followed protocol by [63]. Approximately 60 g of *M. oleifera* roots were dehydrated by freeze-drying for 48 h. Plant material was then finely minced in a common grinder in order to obtain a homogeneous powder, which was immediately put in contact with 100 mM sodium acetate buffer pH 5.2 (1/10 w/v) under agitation at 4 °C. After 2 h extraction, the crude extract was filtered, centrifuged at 12,000 × g, for 20 min at 4 °C, and the supernatant was dialyzed against deionized water for 24 h in a 12 kDa cut off cellulose membrane to obtain a soluble extract.

Soluble extract then was concentrated by freeze-drying, and to it was added 1 M sodium acetate buffer pH 5.2 in order to obtain a final concentration of 100 mM acetate salt. After centrifugation (10,000 x g, 10 min, 4 °C), the sample (5.3 mgP/mL) was applied to a DEAE-Sephacel column (20 cm x 1.5 mm) previously equilibrated with acetate buffer. Retained proteins were eluted with acetate buffer with 0.5 M NaCl. Elution of *MoPOX* from column was monitored by measuring absorbances at 280 nm. Proteins eluted were then dialyzed against water for 24 h and concentrated in Vivaspın (30 kDa cut off).

Concentrated sample (1.3 mgP/mL) was applied to a Hiload® 16/600 Superdex® 75 pg column (60 x 1,6 cm) coupled to a Äktaprime Plus System. A volume of 1 mL of concentrated *MoPOX* was applied to the column pre-equilibrated with the elution buffer of previous chromatographic step. Protein fractionation was performed in 0.4 mL/min flux, 0.5 MPa pressure and collecting 0.5 mL/fraction. Purified *MoPOX* was then dialyzed against water for 24 h and stored at 4 °C. *MoPOX* fraction purified after this last chromatographic step was used for the determination of enzyme primary structure. All the other experiments were performed with purified fraction from DEAE-Sephacel column.

2.2.3. Determination of peroxidase activity

Peroxidase activity was measured according to [70] using guaiacol as substrate. Reactional mixture composed of 50 mM sodium acetate buffer pH 5.2, 20 mM guaiacol and 60 mM hydrogen peroxide was incubated at 30 °C for 10 min. After addition of enzyme, tetraguaiacol formation was monitored by measuring absorbance at 470 nm. One unit of peroxidase activity (UPA) was defined as the amount of enzyme needed to increase one absorbance unit per min under reaction conditions. In the case of immobilized *MoPOX*, activity will be measured in terms of gram of support and will be defined as At_{ie} (activity of immobilized enzyme) according to Equation 1, where Abs is the absorbance and g is mass of support in grams.

$$At_{ie} \text{ (UPA/g)} = \frac{Abs/min}{g} \quad (1)$$

2.2.4. Determination of *MoPOX* primary structure

Purified *MoPOX* obtained from molecular exclusion chromatographic was submitted to an SDS-PAGE analysis in a 10% polyacrylamide gel [71]. The electrophoresis was run at 20 mA and 180 V. Protein bands were visualized after silver staining [72]. Protein spots were digested with trypsin and peptides were extracted from the gel according to [73]. Tryptic

peptides were separated in BEH300 C18 column (100 μm \times 100 mm) using the nanoAcquity™ (Waters) system and eluted at 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ with acetonitrile gradient (5–85%) containing 0.1% formic acid. The liquid chromatography system was connected to a nanoelectrospray mass spectrometer source (SYNAPT HDMS system, Waters Corp., Milford, MA, USA). The mass spectrometer was operated in positive mode using a source temperature of 90 °C and capillary voltage of 3.5 kV. The instrument was calibrated with phosphoric acid clusters, and the Lock mass used during the acquisition was the m/z 686.8461 ion. The LC–MS/MS procedure was performed according to the data-dependent acquisition (DDA) method, selecting MS/MS doubly to triply charged precursor ions. Ions were fragmented by collision-induced dissociation using argon as the collision gas and ramp collision energy that varied according to the charge state of the selected precursor ion. Data acquisition was performed at an m/z range of 300–2100 for the MS survey (1 scan/sec) and at an m/z range of 50–2500 for MS/MS. Data were collected with MassLynx 4.1 software and processed using the Protein Lynx Global Server 2.4 (Waters Corp.) and were converted to peak list text files and submitted to a database search using the RedoxiBase database.

2.2.5. Chitosan beads preparation

Chitosan (CTS) beads were prepared following protocol by [74]. Briefly, 0.5 g of chitosan was dissolved in 20 mL of 10% acetic acid and stirred for 1 h. Then, the mixture was dropwise added to a 2 M NaOH solution under mild agitation. The chitosan beads were thoroughly washed with deionized water until neutrality, allowed to dry overnight at room temperature. The wet support was stored at 4 °C.

2.2.6. Chitosan beads modification with divinyl sulfone

Modification of chitosan with divinyl sulfone (DVS) was carried as described by [52]. A volume of 750 μL of DVS were completely solubilized in 20 mL of a 333 mM sodium carbonate solution at pH 10.0, 12.5 or 14.0. To this solution, 1 g of chitosan beads were added and allowed to react under agitation for 35 min at room temperature. Finally, chitosan beads modified with DVS (CTS-DVS) were abundantly washed with deionized water and stored at 4 °C.

2.2.7 Characterization of chitosan beads

Chitosan beads modifications with DVS were evaluated using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) in an Agilent Cary 630 FTIR Spectrophotometer with the data being collect in the range 650 - 4000 cm^{-1} .

2.2.8. *MoPOX immobilization in CTS-DVS*

2.2.8.1 *pH immobilization profile*

Immobilization was carried out using 25 mg of CTS-DVS, offering an initial enzymatic load of 300 UPA per gram of wet support and with continuous agitation. Enzyme immobilization conditions were evaluated for different pH and time of contact between enzyme and support. *MoPOX* immobilization was conducted for 4, 8, 16 and 24 h in 1 mL of final volume of 5mM sodium acetate pH 5.2, 5 mM sodium phosphate pH 7.0 or 5 mM carbonate-bicarbonate pH 10.0.

2.2.8.2. *Maximum enzymatic loading*

Once the best pH and time of immobilization was determined, the maximum enzymatic loading was evaluated. To do so, enzymatic loading ranging from 25 to 500 UPA/g CTS-DVS were offered to the same amount of immobilization support, and effects on immobilization yield and activity of immobilized *MoPOX* were analyzed.

2.2.9 *Immobilization parameters*

Efficiency of proposed immobilization method was evaluated by measuring initial (At_i) of assay blank (soluble enzyme in the specific immobilization condition), and activity of supernatant (At_f) and immobilized enzyme (At_e) after immobilization procedure. These values were used to calculate immobilization yield (Y), theoretical activity (At_T) according the following equations [75]:

$$Y (\%) = \frac{(At_i - At_f)}{At_i} \times 100 \quad (2)$$

$$At_T (\text{UPA/g of support}) = Y \times At_e \quad (3)$$

2.2.10. *SDS-PAGE analysis*

Interaction between enzyme and support was evaluated by SDS-PAGE with a 10% polyacrylamide gel (20 mA, 180 V). Soluble enzyme extract, supernatant after 4 h immobilization and immobilized enzyme were treated in a reductant environment according

to [76]. Samples were treated with rupture buffer (2% SDS and 10% mercaptoethanol) in a 1:10 (v/v or w/v) ratio of sample: rupture buffer. Denaturation was completed by heating samples in boiling water for 10 min. Then, a 20 μ L aliquot of supernatant was applied to the gel and electrophoresis was performed according to [71]. Gel staining was carried out as described by [72].

2.2.11. Effect of pH and temperature in free and immobilized MoPOX activity

Having evaluated the optimum immobilization conditions, the catalytic efficiency of free and immobilized *MoPOX* were analyzed in different pH and temperature conditions. At first, the activity profile, under different pHs, was studied using the following buffer solutions at 50 mM concentration: glycine-HCl pH 2.0, sodium acetate pH 4.0 and 5.2, sodium phosphate pH 6.0 and 7.5, Tris-HCl pH 8.0, glycine-NaOH pH 9.0 and 10.0. Besides pH conditions, activity assay was conducted according to section 2.2.3. The highest activity measurement from both free and immobilized *MoPOX* were taken as reference value of 100%.

In order to determine the effect of temperature in biocatalysts performance, peroxidase activity of free and immobilized *MoPOX* were assayed having 50 mM sodium acetate pH 5.2 as activity buffer. Enzymatic activity was measured after reaction mixture was incubated in the following temperatures: 30, 40, 50, 60, 70 and 80 °C. Besides temperatures conditions, activity assay was conducted according to section 2.2.3. The highest activity measurement from both free and immobilized *MoPOX* were taken as reference value of 100%.

2.2.12. Thermal stability of free and immobilized MoPOX

Thermal stability assay was carried out in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.2 and in water bath at 60 °C. Samples of both free and immobilized *MoPOX* were periodically removed from the water bath and allowed to cold in ice bath before having its activity measured as described in section 2.2.3. In the same way, reference values of activity for free and CTS-DSV-*MoPOX* were obtained before both samples were placed in the 60 °C water bath.

2.2.13. Textile dye decolorization

Remazol Blue® dye was solubilized (50 mg/mL) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 immediately before being used in decolorization assay, which was performed in a recipient protected from light. Reaction mixture was constituted as described by [63] with slight

changes. In a 15 mL tube were added 2 mL dye solution and 250 μ L 1 mM H₂O₂, besides free enzyme, immobilized enzyme, blocked support or nothing (assay control). In this assay, it was also evaluated the dye adsorption capacity of support alone. For this, DVS groups exposed in the chitosan surface were blocked with 1 M ethylenediamine (EDA) in carbonate-bicarbonate buffer pH 10.0 for 24 h [18]. Blocked support (CTS-DVS-EDA) was then abundantly washed with deionized water to remove EDA excess [52]. Reaction was carried out under end-over-end agitation in the absence of light, at room temperature and aliquots were periodically removed to have their absorbance measured at 592 nm in a 96 well microplate.

2.2.14. Operational stability

The reusability efficiency of immobilized *MoPOX* was evaluated by Remazol Blue® degradation under the conditions cited in item 2.2.13 and after 3 h reaction. Immobilized *MoPOX* samples were washed with deionized water between each activity cycle. The decay in CTS-DVS-*MoPOX* activity was measured throughout the cycles having activity of the first cycle as 100% reference value.

2.2.15. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate and results are represented as average and standard deviation (lower than 10%).

3. Results and discussion

3.1. Peroxidase extraction and purification

MoPOX was purified from the *M. oleifera* roots following protocol previously established by [63]. Figure S1 illustrates chromatogram profile and SDS-PAGE gel of purified *MoPOX*. However, considering a higher protein yield and lower costs, we choose to use the semi-purified *MoPOX* samples obtained from the ion exchange chromatography in the following immobilization experiments. The purified protein was used only for mass spectrometry analysis.

3.2. Determination of *MoPOX* primary structure

Tryptic digestion of *MoPOX* resulted in three peptides as illustrated in Table 1. These peptides were analyzed in the plant oxidoreductase database RedoxiBase. Comparative analysis demonstrated that *MoPOX* peptides present high similarity, around 85%, with

regions of other plant peroxidases. This result confirms the classification of the enzyme as one peroxidase.

3.3. Chitosan beads modification with divinyl sulfone

In order to evaluate if the crosslinking agent was successfully incorporated in the immobilization support, the chitosan beads activated under different pH conditions were submitted to a FTIR analysis. Figure 1 shows a typical spectrum of chitosan with absorption bands between 3360 and 3291 cm^{-1} , representing N-H and O-H stretching vibrations. The band at a wavenumber of 2920 cm^{-1} corresponds to C-H symmetric stretching and at 1645 cm^{-1} , to C=O stretching of amide I [77,78]. All samples presented these absorptions bands, which indicate that modification was able to preserve chitosan overall structure. In the same way, all modified samples presented characteristics peaks from DVS, which can be seen at 1310 - 1130 cm^{-1} corresponding to S=O symmetric and asymmetric stretching and 1255 cm^{-1} , representing C-O-C stretching vibration from ether bonds [79,80]. In addition, figure 1 shows that a band at a wavenumber of 1300 cm^{-1} is more evident in chitosan modified with DVS at pH 12.5 in comparison with the other supports. For this reason, we choose this support for the MoPOX immobilization.

3.4. Effect of pH and time on MoPOX immobilization

MoPOX immobilization efficiency in CTS-DVS beads was evaluated in different pHs. Figure 2(A) shows that the best pH of immobilization is pH 5.2. At this immobilization condition, the activity measured in the supernatant is the lowest among the pHs. After 24 h of contact at pH 5.2, the immobilization yield was around 98%, against 23% at pH 7.0 and only 5.0% at pH 10.0. Notwithstanding, literature shows that amino acids that react with DVS, such as cysteine, lysine, histidine and tyrosine, present a higher rate of support binding at alkaline environments (pH 10.0) [8]. Lysine is one of the most common amino acids residues, accounting for over 10% of amino acid sequence and frequently being located at protein surface [81]. However, due to the high pKa value of its ϵ -amino group, lysine can act as a nucleophile only in pHs over 9.0 [53,82]. MoPOX immobilization in pH 10.0 had the lowest immobilization yields, suggesting low frequency of this amino acid in MoPOX surface.

Lowering pH to neutrality resulted in an increase in MoPOX attachment. In neutral pHs the terminal amino group is more nucleophilic than ϵ -amino of lysine once it presents a pKa around 7-8 [8,83,84]. Therefore, one could suggest that the increase in MoPOX immobilization at pH 7.0 is a consequence of support attachment to the terminal amino group.

Histidine is another amino acid reported to react with DVS at neutral pH [85], and it could also be involved in *Mo*POX immobilization at pH 7.0.

The best *Mo*POX immobilization condition was at pH 5.0. One likely explanation for this result is that under different pH conditions, enzyme immobilization in the same support can occur by interaction with different areas of the protein [66,86]. As consequence of this phenomenon, different orientations of enzyme on the support can generate different stabilities and substrate selectivity [57]. Therefore, the effect of pH 5.2 on *Mo*POX orientation towards immobilization support could have resulted in binding of more enzyme molecules and in a *Mo*POX conformational state that allowed a higher activity.

Another data that supports pH 5.2 as the best immobilization condition is shown in Fig. 2(B). Besides having the highest immobilization yield, this pH also resulted in biocatalyst with the highest activities. It is interesting to observe that although *Mo*POX attachment increases over time in pH 5.2, peroxidase activity decreases in longer contact times between the enzyme and CTS-DVS. It is known that immobilization process through multipoint covalent attachment occurs in longer contact times which allow that more crosslinking connections are established between enzyme and support [51,52,66]. However, probably after 4 h immobilization the increasing number of connections between *Mo*POX and CTS-DVS resulted in rigidification of enzyme structure, consequently leading to decreasing in enzyme activity [87]. Considering these results, *Mo*POX immobilization in pH 5.2 for a period of 4 h was adopted in the subsequent experiments.

3.5. CTS-DVS maximum loading capacity

The maximum enzyme loading of the support was evaluated and its influence was tested over immobilization yield and biocatalyst activity. As illustrated in Figure 3(A), CTS-DVS has a maximum enzymatic capacity of 300 UPA per gram of support. This maximum enzymatic loading is estimated as how much protein the support can load while presenting the maximum biocatalyst activity. Not surprisingly, immobilization yield decreased as enzyme loading increased. This usually occurs if enzyme preparation presents some degree of contamination. Immobilization yield is almost constant between enzymatic loading of 25 to 100 UPA/g, ranging from 97 to 93%. Increasing enzyme loading over 100 UPA/g support resulted in a sharp decrease in immobilization yield. Nevertheless, this is not a negative result. It only indicates that the enzyme of interest is being purified in the immobilization process [88]. The highest biocatalyst activity is obtained at 300 UPA/g of enzyme loading. In lower

enzymatic loadings, the enzyme is reacting primarily with the support. However, in increasing enzymatic loadings, *MoPOX* molecules start to be deposited on the first layer of enzyme already attached to the support. This occurs because support surface has already reached its saturation point. Such protein-protein interactions result in diffusional limitations of substrate and products, consequently creating biocatalysts with lower activity [89]. This phenomenon usually occurs when support achieves its maximum loading capacity [75,90]. At enzymatic loadings higher than 300 UPA/g of support, diffusional limitations of substrate and product commence to have a greater effect in the activity, and so less efficient biocatalysts are generated [88,90].

In order to assure that the maximum loading capacity was achieved, the theoretical activity of the support was calculated for the enzyme loadings tested. As Figure 3(B) illustrates, presumed biocatalyst activity start to stabilize in enzyme loadings higher than 300 UPA/g. This indicates that after this point, increases in enzyme loading will not results in biocatalysts with greater activity. The following experiments were carried out using the maximum loading capacity.

3.6. SDS-PAGE analysis

A desorption experiment was performed in an SDS-PAGE analysis in order to confirm that *MoPOX* is being covalently attached to the support by the crosslinking feature of DVS. Figure 4 shows the polyacrylamide gel containing the samples from the immobilization procedure. Lane 2 contains the soluble enzyme with the *MoPOX* band around 52 kDa. The supernatant obtained after immobilization is shown in lane 3. It can be seen that *MoPOX* is also present because after 4 h immobilization, around 33% of relative activity could still be measured in the sample. As expected, there is not any protein band in lane 3 because the reductant conditions of the experiment were not able to dissociate *MoPOX* from the support, meaning that enzyme and support are interacting trough very stable covalent binding.

3.7. CTS-DVS-*MoPOX* optimum pH of activity

Once the best immobilization parameters were stablished, the efficiency of the biocatalyst was tested in different pH conditions. From the pH profile illustrated in Figure 5, two important features of the proposed biocatalyst can be observed. The first one is the change in optimum pH of activity: while soluble enzyme presented higher activity in pH 5.2, immobilized enzyme presented the best activity at pH 8.0. Changes in pH profile can be explained by the type of enzyme and the structure of cross-linker used. Therefore, part of this

phenomenon can be explained by the high stability divinyl sulfone in alkaline environments [53]. Change in optimum pH activity after immobilization can also be explained by the well accepted partition effect, which establishes that the microenvironment in the immobilized enzyme surface and bulk solutions are distinct, including the pH conditions [91,92]. This discontinuity of pH profiles occurs when support presents charges in its surface, resulting in a displacement of pH in enzyme activity [93][ILLANES 2008]. When the support is cationic, enzyme activity pH is displaced to more acidic conditions, while optimum enzyme activity is displaced to alkaline pH when the support is anionic [94]. Although the present work did not analyze the electric charge of the support, the shift of enzyme activity to a more alkaline pH suggests the anionic feature of CTS-DVS. This assumption is supported by the isoelectric point of 5.0 in silica nanoparticles functionalized with DVS [95].

The second feature observed in Figure 5 is that immobilized *MoPOX* presented higher activity than free enzyme in all pHs conditions. This means that the conformational changes induced by immobilization process resulted in increase of enzyme activity. This is a very important result, specially at alkaline conditions. Textile effluent physical and chemical characteristics can widely vary according to the type of fabric, dye and dying process, however high pH and temperature are usually a common feature [[2,11,96]. In a previous work by our group [63], *MoPOX* immobilization in chitosan beads activated with glutaraldehyde (CTS-GA) did not present a shift in pH profile. This result helps to understand the stabilization effect of DVS over commonly used crosslinking agents such as glutaraldehyde, demonstrating the promising application of the proposed biocatalyst in textile wastewater treatment.

The crosslinking with DVS enhanced the overall mechanical resistance of chitosan as the beads maintained their physical structures in a broad pH range from 2.0 to 10.0, even after 72 h of contact. Crosslinking reagents are well known to improve mechanical features of an immobilization support. Nevertheless, CTS-DVS beads has shown mechanical improvement even better than chitosan beads modified with glutaraldehyde [63]. In fact, [97] could not measure the activity of aminotransferases immobilized in CTS-GA when the biocatalysts were treated with pH lower than 6.5 because support became solubilized. Under acidic conditions chitosan beads were resolubilized, meaning that glutaraldehyde modification could not maintain the support crosslinking.

3.8. CTS-DVS-MoPOX optimum temperature of activity

Biocatalyst performance was also investigated under different temperatures as illustrated in Figure 6. In all the temperatures evaluated, immobilized *MoPOX* presented greater activity than the soluble enzyme, specially at higher temperatures. Increases in temperature leads to increases in catalysis rate in the same time that it also increases inactivation rate through heat [93]. In the case of free *MoPOX*, influence of inactivation rate becomes more evident in temperatures higher than 70 °C, as previously demonstrated by [62]. However, immobilized *MoPOX* does not display a preponderant influence of inactivation rate in 70 °C. In fact, CTS-DVS-*MoPOX* was more active at 80 °C. The reason for this is probably the immobilization process through DVS protected *MoPOX* from major conformational changes caused by high temperatures [55,98]. In addition, the high degree of molecule agitation caused by high temperatures favors the enzymatic reactions. The stabilization effect of DVS is easily observed when comparing to results of *MoPOX* immobilization in CTS-GA, which presented lower activities in temperatures higher than 30 °C. This is a very promising result considering the biocatalyst application in textile wastewater treatment because textile effluents usually present high temperatures [2,11,96].

3.9. CTS-DVS-MoPOX thermostability

Notwithstanding, *MoPOX* stabilization by DVS resulted in a biocatalyst more reactive in elevated temperatures, the performance of immobilized enzyme in longer periods of exposure to high temperatures could also reinforce divinyl sulfone as a stabilizer agent. Thermostability profile at 60 °C of free and immobilized enzyme is illustrated in Figure 7. Decay profile of both samples are very similar. First, both samples present a sharp decay in activity after 15 min of thermal inactivation. In the period between 15 and 60 min, the samples continue to show decrease in their activity, which is greater for the immobilized enzyme. However, both samples have an increase in activity in 120 min, followed by a mild decrease in 240 min and another decrease in 360 min. According to profile in Figure 7, it was estimated that free enzyme has a half-life of approximately 360 min, while immobilized enzyme presents half-life of around 300 min. Although, DVS could not enhance *MoPOX* thermal stability, the proposed biocatalyst did not severely impaired enzyme stability to temperature.

3.10. Textile dye degradation by CTS-DVS-MoPOX

Immobilized *MoPOX* was evaluated in the degradation of Remazol Blue RGB ® (RB). Dye degradation was conducted in pH 8.0 in order to best simulate the conditions of textile wastewater, once literature shows that most of dye effluents present high pH [2,11]. Remazol Blue RGB ® degradation profile is illustrated in Figure 8. Dye self-degradation was taken as control and remained less than 3.5% during the entire time investigated. As expected, free *MoPOX* presented low dye discoloration rate, around 6.5%, because soluble enzyme has low activity at alkaline pH (see pH profile in Figure 5). After 300 min reaction, blocked support presented 73% degradation rate, while immobilized *MoPOX* showed around 40% dye degradation. It was not expected that blocked support would have a greater degradation rate than immobilized *MoPOX*. In fact, the rationale in the experiment was to block the vinylic groups in chitosan surface with ethylenediamine (EDA) in order to neutralize DVS reactivity [21]. Moreover, in this way, immobilization support would be covered by amino groups from EDA and by amino and hydroxyl groups from chitosan, those that would have not reacted with DVS during functionalization. In this scenario, the greater dye degradation from the blocked support could be explained by the characteristics of the chosen dye.

In our previous studies, *MoPOX* immobilized in CTS-GA was able to degrade around 80% of RB in 8 h reaction at pH 5.2. Accordingly, the present work intended to evaluate how the proposed biocatalyst would influence the already high RB degradation rate. However, Remazol dyes are reactive dyes that present vinyl sulfone as the reactive group. When in alkaline conditions, Remazol dyes are readily converted to vinyl sulfone derivatives, presenting free vinylic groups [53,82,99]. Therefore, it could be suggested that vinyl sulfone derivatives generated when Remazol Blue was treated in pH 8.0 would be reacting with the blocked support by Michael addition with EDA amino groups. The reaction rate would be greater for the blocked support because of the high density of amino groups in chitosan surface. In contrast, the nucleophilic groups of *MoPOX* would not be available for the vinylic groups of RB, once most of the groups would already be interacting with the DVS on chitosan's surface.

Although presenting the best degradation rate, blocked support would not be a viable candidate for textile dye remediation due to the high toxicity of EDA. Its availability in chitosan's surface is not advised for application in wastewater treatment because, besides being a corrosive and carcinogenic reagent, EDA is also toxic to freshwater algae, planktonic

crustaceans and fish. The result demonstrated that CTS-DVS *MoPOX* is a promising biocatalyst for dye degradation because its good degradation rate despite the alkaline pH.

3.11. CTS-DVS-*MoPOX* operational stability

The reusability of immobilized *MoPOX* was evaluated during seven cycles of RB degradation after 3 h reaction. Figure 9 demonstrates that degradation rate presents a sharp decrease in the second cycle of reuse, with 60% degradation. After the third cycle of use, decreases in rate of reaction were less prominent. During the seventh degradation cycle CTS-DVS-*MoPOX* retained around 36% of its original activity. This reusability result was similar to what was previously obtained in *MoPOX* immobilization in glutaraldehyde activated chitosan beads [63]. Both biocatalysts maintained around 40% of activity after five reuse cycles. A packed bed reactor system with horseradish peroxidase immobilized by entrapment in chitosan beads were used to degrade two vinyl sulfone dyes, Reactive Blue 19 and Reactive Black 5 [67]. After 5 cycles of reuse, the former dye presented around 50% degradation, while the later had around 70% degradation. The authors suggested that a possible HRP leaking would explain the decreased in dye decolorization. Others works with HRP immobilization by entrapment or physical adsorption have also reported enzyme leakage as one of the reasons for decrease in catalytic efficiency throughout enzymatic cycles [67,100]. However, the covalent attachment between support and *MoPOX*, as discussed earlier, demonstrates that is unlike that *MoPOX* lixiviation from chitosan is significant enough to result in decreased catalytic efficiency. A more likely explanation for the decreasing degradation rate in reusability test is the product accumulation in the *MoPOX* reactive site, resulting in steric hindrance and consequently loss of enzyme activity [61,67].

4. Conclusion

The results of this study demonstrated that chitosan modified with divinyl sulfone is a promising immobilization support for *MoPOX*. The proposed immobilization method resulted in *MoPOX* stabilization that allowed the biocatalyst to present better enzyme activity than free enzyme. Although this stabilization effect could not be seen during thermostability assay, immobilized enzyme was still able to present a similar thermal inactivation profile than the free enzyme. More importantly, the pH and temperature profile of immobilized *MoPOX* demonstrated that the proposed biocatalyst is a propitious alternative for decolorization of textile dye without the need for adjusting pH of textile effluent after the dyeing process. Moreover, the applicability of immobilized *MoPOX* was proven possible for textile

wastewater treatment once the biocatalyst can be used for seven cycles presenting 36% dye degradation rate.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of Brazilian research-funding agencies National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education (CAPES).

References

- [1] J. Kerr, J. Landry, *Pulse of the Fashion Industry*, 2017.
- [2] U.S.P. Uday, T.K. Bandyopadhyay, B. Bhunia, *Bioremediation and Detoxification Technology for Treatment of Dye(s) from Textile Effluent*, in: 2016: pp. 267–322.
- [3] S. Arslan, M. Eyvaz, E. Gürbulak, E. Yüksel, *A Review of State-of-the-Art Technologies in Dye-Containing Wastewater Treatment – The Textile Industry Case*, *Text. Wastewater Treat.* (2016) 1–28. <https://doi.org/10.5772/64140>.
- [4] D.A. Yaseen, M. Scholz, *Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review*, Springer Berlin Heidelberg, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2130-z>.
- [5] V. Katheresan, J. Kansedo, S.Y. Lau, *Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review*, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 4676–4697. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.060>.
- [6] J. Khatri, P.V. Nidheesh, T.S. Anantha Singh, M. Suresh Kumar, *Advanced oxidation processes based on zero-valent aluminium for treating textile wastewater*, *Chem. Eng. J.* 348 (2018) 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.074>.
- [7] S. Liang, B. Zhang, J. Shi, T. Wang, L. Zhang, Z. Wang, C. Chen, *Improved decolorization of dye wastewater in an electrochemical system powered by microbial fuel cells and intensified by micro-electrolysis*, *Bioelectrochemistry.* 124 (2018) 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.07.008>.
- [8] S. Sandhya, *Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Condition: Role of Azoreductase*, in: 2010: pp. 39–57. https://doi.org/10.1007/698_2009_43.

- [9] L.Y. Jun, L.S. Yon, N.M. Mubarak, C.H. Bing, S. Pan, M.K. Danquah, E.C. Abdullah, M. Khalid, An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater, *J. Environ. Chem. Eng.* 7 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102961>.
- [10] N.T. Nandhini, S. Rajeshkumar, S. Mythili, The possible mechanism of eco-friendly synthesized nanoparticles on hazardous dyes degradation, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 19 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101138>.
- [11] K.G. Pavithra, S.K. P., V. Jaikumar, S.R. P., Removal of colorants from wastewater: A review on sources and treatment strategies, *J. Ind. Eng. Chem.* 75 (2019) 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.02.011>.
- [12] M. Bilal, T. Rasheed, Y. Zhao, H.M.N. Iqbal, J. Cui, “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials, *Int. J. Biol. Macromol.* 119 (2018) 278–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.134>.
- [13] M. Besharati Vineh, A.A. Saboury, A.A. Poostchi, A.M. Rashidi, K. Parivar, Stability and activity improvement of horseradish peroxidase by covalent immobilization on functionalized reduced graphene oxide and biodegradation of high phenol concentration, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 1314–1322.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.133>.
- [14] M.G.G. Almeida, L.A. Lopes, L.P. Dias, H.P.S. Costa, C.S. Nagano, R.F. Carneiro, M.I. Vasconcelos, D.B.O. Souza, Purification and enzymatic properties of a textile dye-decolourizing peroxidase from *Moringa oleifera* roots, *Brazilian Journal of Development.* 6 (2020) 17526- 17548. <https://DOI:10.34117/bjdv6n4-066>
- [15] L.A. Lopes, Imobilização de uma peroxidase de raízes de *Moringa oleifera* LAM. (MoPOX) em esferas de quitosana e seu potencial na degradação de corantes têxteis, (2019).
- [16] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29 (2015) 205–220.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.
- [17] H. Vaghari, H. Jafarizadeh-Malmiri, M. Mohammadlou, A. Berenjian, N. Anarjan, N. Jafari, S. Nasiri, Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme

- immobilization, *Biotechnol. Lett.* 38 (2016) 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z>.
- [18] J.C.S. Dos Santos, N. Rueda, O. Barbosa, J.F. Fernández-Sánchez, A.L. Medina-Castillo, T. Ramón-Márquez, M.C. Arias-Martos, M.C. Millán-Linares, J. Pedroche, M.D.M. Yust, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin, *RSC Adv.* 5 (2015) 20639–20649. <https://doi.org/10.1039/c4ra16926c>.
- [19] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *Biotechniques.* 37 (2004) 790–802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>.
- [20] J.C.S.D. Santos, O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes, *ChemCatChem.* 7 (2015) 2413–2432. <https://doi.org/10.1002/cctc.201500310>.
- [21] J.C.S. Dos Santos, N. Rueda, R. Torres, O. Barbosa, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties, *Process Biochem.* 50 (2015) 918–927. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.03.018>.
- [22] X. Liu, X. Chen, Y. Li, X. Wang, X. Peng, W. Zhu, Preparation of Superparamagnetic Fe₃O₄@Alginate/Chitosan Nanospheres for *Candida rugosa* lipase Immobilization and Utilization of Layer-by-Layer Assembly to Enhance the Stability of Immobilized Lipase, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 4 (2012) 5169–5178. <https://doi.org/10.1021/am301104c>.
- [23] M. Bilal, H.M.N. Iqbal, H. Hu, W. Wang, X. Zhang, Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system, *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 1352–1360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.215>.
- [24] O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties,

- Biomacromolecules. 14 (2013) 2433–2462. <https://doi.org/10.1021/bm400762h>.
- [25] B.B. Pinheiro, N.S. Rios, E. Rodríguez Aguado, R. Fernandez-Lafuente, T.M. Freire, P.B.A. Fechine, J.C.S. dos Santos, L.R.B. Gonçalves, Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*, *Int. J. Biol. Macromol.* 130 (2019) 798–809. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>.
- [26] R.D.O. Silva, M.R. Silva, P.M. De Farias, INFLUÊNCIA DA ASSEPSIA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Physalis angulata*, (2013) 5302.
- [27] D.R. Hoagland, D.I. Arnon, Preparing the nutrient solution, *Water-Culture Method Grow. Plants without Soil.* 347 (1950) 29–31. <https://doi.org/citeulike-article-id:9455435>.
- [28] H. URBANEK, K. KUZNIAK-GEBAROWSKA, E; HERKA, Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase, *Acta Physiol. Plant.* 13 (1991) 43–50.
- [29] U.K. LAEMMLI, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [30] H. Blum, H. Beier, H.J. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis.* 8 (1987) 93–99. <https://doi.org/10.1002/elps.11150080203>.
- [31] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>.
- [32] P. Maria, B. Chagas, J.A. Torres, M.C. Silva, G.E. Nogueira, C. Donizete, A.D. Corrêa, Original Research Article Catalytic stability of turnip peroxidase in free and immobilized form on chitosan beads, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3 (2014) 576–595.
- [33] J.A. Silva, G.P. Macedo, D.S. Rodrigues, R.L.C. Giordano, L.R.B. Gonçalves, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies, *Biochem. Eng. J.* 60 (2012) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011>.

- [34] C. Garcia-Galan, J.C.S. Dos Santos, O. Barbosa, R. Torres, E.B. Pereira, V.C. Corberan, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol, *Process Biochem.* 49 (2014) 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.028>.
- [35] M.F. Queiroz, K.R.T. Melo, D.A. Sabry, G.L. Sasaki, H.A.O. Rocha, Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation?, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 141–158. <https://doi.org/10.3390/md13010141>.
- [36] M. Mozafari, Moztarzadeh, Jalali, N. Alhosseini, Asgari, Dodel, Samadikuchaksaraei, Kargozar, Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine.* (2012) 25. <https://doi.org/10.2147/ijn.s25376>.
- [37] A.A.M. Shimojo, A.M.B. Pires, R. Lichy, M.H.A. Santana, The performance of crosslinking with divinyl sulfone as controlled by the interplay between the chemical modification and conformation of hyaluronic acid, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 506–512. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150003>.
- [38] J.Y. Lai, Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone cross-linked hyaluronic acid, *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.060>.
- [39] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C.M. Niemeyer, H. Waldmann, Chemical strategies for generating protein biochips, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47 (2008) 9618–9647. <https://doi.org/10.1002/anie.200801711>.
- [40] J.F. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Vinyl Sulfone: A Multi-Purpose Function in Proteomics, in: *Integr. Proteomics*, 2012. <https://doi.org/10.5772/29682>.
- [41] J. Morales-Sanfrutos, J. Lopez-Jaramillo, M. Ortega-Muñoz, A. Megia-Fernandez, F. Perez-Balderas, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Vinyl sulfone: A versatile function for simple bioconjugation and immobilization, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2010) 667–675. <https://doi.org/10.1039/b920576d>.
- [42] K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente, Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 107–122.

- <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.10.003>.
- [43] E. Steen Redeker, D.T. Ta, D. Cortens, B. Billen, W. Guedens, P. Adriaensens, Protein engineering for directed immobilization, *Bioconjug. Chem.* 24 (2013) 1761–1777. <https://doi.org/10.1021/bc4002823>.
- [44] F.J. López-Jaramillo, F. Pérez-Banderas, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, Production, crystallization and X-ray characterization of chemically glycosylated hen egg-white lysozyme, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61 (2005) 435–438. <https://doi.org/10.1107/S1744309105008869>.
- [45] T.L. De Albuquerque, S. Peirce, N. Rueda, A. Marzocchella, L.R.B. Gonçalves, M.V.P. Rocha, R. Fernandez-Lafuente, Ion exchange of β -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability, *Process Biochem.* 51 (2016) 875–880. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.014>.
- [46] J.C.S. dos Santos, N. Rueda, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment, *Enzyme Microb. Technol.* 77 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.05.001>.
- [47] C. Mateo, J.M. Palomo, M. Fuentes, L. Betancor, V. Grazu, F. López-Gallego, B.C.C. Pessela, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>.
- [48] J. Boudrant, J.M. Woodley, R. Fernandez-lafuente, Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation, *Process Biochem.* (2019) 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.
- [49] S.R. Hormozi Jangi, M. Akhond, Z. Dehghani, High throughput covalent immobilization process for improvement of shelf-life, operational cycles, relative activity in organic media and enzymatic kinetics of urease and its application for urea removal from water samples, *Process Biochem.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.001>.
- [50] V.M. Costa, M.C.M. De Souza, P.B.A. Fechine, A.C. Macedo, L.R.B. Gonçalves, Nanobiocatalytic systems based on lipase-Fe₃O₄ and conventional systems for

- isoniazid synthesis: A comparative study, *Brazilian J. Chem. Eng.* 33 (2016) 661–673. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160333s20150137>.
- [51] S.Z. Mazlan, S.A. Hanifah, Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres, *Int. J. Polym. Sci.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/5657271>.
- [52] B. CABUK, C. TARI, S.T. Harsa, β -Galactosidase Immobilization on Chitosan-Hydroxyapatite Complex: Effects of Immobilization Conditions, *J. Nutr. Heal. Food Eng.* 1 (2014) 13–23. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2014.01.00004>.
- [53] A. Illanes, R. Fernandez-lafuente, J.M. Guisán, L. Wilson, Enzyme Biocatalysis, in: A. Illanes (Ed.), *Enzym. Biocatal. Princ. Appl.*, Springer, Valparaíso, Chile, 2008: pp. 155–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00111-2>.
- [54] L. Goldstein, [29] Kinetic Behavior of Immobilized Enzyme Systems, *Methods Enzymol.* 44 (1976) 397–443. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(76\)44031-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)44031-4).
- [55] H. Wang, F. Cheng, W. Shen, G. Cheng, J. Zhao, W. Peng, J. Qu, Amino acid-based anti-fouling functionalization of silica nanoparticles using divinyl sulfone, *Acta Biomater.* 40 (2016) 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.035>.
- [56] I. Bisschops, H. Spanjers, Literature review on textile wastewater characterisation, *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 24 (2003) 1399–1411. <https://doi.org/10.1080/09593330309385684>.
- [57] H. Mallin, U. Menyes, T. Vorhaben, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, Immobilization of two (R)-Amine Transaminases on an Optimized Chitosan Support for the Enzymatic Synthesis of Optically Pure Amines, *ChemCatChem.* 5 (2013) 588–593. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200420>.
- [58] M. Bilal, M. Asgher, M. Iqbal, H. Hu, X. Zhang, Chitosan beads immobilized manganese peroxidase catalytic potential for detoxification and decolorization of textile effluent, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.075>.
- [59] Y.Q. Almulaiky, R.M. El-Shishtawy, M. Aldahri, S.A. Mohamed, M. Afifi, W.H. Abdulaal, J.A. Mahyoub, Amidrazone modified acrylic fabric activated with cyanuric chloride: A novel and efficient support for horseradish peroxidase immobilization and

- phenol removal, *Int. J. Biol. Macromol.* 140 (2019) 949–958.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.179>.
- [60] I.P. Griffith, Immediate visualization of proteins in dodecyl sulfate-polyacrylamide gels by prestaining with remazol dyes, *Anal. Biochem.* 46 (1972) 402–412.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90313-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90313-2).
- [61] M.N. El-Nahass, M.M. El-keiy, E.M.M. Ali, Immobilization of horseradish peroxidase into cubic mesoporous silicate, SBA-16 with high activity and enhanced stability, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 1304–1309.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.025>.
- [62] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, P.G. Righetti, Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis.* 25 (2004) 1327–1333.
<https://doi.org/10.1002/elps.200305844>.

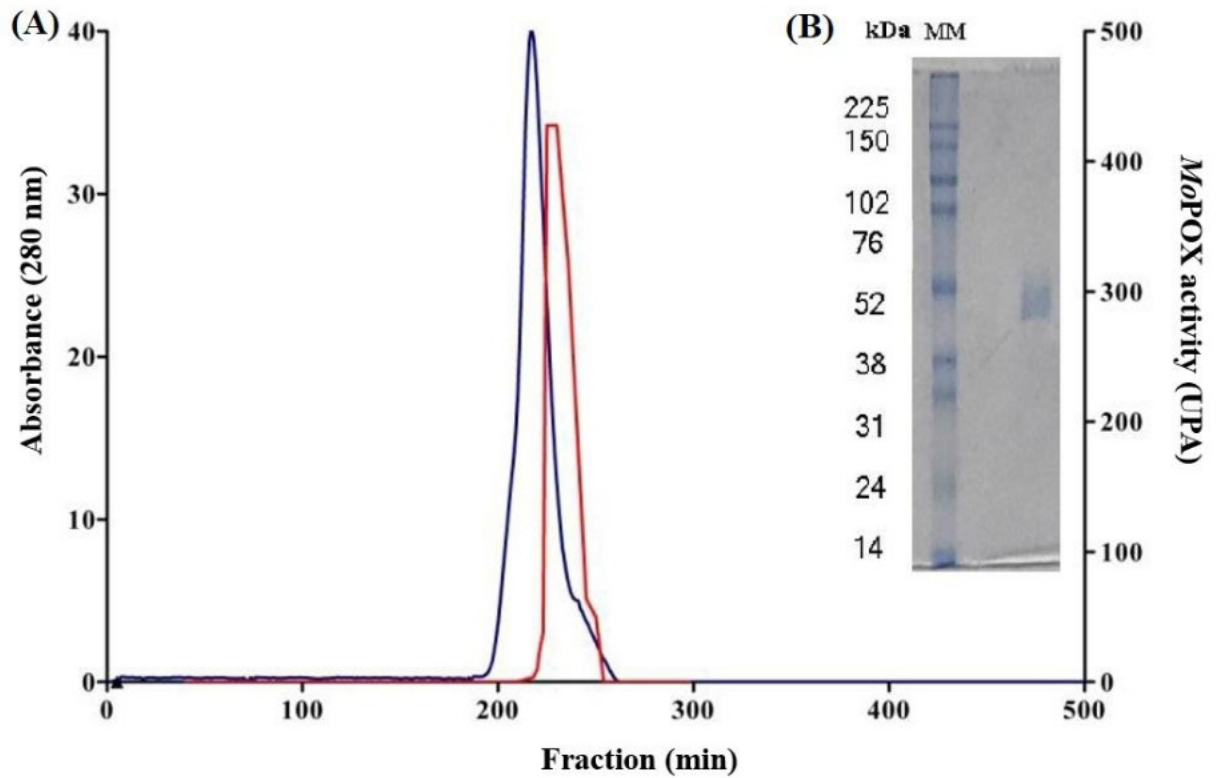


Fig. S1. Purification of *MoPOX* [15]. Chromatogram profile of *MoPOX* obtained after molecular exclusion chromatography in Hiload® 16/600 Superdex® 75 pg (60 x 1,6 cm) coupled to Äktaprime Plus System (A) and SDS-PAGE gel (10% polyacrylamide) of purified *MoPOX*. Gel was stained according to [62].

Peptide sequence	Mass (Da)		Peroxidase with identity (specie)	ID RedoxiBase	Identity (%)
	Experimental	Calculated			
GGTKEEFFEEK	1299.61	1299.59	AtMDAR03 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	13878	85
			ThasMDAR03 (<i>Tarenaya hassleriana</i>)	15763	85
			TaPrx100 (<i>Triticum aestivum</i>)	443	70
LKDDWTDTER	1277.62	1277.58	MpPrx117 (<i>Marchantia polymorpha</i>)	14649	75
EVIAINQDPLGVQGR	1607.93	1607.86	HaPrx08 (<i>Helianthus annuus</i>)	1478	63

Table 1. Comparative analysis of *Mo*POX peptide sequence with data from the plant oxidoreductase database RedoxiBase.

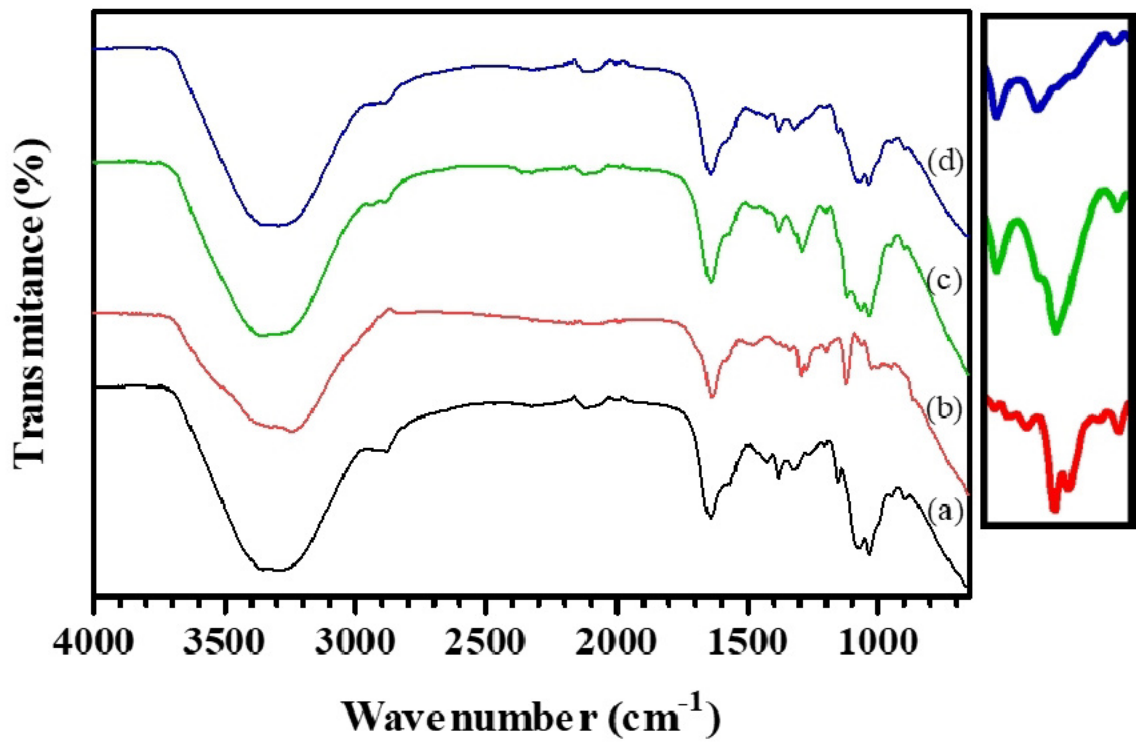


Fig. 1. FTIR spectra of chitosan samples modified with DVS. Non modified chitosan (a), chitosan modified with DVS at pH 10.0 (b), 12.5 (c) and 14.0 (d). The zoomed in section shows peak at 1300 cm⁻¹, related to S=O groups.

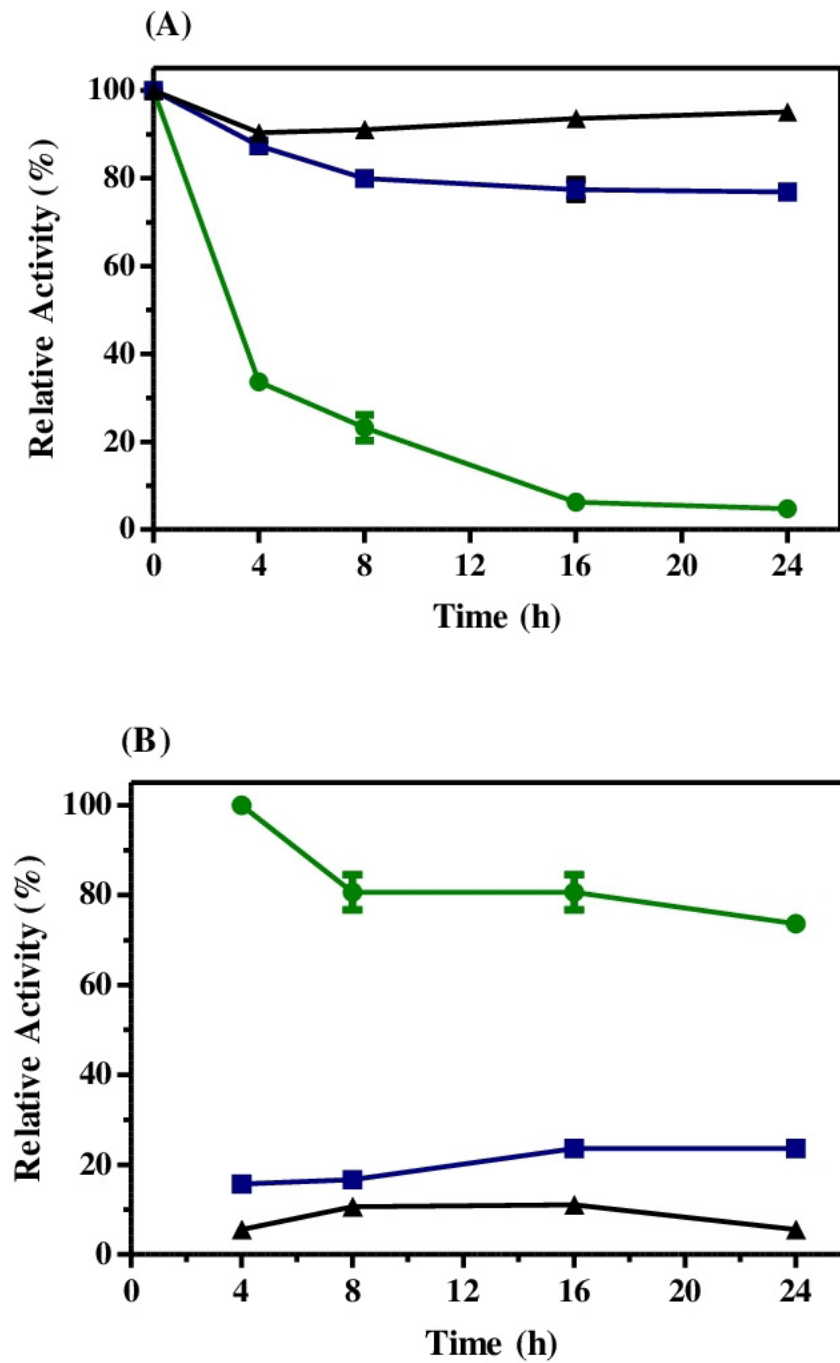


Fig. 2. Effect of different pH conditions on immobilization of *MoPOX* in CTS-DVS. Immobilization course of *MoPOX* represented by relative activity of supernatant (A) and relative activity of immobilized *MoPOX* (B). Enzyme immobilization pH 5.2 (green circles), pH 7.0 (blue squares) and pH 10.0 (black triangles). Reference value of 100% is taken as initial activity of free enzyme in each pH condition (A) and as the highest activity measurement amongst all pH conditions (B).

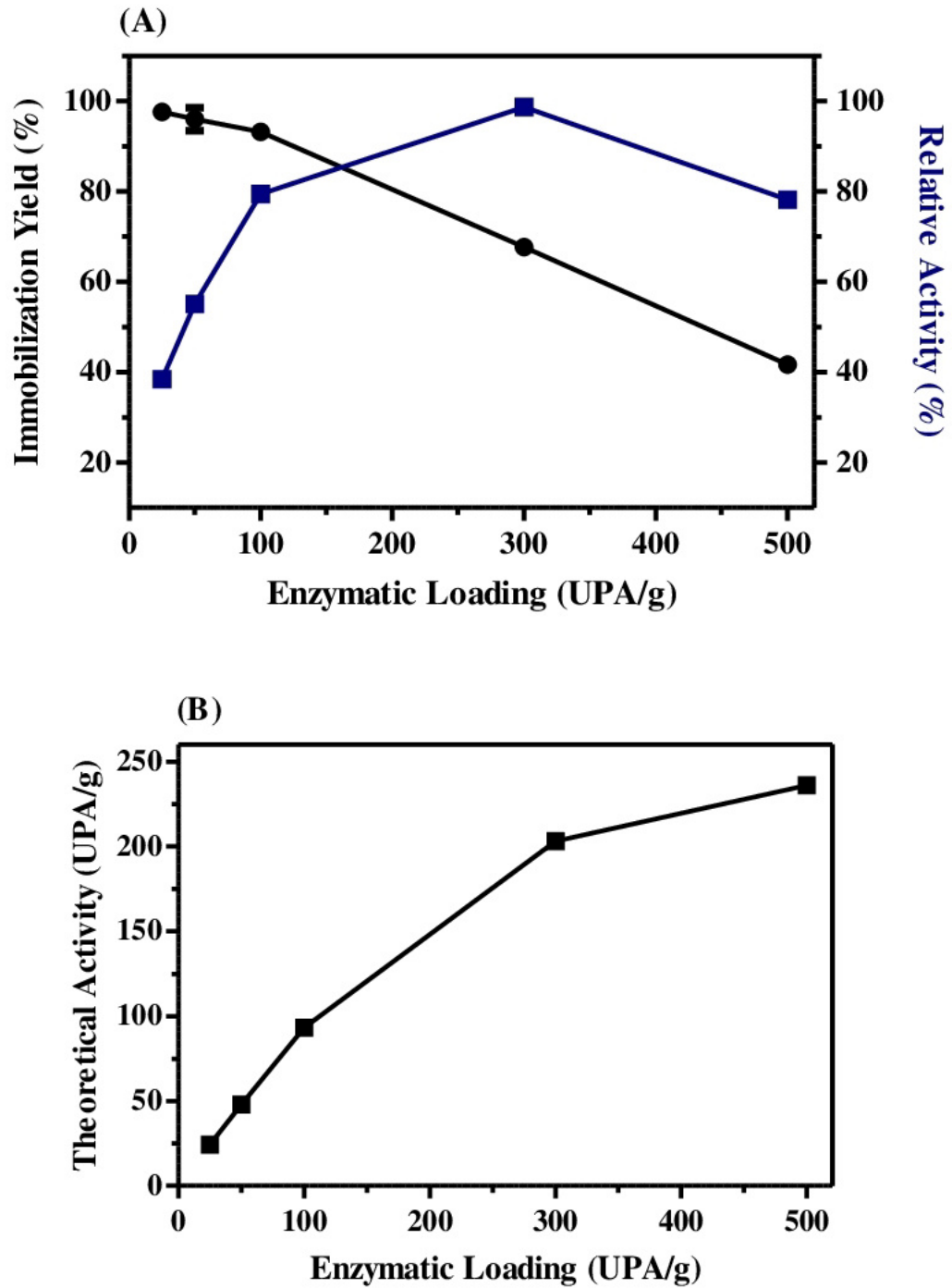


Fig. 3. Influence of enzymatic loading on immobilization yield (black circles) and biocatalyst relative activity (blue squares) (A) and on theoretical activity of immobilized *MoPOX* (B).

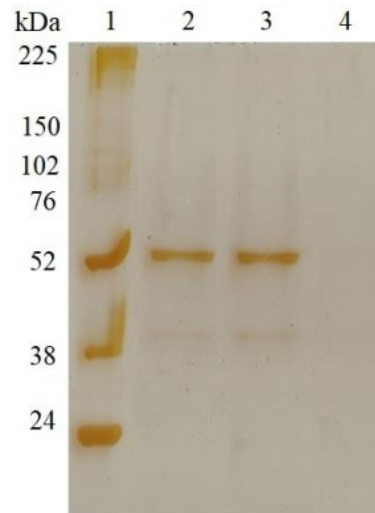


Fig. 4. SDS-PAGE gel profile of free and immobilized enzyme samples. Lane 1: Molecular weight markers, Lane 2: soluble enzyme fraction, Lane 3: supernatant of immobilization and Lane 4: immobilized enzyme.

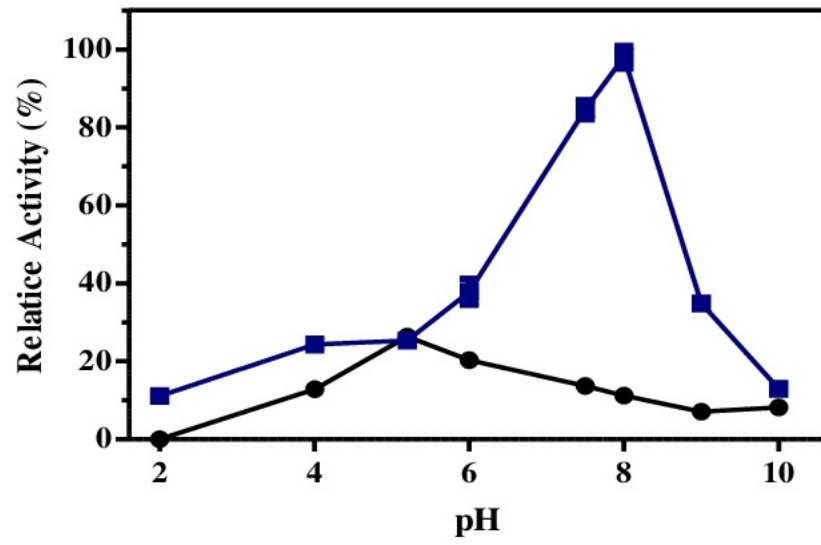


Fig. 5. Effect of pH on free (black circles) and immobilized *MoPOX* activity (blue squares). Reference value of 100 % taken as the highest activity value from both samples.

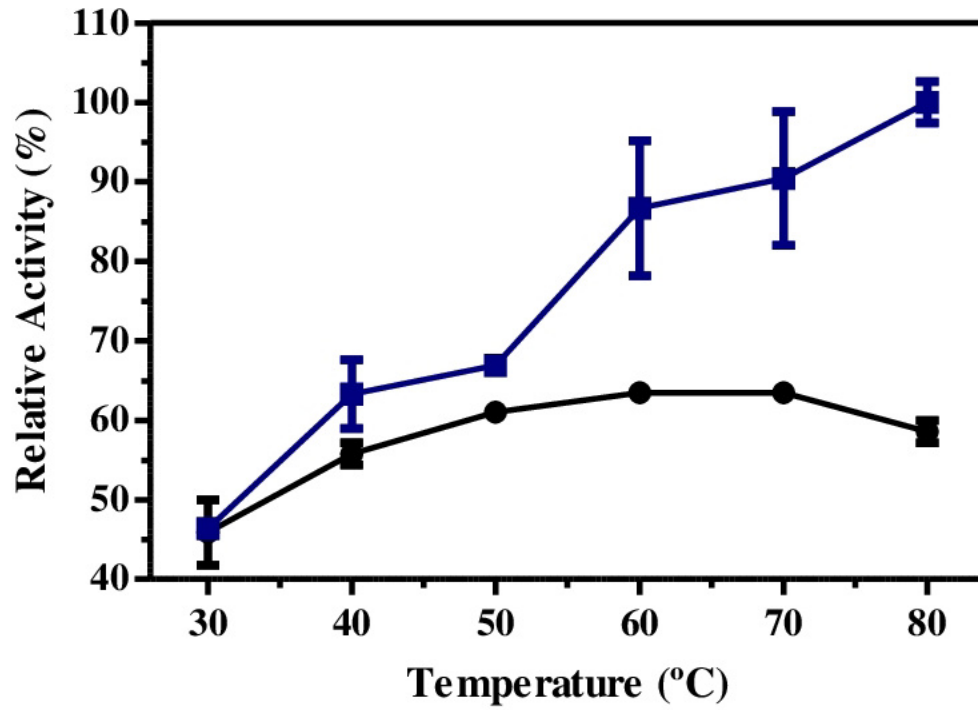


Fig. 6. Effect of temperature on free (black circles) and immobilized *MoPOX* relative activity (blue squares). Reference value of 100 % taken as the highest activity value from both samples.

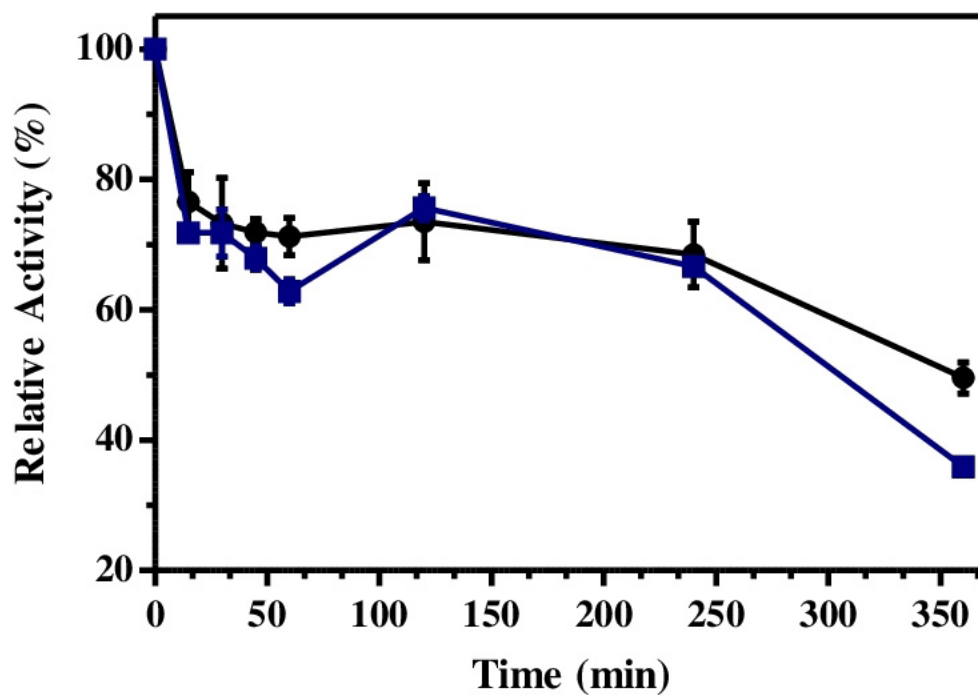


Fig. 7. Thermostability at 60 °C of free (black circles) and immobilized *MoPOX* (blue squares). Reference value of 100 % taken as the highest activity value from each set of samples.

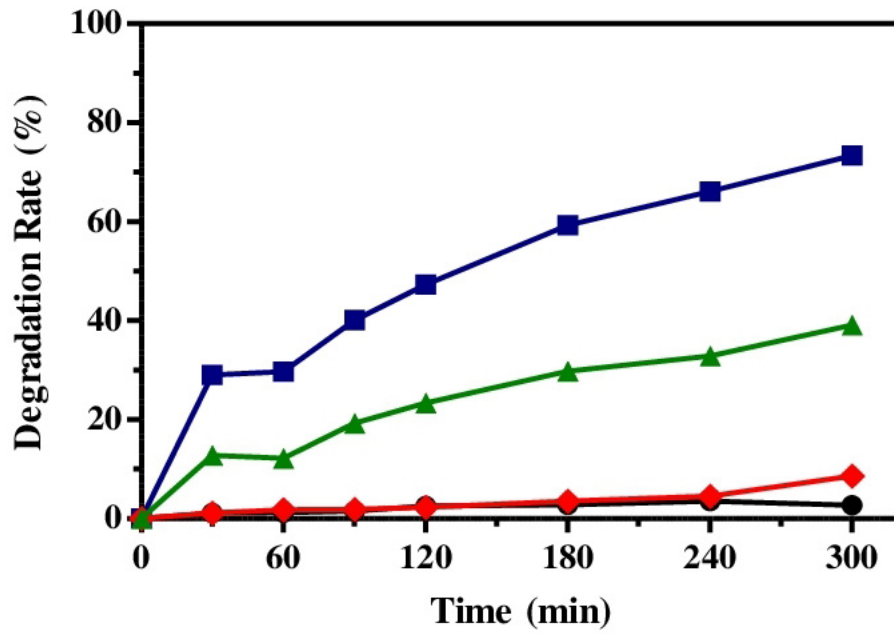


Fig. 8. Degradation rate of Remazol Blue RGB. Control (black circles), free *MoPOX* (red lozenges), CTS-DVS-*MoPOX* (green triangles) and CTS-DVS-EDA (blue squares).

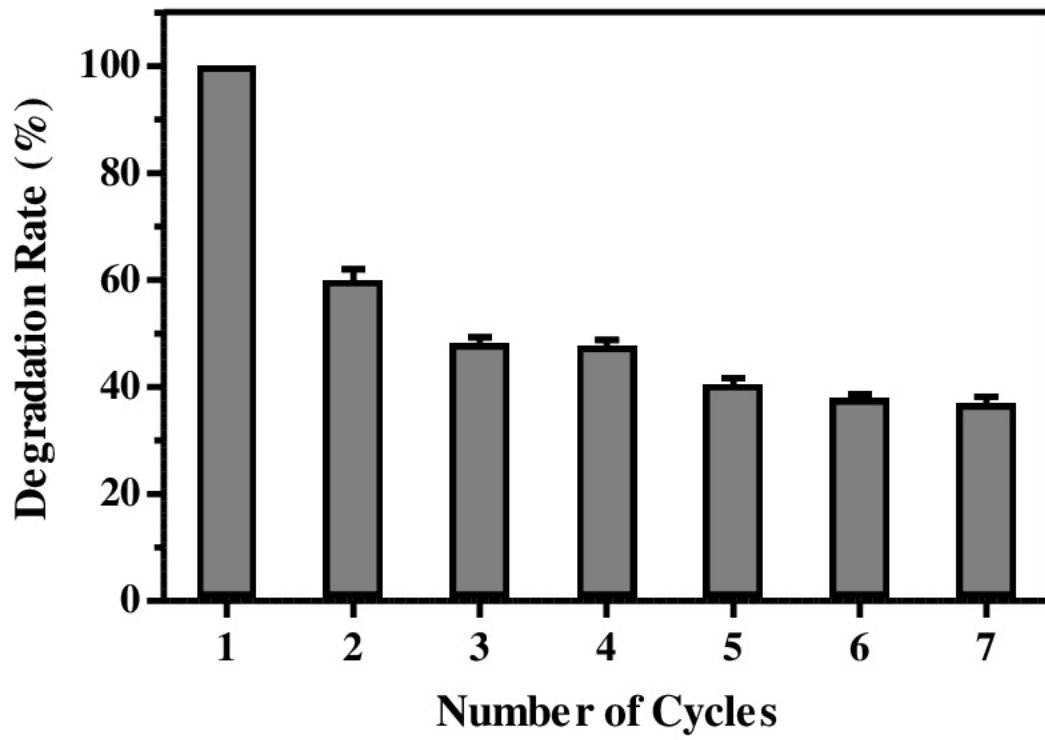


Fig. 9. Reusability of immobilized *Mo*POX expressed as percentage of degradation rate of Remazol® Blue RGB in pH 8.0 after 3 h reaction.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, a imobilização de uma peroxidase purificada de raízes de *Moringa oleifera* foi avaliada com o intuito de gerar um biocatalisador que seja viável para aplicação no tratamento de efluentes têxteis. Para isso, utilizou-se como suporte de imobilização esferas de quitosana modificadas com divinil sulfona de modo a permitir que as intensas interações covalentes multipontuais entre enzima e suporte gerasse um biocatalisador estável nas condições desfavoráveis do efluente têxtil. A interação covalente desejada foi confirmada por ensaio de eletroforese, e a estabilização esperada por meio do agente de ligação cruzada foi comprovada pela resistência da enzima imobilizada diante de condições extremas de pH e temperatura. *MoPOX* imobilizada apresentou melhor desempenho catalítico do que a enzima livre em todos os ensaios avaliados, com exceção ao ensaio de termoestabilidade a 60 °C.. *MoPOX* imobilizada apresentou atividade ótima em pH 8,0, demonstrando que o biocatalisador proposto é uma alternativa propícia à descoloração do corante têxtil sem a necessidade de ajustar o pH do efluente têxtil após o processo de tingimento. Dessa forma, após 5 h de reação em pH 8,0, a enzima imobilizada descoloriu cerca de 40% do corante Remazol® Azul RGB, enquanto *MoPOX* livre apresentou taxa de descoloração de apenas 8,5%. Além disso, o reuso de *MoPOX* imobilizada corroborou com seu possível uso no tratamento de águas residuais têxteis, uma vez que o biocatalisador pode ser utilizado por sete ciclos, apresentando uma taxa de degradação de 36% do corante.

REFERÊNCIAS

- ABDULAZEEZ, A. M.; AJIBOYE, O. S.; WUDIL, A. M.; ABUBAKAR, H *et al.* Partial Purification and Characterization of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Alkaloids and Flavonoids from the Leaves and Seeds of *Moringa oleifera*. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2016.
- ALMEIDA, M. G. G.; LOPES, L.A.; DIAS, L.P.; COSTA, H.P.S.; NAGANO, C.S.; CARNEIRO, R.F.; VASCONCELOS, M.I.; SOUZA, D.B.O. Purification and enzymatic properties of a textile dye-decolourizing peroxidase from *Moringa oleifera* roots. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 17526–17548, 2020.
- ARSLAN, S. S.; EYVAZ, M. GÜRBULAK, E.; YÜKSEL, E. A Review of State-of-the-Art Technologies in Dye-Containing Wastewater Treatment – The Textile Industry Case. **Textile Wastewater Treatment**, p. 1–28, 2016.
- BANSAL, N.; KANWAR, S. S. Peroxidase(s) in environment protection. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- BARBOSA, O. TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R.C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE- R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013.
- BENKHAYA, S.; HARFI, S. EL; HARFI, A. EL. Classifications , properties and applications of textile dyes : A review. n. January 2017, 2017.
- BEZERRA, C. S.; LEMOS, C.M.G.F.; DE SOUSA, M.; GONÇALVES, L.R.B. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. n/a-n/a, 10 jul. 2015.
- BHATIA, D.; SHARMA, N.S.; SINGH, J.; KANWAR, R.S. Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 19, p. 1836–1876, 2017.
- BILAL, M.; ASGHER, M.; IQBAL, M.; HU, H.; ZHANG, X. Chitosan beads immobilized manganese peroxidase catalytic potential for detoxification and decolorization of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 181–189, 2016.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H.M.N.; CUI, J. “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 278–290, 2018.
- BILAL, M.; RASHEE, T.; NABEEL, F.; IQBAL, H.M.N.; ZHAO, Y. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review. **Journal of Environmental Management**, v. 234, n. October 2018, p. 253–264, 2019.
- BÓDALO, A.; GÓMEZ, J.L.; GÓMEZ, E.; BATISDA, J.; MÁXIMO, M.F. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. **Chemosphere**, v. 63, n.

4, p. 626–632, 2006.

BRÜSCHWEILER, B. J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 214–226, ago. 2017.

CHEMNET. **Zhejiang NetSun Co., Ltd.** [s.l.: s.n.]. 2020. Disponível em: http://www.chemindex.com/index/?f=show_cas_info&terms=+93951-21-4. Acesso em: 3 de Abril de 2020.

CNI. **O setor têxtil e de confecção e os desafios da sustentabilidade**Confederação Nacional da Indústria, Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://bucket-gw-cni-static-cms-si.s3.amazonaws.com/media/filer_public/bb/6f/bb6fdd8d-8201-41ca-981d-deef4f58461f/abit.pdf.

DA SILVA NETO, J. X.; COSTA, H.P.S.; VASCONCELOS, I.M.; PEREIRE, M.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; LOPES, T.D.P.; DIAS, L.P.; ARAÚJO, N.M.S.; MOURA, L.F.W.G.; VAN TILBURG, M.F.; GUEDES, M.I.F.; LOPES, L.A.; MORAIS, E.G.; SOUZA, D.B.O. Role of membrane sterol and redox system in the anti-candida activity reported for Mo-CBP2, a protein from Moringa oleifera seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 814–824, 2020.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE MONTELLANO, P. R. O. Catalytic Mechanisms of Heme Peroxidases. In: **Biocatalysis Based on Heme Peroxidases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 79–107.

DE SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; DE SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 1073–1078, 2007.

DESORE, A.; NARULA, S. A. An overview on corporate response towards sustainability issues in textile industry. **Environment, Development and Sustainability**, v. 20, n. 4, p. 1439–1459, 20 ago. 2018.

DOS SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; BARBOSA, O.; FERNÁNDEZ-SHÁNCHEZ, J.F.; MEDINA-CASTILLO, A.L.; RÁMON-MÁRQUEZ, T.; ARIAS-MATOS, M.C.; MILLÁN-LINARES, M.C.; PEDROCHE, J. YUST, M.D.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015a.

DOS SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, 2015b.

DOS SANTOS, J. C. S.; RUEDA, N.; TORRES, R.; BARBOSA, O.; GONÇALVES, L.R.B.;

- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015c.
- DRUMOND CHEQUER, F. M.; OLIVEIRA, G.A.R.; FÉRRAZ, E.R.A.; CARDOSO, J.C.; ZANONI, M.V.B.; OLIVEIRA, D.M.. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. **Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing**, 2013.
- FARIAS, S.; OLIVEIRA, D.; DE SOUZA, A.A.U.; DE SOUZA, S.M.A.G.U.; MORGADO, M.. Removal of Reactive Blue 21 and Reactive Red 195 dyes using horseradish peroxidase as catalyst. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 701–707, 2017.
- FREEMAN, H. Aromatic amines: use in azo dye chemistry. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, n. 1, p. 145, 2013.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 251–262, 2001.
- GHALY, A.; ANANTHASHANKAR, R.; ALHATTAB, M.; RAMAKRISNAN, V.V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 05, n. 01, p. 1–18, 2014.
- GHOLAMI-BORUJENI, F.; FARAMARZI, M. A.; NEJATZADEH, F. Oxidative Degradation and Detoxification of. n. January, 2013.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Textile Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Wool, Chemical, Silk, Cotton), By Product (Natural Fibers, Polyester, Nylon), By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. [s.l.: s.n.]**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/textile-market>. Acesso em: 3 de Abril de 2020.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Revisão: corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.
- GUPTA, S.; JAIN, R.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. Nutritional and medicinal applications of Moringa oleifera Lam.—Review of current status and future possibilities. **Journal of Herbal Medicine**, v. 11, p. 1–11, 2018.
- HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1177–1186, 2009.
- HANNAN, M. A.; KANGA, J.Y.; MOHIBULLAHA; HONGA, Y.K.; LEEB, H.S.; CHOID, J.S.; CHOI, I.S.; MOON, I.S.. Moringa oleifera with promising neuronal survival and neurite outgrowth promoting potentials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 1, p. 142–150, 2014.
- HUANG, R.; LIU, Q.; HUO, J.; YANG, B. Adsorption of methyl orange onto protonated cross-linked chitosan. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 24–32, jan. 2017.
- IMRAN, M.; CROWLEY, D.E.; KHALID, A.; HUSSAIN, S.; MUMTAZ, M.W.; ARSHAD,

- M. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 73–92, 2015.
- JUN, L. Y.; YON, L.S.; MUBARAK, N.M.; BING, C.H.; ABDULLAH, E.C.; KHALID, M. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, 2019.
- KATHERESAN, V.; KANSEDO, J.; LAU, S. Y. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 4676–4697, 2018.
- KERR, J.; LANDRY, J. **Pulse of the Fashion Industry** *Global Fashion Agenda & The Boston Consulting Group*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: http://globalfashionagenda.com/wp-content/uploads/2017/05/Pulse-of-the-Fashion-Industry_2017.pdf. Acesso em: 3 de Abril de 2020.
- KHAN, S.; MALIK, A. Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 5, p. 4446–4458, 2018.
- KHARISOV, B. I.; DIAS, H. V. R.; KHARISSOVA, O. V. Mini-review: Ferrite nanoparticles in the catalysis. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.
- KHATRI, J.; NIDHEESH, P.V.; SINGH, T.A.; KUMAR, M.S. Advanced oxidation processes based on zero-valent aluminium for treating textile wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 348, p. 67–73, set. 2018.
- KIMURA, I. Y. Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana. **Tese**, p. 200, 2001.
- LEHMANN, M. TÄRNEBERG, S.; TOCHTERMANN, T.; CHALMER, C.; EDERHANSEN, J.; SEARA, J.F.; BOGER, S.; HASE, C.; VON BERLEPSCH, V.; DEICHMANN, S. **Pulse of the Fashion Industry 2018 Boston Consulting Group Global Fashion Agenda**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.globalfashionagenda.com/pulse-of-the-fashion-industry-2018-report-released/>. Acesso em: 3 de Abeil de 2020.
- LEHMANN, M.; ARICI, G.; BOGER, S.; MARTINEZ-PARDO, C.; KRUEGER, F.; SCHNEIDER, M.; CARRIÈRE-PRADAL, B.; SCHOU, D. **Pulse of the 2019 Update Global Fashion Agenda & Boston Consulting Group & Sustainable Apparel Coalition**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.globalfashionagenda.com/publications-andpolicy/pulse-of-the-industry/>. Acesso em: 3 de Abril 2020.
- LELLIS, B. *et al.* Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275–290, 2019.
- LEONE, A.; FÁVARO-POLONIO, C.Z.; PAMPHILE, J.A.; POLONIO, J.C. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12791–12835, 2015.

LI, R.; GAO, B.; GUO, K.; YUE, Q.; ZHENG, H.; WANG, Y. Effects of papermaking sludge-based polymer on coagulation behavior in the disperse and reactive dyes wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 240, p. 59–67, set. 2017.

LIU, X. CHEN, X.; LI, Y.; WANG, X.; PENG, X.; ZHU, W. Preparation of Superparamagnetic Fe₃O₄@Alginate/Chitosan Nanospheres for *Candida rugosa* lipase Immobilization and Utilization of Layer-by-Layer Assembly to Enhance the Stability of Immobilized Lipase. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 10, p. 5169–5178, 24 out. 2012.

LOPES, L. A. **Imobilização de uma peroxidase de raízes de *Moringa oleifera* LAM. (MoPOX) em esferas de quitosana e seu potencial na degradação de corantes têxteis.** [s.l.: s.n.].

LOPES, T. D. P.; SOUZA, P.F.N.; COSTA, H.P.S.; PEREIRE, M.L.; NETO, J.X.S.; DE PAULA, P.C.; BRILHANTE, R.S.N.; OLIVEIRA, J.T.A.; VASCONCELOS, I.M.; SOUZA, D.B.O. Mo-CBP4, a purified chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a potent antidermatophytic protein: In vitro mechanisms of action, in vivo effect against infection, and clinical application as a hydrogel for skin infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 432–442, 2020.

LOPEZ-JARAMILLO, J. F.; HERNANDEZ-MATEO, F.; SANTOYO-GONZALEZ, F. Vinyl Sulfone: A Multi-Purpose Function in Proteomics. In: **Integrative Proteomics**. [s.l.: s.n.].

MADHAV, S.; AHAMAD, A.; SINGH, P.; MISHRA, P.K. A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 3, p. 31–41, 2018.

MALINAUSKIENE, L.; BRUZE, M.; RYBERG, K.; ZIMERSON, E.; ISAKSSON, M. Contact allergy from disperse dyes in textiles-a review. **Contact Dermatitis**, v. 68, n. 2, p. 65–75, fev. 2013.

MARCHIS, T.; AVETTA, P.; BIANCO-PREVOT, A.; FABBRI, D.; VISCARDI, G.; LAURENTI, E. Oxidative degradation of Remazol Turquoise Blue G 133 by soybean peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 2, p. 321–327, 2011.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, maio 2007.

MIGNEAULT, I; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M.J.; WALDRON, K.C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, nov. 2004.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p.

205–220, 2015.

MOHAMMED, L.; GOMMA, H.G.; RAGAB, D.; ZHU, J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. **Particuology**, v. 30, p. 1–14, 2017.

MORIKAWA, Y.; SHIOMI, K.; ISHIHARA, Y.; MATSUURA, N. Triple primary cancers involving kidney, urinary bladder, and liver in a dye worker. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 31, n. 1, p. 44–49, jan. 1997.

PANDEY, V. P.; AWASTHI, M.; SINGH, S.; TIWARI, S.; DWIVEDI, U.N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 06, n. 01, p. 1–16, 2017.

PAULA, P. C.; SOUZA, D.B.O. ; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U; ALVES, B.G.T; PEREIRE, M.L.; FARIAS, D.F.; VIANA, M.P.; SANTOS, F.A.; MORAIS, T.C.; VASCONCELOS, I.K. A protein isolate from *Moringa oleifera* leaves has hypoglycemic and antioxidant effects in alloxan-induced diabetic Mice. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

PINHEIRO, B. B.; RIOS, N.S.; AGUADO, E.R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, T.M.; FECHINE, P.B.A.; DOS SANTOS, J.C.S.; GONÇALVES, L.R.B. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 798–809, 2019.

QUEIROZ, M.; DA CONCEIÇÃO, K.C.; MELO, M.N.; SÁNCHEZ, O.C.; ALVAREZ, H.M.; SOARES, C.M.F.; FRICKS, A.T. Imobilização De Peroxidase De Raiz Forte Em Bagaço De Cana-De-Açúcar. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1019–1024, 2018.

RACHMAWATI, I.; RIFA'I, M. In Vitro Immunomodulatory Activity of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaf to the CD4 +, CD8+ and B220+ Cells in *Mus musculus*. **The Journal of Experimental Life Sciences**, v. 4, n. 1, p. 15–20, 2014.

ROVIRA, J.; DOMINGO, J. L. Human health risks due to exposure to inorganic and organic chemicals from textiles: A review. **Environmental Research**, v. 168, p. 62–69, 2019.

SANDHYA, S. Biodegradation of Azo Dyes Under Anaerobic Condition: Role of Azoreductase. In: *[s.l.: s.n.]*. p. 39–57.

SINGH, K.; ARORA, S. Removal of synthetic textile dyes from wastewaters: A critical review on present treatment technologies. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 807–878, 2011.

SULTANA, S. Nutritional and functional properties of *Moringa Oleifera*. **Metabolism Open**, v. 8, p. 100061, 2020.

TORRES-DUARTE, C.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field. In: **Biocatalysis Based on Heme Peroxidases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 179–206.

UDAY, U. S. P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Bioremediation and Detoxification Technology for Treatment of Dye(s) from Textile Effluent. In: *[s.l.: s.n.]*. p.

267–322.

UDDIN, F. Introductory Chapter: Textile Manufacturing Processes. **Textile Manufacturing Processes**, 2019.

VAGHARI, H.; JAFARIZADEH-MALMIRI, H.; MOHAMMADLOU, M.; BERENJIAN, A.; ANARJAN, N.; JAFARI, N.; & NASIRI, S. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 223–233, 2016.

VIKRANT, K.; GIRI, B. S.; RAZA, N.; ROY, K.; KIM, K.-H.; RAI, B. N.; SINGH, R. S. Recent advancements in bioremediation of dye: Current status and challenges. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 355–367, 2018.

YASEEN, D. A.; SCHOLZ, M. **Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2019. v. 16

ZÁMOCKÝ, M.; OBINGER, C. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. In: **Biocatalysis Based on Heme Peroxidases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 7–35.

ZDARTA, J.; MEYER, A.S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 258, p. 1–20, 2018.

ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 8, p. 4503–4513, 7 ago. 2015.

ZION MARKET RESEARCH. **Global Textile Market Is Expected To Reach Around USD 1,207 Billion By 2025**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/news/textile-market>. Acesso em: 3 de Abril 2020.